

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Департамент координации деятельности организаций в сфере
сельскохозяйственных наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Волгоградский государственный аграрный университет»

На правах рукописи

Меликиди Вероника Христофоровна

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ
КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ФОНЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИФОСАТА В
КОРМАХ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**

4.2.4 Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и
производства продукции животноводства

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Георгий Юрьевич Лаптев

г.Волгоград-2023 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Глифосат и его свойства. Применение глифосата.....	13
1.1.1 Уровни содержания глифосата в объектах окружающей среды.....	16
1.1.2 Токсическое действие глифосата для человека и животных.....	18
1.1.3 Уровень содержания глифосата в кормах для птицы.....	23
1.1.4. Методы снижения концентрации токсичных веществ в кормах и других объектах.....	25
1.1.5 Использование пробиотических микроорганизмов в практике птицеводства.....	28
1.1.6 Механизмы действия пробиотиков в желудочно-кишечном тракте птицы.....	31
1.1.7 Синтез метаболитов пробиотическими бактериями и их значение для организма птицы.....	34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1 Исследование содержания глифосата в кормах методом иммуноферментного анализа.....	39
2.2 Исследование способности бактерий выживать в присутствии глифосатсодержащего препарата.....	40
2.3 Исследование биодеструкции глифосата бактериями с помощью метода ИФА.....	41
2.4 Исследование биодеструкции глифосата бактериями с помощью метода ВЭЖХ.....	42
2.5 Метод определения способности бактерий выживать в условиях желудка и кишечника, имитируемых <i>in vitro</i>	44

2.6 Методы определения метаболитного профиля бактерий <i>Bacillus megaterium</i> - 4801 и <i>Enterococcus faecium</i> 1-35	45
2.7 Зоотехнический опыт по скармливанию глифосатсодержащего корма и пробиотика «Пробиоцид-Ультра» цыплятам-бройлерам	49
2.8 Определение состава микрофлоры слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров молекулярно-генетическим методом	53
2.9 Зоотехнический опыт по скармливанию глифосатсодержащего корма и пробиотика «Целлобактерин®+» курам-несушкам.....	54
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1 Анализ содержания глифосата в образцах кормов растительного происхождения и в комбикормах	59
3.2 Определение способности бактерий к выживаемости в присутствии глифосатсодержащего препарата	61
3.3 Определение биодеструкции глифосата в инкубируемых смесях методом ИФА	69
3.4 Определение биодеструкции глифосата в инкубируемых смесях методом ВЭЖХ	70
3.5 Оценка выживаемости бактерий в имитированных условиях желудочно-кишечного тракта <i>in vitro</i>	74
3.6 Исследование метаболитного профиля пробиотических бактерий <i>Bacillus megaterium</i> - 4801 и <i>Enterococcus faecium</i> 1-35	77
3.6.1 Определение витаминов группы В в культуральной жидкости бактерий <i>Bacillus megaterium</i> – 4801.....	78
3.6.2 Определение аминокислот методом УЭЖХ-СФ	79
3.6.3 Определение молекулярной массы пептидов методом Малди	84
3.6.4 Определение метаболитного профиля бактерий методом ГЖХ-МС	85
3.7 Оценка эффективности применения пробиотика «Пробиоцид-Ультра» при кормлении цыплят-бройлеров комбикормом, содержащим глифосат	88
3.8 Микрофлора цыплят-бройлеров	90

3.9 Оценка эффективности применения пробиотика «Целлобактерин®+» при кормлении кур-несушек комбикормом, содержащим глифосат	93
3.10 Производственная апробация	96
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	100
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ПРЕДЛОЖЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВУ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	111
ПРИЛОЖЕНИЯ	135
Приложение А	136
Приложение Б	138

ВВЕДЕНИЕ

Птицеводство в Российской Федерации – является важной отраслью экономики сельскохозяйственного сектора. Продовольственная безопасность России обеспечивается за счет производства мяса птицы как основного доступного источника белка для населения. В России в 2022 году, по данным Росстат, произведено мяса птицы более 5,3 млн. тонн. Самая большая доля потребления (44,3%) по-прежнему приходится на мясо птицы. Величина потребления составила около 35 кг на среднестатистического россиянина в 2022 году (Сухорукова, 2023).

Основными сложностями при производстве птицы специалисты отмечают подверженность птицы инфекционным заболеваниям и высокую стоимость кормов.

Кормление современных кроссов птиц подразумевает использование высококачественных комбикормов в составе детализированных рационов по многим питательным веществам, включая протеин, клетчатку, жир, аминокислоты, витамины, макро- и микроэлементы (Фисинин и др., 2018, 2019; Егоров и др., 2021; Буяров, 2018).

Одним из трендов современного птицеводства является принцип снижения использования антибиотиков в кормах или полный отказ от них. В мировом птицеводстве отказ от антибиотиков даже в лидерах по этому направлению происходил постепенно. В Российской Федерации с марта 2023 года действует Федеральный Закон №463 «О внесении изменений в закон Российской Федерации «О ветеринарии» и Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», основная суть которого заключается в том, что применение антибиотиков в хозяйствах должно строго регулироваться и антибиотики должны использоваться только в случае действительной необходимости (ФЗ №463).

На крупных птицефабриках сосредоточены очень большие поголовья птиц. Они подвержены ряду инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной

этиологии, поэтому содержание их в огромных птичниках без использования каких-либо лечебных препаратов представляется маловероятным. Но, если обратиться к опыту стран, отказавшихся от применения антибиотиков, то оказывается, что это возможно. В стратегию защиты птицы от бактериальных инфекций без использования антибиотиков входит целый комплекс мер, например, меры по улучшению санитарно-гигиенического состояния помещений, кормов, воды (Салеева и др., 2018; Толстых и др., 2016; Нуралиев, 2018). Эффективным способом снижения микробной нагрузки на желудочно-кишечный тракт птицы является применение пробиотиков (Фисинин и др., 2017, Никитченко и др., 2021, Лаптев и др., 2019).

Для каждого предприятия актуальной остается проблема нахождения оптимальной величины конверсии корма. Показатели конверсии напрямую зависят от того, насколько полно усваиваются питательные вещества корма, нейтрализуются антипитательные факторы и каков иммунный статус организма (Лютых, 2020; Гаганов, Зверкова, 2019). Конверсия и другие показатели откорма зависят от здоровья желудочно-кишечного тракта и его способности бороться со стрессовыми факторами кормления (Белая, 2019; Гавилей, 2020).

В кормах практически всегда присутствуют посторонние вещества - загрязнители кормов. К ним относят микотоксины, пестициды, сорную примесь и др. Сочетание этих веществ и неблагоприятной обстановки на производстве приводит к возникновению стресс-факторов, которые влияют на здоровье птицы, ее иммунитет и продуктивность (Борутова, 2020; Крюков и др., 2019, Егоров и др., 2019).

Актуальность исследования. Для обеспечения интенсивного птицеводства кормами необходимо бесперебойное снабжение комбикормовых заводов и собственных кормоцехов предприятий качественным сырьем – растительными кормовыми культурами. Наиболее масштабно в практике изготовления комбикормов в нашей стране используют пшеницу, подсолнечник, кукурузу,

ячмень, сою, рапс и др. культуры (Рядчиков, 2015; Лисунова, 2011; Коломейченко, 2015).

В России и во всем мире широко применяют пестициды для получения стабильного урожая на полях и для снижения потерь урожая, связанных с сорной растительностью, вредителями и заболеваниями растений. Стойкость и величина урожая, а также сохранность и устойчивость к перевозке (Суринский и др., 2013, Догадина и др., 2022, Кудин и др., 2018, Маханькова и др., 2011) являются показателями, которых добиваются, используя большой ассортимент гербицидов, фунгицидов, инсектицидов и др. пестицидов. Остаточные количества пестицидов накапливаются в растительных тканях кормовых культур (Борисова и др. 2022; Петрова и др., 2020, Медведев, 2019; Böhn et al., 2013) и через комбикорма могут попадать в рацион птицы.

Поиск и разработка перспективных кормовых добавок, способствующих нейтрализации остаточных количеств пестицидов в содержимом желудочно-кишечного тракта птицы, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы. Ряд исследователей изучали содержание глифосата в различных биологических объектах (Barnett, Gibson, 2020; Soares et al., 2021; Chiesa et al., 2019; Bai et al., 2016). Отечественные ученые анализировали содержание остаточных количеств пестицидов в кормах для сельскохозяйственных животных, птицы и рыб (Сорокин и др., 2022).

Влияние глифосата на организм птицы изучено в ограниченном количестве исследований, связанных в основном, с определением уровня токсичности глифосата (Ruuskanen et al., 2020; Eason et al., 2002; Boudergue, 2009). Исследований, связанных с изучением влияния глифосата на показатели продуктивности и состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы до настоящего времени не проводилось.

Цели и задачи исследований. Целью исследований является изучение

эффективности действия кормовых добавок при использовании кормов, содержащих остаточные количества глифосата, в кормлении цыплят-бройлеров и кур-несушек.

В соответствии с целью исследований были поставлены следующие задачи:

1. определить в комбикормах и кормах растительного происхождения уровень содержания глифосата;
2. оценить способность пробиотических бактерий к выживанию в питательных средах с внесением глифосатсодержащего препарата;
3. провести опыты по биодеструкции глифосата различными видами бактерий, подобрать наиболее перспективные штаммы бактерий;
4. определить биохимический спектр метаболитов, продуцируемых выбранными штаммами бактерий, в жидкую среду;
5. провести опыты по выживаемости бактерий в условиях *in vitro*, имитирующих условия желудочно-кишечного тракта птиц;
6. изучить влияние пробиотика «Пробиоцид-Ультра» на зоотехнические показатели цыплят-бройлеров в условиях скармливания им кормов, в присутствии остаточного количества глифосата;
7. определить состав микрофлоры слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров с помощью молекулярно-генетического метода исследования;
8. изучить влияние пробиотика «Целлобактерин+» на зоотехнические показатели кур-несушек в условиях скармливания им кормов с остаточным количеством глифосата;
9. оценить экономическую эффективность пробиотика «Целлобактерин+» в кормлении кур-несушек.

Научная новизна исследований. Впервые в широком спектре кормов растительного происхождения было проверено содержание пестицида глифосат. Из ряда пробиотических бактерий выбраны перспективные продуценты, обладающие полезными свойствами: способностью разрушать молекулу глифосата, снижая, таким образом, содержание остаточного уровня глифосата в

организме сельскохозяйственной птицы. Кроме того, обнаружено, что бактерии выделяют в окружающую среду ценные метаболиты, которые благоприятно воздействуют на желудочно-кишечный тракт птицы. Оценена эффективность действия пробиотиков при скармливании кормов, загрязненных глифосатом, бройлерам и курам – несушкам. Изучено влияние глифосата, присутствующего в кормах, на продуктивность птицы.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость заключается в открытии свойств некоторых пробиотических видов бактерий разрушать глифосат, синтезировать в среду полезные для кишечника птицы метаболиты. В результате проведения исследований доказано, что глифосат отрицательно влияет на продуктивные качества цыплят-бройлеров и кур-несушек. При этом предложен способ снижения негативного влияния глифосата на продуктивные качества птицы. Для условий промышленного птицеводства предложены две кормовые добавки на основе пробиотических видов бактерий для улучшения состояния микробиоценоза желудочно-кишечного тракта птицы и поддержания высокого уровня продуктивности в присутствии глифосата в кормах.

Методология и методы исследований. Исследования проводились в период с 2017 по 2023 годы. В основе методологии выполненных исследований лежат научные положения, изложенные в трудах отечественных и зарубежных исследователей по данному вопросу. В ходе исследований применяли различные методы, как общепринятые, так и специальные. Для определения содержания глифосата в кормах использовали метод иммуноферментного анализа. Пробиотические виды бактерий культивировали с применением классических методов микробиологии: культивирование бактерий в жидких питательных средах; микробиологический посев глубинным и поверхностным способом; микроскопирование образцов полученной культуральной жидкости бактерий. Для определения рН использовали потенциометрический метод. Для определения сухого остатка использовали гравиметрический метод. Биохимические свойства

культур пробиотических штаммов определяли с помощью методов современной аналитической химии: высокоэффективная жидкостная хроматография, газо-жидкостная хроматомасс-спектрометрия, определение белка проводили по методу Лоури. В нескольких этапах работы использовали технологические приемы кормления и содержания птицы и зоотехнические методы для оценки эффективности применения кормовой добавки.

Основные положения, выносимые на защиту:

- в комбикормах для птицы и в сырье растительного происхождения обнаружен глифосат в различных концентрациях;

- среди пробиотических бактерий выявлены виды, обладающие способностью к разложению глифосата, синтезу вторичных метаболитов, полезных для кишечника птицы, а также оценена способность этих бактерий выживать в условиях желудочно-кишечного тракта птиц, имитируемых *in vitro*;

- доказана эффективность применения пробиотиков «Целлобактерин+» и «Пробиоцид-Ультра» для сельскохозяйственной птицы при скормливании кормов с содержанием глифосата.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов исследования подтверждается верной, логично построенной методикой диссертации. При выполнении работы использовали общепринятые и современные методы исследования. Настоящая работа подкреплена фактическими данными, представленными в таблицах и на рисунках. Результаты в достаточной степени обоснованы. Сформулированные выводы и практические предложения базируются на результатах научных исследований.

Численные материалы исследований биометрически обработаны на основе методов статистической обработки информации. Данные обрабатывались на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel 2010 и являются достоверными. Статистическая обработка проведена с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверными считали результаты при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

Апробация работы.

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на отечественных и международных научно-практических мероприятиях:

-Международная научно-практическая конференции «Научное обеспечение развития животноводства в Российской Федерации» (Дубровицы, 2019);

-Международная научно-практическая конференция «Инновационные технологии в агропромышленном комплексе в современных экономических условиях» (Волгоград, 2021);

-Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Селекционные и технологические аспекты интенсификации производства продуктов животноводства», посвященная 150-летию со дня рождения академика М.Ф. Иванова (Москва, 2022);

-Agriculture Digitalization and Organic Production. Proceedings of the First International Conference, ADOP 2021, Springer, 2022;

-Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Охрана окружающей среды. Роль и влияние лекарственных средств и их метаболитов в обеспечении экологической безопасности пищевых продуктов» (Санкт-Петербург, 2023).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 8 работ в изданиях, включенных в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, в том числе 1 статья в журнале, индексируемом в МБД (Scopus), отражены в 1 патенте, вошли в состав 1 учебного пособия.

Личное участие автора. Диссертационная работа представляет собой результат научных исследований автора в период с 2017 по 2023 год. Большая часть научных исследований, описанных в диссертационной работе, выполнена аспирантом самостоятельно под руководством научного руководителя, доктора биологических наук Георгия Юрьевича Лаптева.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, основной части (обзор литературы, материалы и методы исследований,

результаты исследований), заключения, списка литературы, приложений. Работа представлена на 139 страницах компьютерного текста с включением 25 таблиц, 19 рисунков и 2 приложений. Список литературы включает 179 источников, из них 76 – иностранных авторов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Глифосат и его свойства. Применение глифосата

В последнее десятилетие в Российской Федерации увеличиваются объемы использования средств защиты растений – инсектицидов, фунгицидов, протравителей и гербицидов (Захаренко, 2020). Гербицид глифосат широко используется во всем мире и в России как неселективный гербицид системного действия.

Впервые молекулу глифосата открыл швейцарский химик доктор Генри Мартин в 1950 году, но молекула не нашла применения для целей фармацевтики (рис.1). Спустя 20 лет в 1970 году ученый компании Monsanto доктор Джон Франц определил у этой молекулы сильные гербицидные свойства. На основе этого вещества был разработан препарат гербицид под торговым названием RoundUp (Benbrook, 2016).

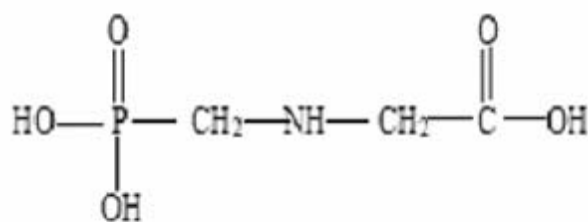


Рисунок 1 – Молекулярная формула глифосата

Молекула глифосата является N-фосфометильным производным аминокислоты глицина. Она обладает свойствами слабой органической кислоты (Franz et al, 1997). Молекулярная масса глифосата – 169,1 г/моль. Вещество обладает высокой растворимостью в воде (10500 мг/л) (Lewis et al, 2016). В препаратах часто используют соли глифосата – аммонийную или изопропиламинную, для увеличения растворимости. В коммерческих препаратах

помимо глифосата, также есть вспомогательные вещества. Их, как правило, не указывают в составе на этикетках, и они остаются неизвестными для пользователей пестицидов. В качестве вспомогательных веществ используют поверхностно-активные вещества, наполнители, смачиватели, прилипатели и т.д., которые повышают эффективность действия гербицида в десятки раз (Куликова, Лебедева, 2010).

Глифосат действует как ингибитор важнейшего фермента в клетках растений – 5-енолпирувил - шикимат -3 -фосфат – синтазы. При ингибировании этого фермента глифосатом останавливается синтез важнейших соединений – ароматических аминокислот: тирозина, триптофана, фенилаланина. Отсутствие синтеза ароматических аминокислот в свою очередь делает невозможным синтез белка, а также других необходимых соединений в тканях растений, например, промоторов и ингибиторов роста, фенолов, лигнина (Кузнецова, Чмиль, 2010; Marques, 2007). Считается, что глифосат является безопасным для млекопитающих, птиц и рыб, т.к. у них нет шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот и фермента 5-енолпирувил - шикимат -3 -фосфат – синтазы. Бактерии по-разному реагируют на присутствие глифосата, одни – являются чувствительными к глифосату, другие – оказываются устойчивыми к нему (Shehata et al., 2012; Bonnet et al., 2007; Clair et al., 2012).

При опрыскивании глифосат попадает во флоэму через листья и способен передвигаться по растению, передвигаясь из наземной части в корни. Глифосат является гербицидом сплошного действия (Dill et al, 2010).

Исследователи считают, что деградация глифосата происходит в основном за счет микробного разрушения (Dick, Quinn, 1995; Gimsing et al., 2004; Hove-Jensen et al., 2014; Sviridov et al., 2011; Wardle, Parkinson, 1990; Zabaloy et al., 2011). В меньшей степени на деградацию глифосата и его метаболитов влияют физические факторы, такие как, свет, температура, влажность и др. При этом во влажном и теплом климате разрушение глифосата происходит быстрее, чем в сухом и холодном (Bento et al., 2016; Stenrod et al., 2006).

По данным (Duke, Powles, 2008, 2018; Benbrook, 2016) глифосат широко применяется в США и по всему миру. С момента выпуска готовой формы пестицида RoundUp в 1974 году в США было применено более 1,6 миллиарда килограммов активного ингредиента глифосата, а во всем мире около 8,6 миллиарда килограммов. Дальнейшее увеличение объемов применения глифосата связано с появлением на рынке генетически модифицированных организмов, в первую очередь сои (Pollegioni et al., 2011; Yi et al., 2016). Начиная с 1996 года, потребление глифосата во всем мире возросло почти в 15 раз, так как глифосат стали применять не только в межсезонье для очистки поля от сорняков, но и по всходам посадок ГМ-сои, а затем и других ГМ-культур. При этом кратность обработки тоже увеличилась (Медведев, 2021; Vøhn, 2013). При выращивании ГМ-сои и обработке полей глифосатом от конкурирующих с соей сорняков, значительно повышается урожайность культуры (Сорокин, 2022).

Через несколько лет после начала выращивания ГМ-сои появились сорняки, устойчивые к глифосату (Cerqueira, Duke, 2006; Duke, 2014). По данным (Ding et al., 2011; Duke et al., 2018) сорные растения эволюционируют и вырабатывают механизмы устойчивости к глифосату. Ассортимент устойчивых видов растет с каждым годом, распространяясь не только на территории Америки, Канады, но и Бразилии, Аргентины и др. стран. Этот фактор, в свою очередь, вызывает необходимость обрабатывать глифосатом сельскохозяйственные поля еще чаще и напрямую влияет на накопление остатков глифосата в растительных культурах (Медведев, 2021).

Глифосат применяют против однолетних и многолетних злаковых и двудольных сорняков. Опрыскивание проводят по вегетирующим сорнякам при условии защиты культуры, если речь не идет о ГМО-культурах. Широко применяют глифосат на полях, предназначенных под посев различных культур. Глифосат также применяют на чайных плантациях, виноградниках, посадках цитрусовых, в посадках плодовых и ягодных культур. Кроме того, глифосат применяют в садово-парковом, а также в городском хозяйстве, в лесах и при

обработке растительности вдоль объектов городской инфраструктуры (Куликова, Лебедева, 2010).

1.1.1 Уровни содержания глифосата в объектах окружающей среды

Из сообщений Россельхознадзора РФ следует, что участились случаи обнаружения глифосата в сырье и в продукции растительного происхождения, как ввозимой, так и вывозимой с территории РФ в 2020-2021гг. При проверке партий гречихи, предназначенной для отгрузки на экспорт, было обнаружено, превышение содержания глифосата в 7 раз в трех партиях продукта. Превышение концентрации глифосата до 57 раз определили в партиях гречневой крупы, отгруженной в Республику Молдову, из Курской, Липецкой, Брянской и Воронежской областей. Дополнительно сообщалось, что обнаружили превышение содержания глифосата в соевых бобах, ввозимых из Бразилии, в 14 раз по сравнению с МДУ (Россельхознадзор. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. URL: <https://fsvps.gov.ru/news/rosselhornadzor-usilivaet-kontrol-za-soderzhanie-glifosata-v-jeksportiruemom-i-importiruemom-zerne> (дата обращения: 01.02.2023)).

Глифосат часто обнаруживают в продуктах питания и в моче человека при исследованиях в разных странах мира. Так, в одном из исследований в Германии, проведенном на 300 добровольцах, в 8,3% случаев S. T. Soukup, B. Merz выявили содержание глифосата в моче в количестве больше 0,2 мкг/л, причем была установлена прямая связь между потреблением таких продуктов как грибы и соевые бобы и выявлением глифосата в моче людей (Soukup, Merz, 2020).

Другие исследователи из Германии J.Sunder и A.Gruning сообщают, что при определении глифосата в 40 пробах пива разных сортов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии был обнаружен глифосата в 60%

образцов. Наименьший уровень глифосата составил 2,50 мкг/л в безалкогольном пиве, наибольший уровень глифосата составил 33,06 мкг/л в образце пива сорта «Пилснер» (Sander, Gruning, 2017).

Исследователи (Soares, Silva, 2021) провели обширный анализ продуктов питания в ряде Европейских стран и США. Они выяснили, что остаточные количества глифосата обнаруживаются в 23% проверенных образцов мяса и рыбы. Диапазон содержания глифосата составил от 1,0 до 4,9 мкг/кг, что оказалось ниже предельно допустимого уровня. Однако, при исследовании зерновых продуктов в Швейцарии было обнаружено, что в 90% образцов пшеницы, 80% хлопьев для завтрака и 70% образцов хлеба имеются остатки глифосата. При этом содержание глифосата определяли в диапазоне от 1 до 421 мкг/кг. Некоторые образцы содержат остатки глифосата в 4 - 29 раз выше, чем предельно допустимые уровни, принятые в Европейском Союзе. Образец пшеницы из Италии содержал 243000 мкг/кг глифосата, что превышает допустимые разрешенные уровни в 25 раз.

Кроме этого, глифосат был обнаружен в овощах и бобовых культурах. Так, в 50% бобовых из Швейцарии было обнаружено от 1 до 2948 мкг/кг глифосата. При этом среднее значение составило 173 мкг/кг глифосата. В 18% образцов овощей из Италии обнаружено от 3 до 300 мкг/кг глифосата.

В этом же исследовании был проведен анализ образцов меда, в результате которого выяснили, что практически все образцы меда из Канады и Швейцарии содержат глифосат на уровнях от 1 до 49,8 мкг/кг, что входит в допустимый максимальный уровень. В 12% образцов меда из Эстонии содержится от 3 до 62 мкг/кг глифосата, при этом несколько образцов превышают максимально допустимый уровень. В образцах меда из США остатки глифосата обнаружили в 32% образцов и диапазон содержания находился в районе концентраций от 15 до 342 мкг/кг. Больше половины образцов содержали глифосат в концентрации значительно выше, чем нормируемые в США уровни.

1.1.2 Токсическое действие глифосата для человека и животных

Считается, что гербицид глифосат является малотоксичным для пчел, других полезных насекомых и для теплокровных (ЛД₅₀ для крыс 4900 мг/кг, кроликов – 3800 мг/кг, мышей 2060 мг/кг). Препараты на основе глифосата относятся к 3 классу опасности для человека и 3 классу опасности для пчел. ПДК глифосата в почве составляет 0,5 мг/кг, ПДК в воде водоемов 0,02 мг/дм³, ПДК в атмосферном воздухе 0,1 мг/м³ (Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 2 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21).

Вопросы о токсичности глифосата для человека и животных являются остро дискуссионными в обществе. На сегодняшний день остаются неизученными многие аспекты влияния долгосрочного воздействия глифосата на человека и животных. В разное время проводили исследования о токсическом воздействии этого пестицида и зачастую получали противоречивые данные. Мировое сообщество по-разному относится к рискам воздействия глифосата на человека и интенсивности его применения в сельском хозяйстве.

С одной стороны США, как основной производитель и поставщик ГМО-культур, в частности ГМ-сои поддерживает на законодательном уровне высокие нормы внесения глифосата, и высокие нормы допустимого потребления с пищей – 1,75 мг/кг веса тела в сутки. В Европе этот показатель равняется – 0,3 мг/кг веса тела в сутки, в то время как в России этот показатель равен 0,5 мг/кг веса тела в сутки (СанПиН 1.2.3685-21). В США также установлены нормы содержания глифосата в кормах для сельскохозяйственных животных (Memorandum, 2002).

С другой стороны, периодически появляются обстоятельства, которые заставляют задуматься и переоценить данные о безопасности глифосата. Таким образом, было зарегистрировано несколько случаев заболевания раком (неходжкинская лимфома) у людей, которые по долгу службы использовали

глифосат в своей работе. Эти случаи вошли в историю и стали основаниями для судов с корпорацией Monsanto (основным на тот момент производителем пестицидов на основе глифосата). Судебные разбирательства окончились выплатой огромных денежных компенсаций заявителям этих исков (Хвостик, 2020).

В 2015 году Международное Агентство по изучению рака ВОЗ классифицировало глифосат как, вероятно, канцерогенный для человека (группа 2А)». Эксперты Агентства разъяснили, что имеются ограниченные доказательства канцерогенности неходжкинской лимфомы у людей. Также были приведены результаты испытаний, где было показано, что глифосат вызывал повреждение ДНК и хромосом в клетках человека. Кроме этого, был сделан вывод о появлении достаточных доказательств канцерогенности у экспериментальных животных. Дополнительно в одном исследовании было установлено увеличение в крови людей маркеров хромосомного повреждения (микроядер) после распыления препарата с глифосатом вблизи населенного пункта (IARC, Monographs, Volume 112, 2015).

В одном из последних обзоров (Gillezeau et al, 2019) приведены данные о подверженности работников, занятых в сельском хозяйстве, влиянию глифосата. Так, в Ирландии у садоводов были взяты образцы мочи до и после распыления глифосата. В результате обнаружили, что содержание глифосата в моче в среднем составляло 1,2 мкг/мл до распыления и 1,53 мкг/мл после распыления пестицида. В другом исследовании образцы мочи были проанализированы у 40 женщин (во время лактации), глифосат обнаружен в 37 образцах из 40, в среднем концентрация составила 0,28 мкг/л. При этом не было выявлено статистически значимых различий у жительниц городских и сельских территорий. В США исследовали образцы мочи, взятые у 71 беременной женщины в возрасте от 18 до 39 лет, при этом среднее значение содержания глифосата в образцах составляло 3,4 мкг/л.

В некоторых странах мира в настоящее время пересматривают вопрос о дальнейшем использовании глифосата, в результате чего вводят ограничения на его использование, либо полностью запрещают использование глифосата внутри

страны. С апреля 2019 года глифосат полностью запрещен во Вьетнаме. В Мексике правительство приняло меры к постепенному сокращению и окончательному выводу из употребления глифосата к концу 2024 года. Австрийский парламент проголосовал за запрет глифосата в Австрии в июле 2019 года.

Руководство немецких и швейцарских железных дорог распорядилось постепенно снижать использование глифосата для обработки железнодорожного полотна от сорной растительности и полностью запретить его к 2025 году. В настоящий момент идет большая работа по формированию досье о токсичности глифосата, а решение по его использованию в Европейском союзе должно быть принято до декабря 2023 года (EFSA Journal. URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/glyphosate-efsa-and-echa-update-timelines-assessments> (дата обращения: 01.04.2023)).

Ученые в России обращают внимание на динамику увеличения содержания глифосата в продуктах растительного происхождения, а также в продукции, получаемой от сельскохозяйственных животных и птицы. Медведев О.С. говорит о том, что в связи с интенсивным выращиванием ГМО-культур, устойчивых к действию глифосата, а также, в связи с появлением сорняков, устойчивых к глифосату, в несколько раз увеличились нормы внесения этого пестицида под посевы культур в Америке, Бразилии, Аргентине. За последние годы они возросли с 1,72 кг/га до 3,0- 4,0 кг/га. Эти страны являются основными поставщиками ГМО-сои, ввозимой на территорию РФ. Следовательно, можно сделать вывод о том, что в продуктах питания реальные остаточные количества глифосата также будут иметь тенденцию к увеличению (Медведев, 2021).

Об изменяющемся фоновом содержании глифосата в продуктах питания можно судить по увеличению допустимых норм его содержания. Например, в 2009 году в зерне хлебных злаков допускалось содержание глифосата не более 0,3 мг/кг, а уже в 2021 году принят норматив – не более 20 мг/кг. Таким образом, произошло увеличение допустимого содержания глифосата в 66 раз. Для такого продукта, как семена подсолнечника, увеличение допустимого содержания глифосата произошло

в 23 раза. Для зерна сои норматив с 0,15 мг/кг увеличился до 20 мг/кг, т.е. в 133 раза (Методические указания 4.1.1978-05; СанПиН 1.2.3685-21).

О важности глубокого изучения влияния глифосата на микробиом кишечника человека говорят ученые (Barnett, Gibbson, 2020). В обзоре, посвященном хроническому влиянию малых доз глифосата на популяцию современного человека, они поднимают проблему взаимосвязи увеличивающегося количества заболеваний целиакией и различными расстройствами кишечника и «хроническим» присутствием глифосата в пище людей, который поступает, главным образом, из продуктов переработки пшеницы.

Исследования, проведенные в отношении влияния глифосата на людей, страдают рядом недостатков, что не позволяет сообществу ученых ясно оценить ситуацию. Одним из недостатков является то, что во всех исследованиях рассматривают различные дозы глифосата, зачастую не соотносящиеся с реальным суточным потреблением глифосата человеком. Другой очень важный недостаток заключается в том, что оценивая влияние глифосата, необходимо всегда помнить о том, что растительные культуры обрабатываются не чистым веществом глифосат, а гербицидом на основе глифосата, со сложным составом, определить который не представляется возможным, так как данные о полном составе гербицида скрыты патентными формулами. При этом токсическое воздействие не только глифосата, а состава глифосата с вспомогательными веществами, может быть значительно выше (Куликова, Лебедева, 2010).

В публикациях, посвященных воздействию глифосата на популяцию человека и животных, уделяется особое внимание влиянию этого пестицида на микробиом желудочно-кишечного тракта (Fei et al., 2013). Исследователи Shehata A. и Shcrödl W. (Shehata, Shcrödl, 2012) изучали влияние глифосата на представителей микрофлоры желудочно-кишечного тракта птиц. В этой работе было установлено, что присутствие глифосата в желудочно-кишечном тракте птицы может по-разному влиять на представителей нормофлоры и на патогенные бактерии. Ученые резюмировали, что некоторые патогенные бактерии показывают

устойчивость к глифосату, а вот представители нормофлоры часто оказываются высокочувствительными к этому веществу. Авторы определяли минимальную ингибирующую концентрацию, при которой количество бактерий в смеси *in vitro* после инкубации становилось меньше, чем посевная доза этих бактерий, вносимых в среду до инкубации. Например, бактерия, традиционно относимая к представителям полезной микрофлоры, *Bifidobacterium adolescentis* оказалась чувствительна к концентрации глифосата 0,075 мг/мл, рост бактерий *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* ингибировался при концентрации глифосата 0,150 мг/мл, *Lactobacillus spp.* при 0,600 мг/мл соответственно. И наоборот, такие бактерии как *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis* выживали в инкубируемой смеси с содержанием глифосата 5,0 мг/мл, и бактерии *Clostridium botulinum type A, B* и *Clostridium perfringens* ингибировались только при концентрации 1,2 и 5,0 мг/мл соответственно.

Воздействие глифосата на птиц впервые в долгосрочном эксперименте провели финские ученые (Ruuskanen et al, 2020). Они скармливали японским перепелам корм, содержащий 160 мг/кг глифосата, и определяли целый ряд важных показателей физиологического статуса и здоровья птицы. Эксперимент продолжали в течение 52 недель. Основные выводы, которые приводят авторы данного исследования, заключаются в том, что воздействие глифосата снижало печеночную активность внутриклеточного антиоксидантного фермента (каталазы). Одним из существенных выводов также является вывод о том, что глифосат изменял состав микробиома кишечника птицы, особенно в молодом возрасте, и у самок в большей степени по сравнению с самцами. Ученые наблюдали уменьшение наиболее распространенной филои бактерий *Firmicutes* и увеличение разнообразия *Actinobacteria*. Распространенность бактерий рода *Lactobacillus* имела тенденцию к снижению. Напротив, недавно обнаруженный патоген птиц, *Enterococcus cecorum* (Jung, et al., 2018) увеличивался в кишечнике птицы, потреблявшей корм с глифосатом в возрасте 12 недель. Также было выявлено, что у самцов снизился

уровень гормона тестостерона, хотя явно это не повлияло на репродуктивную функцию самцов.

В исследовании, проведенном в 2021 году (Шувалова, Прутенская, 2021) обнаружили, что при скармливании овса с глифосатом в различных концентрациях от 7 до 28 мг/кг корма мышам, в опытных группах было отмечено снижение фертильности и жизнеспособности потомства. Потребление корма с глифосатом влияло на кроветворную систему организма. Количество лейкоцитов в крови снизилось на 73% через 6 месяцев скармливания глифосата в дозировке 28 мг/кг корма. К тому же, в крови животных опытной группы наблюдались изменения формы и величины эритроцитов. При исследовании гистологических препаратов клеток печени обнаружили нарушение структуры ткани органа.

Глифосат также оказывает влияние на микробное сообщество почв, подавляя жизнедеятельность некоторых видов микроорганизмов (Железова, 2018).

1.1.3 Уровень содержания глифосата в кормах для птицы

Интенсивное выращивание птицы на промышленных предприятиях требует бесперебойного обеспечения комбикормами птицеводческих хозяйств. Основная доля сырья в комбикорме – это продукты растительного происхождения. К ним относят зерновые культуры – пшеницу, ячмень, кукурузу, зернобобовые культуры – горох, сою, люпин, а также различные масличные культуры – подсолнечник, рапс.

Для получения стабильной и высокой урожайности растительных культур необходимо *надежное получение урожая на полях*, что в свою очередь обязывает применять значительное количество агрохимикатов: минеральных удобрений, пестицидов, стимуляторов роста растений и др. Рынок пестицидов в России по показателю прироста объема продаж занимает первое место в мире (Захаренко,

2020, 2021). Постепенно остаточные количества ядохимикатов накапливаются в воде, почвах, в растительном сырье, затем через комбикорма попадают в рацион птицы и, в конечном итоге, через продукты птицеводства могут попадать в пищу человека.

Анализ кормов на содержание различных вредных веществ проводят лаборатории по оценке качества кормов и контролирующие надзорные органы (Белоусов, 2013). Из сообщений ФГБУ «Всероссийского государственного Центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» известно, что в последние годы обнаруживают остаточные количества глифосата в растительном сырье для изготовления кормов, а также в комбикормах для продуктивных животных и в кормах для непродуктивных животных. Так, по данным Сорокина и др., глифосат и его метаболиты обнаруживали в 2020-2021 году в комбикормах для коров, свиней, кроликов, в объектах аквакультуры, и в кормах для мелких домашних животных в диапазоне от 0,06 мг/кг до 0,47 мг/кг (Сорокин, 2022).

Глифосат является высокорастворимым соединением. Растворимость глифосата в воде составляет 10,5 г/л при pH 1,9 и 20°C. Глифосат, который обнаруживают в поверхностных водах, является результатом смыва данного пестицида с поверхности растений, а также результатом прямого применения глифосата по сорной водной растительности (Кузнецова, 2010). Глифосат обладает высокой способностью связываться с частицами почвы. Период полураспада глифосата в почвах составляет от 20 до 100 дней. По мнению Кузнецовой О.М. деградация глифосата в воде, водных осадках и почвах обусловлена, главным образом, за счет разрушения его микроорганизмами.

В ходе проведенного обзора доступных публикаций, был сделан вывод о недостаточном количестве информации о содержании глифосата в растительных культурах, используемых для изготовления комбикормов в РФ. Эта тема требует более тщательного изучения.

1.1.4. Методы снижения концентрации токсичных веществ в кормах и других объектах

К методам снижения содержания токсичных веществ в кормах относят специальные обработки кормов химическими агентами (например, органическими кислотами, аммиаком, озоном и др.), температурную обработку кормов, а также применение УФ -облучения. Все эти методы являются трудозатратными и дорогими, кроме того, при их выполнении необходимо надежно защищать работников предприятий от вредных факторов (Семенов и др., 2017).

Современным, эффективным способом является применение сорбентов в кормлении животных, которые подбирают с учетом вида загрязнения в кормах, а также дозы загрязнения, например, микотоксинами (Лопалева, 2022).

Сорбенты используют для снижения нежелательных токсических воздействий, которые токсиканты могут оказать на организм животных (Гамко, 1999; Карташов, 2000; Кердяшов, 2014; Задорожная, 2004).

В кормлении птицы широко используются сорбенты на минеральной основе (Дарьин, 2017). Попадая в желудочно-кишечный тракт вместе с кормом, они воздействуют на остаточные количества токсических веществ, связывают их, и выводят из организма вместе с каловыми массами (EFSA, 2018; *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*, 2003; Wu et al., 2009).

Некоторые микроорганизмы обладают способностью разрушать микотоксины (Cheng et al., 2016; Wang et al., 2020), пестициды (Ксенофонтова, 2012; Решетов, 2012) и др. нежелательные вещества. Механизм действия заключается в разрушении токсических веществ до безопасных соединений с помощью специфических ферментов микроорганизмов.

Загрязнение почв и окружающей среды глифосатом набирает обороты, так как с 90-х годов 20 века на полях возделываются культуры генетически

модифицированные и устойчивые к глифосату. Нормы использования глифосата и кратности обработок полей многократно увеличены с тех пор, как был открыт глифосат в 1970 году. Для удаления остатков глифосата в окружающей среде может подойти стратегия биодеструкции глифосата подходящими микроорганизмами. Бактерии являются достаточно хорошим агентом, подходящим для этой цели.

По данным Свиридова и др. из всех видов деградации глифосата наиболее изучена микробная деградация. Автор указывает на два пути разрушения глифосата. По первому пути при микробной деградации глифосата получаются два продукта: саркозин и неорганический фосфор. Второй вариант деградации глифосата проходит с образованием аминотетрагидропиримидиновой кислоты и гликозилата (Sviridov et al., 2015).

По данным (Castrejon-G., 2021) микробиологический метод биотрансформации глифосата и его метаболитов имеет большое значение, так как являются экологичным и недорогим способом биоремедиации и извлечения этого загрязнителя из объектов окружающей среды. Одними из основных изучаемых претендентов на эту роль оказались бактерии рода *Bacillus* и бактерии рода *Ochrobactrum*. При этом отмечается, что в некоторых случаях комбинация из нескольких видов бактерий действует эффективнее, чем каждая из бактерий по отдельности.

Авторы статьи указывают на преимущественное использование бактериями глифосата и его метаболитов в качестве источника углерода, для большей эффективности процесса, так как бактерии для роста нуждаются в источнике углерода значительно больше, чем в источнике фосфора.

В работе (Бакулин, Овсянников и др., 2014) выделяли глифосатустойчивые штаммы протеобактерий из образцов сельскохозяйственных почв, обрабатываемых глифосатом. Путем поэтапного культивирования бактерий со все возрастающими концентрациями глифосата и отбора самых устойчивых штаммов, ученые выделили культуру *Pseudomonas alcaligenes*. Данный штамм показал

высокую способность к деградации глифосата в образцах почвы в исследовании *in vitro*.

В работе Игнатовец О.С. (Игнатовец и др., 2015) использовали биотехнологические приемы для улучшения эффективности бактерий в отношении способности к разрушению пестицидов в почве. Среди проверенных факторов решающими оказались температура, время аэрации и нанесение бактерий на носители-иммобилизаторы.

Почва является богатым субстратом, из которого можно выделить бактерии, способные разрушать различные токсические соединения, в т.ч. глифосат (Fan, Yang, 2012). Штамм *Bacillus cereus CB4*, выделенный из почвы, оказался способным разрушать глифосат по двум метаболическим путям. В первом случае глифосат разрушается до аминотетрагидропиримидиновой кислоты и гликоксилата. Во втором варианте биотрансформационного пути конечными продуктами являются глицин и формальдегид. Correa сообщил о биотрансформации глифосата с помощью бактерий *Penicillium 4A21*, выделенными из почвы Амазонских лесов (Correa, 2022).

Продолжительность биодegradации также играет практическую роль. В опытах, проведенных (Mousa, 2019), концентрация глифосата в инкубируемой смеси с бактериями *Bacillus megaterium* снижалась на 71% на 60-е сутки культивирования. Установлено, что *Bacillus megaterium* потребляла глифосат как единственный источник фосфора в питательной среде. Авторы данной работы рекомендуют культуру бактерий *Bacillus megaterium* как перспективную культуру для стратегии биоремедиации почв.

В некоторых случаях к полезному свойству бактериальной деградации глифосата добавляются также и другие полезные свойства бактерий. Например, бактерии действуют одновременно как биодеградаторы и как стимуляторы роста растений, что было показано в работе (Rodríguez, 2019). После обработки картофельного поля глифосатом по вегетационной массе, в образцах, где проводили одновременно обработку глифосатом и раствором бактерии

Lysinibacillus sphaericus, снизилось содержание глифосата в зеленой массе и улучшились параметры фиксации азота в почве.

1.1.5 Использование пробиотических микроорганизмов в практике птицеводства

При изготовлении полнорационных комбикормов для птицы, уже несколько десятилетий используют кормовые добавки различного происхождения и спектра действия. Цель применения кормовых добавок - улучшение свойств кормов, обогащение рационов витаминами, аминокислотами, макро- и микроэлементами. Кормовые добавки могут улучшать вкус кормов, и пробуждать аппетит у птицы, могут стабилизировать микробиологические показатели кормов, препятствуя их порче. Известны также сорбенты, которые используют для нейтрализации токсических соединений в кормах (Измайлович, 2021; Рядчиков, 2015; Фисинин, 2011).

В кормлении птиц широко используют живые бактерии, обладающие благоприятным влиянием на организм хозяина, – пробиотики (Yirga, 2015). Пробиотики, применяемые в птицеводстве, делят на 2 группы: пробиотики, скармливаемые через корма, или выпаиваемые через воду, так называемые – пробиотики прямого скармливания. И новое направление, которое пока получило небольшое развитие – это способ введения пробиотика развивающемуся эмбриону с использованием технологии кормления *in ovo* (Abd El-Hack et al, 2020).

Пробиотики – это полезные кормовые добавки, содержащие микроорганизмы, которые могут дополнять применение антибиотиков и восстанавливать функции кишечника путем стабилизации микрофлоры кишечника, повышения производительности животных, а также помогать в стратегии восстановления кишечного микробиома после применения

антибиотиков (Jha et al, 2020). Использование пробиотиков увеличивается год от года, так как они требуются, чтобы заменить стратегию птицеводства с использованием ростостимулирующих антибиотиков. Кроме того, по мере исследования пробиотиков становятся более очевидными полезные эффекты, которые они оказывают на птицу.

Главными полезными свойствами пробиотических микроорганизмов считают восстановление кишечной микрофлоры после использования антибиотиков, стабилизация кишечной микрофлоры, снижение негативного влияния стресс-факторов, таких как тепловой стресс, скученность посадки, погрешности в кормлении птицы (Патент № 2652836 С1; Йылдырым и др., 2020).

Нередко, в хозяйствах, использующих пробиотики в кормлении птицы, отмечают улучшение производственных показателей, таких как увеличение среднесуточного привеса, увеличение потребления корма, выровненность стада, снижение падежа и др. (Лаптев и др. 2020b). Одновременно с этими данными, другие хозяйства отмечают снижение бактериальных кишечных инфекций у поголовья и стимулирование иммунитета (Гиндуллин и др, 2014; Патент № 2235772 С1, 2004; Зеленская, 2010; Ноздрин и др., 2009; Abd El-Moneim et al, 2020; Zaghari et al, 2015).

Научные эксперты заключают, что свойства, благоприятные эффекты и возможности пробиотиков являются индивидуальными характеристиками и зависят от каждого штамма. Пробиотики производят в сухой и жидкой форме. Это обстоятельство также влияет на эффекты от применения пробиотика.

В практике птицеводства при использовании пробиотиков чаще всего в составе кормовых добавок можно встретить такие роды бактерий, как *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* и дрожжей *Saccharomyces* и *Candida* (Феоктистова и др, 2017; Яруллина, Фахруллин, 2014; Кротова, 2021, Рябцева и др, 2019).

Молочнокислые микроорганизмы могут становиться все более популярными для человека, животных и птицы, так как они способствуют перевариванию

лактозы. Также по данным некоторых ученых молочнокислые микроорганизмы связаны с такими эффектами, как предупреждение некоторых видов рака, снижение кишечных инфекций и снижение уровня холестерина в крови. Эти данные еще также нуждаются в дальнейшем изучении. При применении молочнокислых бактерий улучшается рост и статус здоровья сельскохозяйственных животных (Vioco-Saiz, 2019).

При исследовании пробиотика на основе бактерий *Bacillus subtilis* в кормлении бройлеров ученые (Uradhaya et al., 2019) пришли к выводу, что пробиотик в дозировке 500 г/т корма при использовании рациона со сниженным содержанием обменной энергии и сырого протеина, улучшает привесы птицы, качество мяса и снижает выделение аммиака в окружающую среду, по сравнению с группой, также, получавшей обедненный рацион и не получавшей пробиотик.

По данным ученых Казанского Университета (Феоктистова и др., 2017) пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* оказывают положительное влияние на рост и развитие цыплят. Также дополнительным преимуществом бактерий *Bacillus* оказалась способность синтезировать дополнительно фермент фитазу, высвобождающую фосфор из фитатов, находящихся в растительном сырье, и способствующих большему усвоению фосфора у птицы.

Японские ученые (Ruttanavut et al., 2012) проводили опыт по скармливанию ферментированных имбиря и японской полыни с содержанием *Lactobacillus spp.*, *Bacillus subtilis* в составе основного рациона родительскому стаду яичной птицы. По окончании опыта сообщали, что у птицы опытной группы увеличилось количество и длина ворсинок эпителиального слоя кишечника по сравнению с контрольной группой. Также было отмечено, что потребление корма и прирост живой массы не отличались в группах контроль и опыт, что указывает на возможность замещать часть основного рациона переработанными пищевыми отходами.

Использование комплексного препарата, содержащего бактерии *Lactobacillus acidophilus* и органические кислоты применяли в опыте по

выращиванию яичной молодки (Ткачева, 2019). Препарат выпаивали несущке через воду курсом в течение 5 дней. По окончании опыта отметили увеличение живой массы кур-несушек к началу предкладкового периода. Дополнительно, отметили более лучшие показатели выровненности стада. Показатель однородности стада молодых опытной группы к началу продуктивного периода превышал контроль на 1,3% и составил 95,2% в опытной группе по отношению к 93,9% в контроле.

Исследователи Похиленко и др. (Похиленко, Перельгин, 2007) составили список критериев, которым должны соответствовать пробиотические бактерии, чтобы их можно было допускать к использованию в качестве лечебных препаратов. Основной критерий – безопасность для человека и животных, т.е. отсутствие патогенности. Также важным называют толерантность в отношении представителей нормофлоры, отсутствие генов, связанных с продукцией токсинов. Кроме этого, производитель пробиотика должен предоставить информацию о природе и механизме пробиотического действия, а также о технологических свойствах микроорганизмов.

Немаловажным фактом является способность полезных микроорганизмов проходить через агрессивную среду желудка и колонизировать стенки кишечника. По данным авторов (Дармов и др., 2011) штаммы пробиотиков перед внедрением в практику применения необходимо проверять на свойство выживаемости в условиях желудочно-кишечного тракта макроорганизма.

1.1.6 Механизмы действия пробиотиков в желудочно-кишечном тракте птицы

Механизмы действия пробиотиков изучают многие исследователи, работающие в области здоровья человека, и специалисты по кормлению и

ветеринарии, работающие в области птицеводства и животноводства (Егоров и др., 2019; Бондаренко, Рыбальченко, 2009; Кильдиярова, 2016; Похиленко, Перельгин, 2007).

Пробиотические штаммы микроорганизмов характеризуются многообразием механизмов действия в желудочно-кишечном тракте макроорганизма – хозяина. Каждому виду микроорганизмов присущи свои специфические свойства. Одним из основных механизмов, как считают ученые, является конкурентное исключение. Оно состоит в том, что культуры полезных микроорганизмов конкурируют с потенциально вредоносными бактериями за места адгезии на эпителии кишечника или за источники питания - органические вещества (Yirga, 2015).

Методами молекулярной биологии подтверждена выживаемость с последующей адгезией к мукозной оболочке и размножением вводимых бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике (Бондаренко, Рыбальченко, 2009).

Хорошо изучен механизм антагонистического действия пробиотиков на патогенную и условно-патогенную микрофлору за счет синтеза пробиотическими штаммами различных активных веществ: лизоцима, органических кислот, антибактериальных пептидов (Бондаренко, Рыбальченко, 2009).

Основные механизмы действия спорогенных пробиотиков: восстановление собственной нормальной кишечной микрофлоры макроорганизма; подавление роста потенциально-патогенных и патогенных микроорганизмов благодаря выработке лизоцима, бактериоцинов; повышение резистентности иммунной системы; продуцирование пищеварительных ферментов (Мурленков, Шендаков, 2018).

Пробиотики действуют как стимуляторы иммунитета. По мнению коллектива авторов (Viesco-Saiz et al., 2019) молочнокислые бактерии, например, вызывают положительные изменения в иммунной системе хозяина. Это связано с их способностью вызывать продукцию цитокинов, а также индуцировать врожденный или приобретенный иммунный ответ макроорганизма. Пробиотики

взаимодействуют с кишечными эпителиальными и дендритными клетками, стимулируют выработку слизи и синтез дефензинов. О влиянии на приобретенный иммунитет можно судить по данным авторов (Asgari et al., 2016). У цыплят, которым скармливали добавку, содержащую *Lactobacillus acidophilus* LA5, увеличилось содержание иммунных клеток *CD4*, *CD8* и *TCR* в кишечнике и периферической крови. Введение *Lactobacillus spp.* способствовало эффективной активации иммунитета слизистой оболочки цыплят за счет повышения уровней IgA и IgG (Rocha et al., 2012).

Среди других механизмов известен еще один – адгезия пробиотических бактерий к стенкам пищеварительного тракта для предотвращения колонизации патогенными бактериями. При этом наблюдают следующий процесс: увеличивается колонизация стенок кишечника благоприятной микрофлорой, которая в свою очередь, ингибирует прикрепление патогенных бактерий к клеткам эпителия кишечника (McDonald, 2010). Интересным является тот факт, что некоторые микроорганизмы могут влиять на экспрессию конъюгатов гликоля на эпителиальных клетках, и они могут использоваться как рецепторы для адгезии бактерий (Umesaki et al., 1997).

При выпаивании препарата «Иммунофлор» (на основе бактерий *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium globosum*) цыплятам кросса Хаббард двух - курсовым приемом, удалось повысить живую массу бройлеров на 171 г, снизить падеж птицы на 1,3%, а также затраты корма на 1 кг прироста на 2,3% в опытной группе по сравнению с контрольной (Буряков, 2022).

В исследовании (Никитченко и др., 2022) цыплятам опытной группы скармливали пробиотик «Суб-Про» на основе культуры *Bacillus subtilis* -2335, а контрольной группе – антибиотик. Пробиотик оказал положительное влияние на скорость роста и показатели качества мяса цыплят. В опытной группе цыплята превышали по весу цыплят в контрольной группе на 23 г при одинаковой сохранности. Среднесуточный прирост цыплят опытной группы составил 64,2 г, а

контрольной группы с антибиотиком – 62,7 г. Авторы рекомендуют использовать пробиотик, как заменитель антибиотика при выращивании цыплят.

1.1.7 Синтез метаболитов пробиотическими бактериями и их значение для организма птицы

Пробиотические бактерии рода *Bacillus* обладают широким спектром метаболической активности. Они перерабатывают большинство самых различных субстратов. Среди метаболитов бактерий *Bacillus* есть органические кислоты, белки, пептиды, витамины группы В и К, аминокислоты, антибиотикоподобные соединения (Каравайко, 2004; Sorokulova, 2013; Грязнева, 2013; Wuxing et al., 2006; Baruzzi et al, 2011; Sumi et al, 2015).

Бактерии рода *Bacillus* обладают разносторонней полиферментной активностью. Их энзимные системы включают набор ферментов различных классов, что обеспечивает им возможность существовать на разнообразных субстратах. У бацилл особенно развита система гидролаз (Смирнов, 1983). Эти микроорганизмы синтезируют хитиназы, α -амилазы, протеазы, лактамазы, целлюлазы и ряд других ферментов (Цурикова и др., 2002; De Clerck, De Vos, 2002). Пробиотики, обладающие ферментативными системами с широкой субстратной специфичностью, применяются в сельском хозяйстве при решении проблемы кормовой базы в животноводстве и птицеводстве (Шимкус, Юкна, 2004; Upadhaya et al, 2019; Феоктистова, 2017).

В настоящее время живые микробные культуры, в частности бактерии рода *Bacillus* с высокой биологической активностью с успехом применяют в качестве кормовых добавок. Так амилазы, продуцируемые бациллами, способствуют расщеплению крахмалсодержащих компонентов кормов, протеазы воздействуют на протеины, липазы – на жиры (Маркин, Нестеров, 2019). Бактериальные

ферментные комплексы участвуют в процессах деградации различных по своему составу сырьевых компонентов корма и способствуют его оптимальному усвоению. Данные ферменты способствуют расщеплению и усвоению высокомолекулярных белков и полисахаридов, и позволяют заменить дорогие компоненты корма на более дешевые (Сафронова и др., 2006, Рустамова и др., 2005).

Бифидобактерии продуцируют конечные метаболиты, например, уксусную и молочную кислоты, которые, в свою очередь, снижают содержание грамм-отрицательных и грамм-положительных патогенных микроорганизмов (Gibson, Roberfroid, 1995).

По данным Ардатской и др. основными продуцентами уксусной и молочной кислоты в кишечнике макроорганизма являются бактерии *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, продуцентами молочной кислоты бактерии *Streptococcus*, продуценты масляной кислоты – бактерии рода *Clostridium* (Ардатская, 2014). Перечисленные выше кислоты относятся к короткоцепочечным жирным кислотам, которые напрямую оказывают благоприятное действие на кишечник макроорганизма.

Исследователями (Brurberg et al., 1997) было показано, что молочнокислые бактерии *Lactobacillus sake LTH 673* синтезируют бактериоцин сакацин, который обладает антимикробным действием в отношении патогенных *Streptococcus spp.* К тому же, исследователи отметили, что интенсивность выработки бактериоцина зависит от условий культивирования бактерий.

У бактерий рода *Enterococcus* Сычевой и др. (Сычева, Пешкова и др., 2017) обнаружены гены бактериоциногенности, при этом выделенные из кишечника человека изоляты энтерококков проявляли антагонистическую активность в отношении патогенных видов энтерококков и бактерий р. *Listeria*. Известно, что энтерококки относятся к нормофлоре человека и животных, они обеспечивают колонизационную резистентность слизистой кишечника. При ферментации

разнообразных углеводов, бактерии рода *Enterococcus* обеспечивают накопление молочной кислоты (Молохова и др., 2011).

Учеными выделен и охарактеризован штамм *Enterococcus thailandicus sp.nov.* из мясных продуктов, для которого характерно накопление в культуральной жидкости длинноцепочечных жирных кислот – пальмитиновой и стеариновой (Tanasupowat et al, 2008). Известно, что длинноцепочечная жирная кислота, например, лауриновая кислота, способна снижать нагрузку в пищеварительном тракте цыплят – бройлеров по содержанию *Campylobacter jejuni* (Zeiger, 2017).

Современные исследователи считают, что органические кислоты могут служить эффективной альтернативой антибактериальным препаратам. Пропионовая, уксусная, муравьиная кислоты оказывают влияние на скорость роста, потребление корма и эффективность кормления цыплят- бройлеров (Khan et al, 2022).

Здоровье и продуктивность птицы напрямую связаны с нормированным кормлением, а также безопасностью и качеством кормов. Основная часть рациона птицы состоит из кормов, изготовленных на основе растительных культур. В настоящее время возделывание всех сельскохозяйственных культур связано с интенсивным использованием различных пестицидов. Глифосат, как один из самых эффективных пестицидов, используют повсеместно. Также, глифосат широко используют как десикант. Использование его как пестицида, и в большей степени как десиканта, приводит к накоплению остаточных количеств в кормовых культурах и в сырье для продуктов питания человека. Одновременно с этим увеличивается количество сорняков, устойчивых к действию глифосата. Следовательно, уровень использования, а именно, дозы внесения и кратность обработки глифосатом полей постепенно увеличивается. Исходя из этого, мы ожидаем, что остаточные количества этого пестицида и дальше будут накапливаться в объектах окружающей среды (в почве, в растительных культурах, в воде). При этом, предположительно, уровни обнаружения глифосата будут увеличиваться.

Основной путь биodeградации глифосата – микробиологический. То есть, используя свои ферментативные системы, микроорганизмы потребляют глифосат как источник фосфора или как источник углерода. Биотрансформация глифосата проходит по нескольким биохимическим путям. В одном случае продуктами реакции биотрансформации являются аминотетрагидроптеридиновая кислота и гликозилат, а в другом саркозин, который затем разлагается до простых соединений углекислого газа и воды. Аминотетрагидроптеридиновая кислота является метаболитом глифосата и не уступает ему в степени токсичности, поэтому предпочтительнее путь разложения глифосата до простых веществ.

Поиск бактерий, которые являлись бы биодеструкторами глифосата, является актуальной задачей. Для того, чтобы с успехом применять такие бактерии в практике птицеводства, необходимым условием должна быть их безопасность для организма птицы. Поэтому поиск бактерий необходимо сосредоточить среди представителей нормофлоры птицы или животных, или среди сапрофитных видов. Изучение свойств бактерий, которые обладают способностью к биодеструкции и, одновременно с этим, являются пробиотиками, приведет к созданию новых препаратов, которые могут с успехом применяться в кормлении сельскохозяйственной птицы. Дополнительный пробиотический эффект важен также еще и потому, что при воздействии глифосата часто отмечают неблагоприятное влияние пестицида на микрофлору желудочно-кишечного тракта организма, будь то птица, животное или человек.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели и выполнения задач исследования по изучению эффективности действия пробиотиков «Пробиоцид-Ультра» и «Целлобактерин+» при скармливании глифосатсодержащих кормов на продуктивные качества сельскохозяйственной птицы был проведен ряд исследований:

- определение глифосата в комбикормах и сырье растительного происхождения для приготовления комбикормов;
- культивирование бактерий с различными концентрациями глифосатсодержащих препаратов для определения выживаемости бактерий;
- культивирование бактерий с глифосатсодержащим препаратом или глифосатом в выбранной концентрации, определение степени биотрансформации глифосата методом ИФА и методом ВЭЖХ;
- исследование спектра метаболитов в культуральных жидкостях бактерий, выбранных для дальнейшего использования;
- проведение опыта *in vitro* по выживаемости бактерий в имитируемых условиях желудочно-кишечного тракта птиц;
- проведение зоотехнического опыта на цыплятах-бройлерах для изучения влияния глифосата в концентрации 20 мг/кг корма и пробиотика «Пробиоцид-Ультра» на зоотехнические показатели;
- проведение зоотехнического опыта на курах-несушках для изучения влияния глифосата в концентрации 40 мг/кг корма и пробиотика «Целлобактерин+» на зоотехнические показатели;
- проведение апробации эффективности действия пробиотика «Целлобактерин+» в производственных условиях на курах-несушках.

–

Общая схема исследований представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – общая схема исследований

2.1 Исследование содержания глифосата в кормах методом иммуноферментного анализа

Проводили пробоподготовку образцов корма и получали рабочие экстракты, в которых определяли содержание глифосата. Для анализа использовали тест-системы Glyphosate ELISA Microtiter Plate (США, Abraxis®). Экстракт образца (или стандарты) добавляли в лунки, покрытые антителами козы к кролику. Раствор антител кролика к глифосату добавляли в те же микролунки и инкубировали в течение 30 минут. После этого в лунки добавляли раствор конъюгированного с ферментом глифосата. В этот момент происходит конкурентная реакция между

глифосатом, который может присутствовать в образце, и ферментом, маркированным глифосатом, для связывания антител кролика к глифосату и антител козы к кролику, иммобилизованных в микролунках. Содержимое лунок инкубировали 60 минут. После отмывки и добавления раствора субстрата происходит изменение цвета раствора в лунках. Интенсивность цветового сигнала обратно пропорциональна концентрации глифосата, присутствующего в образцах. Концентрации образцов определяли интерполированием по стандартной кривой, построенной с использованием стандартных образцов известной концентрации. Содержание глифосата в пробах выражали в мг/кг.

2.2 Исследование способности бактерий выживать в присутствии глифосатсодержащего препарата

Штаммы бактерий для исследования способности к биотрансформации глифосата были выбраны из коллекции ООО «БИОТРОФ».

В качестве глифосатсодержащего вещества был использован коммерческий препарат «Торнадо» (производитель фирма «Август»), содержащий 360 г/л N-фосфонометилглицина (изопропиламинной соли) и вспомогательные вещества неизвестного состава.

Исследуемые дозы глифосата выбирали исходя из условий нормирования глифосата в растительном сырье и с учетом полученных данных о реальных уровнях содержания глифосата в сырье.

В предварительном эксперименте оценивали способность бактерий выживать в среде с присутствием глифосатсодержащего препарата «Торнадо» (изготовитель АО «Август»). Проводили культивирование в питательной среде простого состава с мелассой и минеральными солями для бактерий рода *Bacillus* и с сахарозой и дрожжевым экстрактом для бактерий рода *Enterococcus*. Перед

засевом питательных сред бактериями добавляли расчетное количество глифосатсодержащего препарата. Культивирование бактерий рода *Bacillus* проводили в стеклянных колбах с ватно-марлевыми пробками на качалке при скорости вращения качалочной платформы 180 об/мин при температуре 32⁰С. Культивирование бактерий рода *Enterococcus* проводили в стеклянных колбах, закрытых герметичными крышками, при температуре 38⁰С.

Определяли начальный титр бактерий, титр бактерий через одни сутки и через двое суток культивирования методом серийных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды. Среда подбирали в зависимости от штамма бактерий, например, бактерии рода *Bacillus* высевали на ГРМ-агар, бактерии рода *Enterococcus* на энтерококкагар и др. среды.

Уровень кислотности среды (рН) определяли потенциометрическим методом.

Микроскопическое исследование бактериальных культур проводили с помощью микроскопа «Primo Star» при увеличении Ph×40 и приготовлении препарата методом «раздавленной капли». Визуально оценивали морфологические признаки колоний исследуемых микроорганизмов.

2.3 Исследование биодеструкции глифоста бактериями с помощью метода ИФА

Содержание глифосата в исследуемых пробах определяли методом ИФА. Пробы инкубируемых смесей бактерий с различными концентрациями глифосатсодержащего препарата отбирали сразу после внесения всех компонентов в инкубируемую смесь – начальная проба, и на 2 сутки культивирования – конечная проба. До определения глифосата пробы замораживали при минус 20⁰С.

Пробоподготовку выполняли по рекомендациям производителя тест-систем для определения глифосата.

Для определения глифосата методом ИФА пробы культуральной жидкости бактерий предварительно размораживали, проводили центрифугирование, отделяли надосадочную жидкость, определяли рН надосадочной жидкости и при необходимости доводили до рН =6-8. Затем проводили ИФА как описано в п. 2.1. Если полученный результат по содержанию глифосата находился выше диапазона определения тест-системой, то пробы разбавляли дистиллированной водой и проводили анализ снова. Полученный результат представляли в мкг/мл культуральной жидкости с учетом выполненного разбавления.

Биодеструкцию глифосата определяли по формуле 1:

$$\text{БД, \%} = 100 - (\text{X2/X1} \times 100) \quad (1),$$

где X1 – концентрация вещества до инкубирования, мкг/мл

X2 – концентрация вещества после инкубирования, мкг/мл

2.4 Исследование биодеструкции глифосата бактериями с помощью метода ВЭЖХ

Для подтверждения результатов, полученных методом ИФА для двух видов бактерий, проводили проверку содержания глифосата методом ВЭЖХ. Подготовку проб и постановку опыта проводили согласно методическим указаниям МУК 4.1.3513-17.

Методика выполнения измерений МУК 4.1.3513-17 устанавливает порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации глифосата в зеленой массе растений, зерне и соломе зерновых колосовых культур, зерне гороха, зерне кукурузы, семенах подсолнечника, рапса, льна, бобах сои, растительном масле, плодах и соке

плодовых семечковых и плодовых косточковых, ягодах и соке винограда в диапазоне концентраций 0,5-10,0 мг/кг. Культуральная жидкость пробиотических бактерий впервые была проанализирована этим методом исследования. В ходе проведения исследований установили, что тип питательной среды влияет на сигнал, распознаваемый оборудованием, как сигнал от глифосата, поэтому в опыте использовали простые питательные среды известного состава. Также в ходе проведения исследований приняли решение модифицировать этап пробоподготовки. Так как исходная культуральная жидкость является жидким образцом, то вместо экстракции пробы значительным количеством соляной кислоты, вносили только небольшое количество концентрированной соляной кислоты. Глифосат легко образует комплексы с различными катионами, что затрудняет его извлечение из биологических матриц, а подкисление образцов соляной кислотой до $pH = 1$ позволяет успешно решить эту проблему, т.к. происходит гидролиз конъюгатов глифосата с компонентами матрицы (Кузовкова и др., 2016).

Метод основан на определении глифосата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием флуоресцентного детектора после извлечения из образцов раствором соляной кислоты и последующей дериватизации. Идентификация глифосата проводится по времени удерживания, количественное определение — методом абсолютной калибровки. Избирательность метода обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования.

Условия хроматографирования: высокоэффективный жидкостной хроматограф “Alliance” (Waters) с флуорометрическим детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки. Аналитическая колонка Sun Fire C-18 (250 × 4,6) мм, 5 мкм (Waters). Температура колонки 25 °С. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,01 М KH_2PO_4 в соотношении 20:80. Скорость потока элюента: 1 мл/мин. Длина волны: λ_{max} возбуждения 270

нм; λ max эмиссии 313 нм. Объем вводимой пробы 20 мкл. Результат выражали в мкг/мл культуральной жидкости.

В подтверждающих экспериментах по изучению биодеструкции глифосата в пробах культуральных жидкостей бактерий методом ВЭЖХ использовали чистое вещество глифосат (N-фосфонометилглицин) с содержанием основного вещества 96% (Sigma-Aldrich).

Биодеструкцию определяли как указано в п. 2.3

Исходную концентрацию чистого вещества глифосата 5 мкг/мл выбрали таким образом, чтобы она находилась в диапазоне МДУ концентраций глифосата в соответствии с нормами (СанПиН 1.2.3685-21), а также входила в диапазон определения метода ВЭЖХ.

2.5 Метод определения способности бактерий выживать в условиях желудка и кишечника, имитируемых *in vitro*

Для изучения выживаемости микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте использовали методику, описанную в методических рекомендациях по оценке биобезопасности наноматериалов (Оценка биобезопасности наноматериалов). На первом этапе моделировали условия желудка *in vitro*. Для этого инкубировали пробиотические микроорганизмы в буферном растворе в кислой среде с добавлением фермента пепсин в течение 4 ч при 38 °С.

На следующем этапе моделировали условия кишечника, используя буферный раствор со слабощелочной средой в присутствии таких ферментов, как амилаза, протеаза, липаза (использовали препарат «Панзинорм»). Пробиотические микроорганизмы родов *Bacillus* и *Enterococcus* инкубировали в течение 18 ч при температуре 38 °С. Количество жизнеспособных бактерий на каждом этапе

определяли методом серийных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды.

Дополнительно изучали влияние желчных кислот на исследуемые бактерии. Штаммы бактерий *Bacillus sp.* и *Enterococcus faecium* инкубировали в присутствии желчных кислот по методике, описанной в фармакопейной статье «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» (ОФС.1.7.2.0012.15). Перед посевом бактерий в жидкие питательные среды добавляли раствор желчи с тем расчетом, чтобы концентрация желчи составляла 0,005%; 0,6% и 10% соответственно. После инкубирования в течение 1 суток при 38⁰С оценивали рост культур методом посева на плотные питательные среды.

2.6 Методы определения метаболитного профиля бактерий *Bacillus megaterium* - 4801 и *Enterococcus faecium* 1-35

Метаболиты бактерий определяли по схеме, изображенной на рисунке 3.

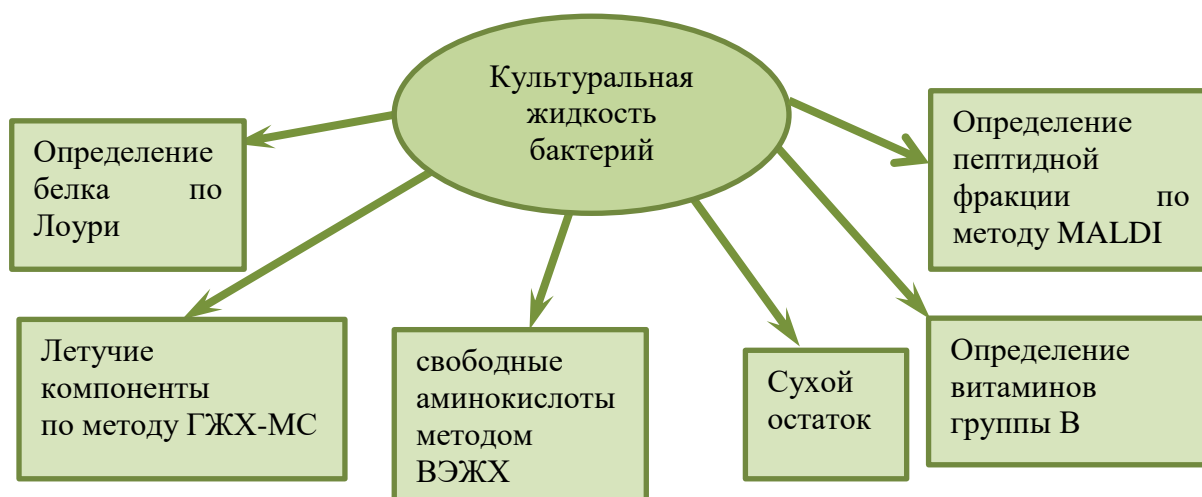


Рисунок 3 – Схема определения метаболитов

а) Определение белка в культуральной жидкости бактерий проводили по методу Лоури.

б) Определение витаминов группы В в культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium -4801*.

Испытуемые образцы анализировали без специальной пробоподготовки. Референтные образцы готовили с концентрацией 0,1 мг/мл.

Условия хроматографирования представлены в таблице А.1 Приложения А.

Для количественного определения витаминов группы В измеряли площади пиков определяемого витамина на хроматограммах референтного и испытуемого образцов и вычисляли их содержание X_i в 1 мл жидкости в микрограммах по формуле (2):

$$X = \frac{S_x \cdot C_0}{S_0} \quad (2), \quad \text{где}$$

S_0 и S_x - площади пиков целевого витамина на хроматограммах референтного и испытуемого образца соответственно;
 C_0 - концентрация витамина в референтном образце в мкг/мл.

в) Определение аминокислот методом УЭЖХ-СФ.

Приготовление стандартного образца раствора смеси аминокислот проводили следующим способом. Растворы индивидуальных аминокислот с концентрацией 1 мг/мл получали при внесении в мерные колбы вместимостью 10 мл по 10 мг (точные навески) каждой из 20 аминокислот и последующем растворении в 0,1 М соляной кислоты.

Стандартный раствор смеси аминокислот с концентрацией 0,01 мг/мл получали в результате внесения в мерную колбу вместимостью 10 мл по 0,1 мл растворов 20 индивидуальных аминокислот и доведения объема до метки 0,1 М соляной кислотой с перемешиванием.

Подготовка проб

В пробирку вместимостью 5 мл помещали 20 мкл испытуемого образца, добавляли 30 мкл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 15 мкл ацетонитрила и 2 мкл фенилизотионата. Полученный раствор выдерживали 20 мин при комнатной температуре в тёмном месте и упаривали досуха в высоком вакууме при 60 С в течение 15 мин. Сухой остаток растворяли в 150 мкл водно-ацетонитрильной смеси в соотношении 19:1, переносили в хроматографическую виалу.

Условия хроматографического анализа ФИТЦ-производных аминокислот представлены в таблице А.2 Приложения А.

Количественное определение аминокислот. Измеряли площади пиков каждой аминокислоты на хроматограммах их стандартной смеси и испытуемого образца и вычисляли их содержание X в 1 мл жидкости в микрограммах по формуле (3):

$$X = \frac{S_x \cdot C_0}{S_0} \quad (3), \text{ где}$$

S_0 и S_x - площади пиков аминокислоты на хроматограммах стандартной смеси аминокислот и испытуемого образца соответственно;

C_0 - концентрация индивидуальных аминокислот в стандартном растворе их смеси в мкг/мл.

г) Определение молекулярной массы пептидов методом МАЛДИ.

Подготовка проб

Исследованию подвергались неразбавленные образцы и их растворы, разбавленные 0,1% трифторуксусной кислоты в 10 раз.

Условия регистрации масс-спектров: мощность лазера: 50%; число импульсов на суперпозицию: 1500-2500; диапазон масс: 400-50000 Да.

д) Газожидкостная хроматомасс-спектрометрия (ГЖХ-МС).

Подготовка проб

Для получения обзорной хроматограммы летучих компонентов образцов КЖ бактерий *Bacillus megaterium* – 4801 и *Enterococcus faecium* 1-35 аликвоту

соответствующей культуральной жидкости 0,1 мл выпаривали досуха при комнатной температуре в токе воздуха. К сухому остатку прибавляли 30 мкл силилирующего реагента ТМСТФА и выдерживали пробу при 80°C в течение 5 мин (проба А).

е) Для количественной оценки содержания уксусной кислоты в КЖ бактерий методом добавок к 0,1 мл культуральной жидкости прибавляли 0,9 мл воды и 10 мкл 0,2% раствора дейтерированного метилового эфира тридекановой кислоты (проба Б).

К пробе Б прибавляли 10 мкл 10% раствора уксусной кислоты (проба В).

Аналогичным образом обрабатывали образец сравнения (питательная среда).

Условия хроматографирования проб А – В представлены в таблице А.3 Приложения А.

Обработка экспериментальных данных.

Хроматограмма регистрировалась по полному ионному току в диапазоне масс от 35 до 450 Да.

Для идентификации компонентов пробы использовали программное обеспечение GCMS solution и электронную библиотеку масс-спектров NIST08.

Содержание уксусной кислоты в пробах X в мг/мл вычисляли по формуле (4):

$$X = \frac{m \cdot S_X \cdot 10}{S_{STD1} \left(\frac{S_{X^+}}{S_{STD2}} - \frac{S_X}{S_{STD1}} \right)}, \quad (4)$$

где S_X и S_{X^+} — площади пика уксусной кислоты на хроматограммах, зарегистрированных соответственно до и после ее добавки;

S_{STD1} и S_{STD2} — площади пика внутреннего стандарта на хроматограммах, зарегистрированных соответственно до и после добавки уксусной кислоты;

m	масса добавки уксусной кислоты в миллиграммах;
10	числовой коэффициент, учитывающий разбавление при получении проб Б и В.

ж) Определение сухого остатка

Определение сухого остатка проводили термогравиметрическим методом с помощью анализатора влажности. В анализаторе влажности реализован принцип термогравиметрического анализа, при котором происходит высушивание образца с помощью галогеновой лампы и определение содержания влаги, вычисляемого на основе разности между влажным и сухим весом.

2.7 Зоотехнический опыт по скармливанию глифосатсодержащего корма и пробиотика «Пробиоцид-Ультра» цыплятам-бройлерам

Для изучения влияния глифосата на зоотехнические показатели цыплят в виварии ООО «БИОТРОФ» в 2021 году был проведен опыт на цыплятах-бройлерах кросса «ROSS-308». Цыплята-бройлеры были распределены на 3 группы по 40 голов в каждой группе. Продолжительность выращивания 35 суток.

Световой и влажностный режим соответствовали руководству по содержанию бройлерного поголовья кросса «ROSS- 308». Схема опыта представлена в таблице 1.

Пробиоцид-Ультра – это метапробиотик, содержащий органические кислоты (лимонную, фумаровую и пробиотический штамм *Bacillus megaterium -4801*).

Таблица 1 – Схема опыта

Показатель	I-Контрольная	II-Глифосат	III-Глифосат+ Пробиоцид- Ультра
Количество голов в группе	40	40	40
Рацион	ОР	ОР	ОР
Введение глифосата	-	20 мг/кг корма	20 мг/кг корма
Испытуемая добавка	-	-	Пробиоцид- Ультра 1 кг/т

Группы кормили одинаково: до 28 суточного возраста использовали полнорационный комбикорм ПК5_1Г_1101 для бройлеров в возрасте от 1 до 4 недель производства Гатчинского ККЗ (таблицы 2, 3). С 28 по 35 сутки выращивания цыплят кормили полнорационным комбикормом ПК-6_Г_1102. Глифосат для группы II и III наносили методом крупнодисперсного распыления еженедельно в таком количестве, чтобы конечная концентрация его в кормах составляла 20 мг/кг корма. Раствор глифосата готовили из коммерчески доступного препарата «Агрокиллер ВР» (производитель АО «Август», Россия) путем разбавления необходимого количества препарата с водой. Группа III в дополнение к основному рациону получала пробиотик «Пробиоцид-Ультра» в дозировке 1 кг на 1 тонну комбикорма.

Таблица 2 – Состав и питательность комбикормов для бройлеров

Компоненты	Возраст содержания, дни	
	1-27	28-35
1	2	3
Пшеница	44,97	31,49
Кукуруза	20,00	33,00
Шрот соевый	18,34	8,60
Шрот подсолнечный	6,00	5,00
Жмых подсолнечный	0	6,50

1	2	3
Белковый концентрат	3,60	5,50
Рыбная мука	2,86	0
Дрожжи кормовые	2,00	4,00
L-лизин моногидрохлорид	0,49	0,52
DL-метионин	0,28	0,30
L-треонин	0,11	0,11
Известняковая мука	0,03	0,40
Монокальций фосфат	0	0,25
Фосфат дефторированный	0,16	0
Соль поваренная	0,08	0,14
Сульфат натрия	0,08	0,09
Премикс П5старт У	1	1
В 100 г комбикорма содержится:		
Обменная энергия, ккал	295	315
Влажность,%	11,82	10,45
Сырой протеин	22,0	19,01
Сырой жир	2,51	6,00
Сырая клетчатка	3,80	4,26
Зола в HCl	0,35	0,89
Линолевая кислота	1,12	3,05
Лизин	1,25	1,10
Метионин	0,60	0,58
Метионин+цистин	0,91	0,86
Треонин	0,82	0,73
Триптофан	0,22	0,20
Лизин уп	0,55	0,98
Метионин уп	0,70	0,54
Метионин+цистин уп	0,77	0,76
Треонин уп	0,70	0,62
Кальций	0,90	0,82
Фосфор	0,58	0,51
Фосфор усв	0,44	0,39

1	2	3
Калий	0,74	0,47
Хлор	0,21	0,22
Натрий	0,16	0,16
Хлорид натрия	0,35	0,40

Таблица 3 – Дополнительный ввод БАВ в 1 кг комбикорма из премикса

Компоненты	Возраст содержания, дни	
	1-27	28-35
Витамин А, тыс МЕ/кг	14,00	11,00
Витамин D3, тыс МЕ/кг	5,00	5,00
Витамин Е, мг/кг	80,00	50,00
Витамин К3, мг/кг	4,00	3,00
Витамин В1, мг/кг	4,00	2,00
Витамин В2, мг/кг	9,00	8,00
Витамин В3, мг/кг	15,00	12,00
Витамин В4, мг/кг	400,00	350,00
Витамин В5 (ниацин)/РР, мг/кг	60,00	50,00
Витамин В6, мг/кг	4,00	3,00
Витамин Вс (фолиевая к-та), мг/кг	2,00	1,50
Витамин В12, мг/кг	0,020	0,020
Витамин Н (биотин), мг/кг	0,200	0,180
Железо, мг	40,0	40,0
Марганец, мг	100,0	100,0
Цинк, мг	100,0	100,0
Медь, мг	15,0	15,0
Йод, мг	1,0	1,0
Селен, мг	0,30	0,30
Эндокс, мг	124,0	125,0
Ровабио эксель АП, мг	50,00	50,00
Хостазим Р 10000, мг	50,00	50,00

Учитываемые показатели:

- сохранность цыплят-бройлеров с учетом причин отхода за период опыта, %;
- живая масса еженедельно, индивидуально, г;
- потребление кормов групповое, за весь период выращивания, кг на голову;
- затраты кормов на 1 кг прироста живой массы за период опыта, кг;
- исследование микрофлоры слепых отростков кишечника.

2.8 Определение состава микрофлоры слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров молекулярно-генетическим методом

В конце эксперимента на 35 сутки проводили отбор проб химуса слепых отростков кишечника от трех птиц из каждой группы.

Тотальную ДНК выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Бактериальное сообщество слепой кишки оценивали методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с праймерами для V3-V4 региона 16S рРНК. Прямой праймер:

5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3';

обратный

праймер: 5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. ПЦР проводили при следующих условиях: 3 мин при 95°C; 30 с при 95°C, 30 с при 55 °C, 30 с при 72°C (необходимо для удлинения последовательности) (25 циклов); 5 мин при 72°C (окончательное удлинение). Секвенирование осуществляли при помощи реагентов для подготовки библиотек Nextera® XT IndexKit («Illumina, Inc.», США), для очистки ПЦР-продуктов Agencourt AMPure

XP («Beckman Coulter Inc.», США) и для проведения секвенирования MiSeq® ReagentKit v2 (500 cycle) («Illumina, Inc.», США).

Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения QIIME2 ver. 2020.8 (<https://docs.qiime2.org/2020.8/>). Фильтрацию шумовых последовательностей проводили с помощью встроенного в пакет QIIME2 метода DADA2, включающего информацию о качестве в свою модель ошибок, что делает алгоритм устойчивым к последовательности более низкого качества, при этом использовали максимальную длину последовательности обрезки, равную 250 п.н. (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). Для построения филогении de novo выполнили множественное выравнивание последовательностей, применяя программный пакет MAFFT. Для анализа таксономии использовали справочную базу данных Silva 138.1 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138.1>).

2.9 Зоотехнический опыт по скармливанию глифосатсодержащего корма и пробиотика «Целлобактерин®+» курам-несушкам

Для изучения влияния пробиотика «Целлобактерин®+» на яичную продуктивность и качество яиц при скармливании кормов, содержащих глифосат, в виварии ООО «БИОТРОФ» в 2021 году был проведен опыт на курах-несушках кросса «Декалб Уайт» в клеточных блоках БН-1 по 22 головы в каждой группе с 394- дневного возраста в течение 5 недель.

Световой, температурный и влажностный режим соответствовали руководству по клеточному содержанию Декалб Уайт.

«Целлобактерин®+» это натуральный комплекс живых бактерий, способствующий лучшему перевариванию клетчатки и улучшению процессов пищеварения, а также выполняющий функции двух кормовых добавок: кормового фермента и пробиотика. В состав «Целлобактерин®+» входит штамм бактерий

Enterococcus faecium 1-35, нанесенный на твердый носитель (отруби).

Схема опыта представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Схема опыта

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 Глифосат	Группа 3 Глифосат Целлобактерин+
Количество голов в группе	22	22	22
Рацион	ОР	ОР	ОР
Введение глифосата	-	40 мг/кг	40 мг/кг
Испытуемая добавка	-	-	Целлобактерин+ 1 кг/т корма

Контрольную группу кормили комбикормом ПК 1-2 Г_444 (ОЭ 254 ккал/100 г) для кур-несушек старше 47 недельного возраста 130 г/гол производства Гатчинского ККЗ (таблицы 5, 6). Опытные группы кормили этим же комбикормом с добавлением глифосата. Глифосат для опытных групп наносили методом крупнодисперсного распыления еженедельно в таком количестве, чтобы конечная концентрация его в кормах, составляла 40 мг/кг корма. Раствор глифосата готовили из коммерчески доступного препарата «Агрокиллер ВР» путем разбавления необходимого количества препарата с водой. Группа 3 в дополнение к основному рациону получала пробиотик «Целлобактерин+» в дозировке 1 кг на 1 тонну комбикорма.

Таблица 5 – Состав комбикорма для кур-несушек в возрасте свыше
47 недель ПК 1-2 Г_444

Состав	В рецепте
Пшеница	48,00
Кукуруза	10,90
Отруби пшеничные	13,00
Шрот подсолнечный	10,20
Белковый концентрат	3,00
Дрожжи кормовые	3,50
Масло растительное	0,55
L-лизин моногидрохлорид	0,31
DL-метионин	0,11
Крупка известняковая	3,50
Ракушка сушеная кормовая калиброванная	1,50
Известняковая мука	4,10
Фосфат дефторированный	0,65
Соль поваренная	0,18
Премикс П1-2 0,5%	0,50

Таблица 6 – Питательность комбикорма для кур-несушек в возрасте свыше 47
недель ПК 1-2 Г_444

Показатели качества			Дополнительно введено БАВ в 1 кг комбикорма из премикса		
Наименование	Единицы измерения	Расчет	Наименование	Единицы измерения	Знач.
1	2	3	4	5	6
Обменная энергия птицы с ферм.	ккал/100г	254	Витамин А	Тыс. МЕ/кг	10,00
Обменная энергия птицы	ккал/100г	247	Витамин D3	Тыс. МЕ/кг	3,00
Влажность, %	%	11,46	Витамин Е	мг/кг	20,00
Сырой протеин	%	15,30	Витамин К3	мг	3,00
Сырой жир	%	2,97	Витамин В1	мг	1,00
Сырая клетчатка	%	4,59	Витамин В2	мг	4,00

1	2	3	4	5	6
Зола в HCl	%	0,64	Витамин B3	мг	10,00
Линолев.к-та	%	1,31	Витамин B4	мг	400,00
Лизин (общ)	%	0,70	Витамин B5 (ниацин PP)	мг	30,00
Метионин (общ)	%	0,36	Витамин B6	мг	3,00
Мет.+Цистин (общ)	%	0,62	Витамин Bc/ фолиевая кислота	мг	0,50
Треонин (общ)	%	0,46	Витамин B12	мг	0,025
Триптофан (общ)	%	0,19	Витамин H (биотин)	мг	0,100
1	2	3	4	5	6
Аргинин	%	0,91	Fe	мг	60,00
Лизин уп	%	0,62	Mn	мг	70,00
Метионин уп	%	0,33	Zn	мг	50,00
Метионин+ цист уп	%	0,54	Cu	мг	8,00
Треонин уп	%	0,35	Co	мг	0,50
Кальций	%	3,79	J	мг	0,70
1	2	3	4	5	6
Фосфор	%	0,62	Se	мг	0,20
Фосфор (усв)	%	0,33	Натуфос 10000	мг	40,0
Калий	%	0,56	Ронозим Мульти Грей	мг	125,0
Хлор	%	0,22	Эндокс	мг	125,0
Натрий	%	0,16			
Хлорид натрия	%	0,34			

Учитываемые показатели:

- Сохранность кур-несушек с учетом причин отхода за период опыта %;
- Живая масса кур в начале опыта и в конце, индивидуально, г;
- Яйценоскость, учет ежедневно — групповой, шт;
- Интенсивность яйценоскости еженедельно по группам, %;
- Потребление кормов на 1 голову в сутки (учет ежедневный по группам), кг;
- Затраты кормов на 10 штук яиц за период опыта, кг;
- Средняя масса яиц по группам, за период опыта, г;
- Качество скорлупы, качество яиц (индекс формы, индекс белка, индекс желтка) на начало опыта и в конце.

Качество яиц оценивали с помощью методов и инструментов, разработанных на кафедре птицеводства и мелкого животноводства Санкт-Петербургского государственного аграрного университета (Царенко, Васильева, 2016).

Производственную апробацию применения пробиотика «Целлобактерин+» проводили на курах-несушках кросса «Хайсекс Браун» в период 2021-2022гг. в АО «Агрофирма Восток».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Анализ содержания глифосата в образцах кормов растительного происхождения и в комбикормах

Образцы комбикормов и кормов растительного происхождения отбирали на действующих птицеводческих предприятиях, а также на комбикормовых заводах в различных регионах России. Нами (Тюрина, Меликиди и др., 2021) были исследованы образцы на наличие пестицида глифосата (N-фосфометилглицина) методом ИФА. Анализировали следующие виды кормов: комбикорма, премиксы, шроты и жмыхи, зерно пшеницы, ячмень, сою, горох, отруби пшеничные, люпин и др. Наименования образцов представлены на рисунке 4.

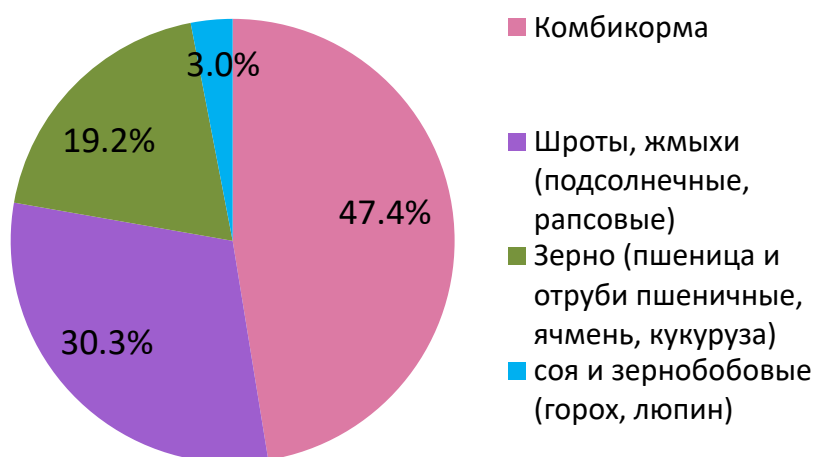


Рисунок 4 – Виды кормов, исследованных на содержание глифосата

Из общего числа исследованных образцов было 49 образцов комбикормов для разных возрастных групп птицы и 50 образцов растительных кормов. Из 99 исследованных образцов в 70 образцах обнаружен глифосат. Глифосат обнаруживали в диапазоне концентраций от $<0,075$ мкг/кг до $0,687 \pm 0,089$ мг/кг. В

29 образцах обнаружили минимальные количества глифосата - ниже допустимого предела определения тест-системой $<0,075$ мг/кг, что показано на рисунке 5.

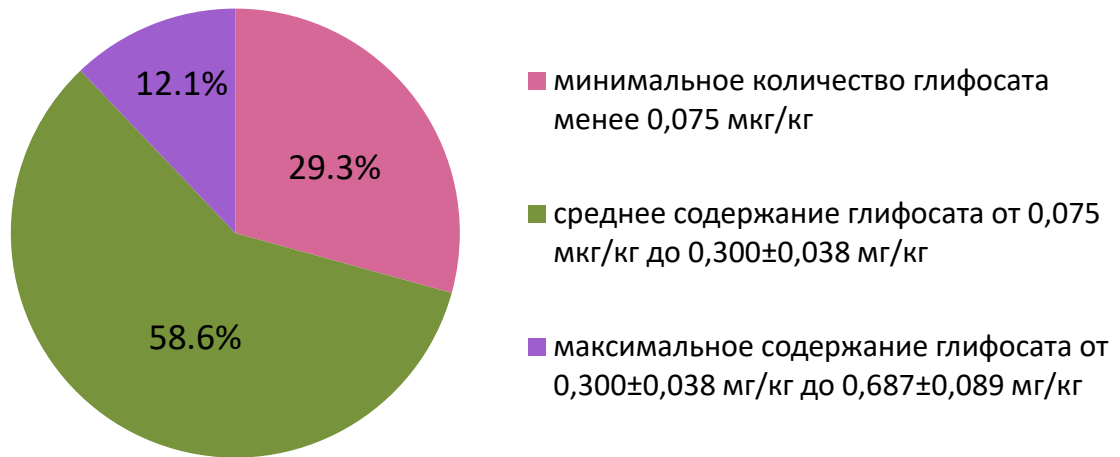


Рисунок 5 – Содержание глифосата в различных видах кормов

Содержание глифосата в растительных кормах сравнивали с действующими нормативами Технического Регламента (ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна»), где приведены следующие максимально допустимые уровни по глифосату: подсолнечник (семена), кукуруза (зерно)– 0,3 мг/кг; зерно хлебных злаков – 3,0 мг/кг; рис, соя (бобы)– 0,15 мг/кг. Содержание глифосата в комбикормах не нормируется в РФ, поэтому мы сравнивали его с существующими нормами по различным видам растительного сырья.

Из общего числа исследованных образцов комбикормов в 29 образцах обнаружили содержание глифосата менее 0,150 мг/кг, что соответствует МДУ на сою. В 17 образцах комбикормов содержание глифосата превышало МДУ (по сое) в 1,06 – 4,6 раза соответственно.

Два образца соевого шрота содержали глифосат в количестве, превышающем МДУ на 37-44%, также 3 образца подсолнечного шрота превышали МДУ (подсолнечник) в 1,7-2,2 раза соответственно.

На рисунке 6 представлены данные по содержанию глифосата в кормах по сравнению с МДУ содержания глифосата для различных продуктов.

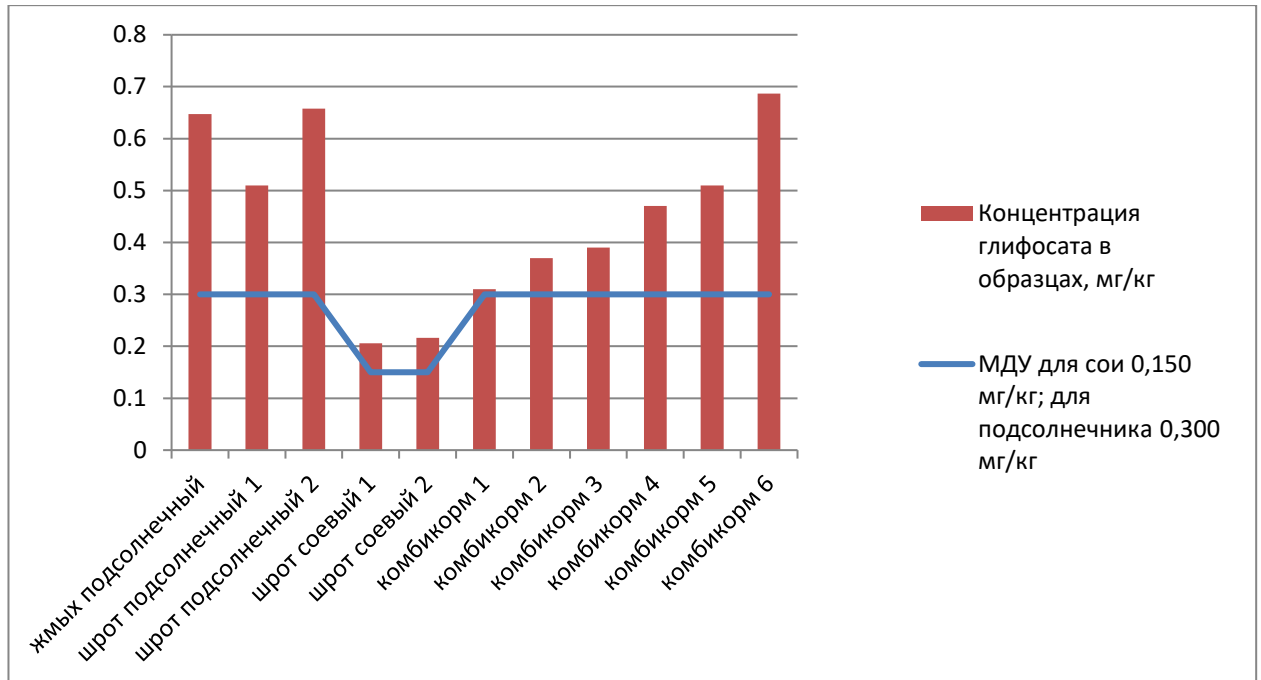


Рисунок 6 – Содержание глифосата в образцах кормов для птицы

Что касается непосредственно комбикормов для птицы, то высокое содержание глифосата (более 0,150 мг/кг) наблюдали в 39% стартовых рационов и в 22% финишных рационов.

3.2 Определение способности бактерий к выживаемости в присутствии глифосатсодержащего препарата

На первоначальном этапе работы по поиску микробиологических агентов - биодеструкторов глифосата необходимо было провести скрининг среди имеющихся в наличии штаммов бактерий на способность выживать в присутствии глифосатсодержащего препарата в различных концентрациях. Концентрации глифосата в инкубируемых смесях подбирали от максимально встречаемой в

комбикормах (по результатам наших исследований) до концентрации, превышающей ПДК для различных растительных культур.

Данные по совместному инкубированию бактерий и глифосатсодержащего препарата представлены на рисунках 7, 8, 9.

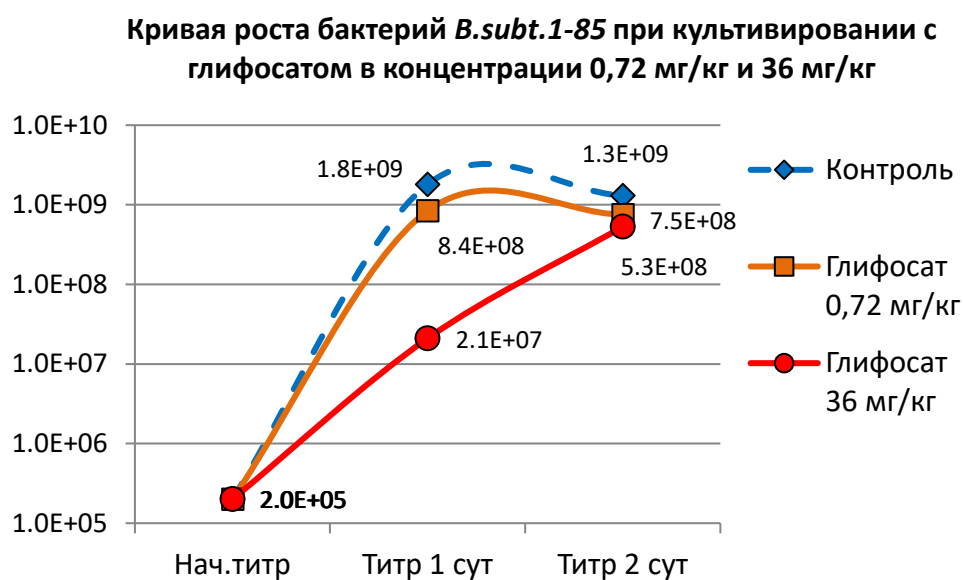
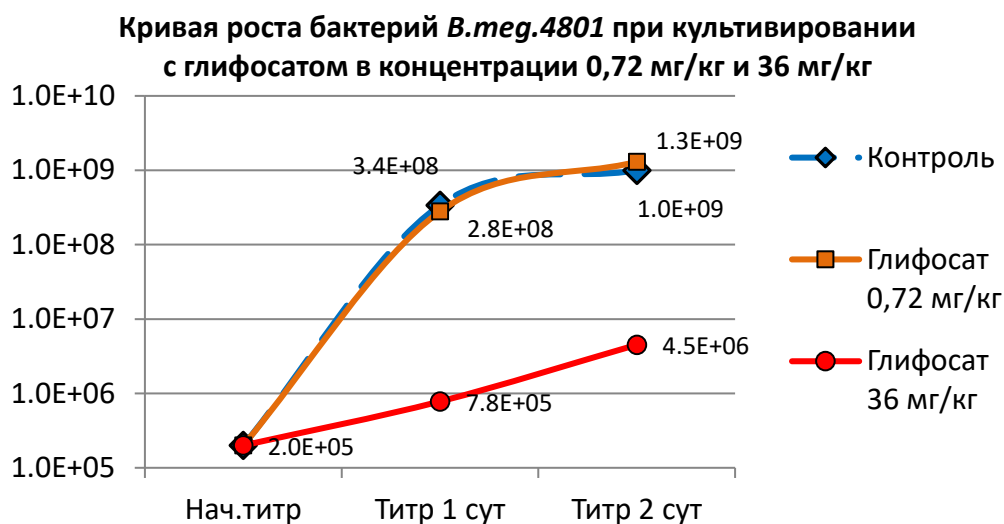
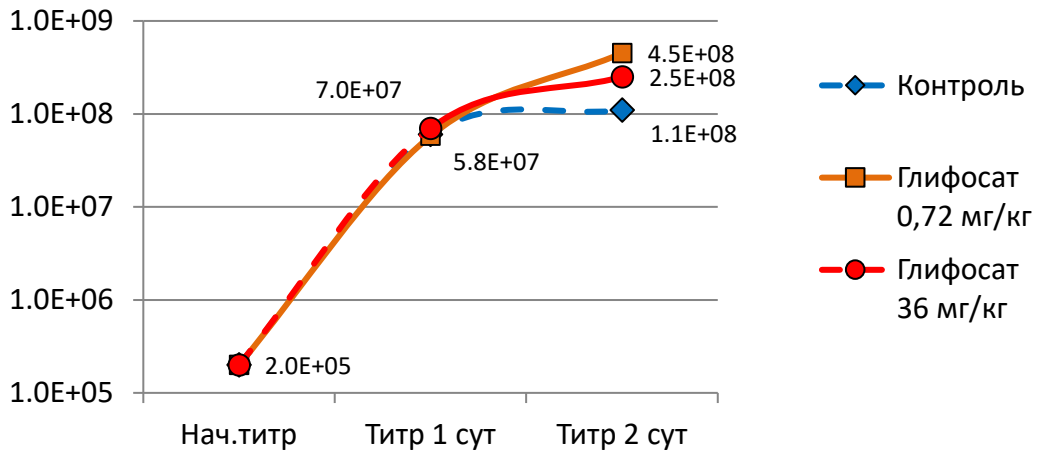


Рисунок 7 – Выживаемость бактерий *Bacillus megaterium* – 4801, *Bacillus subtilis* – 1-85 в питательной среде с различными концентрациями глифосата

Кривая роста бактерий *Ent.faecium 1-35* при культивировании с глифосатом в концентрации 0,72 мг/кг и 36 мг/кг



Кривая роста бактерий *B.subt.111* при культивировании с глифосатом в концентрации 0,72 мг/кг, 36 мг/кг, 300 мг/кг

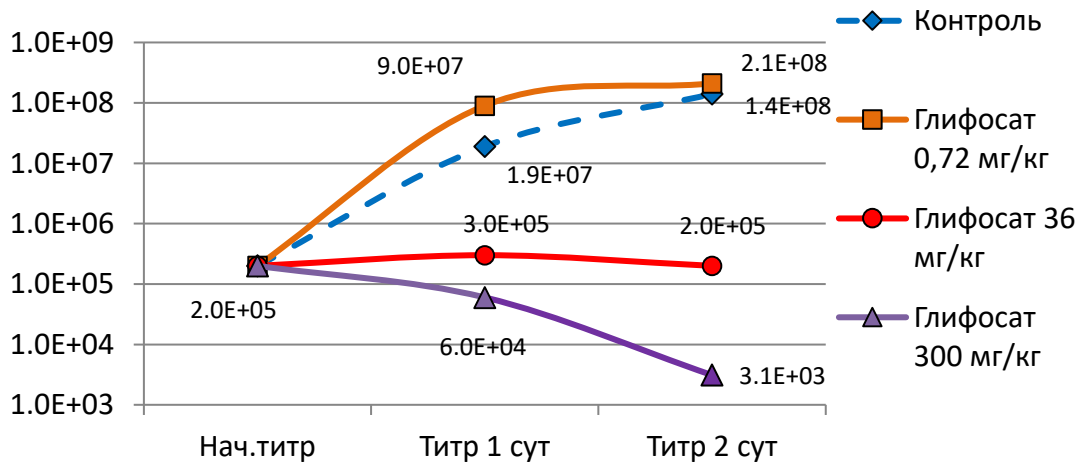


Рисунок 8 – Выживаемость бактерий *Enterococcus faecium 1-35*, *Bacillus subtilis – 111* в питательной среде с различными концентрациями глифосата

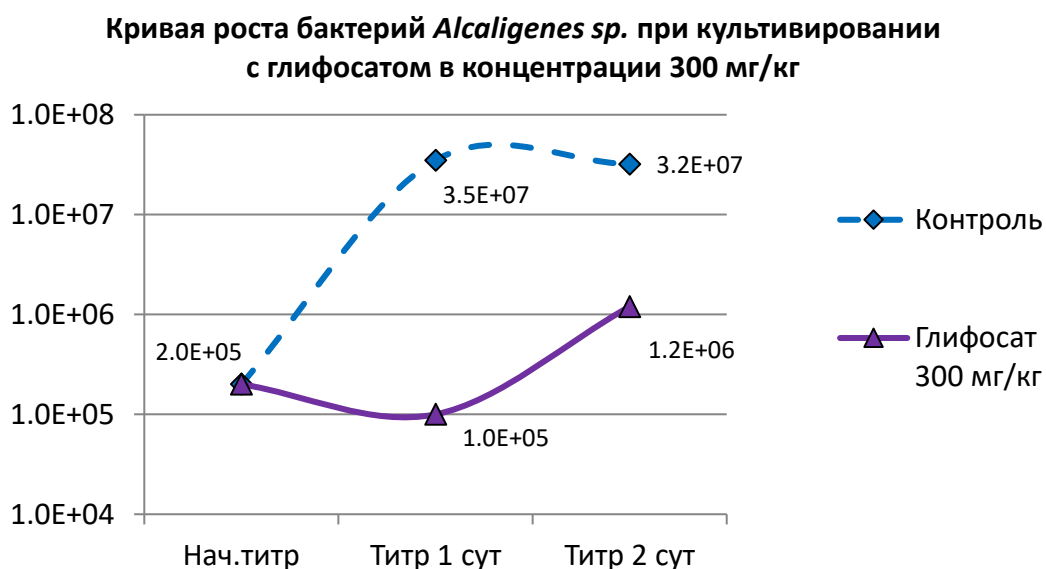
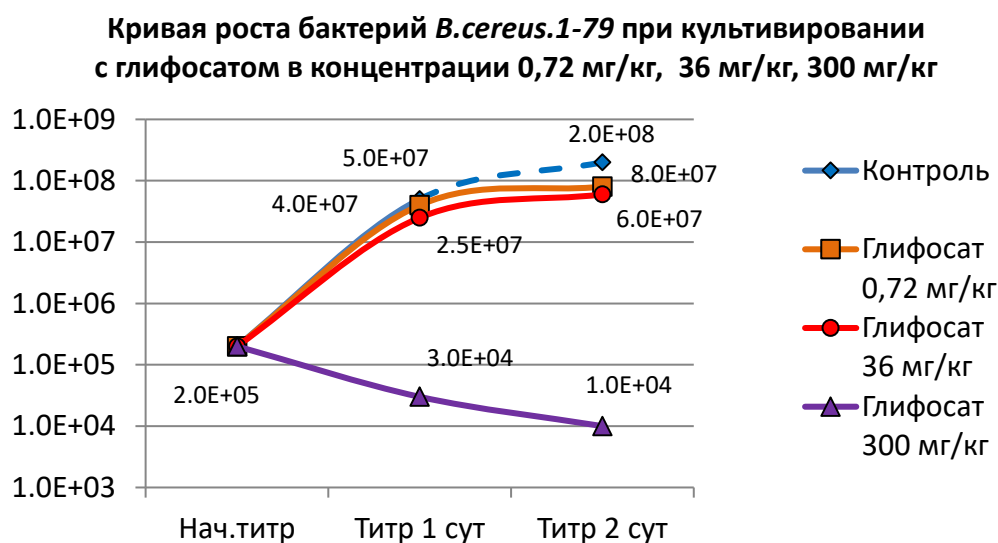


Рисунок 9 – Выживаемость бактерий *Bacillus cereus 1-79*, *Alcaligenes sp.* в питательной среде с различными концентрациями глифосата

Количество жизнеспособных клеток бактерий в исследуемых питательных средах с глифосатсодержащим препаратом и в контрольной среде, КоЕ/мл представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Количество жизнеспособных клеток бактерий, КоЕ/мл (n=3, M±m)

Концентрация глифосата	Титр начальный	Титр 1 сут	Титр 2 сут
<i>Bacillus megaterium -4801</i>			
Контроль 0 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$3,40 \times 10^8 \pm 0,21 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9 \pm 0,07 \times 10^8$
0,72 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9 \pm 0,09 \times 10^9$
36 мг/л	$2,3 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis -111</i>			
Контроль 0 мг/л	$2,1 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7 \pm 0,08 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
0,72 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$9,0 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
36 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$
300 мг/л	$2,2 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$
<i>Bacillus subtilis -1-85</i>			
Контроль 0 мг/л	$2,1 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
0,72 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$8,4 \times 10^8 \pm 0,7 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8 \pm 0,7 \times 10^8$
36 мг/л	$2,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$5,3 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$
<i>Bacillus cereus 1-79</i>			
Контроль 0 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8 \pm 0,07 \times 10^8$
0,72 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$
36 мг/л	$2,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$
300 мг/л	$2,1 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4 \pm 0,09 \times 10^4$
<i>Enterococcus faecium 1-35</i>			
Контроль 0 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$6,0 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
0,72 мг/л	$2,1 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
36 мг/л	$2,2 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
<i>Alcaligenes sp.</i>			
Контроль 0 мг/л	$2,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
300 мг/л	$2,2 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$

Результаты, полученные при культивировании бактерий с глифосатсодержащим препаратом «Торнадо» показали, что пробиотические бактерии способны к росту на среде с глифосатом в концентрации от 0,72 до 36

мг/л. Концентрация глифосата 0,72 мг/л в инкубируемой смеси хорошо переносится всеми исследуемыми видами бактерий. Содержание живых клеток в этом случае примерно равно содержанию клеток в контрольных колбах без глифосата.

При увеличении концентрации до 36 мг/л наблюдали различную реакцию бактерий. Культура *Bacillus megaterium-4801* дольше приспосабливается к изменившимся условиям питательной среды. В течение первых суток клетки бактерий адаптируются к глифосату и к другим веществам, находящимся в препарате «Торнадо». В течение вторых суток происходит рост бактерий примерно на один порядок по сравнению с начальной внесенной концентрацией до значения $4,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ КоЕ/мл. В контрольной и 1-й опытной колбе (концентрация глифосата 0,72 мг/л) через 48 часов роста наблюдали титр $1,00 \times 10^9 \pm 0,07 \times 10^8$ КоЕ/мл и $1,30 \times 10^9 \pm 0,09 \times 10^9$ КоЕ/мл соответственно.

Для культуры *Bacillus subtilis 1-85* характерна быстрая адаптация к изменившимся условиям окружающей среды при добавлении концентрации глифосата 36 мг/л. Титр бактерий в этом варианте на 1-е сутки составил $2,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ КоЕ/мл, и на вторые сутки составил $5,3 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$ КоЕ/мл. В контрольной и 1-й опытной колбе (концентрация глифосата 0,72 мг/л) через 48 часов роста наблюдали титр бактерий $1,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ КоЕ/мл и $7,5 \times 10^8 \pm 0,7 \times 10^8$ КоЕ/мл соответственно.

Культура *Enterococcus faecium 1-35* проявила высокую адаптационную способность к росту в среде с добавлением глифосата в концентрации 36 мг/л. Титр бактерий в этом варианте на 1-е сутки составил $7,0 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$ КоЕ /мл, и на вторые сутки составил $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ КоЕ/мл. В контрольной и 1-й опытной колбе (концентрация глифосата 0,72 мг/л) через 48 часов роста наблюдали титр бактерий $1,1 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ КоЕ/мл и $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ КоЕ/мл соответственно.

В отличие от перечисленных выше бактерий для бактерии *Bacillus subtilis – III* концентрация глифосата 36 мг/л оказалась ингибирующей. При этой концентрации к 1-м суткам культивирования титр бактерий составил всего $3,0 \times 10^5$

$\pm 0,2 \times 10^5$ КоЕ/мл, на 2-е сутки снизился до начальной внесенной концентрации $2,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ КоЕ/мл.

Бактерии *Bacillus cereus* 1-79 обладают адаптационной возможностью к глифосату. Во всех опытных вариантах, включая вариант с концентрацией 0,72 мг/л и с концентрацией 36 мг/л, клетки хорошо адаптируются к исследуемым веществам, при этом титр клеток в трех вариантах, начиная с контрольного, составляет $2,00 \times 10^8 \pm 0,07 \times 10^8$ КоЕ/мл, $8,0 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$ КоЕ/мл и $6,0 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$ КоЕ/мл соответственно. Концентрация 300 мг/л оказала ингибирующее действие на культуру клеток.

В научной литературе часто встречаются данные о способности к биодеструкции среди условно-патогенных бактерий, обитающих в почве, сточных водах и др. средах. Принимая это во внимание, была исследована бактерия *Alcaligenes species*. Культивирование этой бактерии проводили в смеси с высокой концентрацией глифосата 300 мг/л. При этом обнаружили, что культура обладает адаптационной способностью к токсическим веществам в значительной концентрации, но концентрация 300 мг/л глифосата задерживает рост бактерии. Титр клеток в контрольной колбе на 2-е сутки культивирования составил $3,2 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ КоЕ/мл, в опытной колбе – $1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ КоЕ/мл.

Исходя из полученных результатов скрининга бактерий, способных к биодеструкции глифосата, пришли к выводу, о перспективности и дальнейшем проведении исследований с пробиотическими культурами *Bacillus subtilis* 1-85, *Enterococcus faecium* 1-35 и *Bacillus megaterium* - 4801.

3.3 Определение биодеструкции глифосата в инкубируемых смесях методом ИФА

На начальном этапе поиска перспективных бактерий, способных к биодеструкции глифосата, использовали метод иммуноферментного анализа. Основными преимуществами метода ИФА перед другими аналитическими методиками является простота проведения анализа и недорогое оборудование, также простой и быстрый способ пробоподготовки.

Культивирование бактерий проводили с коммерчески доступным препаратом пестицида «Торнадо», где действующим веществом является глифосат (N-фосфонометилглицин). Кроме этого, в составе пестицида «Торнадо» имеются также и другие неизвестные для потребителя вещества, предположительно ПАВы, адъюванты.

Результаты по инкубированию смеси бактерий с глифосатом и изменение концентрации глифосата представлены на рисунке 10. В результате инкубирования бактерий *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus subtilis* 1-85, *Bacillus megaterium*-4801 в питательных средах, содержащих глифосат, обнаружили, что происходит снижение концентрации глифосата на 48%, 45% и на 69% соответственно в течение 48 часов (Тюрина, Меликиди и др., 2021).

Результаты, полученные при культивировании бактерий с препаратом «Торнадо» показали, что пробиотические бактерии являются устойчивыми к глифосату в диапазоне концентраций от 0,72 мг/кг до 36мг/кг, а также к веществам, входящим в коммерческий состав препарата.

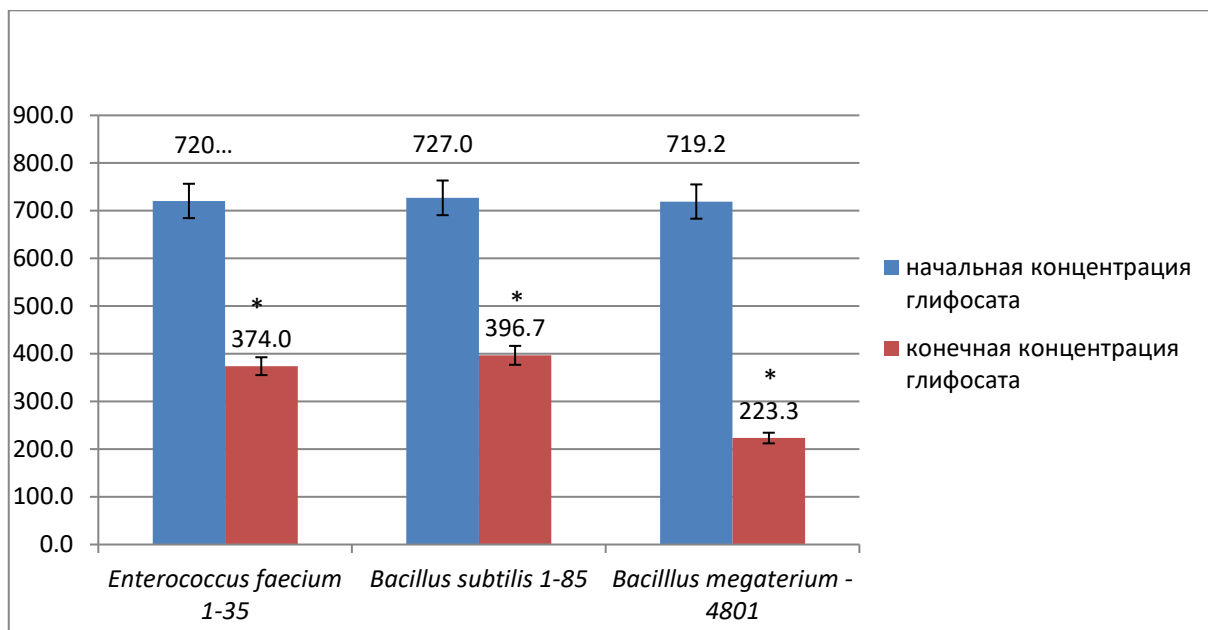


Рисунок 10 – Изменение концентрации глифосата через двое суток инкубирования с бактерией *Enterococcus faecium* 1-35, с бактерией *Bacillus subtilis* 1-85 и *Bacillus megaterium*-4801 соответственно. Отличия в опытных вариантах от контрольных достоверны при $p \leq 0,05$.

3.4 Определение биодеструкции глифосата в инкубируемых смесях методом ВЭЖХ

Для подтверждения результатов, полученных в исследовании по биодеструкции глифосата методом ИФА, провели дополнительное исследование методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ является высокоточным референтным аналитическим методом для определения разнообразных органических веществ.

Результаты проведения эксперимента по биодеструкции чистого вещества глифосата с помощью бактерий в простых питательных средах представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 – Содержание глифосата (N-фосфонометилглицина) в инкубируемой смеси с бактериями *Enterococcus faecium* 1-35 ($M \pm m$, $n=3$)

Наименование пробы	Количество глифосата в пробах, мкг/мл	Изменение содержания глифосата от первоначального уровня содержания глифосата в пробе, %	Титр клеток в растворе инкубирования в экспериментальной колбе (в контрольной колбе), КоЕ/мл	Условия культивирования бактерий
<i>Enterococcus faecium</i> 1-35				
полусинтетическая пит. среда №1	н/о	Контроль фонового уровня - не содержит глифосат	Не содержит клеток бактерий	Анаэробные, Полусинтетическая питательная среда №1 (сахароза, дрожжевой экстракт и др.)
Проба 1 начальная (<i>Enterococcus faecium</i> 1-35+ глифосат стандартный раствор)	4,77 ± 0,18**	100% - принимаем за первоначальный уровень	≈1×10 ⁴ Концентрация клеток в опытной и контрольной колбе в начале культивирования одинаковая	
Проба 2 конечная (<i>Enterococcus faecium</i> 1-35+ глифосат стандартный раствор)	2,46 ± 0,09**	-48% Убыль глифосата в культуральной жидкости <i>Enterococcus faecium</i> 1-35 по окончании инкубирования	Концентрация клеток по окончании культивирования 7,0 ×10 ⁸ ± 0,5×10 ⁸ Опытная колба (7,4 ×10 ⁸ ± 0,1×10 ⁸ Контрольная колба)	

н/о – концентрация ниже порогового значения определения данным методом

** При $p \leq 0,01$

Таблица 9 – Содержание глифосата (N-фосфонометилглицина) в инкубируемой смеси с бактериями *Bacillus subtilis* 1-85 ($M \pm m$, $n=3$)

Наименование пробы	Количество глифосата в пробах, мкг/мл	Изменение содержания глифосата от первоначального уровня содержания глифосата в пробе, %	Титр клеток в растворе инкубирования в экспериментальной колбе (в контрольной колбе), КоЕ/мл	Условия культивирования бактерий
<i>Bacillus subtilis</i> 1-85				
синтетическая пит. среда №2	н/о	Контроль фонового уровня - не содержит глифосат	Не содержит клеток бактерий	Аэробные, синтетическая питательная среда №2
Проба 3 начальная (<i>Bacillus subtilis</i> 1-85+ глифосат стандартный раствор)	$5,05 \pm 0,19^{**}$	100% - принимаем за первоначальный уровень	$\approx 1 \times 10^4$ Концентрация клеток в опытной и контрольной колбе в начале культивирования одинаковая	(сахароза, соли сульфата, фосфата, хлорида)
Проба 4 конечная (<i>Bacillus subtilis</i> 1-85 + глифосат стандартный раствор)	$3,61 \pm 0,14^{**}$	28% Убыль глифосата в культуральной жидкости <i>Bacillus subtilis</i> 1-85 по окончании инкубирования *С учетом испарения жидкости в пробе убыль составляет 32,8%	Концентрация клеток по окончании культивирования в опытной колбе $7,9 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$ (в контрольной колбе $4,3 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$)	

н/о – концентрация ниже порогового значения определения данным методом

** При $p \leq 0,01$

Для условий аэробного культивирования бактерий представлен коэффициент пересчета, учитывающий уменьшение объема культуральной жидкости за двое суток культивирования из-за испарения воды. Количество инкубируемой смеси

уменьшается на 6%. Если предположить, что начальная концентрация глифосата не изменилась, то с учетом испарения воды за двое суток культивирования, концентрация глифосата должна быть больше начальной. Поэтому для теоретического расчета начальной концентрации применяем коэффициент пересчета 1,064. Коэффициент пересчета равен отношению первоначального объема инкубируемой среды в колбе к объему инкубируемой среды в колбе через двое суток инкубирования $K = 40/37,6 = 1,064$.

При проведении инкубирования *Enterococcus faecium* 1-35 с глифосатом в полусинтетической питательной среде №1 определили, что концентрация глифосата в конечном образце через двое суток инкубирования уменьшилась на 48% от первоначально внесенной концентрации. Проверенная проба чистой питательной среды при этом не давала никакого фонового уровня сигнала, аналогичного глифосату. При этом в этой серии опытов титр клеток *Enterococcus faecium* 1-35 составил $7,0 \times 10^8 \pm 0,5 \times 10^8$ КоЕ/мл в опытной колбе и $7,4 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ КоЕ/мл в контрольной колбе соответственно, т.е. *Enterococcus faecium* 1-35 хорошо растет в присутствии глифосата.

При проведении инкубирования *Bacillus subtilis* 1-85 и глифосата в синтетической питательной среде №2 определили, что концентрация глифосата в конечном образце через двое суток инкубирования уменьшается на 32,8% от первоначальной. Проверенная проба чистой питательной среды при этом не давала никакого фонового уровня сигнала, аналогичного глифосату. В этой серии опытов титр клеток *Bacillus subtilis* 1-85 составил $7,9 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$ КоЕ/мл в опытной колбе и $4,3 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ КоЕ/мл в контрольной колбе, что дополнительно указывает на то, что в среде бедного состава глифосат утилизируется бактерией *Bacillus subtilis* 1-85 как дополнительный источник фосфора и углерода, и при этом стимулировал рост культуры сильнее, чем в контрольной колбе, где не было этого дополнительного источника питания.

После проведения опыта по методике ВЭЖХ подтвердили, что выбранные бактерии способны разрушать глифосат в питательной среде. При этом культуры

показали способность к разрушению глифосата в условиях более высокой начальной концентрации 5мкг/мл по сравнению с концентрацией 0,72 мкг/мл, которую использовали в предыдущем опыте. В случае с *Bacillus subtilis* 1-85 снижение глифосата происходит на 33% от первоначально внесенной концентрации. Для бактерии *Enterococcus faecium* 1-35 снижение глифосата происходит на 48% от первоначально внесенной концентрации. Способность бактерий к биодеструкции глифосата в более высокой концентрации, вероятно, связана с тем, что в пробах использовали чистое вещество глифосат. В предыдущем опыте использовали глифосатсодержащий препарат, многокомпонентный состав которого, возможно, усложняет биодеструкцию глифосата.

Результаты по биодеструкции глифосата пробиотическими видами бактерий, полученные в опыте, согласуются с работами, представленными другими исследователями, проводившими изучение способности различных видов бактерий к биодеструкции глифосата в питательных средах, в образцах почвы и др. образцах (Singh et al., 2020; Sviridov et al., 2015; Ezaka et al., 2018).

3.5 Оценка выживаемости бактерий в имитированных условиях желудочно-кишечного тракта *in vitro*

Для подтверждения эффективного действия пробиотиков в условиях желудочно-кишечного тракта птицы, было проведено исследование по способности бактерий выживать в имитируемых условиях желудка и кишечника птиц. Результаты, полученные в исследовании, представлены в таблицах 10, 11.

Таблица 10 – Выживаемость бактерий в пробах при имитации условий желудка *in vitro* ($M \pm m$, $n=3$)

Объем смеси	Состав инкубируемой смеси	Количество фермента	Титр, КоЕ/мл 0 часов	Титр, КоЕ/мл 1,5 ч	Доля, % выживших бактерий
<i>Enterococcus faecium 1-35</i>					
10мл	ЦФБР рН 3.6	Пепсин 5мг/мл	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(4,5 \pm 0,2) \times 10^4$	80%
10мл	ЦФБР рН 3.6	Пепсин 5мг/мл	$(4,6 \pm 0,2) \times 10^5$	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^5$	100%
10мл	ЦФБР рН 3.6	Пепсин 5мг/мл	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^6$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^6$	100%

Таблица 11 – Выживаемость бактерий в пробах при имитации условий кишечника *in vitro* ($M \pm m$, $n=3$)

Объем смеси	Состав инкубируемой смеси	Количество фермента	Титр, КоЕ/мл 0 часов	Титр, КоЕ/мл 18 ч	Доля, %, выживших бактерий
<i>Enterococcus faecium 1-35</i>					
10 мл	ЦФБР рН 6.6	Панзинорм 25мг/мл	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^7$	100% и наблюдается рост бактерий
<i>Bacillus megaterium 4801</i>					
10 мл	ЦФБР рН 6.6	Панзинорм 25мг/мл	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^5$	$(6,1 \pm 0,5) \times 10^7$	100% и наблюдается рост бактерий
<i>Bacillus subtilis 1-85</i>					
10 мл	ЦФБР рН 6.6	Панзинорм 25мг/мл	$(4,2 \pm 0,3) \times 10^6$	$(4,1 \pm 0,3) \times 10^8$	100% и наблюдается рост бактерий

В результате прохождения отделов желудочно-кишечного тракта с их специфическими условиями – кислотностью и составом ферментов, бактерии показали хорошую устойчивость. Бактерии *Enterococcus faecium 1-35* сохранились

на 80% в условиях желудка и на 100% в условиях кишечника, кроме того, показали способность к росту и размножению в условиях кишечника. Бактерии *Bacillus subtilis* 1-85, *Bacillus megaterium* -4801 сохраняются в условиях желудка в кислой среде и в присутствии фермента пепсин. В условиях кишечника эти виды бактерий проявляют способность к росту, титр увеличивается на два порядка по сравнению с исходным титром (Меликиди и др., 2020).

Для того, чтобы оценить влияние желчных кислот на выживаемость бактерий, был проведен опыт по совместному инкубированию бактерий с желчными кислотами в разных концентрациях. Результаты показаны на рисунке 11.

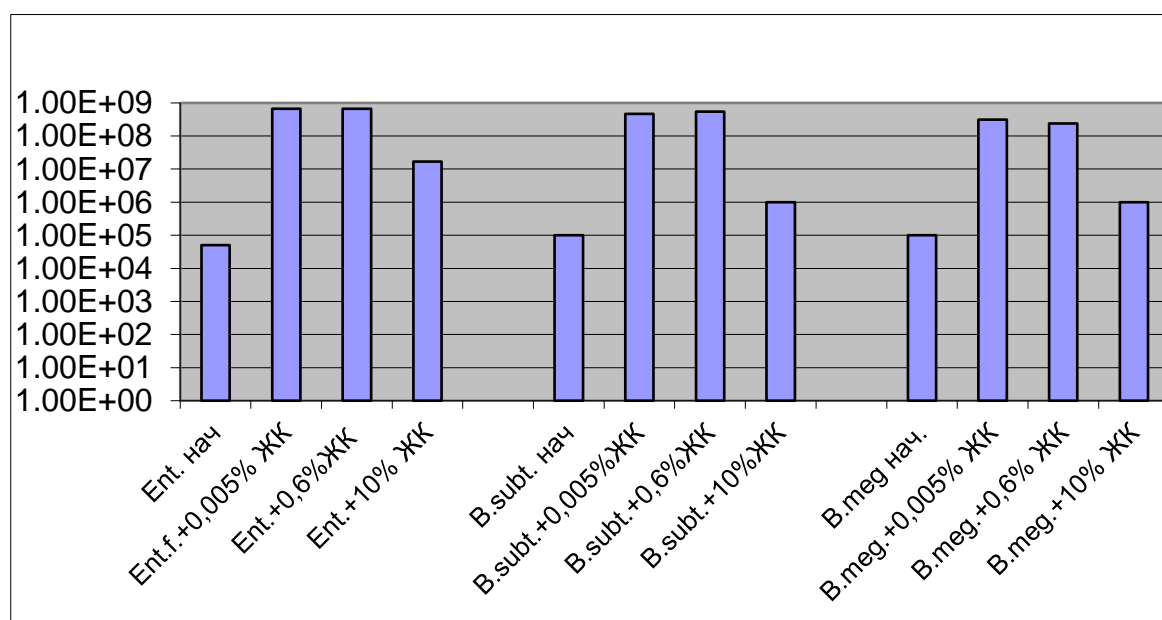


Рисунок 11 – Выживаемость бактерий при инкубировании в присутствии 0,005%; 0,6% и 10% желчных кислот

Под действием желчных кислот количество микроорганизмов *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus subtilis* 1-85, *Bacillus megaterium* 4801 увеличилось на несколько порядков. Таким образом, желчные кислоты повлияли как ростостимулирующий фактор для пробиотических бактерий.

3.6 Исследование метаболитного профиля пробиотических бактерий *Bacillus megaterium* - 4801 и *Enterococcus faecium* 1-35

На начальном этапе анализа метаболитного профиля бактерий определяли общие характеристики, такие как рН, содержание белка, количество сухого остатка.

В таблице 12 представлены данные исследования культуральной жидкости бактерий рода *Bacillus megaterium*-4801 и *Enterococcus faecium* 1-35 и соответствующих питательных сред, на которых были выращены эти бактерии.

Таблица 12 – Общие характеристики бактерий ($M \pm m$, $n=3$)

Показатель	Результат измерений			
	Питательная среда для <i>Bacillus megaterium</i> -4801	Образец <i>Bacillus megaterium</i> -4801	Питательная среда для <i>Enterococcus faecium</i> 1-35	Образец <i>Enterococcus faecium</i> 1-35
рН (24,5 °С)	6,30±0,01	8,70±0,02	6,87±0,03	5,12±0,01
Общий белок, мг/мл	3,80±0,09	6,80±0,07	4,8±0,09	2,7±0,02
Сухой остаток (105°С), %	3,25±0,04	1,60±0,02	1,65±0,03	1,2±0,03

Данные по характеристикам бактерии *Bacillus megaterium* -4801 показывают, что в присутствии бактерий заметно повышается рН раствора. Кроме того, культивирование сопровождается значительным увеличением содержания в образце общего белка и характерным снижением веса сухого остатка в 2,03 раза.

Данные по характеристикам бактерии *Enterococcus faecium* 1-35 показывают, что в присутствии бактерий снижается рН раствора, а также содержание в нем общего белка в 1,8 раза и сухого остатка в 1,4 раза.

Снижение сухого остатка в питательных средах указывает на расходование минеральных солей и других питательных веществ на синтез различных органических соединений и микробной массы бактерий.

Изменение кислотности среды в кислую или щелочную область указывает пути направления синтеза метаболитов. Так, при анализе *Enterococcus faecium* 1-35 определили накопление молочной и уксусной кислот, и одновременно, с этим регистрировали снижение рН КЖ. У бактерии *Bacillus megaterium* -4801, наоборот, регистрировали синтез белковых соединений в КЖ и смещение значения рН в щелочную сторону.

3.6.1 Определение витаминов группы В в культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* – 4801

Определение выполнено методом внешнего стандарта. Идентификация витаминов группы В производилась по хроматографическим параметрам и спектральным характеристикам. Проводили определение витаминов тиамин (В1), рибофлавин (В2), биотин (В7), фолиевая кислота (В9) и цианокобаламин (В12).

В результате опыта в образце культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* – 4801 обнаружен рибофлавин (В2) в количестве 1,7 мкг/мл. Правильность отнесения подтверждается рисунком 12. Витамин В2 имеет важное значение для цыплят-бройлеров. Дефицит витамина приводит к потере аппетита и отставанию в росте, появлению поносов, перерождению печени, нервным параличам и большой смертности. Недостаток витамина В2 в рационах кур-несушек оказывает неблагоприятное действие на развитие эмбриона. В желтке инкубационных яиц кур витамин В2 составляет в норме 3-4 мкг/г (Фисинин, 2011).

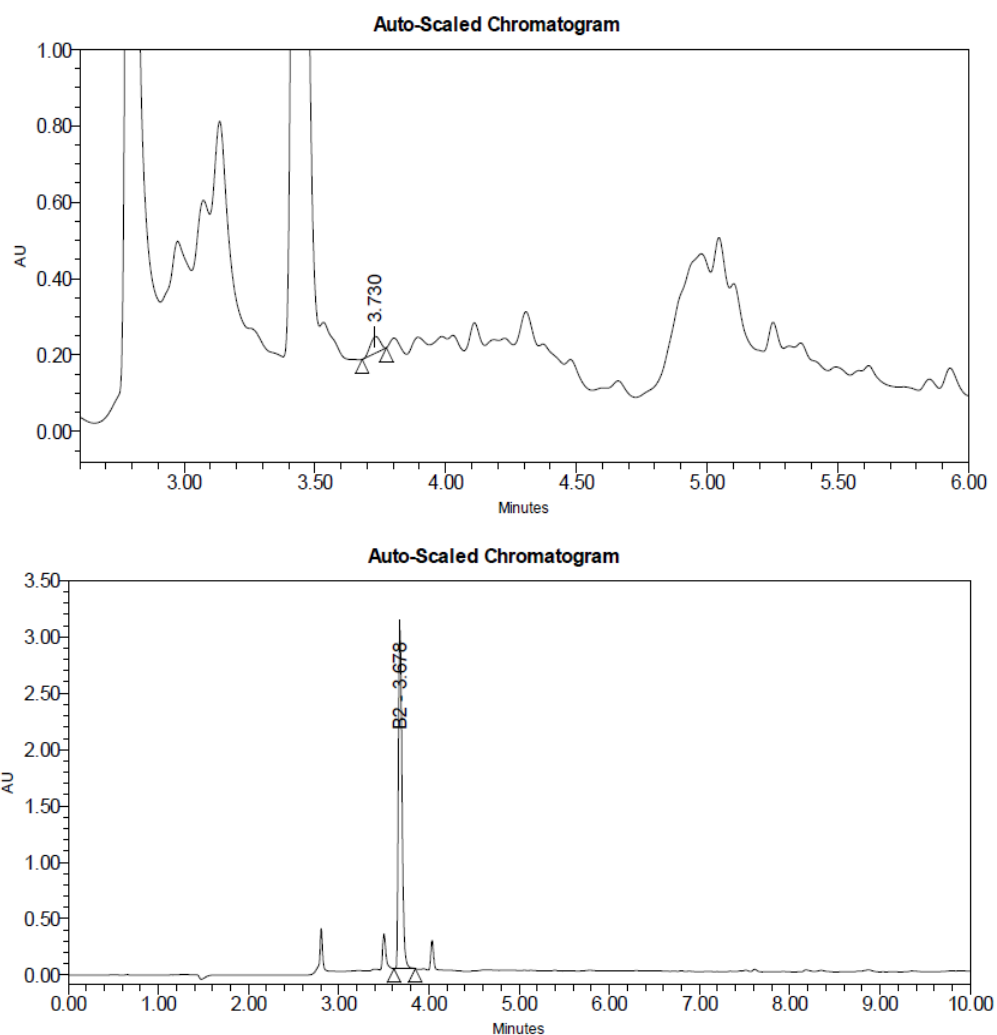


Рисунок 12 – Идентификация витамина В₂ в образце КЖ *Bacillus megaterium* -4801 по хроматографическим параметрам удерживания:
сверху – референтный образец, снизу – образец КЖ бактерии

3.6.2 Определение аминокислот методом УЭЖХ-СФ

Анализ выполнен методом внешнего стандарта. Демонстрационные материалы представлены на рисунке 13, 14 а результаты измерений – в таблице 13, 14.

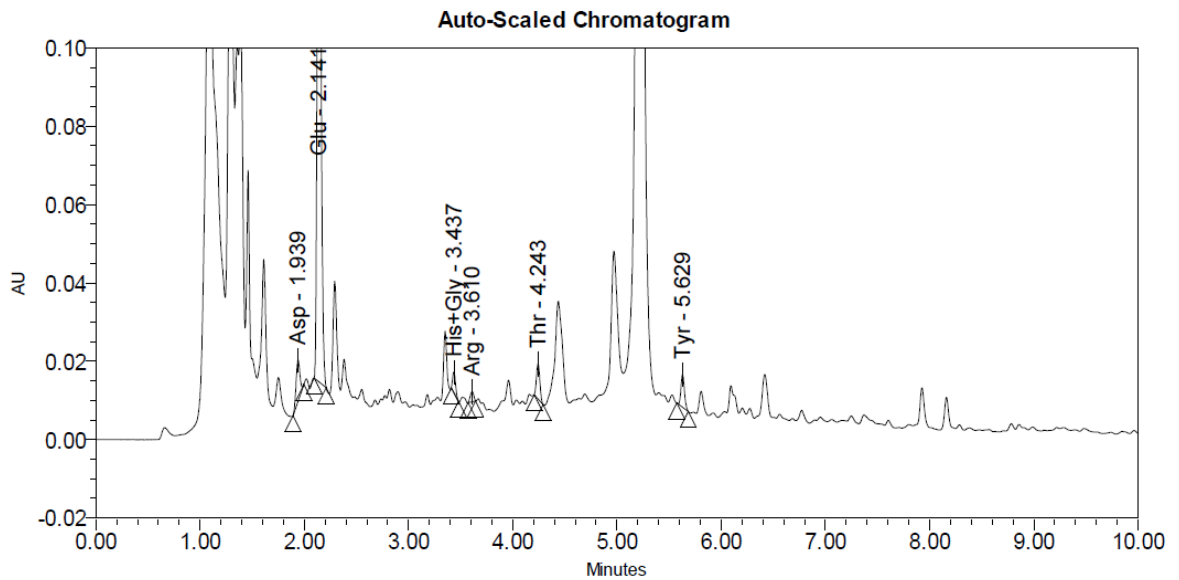
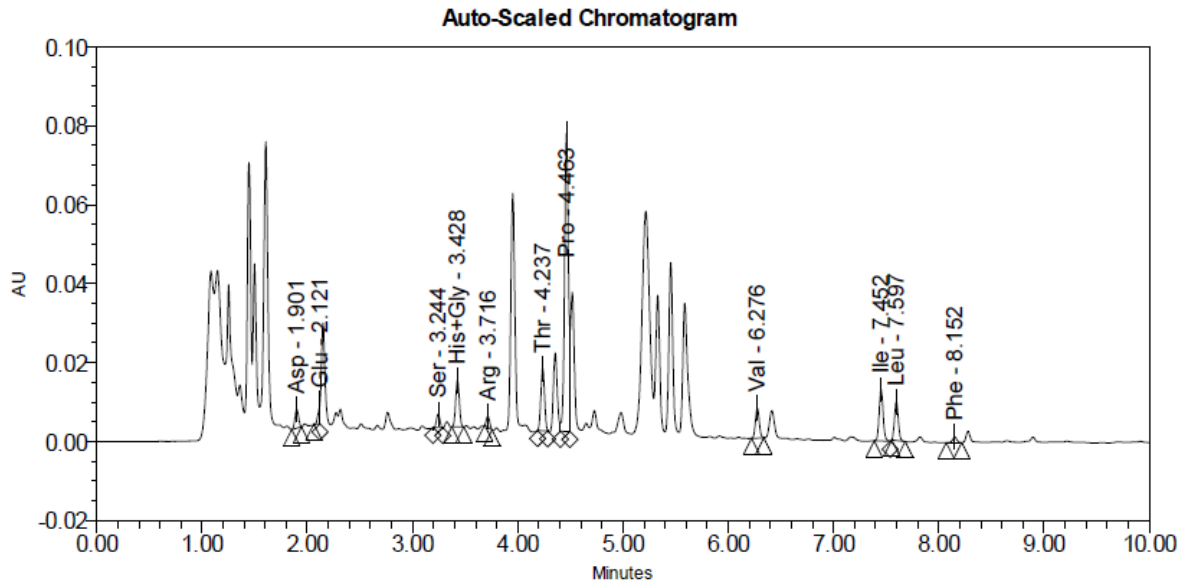


Рисунок 13 – Определение аминокислотного состава культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* -4801 (снизу) и его питательной среды (сверху)

Таблица 13 – Аминокислотный состав культуральной жидкости *Bacillus megaterium* -4801 и питательной среды

Аминокислота	Содержание, мкг/мл	
	Питательная среда	Образец КЖ <i>Bacillus megaterium</i> -4801
1	2	3
Аспарагиновая кислота	4,7	10,8
Глутаминовая кислота	1,4	100,6

1	2	3
Оксипролин	н/о	н/о
Аспарагин	н/о	н/о
Серин	н/о	2,0
Глицин +Гистидин	1,9	0,7
Аргинин	4,1	4,0
Треонин	12,0	0,6
Аланин	н/о	н/о
Пролин	15,0	н/о
Тирозин	н/о	3,5
Валин	8,3	н/о
Метионин	н/о	н/о
Цистеин	н/о	н/о
Изолейцин	5,7	н/о
Лейцин	9,3	н/о
Фенилаланин	0,7	н/о
Триптофан	н/о	н/о
Лизин	н/о	н/о
Суммарно	63,1	122,2

н / о – не обнаружена

Экспериментальные данные показывают, что в образце КЖ *Bacillus megaterium* - 4801 идентифицировано всего 7 аминокислот, но при этом их суммарное содержание почти в 2 раза выше, чем в образце питательной среды, насчитывающем 10 аминокислот. Эффект обеспечивается за счет выделения в КЖ бактерий *Bacillus megaterium* -4801 большого количества глутаминовой кислоты 100мкг/мл (Меликиди и др., 2019а).

Глутаминовая кислота принимает участие в обмене белков и углеводов. Она способствует связыванию, обезвреживанию и выведению из организма аммиака, участвует в синтезе аргинина и пролина, пуринов и пиримидинов, в транспорте ионов калия. Помимо глутаминовой кислоты бактерия синтезирует тирозин, серин и аспарагиновую кислоту.

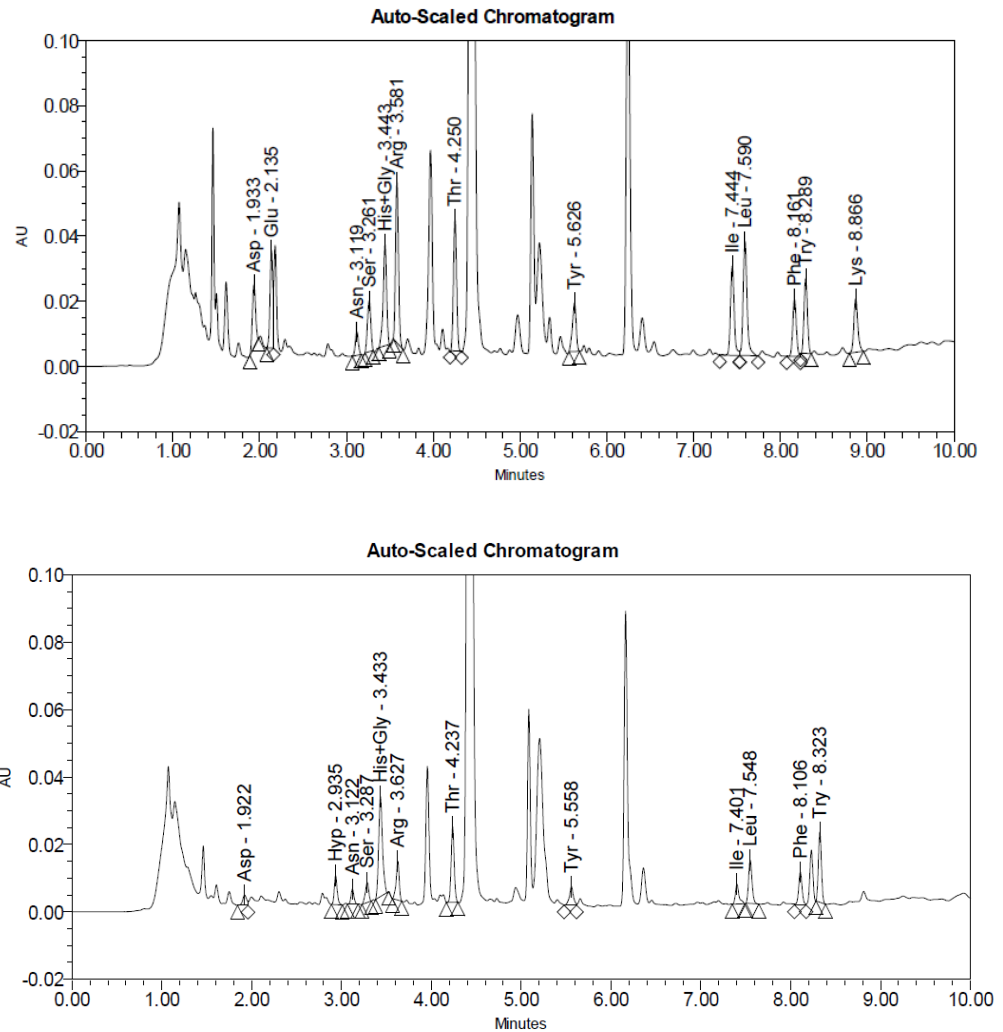


Рисунок 14 – Определение аминокислотного состава культуральной жидкости бактерий *Enterococcus faecium* 1-35 (снизу) и его питательной среды (сверху)

Таблица 14 – Аминокислотный состав культуральной жидкости *Enterococcus faecium* 1-35 и питательной среды

Аминокислота	Содержание, мкг/мл	
	Питательная среда	Образец КЖ <i>Enterococcus faecium</i> 1-35
1	2	3
Аспарагиновая кислота	20,2	3,85
Глутаминовая кислота	14,3	н/о
Оксипролин	н/о [*]	1,6
Аспарагин	10,8	6,2

1	2	3
Серин	9,7	3,6
Глицин +Гистидин	5,8	5,9
Аргинин	77,9	18,2
Треонин	32,2	16,6
Аланин	н/о	н/о
Пролин	н/о	н/о
Тирозин	8,0	3,0
Валин	н/о	н/о
Метионин	н/о	н/о
Цистеин	н/о	н/о
Изолейцин	13,5	2,7
Лейцин	41,2	13,0
Фенилаланин	9,0	4,6
Триптофан	13,0	10,2
Лизин	16,8	н/о
Суммарно	272,4	89,45

*) не обнаружена

Экспериментальные данные показывают, что в образце *Enterococcus faecium 1-35* суммарное содержание аминокислот почти в 3 раза ниже, чем в образце сравнения (питательная среда). При этом уровни большинства индивидуальных аминокислот падают примерно в 2-5 раз, что говорит о необходимости для роста культуры питательных веществ – аминокислот.

Взаимодействия различных членов бактериального сообщества кишечника птицы на уровне метаболома выявляют способность одних видов бактерий синтезировать питательные вещества, которые в свою очередь потребляются другими видами бактерий, способными к продукции полезных для кишечника птицы веществ – например, органических кислот, бактериоцинов и др. веществ. В исследуемом нами пробиотическом препарате бактерия *Bacillus megaterium -4801* является продуцентом ряда аминокислот (глутаминовой кислоты, тирозина,

серина, аспарагиновой кислот), которые в свою очередь утилизирует бактерия *Enterococcus faecium* 1-35, продуцируя молочную и уксусную кислоты.

3.6.3 Определение молекулярной массы пептидов методом Малди

Результаты исследования представлены на рисунке Б.1 в Приложении Б. Они показывают, что в образце КЖ *Bacillus megaterium* - 4801 преобладают пептиды с массой около 2330 Да и в интервале от 1200 до 1800 Да (в том числе пептиды с m/z около 1292 и 1459 Да), в то время как для питательной среды характерно присутствие сигналов более тяжелых соединений с массой около 2590 и 2721 Да.

Результаты исследования представлены на рисунке Б.2 в Приложении Б. Они показывают, что основные компоненты в образце *Enterococcus faecium* 1-35 и его питательной среде совпадают и имеют молекулярную массу в диапазоне от 1650 до 1800 Да. При этом образец сравнения дополнительно содержит несколько более легких пептидов в диапазоне масс от 1000 до 1500 Да (например, с m/z 1036,5 и 1220,5.)

Результаты, полученные по содержанию пептидов в культуральных жидкостях бактерий *Bacillus megaterium* – 4801 и *Enterococcus faecium* 1-35, показывают актуальность продолжения исследований по выявлению активных антимикробных пептидов в культуральных жидкостях соответствующих бактерий.

3.6.4 Определение метаболитного профиля бактерий методом ГЖХ-МС

Обзорная хроматограмма образца *Vacillus megaterium* – 4801 показывает на присутствие 28 летучих компонентов, изображенных на рисунке 15. В таблице 15 дан перечень 19 идентифицированных производных, относящихся к ряду карбоновых кислот.

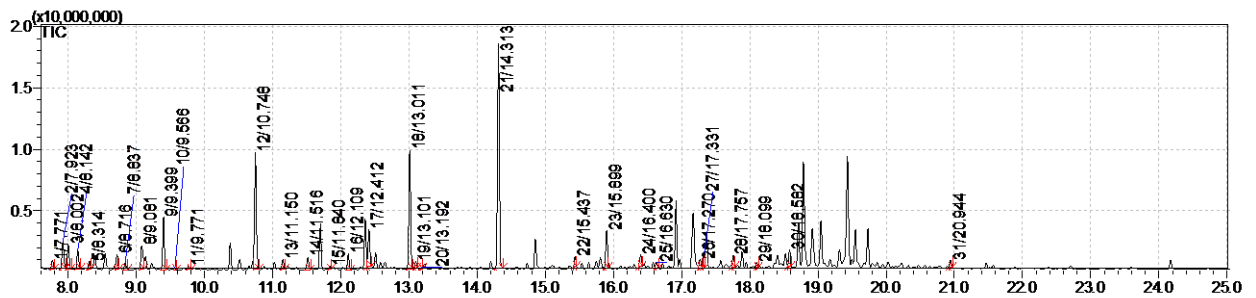


Рисунок 15 – Обзорная хроматограмма ТМСТФА-производных в составе образца КЖ *Vacillus megaterium-4801*

Таблица 15 – Содержание органических кислот и их производных в образце КЖ *Vacillus megaterium-4801*

Компонент	Относительное содержание компонента, % ^{*)} и оценка его массовой концентрации, (мг/мл) ^{**)}	
	Образец КЖ бактерии	Питательная среда
1	2	3
3-метил-3-бутеновая кислота	0,82 (0,05)	
Капроновая кислота	0,84 (0,05)	
Молочная кислота	3,52 (0,2)	89,04 (7,6)
Уксусная кислота	5,55 (0,3)	4,90 (0,4)
2-пропеновая к-та	0,14 (0,008)	
3-гидроксимасляная кислота	13,94 (0,8)	
3-метилмасляная кислота	1,54 (0,08)	
4-метилвалериановая кислота	0,28 (0,015)	

1	2	3
Ацетоуксусная кислота	1,69 (0,09)	
Фосфорная кислота	4,10 (0,2)	6,06 (0,5)
Янтарная кислота	0,63 (0,03)	
Пропионовая кислота	0,18 (0,01)	
Масляная кислота	26,78 (1,5)	
2,3,4-тригидроксимасляная к-та	4,31 (0,2)	
Глутаровая кислота	1,23 (0,07)	
Фенилпропионовая кислота	0,66 (0,04)	
Пантотеновая кислота	0,90 (0,05)	
Фенилуксусная кислота	1,66 (0,09)	
Липоевая кислота	1,64 (0,09)	
Итого:	70,41(3,9)	100,0 (8,5)

*) Метод внутренней нормализации площадей

**) По данным интегрирования и гравиметрии

Согласно данным таблицы 15 совокупность органических кислот в составе образца КЖ *Vacillus megaterium* -4801 включает шесть насыщенных алифатических кислот (C_2 - C_6) и две ненасыщенные, а также три оксикислоты, две фенилзамещенные и две дикарбоновые кислоты. С точки зрения количественных оценок ее основными компонентами являются масляная кислота и соответствующее гидрокси-производное с относительным содержанием около 27 и 14% соответственно. Кроме того, идентифицирована метилмасляная кислота в количестве 1,54%. Среди других классов органических соединений следует отметить присутствие полигидроксисоединения – 2-метилпропантриола с относительным содержанием 13,6% (Лаптев и др., 2020; Меликиди и др., 2019b).

В результате исследования проб КЖ *Enterococcus faecium* 1-35 и питательной среды, установлено, что они содержат одинаковый набор компонентов, включающий молочную, уксусную и фосфорную кислоты. Однако сравнение интенсивности хроматографических сигналов, представленное на рисунке 16,

свидетельствует об увеличении концентрации молочной кислоты в образце КЖ *Enterococcus faecium* 1-35 примерно в 3 раза по сравнению с питательной средой.

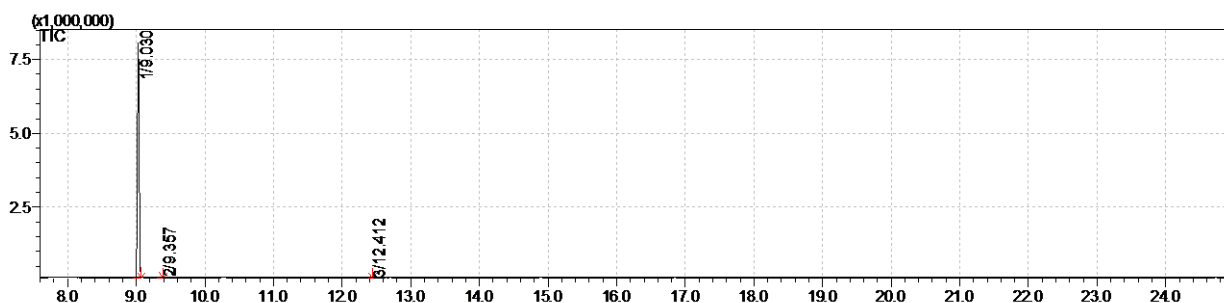


Рисунок 16 – Обзорные хроматограммы ТМСТФА–производных в составе образца КЖ бактерий *Enterococcus faecium* 1-35: 1 – молочная кислота; 2 – уксусная кислота; 3 – фосфорная кислота.

Анализ содержания уксусной кислоты проводили методом добавок с использованием внутреннего стандарта в соответствии с пунктом 2.6. Результаты измерений как среднее трех параллельных определений представлены в таблице 19.

Таблица 16 – Определение уксусной кислоты в культуральной жидкости бактерий *Enterococcus faecium* 1-35 методом ГЖХ-МС ($M \pm m$, $n=3$)

Образец	Содержание уксусной кислоты (мг/мл)
Питательная среда	$0,27 \pm 0,02$
КЖ <i>Enterococcus faecium</i> 1-35	$0,66 \pm 0,03$

Представленные данные позволяют предположить, что в присутствии бактерий *Enterococcus faecium* 1-35 происходит гидролиз белков и обогащение среды органическими кислотами: молочной и уксусной.

3.7 Оценка эффективности применения пробиотика «Пробиоцид-Ультра» при кормлении цыплят-бройлеров комбикормом, содержащим глифосат

Результаты проведения опыта по кормлению цыплят-бройлеров кормом с содержанием глифосата представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Зоотехнические результаты выращивания цыплят-бройлеров

Показатель	Группа		
	I-Контроль	II-Глифосат	III-Глифосат и Пробиоцид-Ультра
1	2	3	4
Поголовье, гол. на начало опыта	40	40	40
На конец опыта	39	40	40
Сохранность %	97,5	100	100
Живая масса при посадке, г	48,0±0,4	47,8±0,5	47,7±0,5
В процентах к контролю, %	100	99,6	99,4
Живая масса на 7-й день, г	159,2±1,8	163,0±1,7	159,8±2,2
В процентах к контролю, %	100,0	102,4	100,4
Живая масса на 14-й день, г	387,2±8,9	415,2±9,0**	394,9±7,5**
В процентах к контролю, %	100	107,2	101,9
Живая масса на 21-й день, г	817,2±12,8	829,4±23,0*	843,8±31,5*
В процентах к контролю, %	100	100,9	102,8
Живая масса на 28-й день, г	1399,8±31,0	1360,0±22,8*	1458,4±30,0*
В процентах к контролю, %	100	97,2	104,2
Живая масса на 35-й день, г	2129,3±42,9	2099,8±39,5*	2189,5±44,1*
В процентах к контролю, %	100	98,6	102,8
Среднесуточный прирост, г	59,46	58,63	61,19
В процентах к контролю, %	100	98,6	102,9
Себестоимость 1 кг привеса, руб.	75,65	77,48	74,81
В % к контролю	100	102,4	98,8
Коэффициент конверсии	1,65	1,68	1,64

*При $p \leq 0,05$, **при $p \leq 0,01$

Внесение в корма глифосата в дозировке 20 мг/кг привело к снижению живой массы бройлеров при убое на 1,4% по сравнению с контролем. При этом, максимальное падение массы было зафиксировано на 28-й день жизни и составило 2,8% по сравнению с контролем. Несмотря на потребление корма с глифосатом, в группе III, получавшей пробиотик «Пробиоцид-Ультра» живая масса бройлеров в 28 дней составила 1458,4 г, что было на 4,2% больше по сравнению с контрольной группой I и на 7,0% больше по сравнению с группой II, получавшей глифосат. К 35-м суткам живая масса группы III, получавшей вместе с глифосатом пробиотик, составила 2189,5г, что было выше на 2,8% чем живая масса в контрольной группе I и на 4,2% выше по сравнению с группой II, получавшей глифосат.

Среднесуточный прирост цыплят за период опыта в группе II, получавшей с кормом глифосат, был снижен на 1,4% по сравнению с контролем, а в группе III, получавшей дополнительно к глифосату пробиотик Пробиоцид-Ультра, среднесуточный прирост был повышен на 2,9% по сравнению с контролем. Добавление пробиотика Пробиоцид-Ультра в группе III, получавшей корм, загрязненный глифосатом, позволило не только нивелировать отрицательное воздействие глифосата на организм бройлеров, но и получить увеличение продуктивности при убое по сравнению с контролем.

Коэффициент конверсии корма в опытной группе III с применением Пробиоцид-Ультра был ниже на 0,6% по сравнению с контрольной группой I, и на 2,4% ниже по сравнению с группой II, получавшей с кормом только глифосат.

Экспериментальные данные позволили нам наблюдать положительную тенденцию по смягчению неблагоприятных эффектов от воздействия глифосата на продуктивность птицы при применении кормовой добавки «Пробиоцид-Ультра».

3.8 Микрофлора цыплят-бройлеров

При проведении NGS-секвенирования микробиома было сгенерировано в общей сложности 57234 секвенированных последовательностей гена 16S рРНК (с медианой считываний 6,134, min = 5,123, max = 7,795).

Были отмечены выраженные отличия между группами по численности микроорганизмов ($P \leq 0,05$), что можно увидеть на рисунке 17. Основной тенденцией являлось снижение численности некоторых представителей нормофлоры на фоне возрастания численности нежелательных форм микроорганизмов.

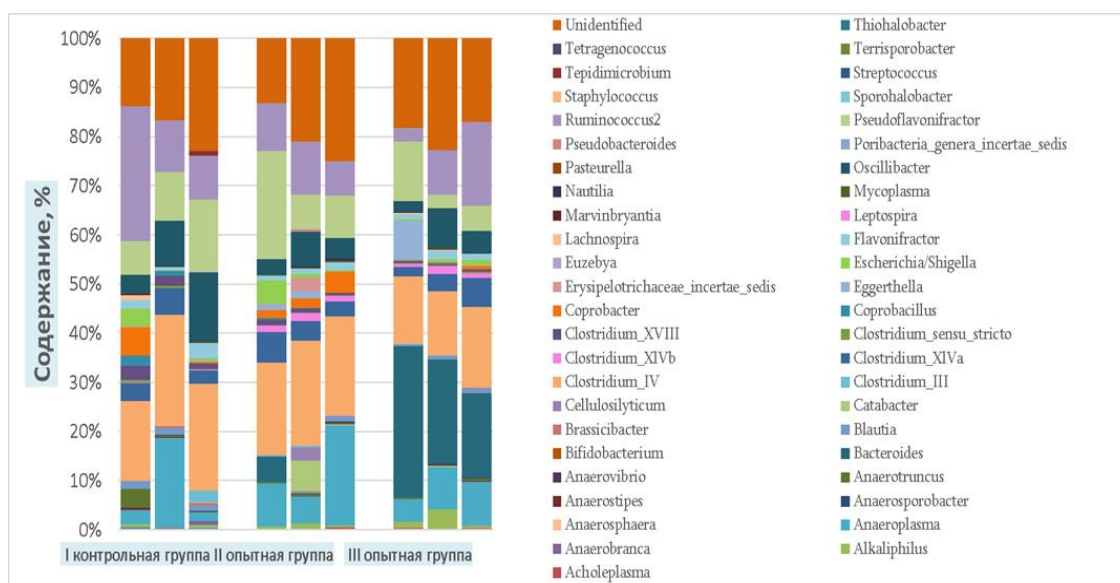


Рисунок 17 – Состав кишечного микробиома цыплят-бройлеров кросса «Росс 308» на уровне бактериальных родов ($P \leq 0,05$) по данным NGS-секвенирования ампликонов 16S рРНК при скормливании глифосата и пробиотика «Пробиоцид-Ультра».

Так, на фоне глифосата в опытных группах II и III снижалось количество представителей филума *Firmicutes* – бактерий рода *Oscillibacter*: $4,1 \pm 0,24$ и $4,1 \pm 0,32\%$ соответственно против $7,5 \pm 0,48\%$ в контрольной группе I ($P \leq 0,05$). Представители *Oscillibacter spp.* являются активными продуцентами валериановой

кислоты как основного конечного продукта метаболизма глюкозы. Валериановая кислота участвует в предотвращении последствий окислительного стресса, снижении экспрессии провоспалительных цитокинов и α -синуклеина с последующим увеличением жизненно важных антиоксидантных ферментов.

На фоне применения глифосата (группа II) происходило также практически полное вытеснение бактерий *Terpidimicrobium* из состава микробиома. Численность данных микроорганизмов снижалась до $0,001 \pm 0,00006\%$, тогда как в контроле I составляла $0,3 \pm 0,02\%$ ($P \leq 0,05$). Данный микроорганизм способен к ферментации труднопереваримых полисахаридов, включая ксилан и целлобиозу, до таких важных продуктов, как ацетат, бутират, пропионат и др. Введение пробиотического штамма микроорганизма (группа III) способствовало некоторому увеличению ($P \leq 0,05$) численности данного рода (до $0,004 \pm 0,0003\%$) по сравнению с группой II.

На фоне глифосата (группа II) вытеснение описанных полезных видов сопровождалось увеличением численности нежелательных таксонов микроорганизмов. Так, например, в группе II возрастала численность представителей *Pseudoflavonifractor* по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$): до $10,7 \pm 0,82$ против $8,7 \pm 0,39\%$. Увеличение численности *Pseudoflavonifractor* связывают с возникновением метаболических расстройств (Wang et al., 2020). В группе III происходило снижение численности представителей *Pseudoflavonifractor* до $5,8 \pm 0,45\%$ по сравнению с группой II ($P \leq 0,05$).

Кроме того, в группе II возрастала численность родов *Staphylococcus*, *Terrisporobacter* и вида *Mycoplasma conjunctivae* по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$). *M. conjunctivae* является возбудителем некоторых заболеваний, например, инфекционного кератоконъюнктивита у сельскохозяйственных животных различных видов. *Terrisporobacter* является анаэробным патогеном. Доказано, что повышение его содержания способствует усилению окислительного стресса у животных.

Важно, что под влиянием пробиотического штамма *Bacillus megaterium*, в группе III происходило снижение численности таких кластридиальных кластеров,

как *Clostridium_III*, *Clostridium_IV*, *Clostridium_sensu_stricto*, *Clostridium_XIVa*, *Clostridium_XIVb*, *Clostridium_XVIII* по сравнению с группой II ($P \leq 0,05$). В сумме эта разница достигала 6,4%. Известно, что виды *Clostridium spp.*, имеют более высокую способность к образованию токсичных или канцерогенных метаболитов среди кишечной микробиоты.

Имеет существенное значение тот факт, что в числе прочих, в нашем эксперименте под влиянием пробиотического штамма *Bacillus megaterium* (группа III) снижалась численность таких видов, как *C. bolteae* и *C. leptum* по сравнению с группой II в 2,2 и 1,7 раза соответственно ($P \leq 0,05$). Наличие *C. bolteae* коррелирует с экспрессией воспалительных генов, связанных как с врожденным, так и с адаптивным иммунитетом.

Интересно, что на фоне введения глифосата (группы II и III) пищеварительную систему птиц колонизировали представители экстремально галофильных (Chun et al., 2019) родов микроорганизмов *Tetragenococcus* и *Sporohalobacter*, которые не присутствовали в контрольной группе I. Интересно, что представители *Sporohalobacter spp.*, известны выраженной способностью к деструкции сложных органических соединений, таких, как нитробензол, о-нитрофенол, м-нитрофенол, п-нитрофенол, нитроанилины, 2,4-динитрофенол, 2,4-динитроанилин (Oren et al., 1991). Возможно, стрессовое воздействие в виде поступления в организм птиц глифосата связано с выживаемостью микроорганизмов, которые обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям, а также имеют в геноме гены биодеструкции. Таким образом, нами было выявлено как представители микробиома кишечника реагируют на изменяющиеся условия среды (Лаптев и др., 2022).

3.9 Оценка эффективности применения пробиотика «Целлобактерин®+» при кормлении кур-несушек комбикормом, содержащим глифосат

Учитывая высокую стоимость изготовления кормовой добавки «Пробиоцид-Ультра», далее было принято решение исследовать действие кормовой добавки «Целлобактерин+» в научно-хозяйственном и производственном опыте на курах-несушках.

Зоотехнические показатели в опыте на курах-несушках представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Зоотехнические показатели в опыте на курах-несушках

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 Глифосат	Группа 3 Глифосат Целлобактерин +
1	2	3	4
Посажено голов	22	22	22
Сохранность кур, %	100	100	100
Живая масса в начале опыта, г	1734,05±30,1	1708,00±29,0	1736,59±31,8
Живая масса в конце опыта, г	1756,50±16,3	1704,50±30,1*	1781,91±17,9*
Средняя масса яиц на начало опыта, г	63,35±0,48	61,86±0,49*	62,93±0,41*
Средняя масса яиц на конец опыта, г	64,00±0,39	61,17±0,57*	63,69±0,44*
Интенсивность яйценоскости до начала опыта (одна неделя), %:	97,40	96,10	95,22
За 1 неделю опыта	94,81	94,81	94,55
За 2 неделю опыта	95,45	94,10	95,65
За 3 неделю опыта	94,16	94,80	95,17
За 4 неделю опыта	93,61	92,08	95,41
За 5 неделю опыта	93,75	93,03	95,57
Средняя за 5 недель опыта	94,36	93,76	95,27
Яйценоскость на среднюю несушку за период опыта, шт.	33,03	32,82	33,46

1	2	3	4
% к контролю	100	99,36	101,3
Затраты кормов: на 10 яиц, кг	1,28	1,30	1,23
% к контролю	100	101,6	96,1
на 1 кг яичной массы, кг	1,99	2,10	1,91
% к контролю	100	105,5	95,9

При * $p \leq 0,05$

Сохранность птицы за время опыта во всех группах была 100%.

В течение опыта продуктивность в контрольной группе 1 снижалась и за пять недель снизилась на 3,12%. В группе 2 с глифосатом продуктивность после ввода загрязненных кормов снизилась на 2,43% по сравнению с началом опыта. В группе 3, в которой на фоне загрязнения кормов глифосатом применяли пробиотик «Целлобактерин^{®+}», продуктивность сначала незначительно снизилась, а затем повысилась и оставалась стабильной до конца опыта.

Применение добавки «Целлобактерин^{®+}» позволило сгладить реакцию птицы на введение загрязненных кормов, в результате чего удалось избежать значительного падения продуктивности.

Яйценоскость на среднюю несущку за период опыта в группе 3 с применением глифосата и добавки «Целлобактерин^{®+}» была выше контроля на 1,3%, при этом был достигнут показатель 33,46 шт. В отличие от группы III, в группе II, где применяли только комбикорм с глифосатом, наблюдали снижение яйценоскости на 0,64% по сравнению с контролем.

В контрольной группе 1 затраты корма на 10 яиц составили 1,28 кг, а на 1 кг яичной массы 1,99 кг. Затраты кормов на 10 яиц в группе 2 с глифосатом были выше показателей контрольной группы, а именно 1,30 кг по сравнению с 1,28 кг в контроле. При этом на 1 кг яичной массы было затрачено 2,1 кг корма. Наименьшее потребление корма на 10 яиц было зафиксировано в группе 3 с глифосатом и пробиотиком «Целлобактерин^{®+}» и составило 1,23 кг корма на 10 яиц, что на 3,9%

ниже затрат в контрольной группе 1 и на 5,4 % ниже затрат в группе 2 с глифосатом. В этой же группе наблюдали наименьшее потребление корма на 1 кг яичной массы - 1,91 кг.

Результаты оценки качества яиц представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Показатели качества яиц, полученных от кур-несушек

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 Глифосат	Группа 3 Глифосат и Целлобактерин +
Средняя масса яиц, г:			
начало опыта	63,35±0,48	61,86±0,49*	62,93±0,41*
окончание	64,00±0,39	61,17±0,57*	63,69±0,44*
Индекс формы, %:			
начало опыта	76,68±0,25	75,26±0,30	77,12±0,24
окончание	75,81±0,32	75,93±0,23	76,76±0,22
Индекс белка, %:			
начало опыта	10,0±0,2	9,0±0,3	10,0±0,2
окончание	9,0±0,2	10,0±0,2	9,0±0,2
Индекс желтка, %:			
начало опыта	43,0±0,5	42,0±0,5	46,0±0,7
окончание	44,0±0,6	46,0±0,9	45,0±0,6
Толщина скорлупы, мм:			
начало опыта	0,337±0,004	0,324±0,007**	0,325±0,006**
окончание	0,359±0,004	0,361±0,004	0,377±0,004
Качество яиц, %:			
Бой яиц			
начало опыта	2,00	1,00	2,00
окончание	2,00	0,00	0,00
Насечка			
начало опыта	8,00	4,00	4,00
окончание	2,00	2,00	3,00
Загрязнение скорлупы (в т.ч. пометом)			
начало опыта	3,00	5,00	1,00
окончание	3,00	7,00	3,00
Мраморность и шероховатость			
начало опыта	4,00	10,00	14,00
окончание	3,00	3,00	6,00

При * $p \leq 0,05$, **при $p \leq 0,01$

По данным в таблице 19 можно увидеть, что наибольшее увеличение средней массы яйца произошло на фоне использования кормов с глифосатом и «Целлобактерином^{®+}» - на 0,76 г за период опыта. В группе с глифосатом масса яйца снизилась на 0,69 г по сравнению с первоначальной массой. Средняя масса яиц в контрольной группе увеличилась на 0,65г по сравнению с началом опыта.

Индекс формы, индекс белка и индекс желтка находились в границах нормы на протяжении опыта. Во всех опытных группах на конец опыта не было выявлено боя яиц, тогда как доля боя в контроле осталась на прежнем уровне.

Толщина скорлупы во всех группах в течение опыта увеличилась, но максимальное увеличение произошло в группе с применением пробиотика «Целлобактерин^{®+}». Толщина скорлупы – это важный производственный показатель, так как она определяет ее прочность. Яйца с большей толщиной скорлупы менее подвержены бою. В условиях производства при получении таких яиц можно сократить производственные потери (Бакулин и др, 2006; Бессарабов, Мельникова, 2009).

Доля яиц с загрязненной скорлупой осталась стабильной в контрольной группе 1, увеличилась в группе 2 с глифосатом, а также в группе 3 с глифосатом и добавкой «Целлобактерин^{®+}» на 2% от первоначального значения. Это можно объяснить качественными изменениями, происходящими в микрофлоре желудочно-кишечного тракта птицы.

3.10 Производственная апробация

Учитывая результаты научно-хозяйственного опыта, была проведена производственная проверка в условиях птицефабрики АО «Агрофирма Восток» Волгоградской области Николаевского района. Кормовую добавку «Целлобактерин+» применяли на взрослом поголовье кур-несушек кросса Хайсекс коричневый в период 2021-2022 год. Испытания проводились на взрослой птице с

225 дня жизни по 365 день. Продолжительность опыта составляла 140 дней. Взрослая птица содержалась в клетках, плотность посадки, световой режим – согласно рекомендациям к кроссу.

Рацион взрослой птицы согласно рекомендациям к кроссу. Уровень содержания глифосата в кормах не превышал МДУ содержания.

Кормовую добавку «Целлобактерин+» вводили в рацион кур опытных групп с комбикормом из расчета 1 кг на 1 тонну комбикорма. В комбикорм контрольных групп кормовую добавку «Целлобактерин+» не вводили. Схема кормления представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Схема кормления кур-несушек

Группы	Взрослая птица	
	Контроль	Опыт
Количество голов	32150	32150
Особенности кормления	ОР	ОР + «Целлобактерин+» 1 кг/т

Для анализа влияния кормовой добавки «Целлобактерин+» на рост и развитие кур-несушек в ходе опыта учитывали следующие показатели: сохранность взрослой птицы, яйценоскость, расход корма путем ежедневного учета заданного количества комбикорма и еженедельного его остатка в течение всего периода опыта, затраты корма на 10 штук яиц кур.

В таблице 21 приведены данные по сохранности кур-несушек за период с 280 до 406 дней.

Таблица 21 – Влияние кормовой добавки «Целлобактерин+» на сохранность кур-несушек

Возраст, дней	Падеж, Опытная группа		Падеж, Контрольная группа	
	Головы, шт.	%, от общего поголовья	Головы, шт.	%, от общего поголовья
1	2	3	4	5
280	85	0,3	104	0,3

1	2	3	4	5
308	170	0,5	196	0,6
343	162	0,5	245	0,8
371	172	0,5	253	0,8
406	215	0,7	295	0,9
Итого	804	2,5	1093	3,4

Применение кормовой добавки «Целлобактерин+» положительно повлияло на сохранность птицы. Падеж взрослой птицы в опытной группе за весь период опыта сократился на 289 голов и 0,9% от контрольной группы.

Результаты производственной апробации представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Экономическая эффективность «Целлобактерин+»
в кормлении кур-несушек

Особенности кормления	Контроль	Опыт
	ОР	ОР + «Целлобактерин+» (1 кг/т)
1	2	3
Количество голов:		
в начале опыта	32 150	32 150
падеж	1093	804
в конце опыта	31 057	31 346
Падеж, %	3,40%	2,50%
Яйценоскость, шт. яиц	332	335
Кол-во яиц, произведенных за период опыта, тыс. шт.	4024	4079
Затраты корма, кг	513 241	493 555
Цена комбикорма, руб./кг	16,23	16,23
Затраты на корм, руб.	8 329 899	8 010 395
Дополнительные затраты на комбикорм, руб.	-	74 033
Производственные затраты всего, тыс. руб.	11 912	11 585
Производственная себестоимость, руб./10 шт.	29,6	28,4
Цена продажи яиц, руб./10 шт. (оптовая, средняя за период)	42,3	42,3
Валовый доход от продажи яиц за период опыта, тыс. руб.	17 023	17 256

1	2	3
Экономический эффект за счет использования добавки, тыс. руб.		559
Валовая рентабельность продаж, %	30,0	32,9
Изменение рентабельности по отношению к контролю, %	-	2,9%

Применение кормовой добавки «Целлобактерин+» в рационе кур-несушек способствует повышению яйценоскости на среднюю несушку с 332 до 335 шт. яиц; позволило снизить расход кормов на 19686 кг за период опыта в опытной группе, себестоимость яиц с 29,6 до 28,4 руб./10 штук; экономический эффект за счет использования добавки составил 559 тыс. рублей. Рентабельность в опытной группе по сравнению с контрольной группой увеличилась на 2,9%. За период проведения испытания отрицательного влияния кормовой добавки «Целлобактерин+» на организм взрослых кур-несушек не выявлено.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГМО – генетически модифицированные организмы

ГРМ – гидролизат рыбной муки

ГЖХ-МС – газожидкостная

ЖК – желчные кислоты

ИФА – иммуноферментный анализ

КЖ- культуральная жидкость

МДУ – максимально допустимый уровень

ОР – основной рацион

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ТМС-триметилсилил

ТФА-трифторуксусный альдегид

УЭЖХ-СФ – ультраэффективная жидкостная хроматография со
спектрофотометрическим детектированием

хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ФИТЦ – фенилизотиоцианат

ЦФБР – цитратно-фосфатный буферный раствор

КоЕ/мл – колониеобразующих единиц в 1 миллилитре

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Промышленное птицеводство в Российской Федерации стремительно наращивает темпы количественного и качественного развития (Околелова, 2020; Фисинин, 2022). За последние десятилетия выведены высокопродуктивные кроссы кур-несушек и цыплят-бройлеров. Высокая продуктивность птицы требует напряженности обменных процессов. В реальных производственных условиях на больших птицефабриках наблюдаются различные стресс-факторы, которые могут быть связаны с кормлением, содержанием, инфекционными вирусными заболеваниями. Кормовая база также не всегда может быть стабильна. С течением времени меняется ситуация по доступности тех или иных кормовых ресурсов. Корма зачастую могут содержать остатки токсичных элементов - микотоксинов, пестицидов, тяжелых металлов и др. веществ.

Учитывая риски, связанные с промышленным птицеводством, в арсенале зоотехников и ветеринарных врачей должны быть эффективные кормовые добавки, которые смягчают стрессовые факторы в кормлении птиц (Енгашев и др., 2021). В ходе проведения собственных исследований, отраженных в данной работе, нами (Меликиди и др., 2020; Тюрина и др., 2021; Лаптев и др., 2022) были определены остаточные количества пестицида глифосата в кормах и проведены опыты по оценке эффективности действия пробиотиков, применяемых при кормлении птицы комбикормами, загрязненными глифосатом.

В широком ассортименте растительного сырья и комбикормов для птицы было проанализировано содержание глифосата. Были проверены такие культуры как пшеница, кукуруза, ячмень, горох, соя, а также жмыхи и шроты подсолнечный, рапсовый и готовые комбикорма для птицы. В большинстве образцов обнаружили остаточные количества глифосата. Глифосат содержался в диапазоне от $0,075 \pm 0,005$ мкг/кг до $0,687 \pm 0,089$ мг/кг. В будущем, мы ожидаем всё большее возрастание нагрузки по глифосату на растительные культуры, так как есть предпосылки для увеличения использования глифосата в связи с распространением

устойчивости к нему сорных растений. Также глифосат широко используется как десикант для различных сельскохозяйственных культур.

Наряду с этим, мы принимаем во внимание, что глифосат может содержаться в импортной ГМО-сое, ввозимой в нашу страну. При исследовании комбикормов, обнаружили, что в финишных комбикормах глифосат встречается чаще, чем в стартовых. Это, по-видимому, связано с большим содержанием соевого шрота в финишных рационах.

Пробиотические культуры *Bacillus megaterium-4801*, *Bacillus subtilis 1-85*, *Enterococcus faecium 1-35* проявили хорошую адаптационную способность к глифосатсодержащему препарату «Торнадо», с этими культурами проводили дальнейшие исследования.

Культуры *Bacillus megaterium-4801*, *Bacillus subtilis 1-85*, *Enterococcus faecium 1-35* снижают содержание глифосата в простых питательных жидких средах с глифосатсодержащим препаратом «Торнадо» от начальной концентрации 720 мкг/л до 374; 396 и 223 мкг/л соответственно.

Для подтверждения результатов по биодеструкции глифосата выбранными штаммами бактерий провели дополнительный эксперимент с инкубированием бактерий и определением концентрации глифосата методом ВЭЖХ. Удалось зафиксировать биодеструкцию чистого вещества глифосата. Глифосат в инкубируемых смесях в начальной концентрации 5 мкг/мл разрушался с бактерией *Enterococcus faecium 1-35* на 48% и с бактерией *Bacillus subtilis 1-85* на 33% соответственно. Вероятно, что биодеструкция чистого вещества глифосата в простых питательных средах проходит эффективнее, чем в присутствии многокомпонентного глифосатсодержащего препарата. Культуральная жидкость этих видов бактерий была впервые проанализирована нами методом ВЭЖХ, была произведена модификация метода пробоподготовки.

Выбранные штаммы бактерий показали высокую способность к выживанию в условиях желудочно-кишечного тракта птицы, имитируемых *in vitro*. Так, бактерия *Enterococcus faecium 1-35* сохраняет жизнеспособность до 80% при

прохождении условий желудка и способна расти, увеличивая титр на один или два порядка в условиях кишечника. Бактерии *Bacillus subtilis* 1-85 и *Bacillus megaterium* -4801 сохраняют 100% жизнеспособных клеток при прохождении условий желудка, кроме того, в условиях кишечника количество клеток увеличивается на два порядка по сравнению с первоначально внесенным количеством.

Проведя анализ метаболитов, выделяемых в окружающую питательную среду бактериями *Bacillus megaterium* -4801 и *Enterococcus faecium* 1-35, мы обнаружили разнообразие биологически активных веществ, среди которых были аминокислоты, пептиды, витамины, органические кислоты и др. органические вещества.

Летучая фракция метаболитов бактерии *Bacillus megaterium* -4801 содержит больше 30 компонентов. Основной из компонентов – это масляная кислота и производное гидроксимасляная кислота. В совокупности они составляют 41% от общего количества идентифицированных летучих веществ в КЖ. Известно, что масляная кислота благоприятно влияет на процессы пищеварения в кишечнике птицы. Она является энергетическим питательным субстратом для клеток кишечника – колоноцитов, обеспечивая на 70% их потребности в энергии. Масляная кислота включается в биохимические процессы питания клеток, тем самым, способствует их быстрой регенерации и восстановлению. Как известно, проникая в колоноциты, масляная кислота быстро метаболизируется в митохондриях до Ацетил-Кофермента А и углекислого газа, при этом синтезируется АТФ (Ардатская, 2014).

Также необходимо сказать, что масляная кислота участвует в регуляторной функции барьерного свойства кишечного эпителия за счет стимуляции синтеза муцина и стимуляции секреции слизи кишечного эпителия (Ардатская, 2014). Дополнительно, можно отметить, что масляная кислота индуцирует выработку антимикробных пептидов клетками колоноцитов и фагоцитами. Антимикробные пептиды, в свою очередь, не допускают прикрепления и инвазии патогенных бактерий через слизистую оболочку ЖКТ.

Помимо масляной кислоты идентифицировали уксусную, молочную, янтарную, пантотеновую, пропионовую, фенилуксусную и липоевую кислоты.

Большой ассортимент метаболитов бактерии *Bacillus megaterium-4801* говорит о богатом разнообразии метаболических путей, что вообще характерно для бактерий рода *Bacillus*.

Культура *Bacillus megaterium-4801* синтезирует в окружающую среду витамин группы В2 (рибофлавин) в концентрации 1,7 мкг/мл.

Помимо этого, обнаружили способность к синтезу глутаминовой кислоты в количестве 100 мкг/мл, а также синтез аспарагиновой кислоты, тирозина и серина в меньшем количестве.

Культура *Enterococcus faecium 1-35* является более требовательной к источникам питания, при этом она обогащает окружающую среду ценными органическими кислотами. Нами было отмечено, что в результате культивирования этого вида бактерий на простой питательной среде, происходит синтез уксусной кислоты до 0,7 мкг/мл, а также в три раза увеличивается содержание молочной кислоты.

Проведена оценка эффективности использования кормовой добавки «Пробиоцид-Ультра» в дозировке 1 кг/т при кормлении бройлеров комбикормом, искусственно загрязненным глифосатом (20 мг/кг корма). Выявлено, что глифосат задерживает рост и развитие цыплят, приводит к снижению живой массы поголовья и сокращению среднесуточного прироста. При использовании пробиотика «Пробиоцид-Ультра» удалось не только сократить отставание в росте цыплят-бройлеров, но и превысить контрольные значения. При введении в корм глифосата живая масса цыплят к 35-суточному возрасту снизилась на 1,4%, среднесуточный прирост снизился на 1,4% по сравнению с контролем. В группе с глифосатом и пробиотиком «Пробиоцид-Ультра» живая масса цыплят к 35-суточному возрасту была выше на 2,8%, чем в контроле и среднесуточный прирост был выше на 2,9%, чем в контрольной группе.

Наши исследования показали, что глифосат, содержащийся в загрязненных кормах для птиц, даже в минимальных концентрациях, которые в несколько раз ниже уровней ПДК для кормов, при хроническом воздействии может негативно влиять на микробные сообщества кишечника. Патогенные и оппортунистические микроорганизмы, которые, вероятно, менее чувствительны или даже нечувствительны к глифосату, могут увеличивать численность, вытесняя представителей нормофлоры. Вытеснение симбиотической нормобиоты может негативно сказаться на процессах переваривания клетчатки и синтеза важных для птиц метаболитов. Увеличение доли патогенов может вызывать распространение инфекционных заболеваний. Так, в опытной группе, по сравнению с контрольной группой, возрастало количество семейств *Staphylococcaceae* – в 5,0 раз и *Enterobacteriaceae* – в 1,5 раза ($P \leq 0,05$). Введение в рацион пробиотика «Пробиоцид-Ультра» на фоне присутствия в кормах глифосата оказало позитивное влияние на разнообразие и численность микроорганизмов различных таксонов. Под влиянием пробиотика «Пробиоцид-Ультра» во второй опытной группе происходило снижение численности таких кластридиальных кластеров, как *Clostridium_III*, *Clostridium_IV*, *Clostridium_sensu_stricto* *Clostridium_XIVa*, *Clostridium_XIVb*, *Clostridium_XVIII* по сравнению с группой без пробиотика ($P \leq 0,05$). Вероятно, это связано с антимикробной активностью штамма в составе пробиотика и/или присутствием генов биодеструкции ксенобиотиков, что предполагает будущие исследования в данном направлении.

Воздействие глифосата можно было наблюдать в ходе опыта на курах-несушках.

В группе несушек, получавших корм с содержанием глифосата 40 мг/кг корма, интенсивность яйценоскости снизилась на 2,43 % по сравнению с начальным этапом. Яйценоскость на среднюю несушку в этой группе была ниже на 0,64%, чем в контрольной группе. Затраты корма на 10 яиц составили 1,30 кг, что на 1,6% выше, чем в контрольной группе.

В группе несушек, получавших корм с содержанием глифосата 40 мг/кг и

дополнительно пробиотик «Целлобактерин^{®+}», интенсивность яйценоскости практически не изменилась по сравнению с начальным этапом. Яйценоскость на среднюю несушку в этой группе была на 1,94% выше, чем в группе с глифосатом и на 1,3% выше, чем в контрольной группе соответственно. Затраты корма на 10 яиц составили 1,23 кг, что на 3,9% ниже, чем в контрольной группе и на 5,4% ниже, чем в группе с глифосатом.

Наибольшее увеличение средней массы яйца произошло на фоне использования кормов с глифосатом и «Целлобактерин^{®+}» (на 0,76 г за период опыта). В контрольной группе (без глифосата) средняя масса яйца увеличилась на 0,65г. В группе с глифосатом масса яйца снизилась на 0,69г по сравнению с первоначальной массой.

Толщина скорлупы во всех группах в течение опыта увеличилась, но максимальное увеличение произошло в группе с применением пробиотика «Целлобактерин^{®+}». Доля загрязненных яиц во всех группах с применением глифосата возросла на 2% - это максимальный рост по сравнению с контрольной группой. Это явление указывает на изменения, которые произошли в кишечнике, в частности на изменение вязкости содержимого кишечника, что в свою очередь, косвенно свидетельствует об изменении микробного фона ЖКТ.

Таким образом, применение кормовой добавки «Целлобактерин^{®+}» во второй половине продуктивного периода на фоне загрязнения кормов глифосатом является эффективным способом нивелирования неблагоприятных эффектов от воздействия остаточного количества пестицидов в кормах.

Проведена производственная апробация пробиотика «Целлобактерин+» на промышленном стаде кур-несушек. Применение пробиотика «Целлобактерин+» положительно повлияло на сохранность птицы, увеличение яйценоскости и снижение затрат на кормление птицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований по анализу содержания глифосата в кормах и изучению влияния пробиотиков «Пробиоцид-Ультра» и «Целлобактерин+» на продуктивные показатели сельскохозяйственной птицы при скормливании им глифосатсодержащего корма позволяет сделать следующие выводы:

1. В сырье для производства комбикормов и в комбикормах обнаружено содержание глифосата (N-фосфонометилглицина) в различных диапазонах. В 70% образцов обнаружили содержание глифосата в диапазоне концентраций от $0,075 \pm 0,005$ мкг/кг до $0,687 \pm 0,089$ мг/кг.

2. Выявлены пробиотические культуры *Bacillus subtilis* 1-85, *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus megaterium* -4801, способные выживать в присутствии от 0,72 мг/л до 36,0 мг/л глифосатсодержащего препарата «Торнадо» в жидкой питательной среде.

3. У бактерий *Enterococcus faecium* 1-35 обнаружена способность к биодеструкции глифосата (в составе глифосатсодержащего препарата «Торнадо») от первоначально внесенной концентрации 0,72 мг/л на 48%. У бактерии *Bacillus subtilis* 1-85 снижение содержания глифосата от первоначально внесенной концентрации происходит на 45% и у бактерии *Bacillus megaterium* -4801 на 69% соответственно. Данные по биодеструкции, полученные методом ИФА, подтверждены методом ВЭЖХ. При этом бактерии *Enterococcus faecium* 1-35 и *Bacillus subtilis* 1-85 снижают начальную концентрацию глифосата (чистое вещество) от первоначально внесенной 5мг/л на 48% и 33% соответственно.

4. По результатам способности бактерий к биодеструкции выбраны штаммы *Enterococcus faecium* 1-35 и *Bacillus megaterium* 4801 для изучения их метаболической активности. Обнаружена способность штамма *Enterococcus faecium* 1-35 продуцировать молочную и уксусную кислоты.

Обнаружены широкие метаболические возможности штамма *Bacillus megaterium* -4801. У штамма происходит синтез ряда важнейших метаболитов: масляной кислоты и ее производных, а также липоевой, ацетоуксусной, пантотеновой, глутаровой, фенилпропионовой, янтарной и капроновой кислот, витамина B₂, глутамина, различных пептидов.

5. В опытах по оценке выживаемости бактерий в условиях *in vitro*, имитирующих условия желудочно-кишечного тракта птиц, выявлена способность бактерий *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus subtilis* 1-85 и *Bacillus megaterium*-4801 сохранять жизнеспособность. Титр бактерий *Enterococcus faecium*- 1-35 в условиях желудка незначительно снижался; титр бактерий *Bacillus subtilis* 1-85 и *Bacillus megaterium*-4801 не изменялся при этих же условиях. При прохождении условий кишечника не только сохранялся первоначальный титр бактерий, но наблюдали рост бактерий на один-два порядка. Была определена способность всех исследуемых видов бактерий к росту при культивировании в модельных питательных средах в присутствии 0,005%, 0,6% и 10% -ых растворов желчи.

6. Проведена оценка эффективности использования кормовой добавки «Пробиоцид-Ультра» в дозировке 1 кг/т при кормлении бройлеров комбикормом, искусственно загрязненным глифосатом (20 мг/кг корма). Выявлено, что глифосат задерживает рост и развитие цыплят, приводит к снижению живой массы поголовья и сокращению среднесуточного прироста. При использовании пробиотика «Пробиоцид-Ультра» удалось не только сократить отставание в росте цыплят-бройлеров, но и превысить контрольные значения. При введении в корм глифосата живая масса цыплят к 35- суточному возрасту снизилась на 1,4%, среднесуточный прирост снизился на 1,4% по сравнению с контролем. В группе с глифосатом и пробиотиком «Пробиоцид-Ультра» живая масса цыплят к 35-суточному возрасту была выше на 2,8%, чем в контроле и среднесуточный прирост был выше на 2,9%, чем в контрольной группе.

7. В содержимом слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров с помощью молекулярно-генетического метода исследования обнаружены

изменения в микробном сообществе. При кормлении бройлеров глифосатсодержащими кормами увеличивается количество патогенных микроорганизмов. Пробиотик «Пробиоцид-Ультра» способствует снижению содержания патогенных микроорганизмов.

8. В группе несушек, получавших корм с содержанием глифосата 40 мг/кг корма, интенсивность яйценоскости снизилась на 2,43 % по сравнению с начальным этапом. Затраты корма на 10 яиц составили 1,30 кг, что на 1,6% выше, чем в контрольной группе. В группе несушек, получавших корм с содержанием глифосата 40 мг/кг и дополнительно пробиотик «Целлобактерин[®]+», интенсивность яйценоскости практически не изменилась по сравнению с начальным этапом. Затраты корма на 10 яиц составили 1,23 кг, что на 3,9% ниже, чем в контрольной группе и на 5,4% ниже, чем в группе с глифосатом.

Наибольшее увеличение средней массы яйца произошло на фоне использования кормов с глифосатом и «Целлобактерин[®]+» (на 0,76 г за период опыта). В контрольной группе (без глифосата) средняя масса яйца увеличилась на 0,65г. В группе с глифосатом масса яйца снизилась на 0,69г по сравнению с первоначальной массой.

9. Использование в составе рациона пробиотика «Целлобактерин+» положительно повлияло на сохранность кур-несушек в промышленном стаде. Падеж птицы сократился на 0,9% в опытной группе по сравнению с контрольной группой. Применение кормовой добавки «Целлобактерин+» в рационе кур-несушек положительно повлияло на сохранность птицы; способствует повышению яйценоскости на среднюю несушку с 332 до 335 шт. яиц; позволило снизить расход кормов на 19686 кг за период опыта в опытной группе, себестоимость яиц с 29,6 до 28,4 руб./10 штук; экономический эффект за счет использования добавки составил 559 тыс. рублей.

ПРЕДЛОЖЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВУ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для кормления цыплят-бройлеров рекомендовано применять кормовую добавку «Пробиоцид-Ультра» в составе основного рациона в дозировке 1 кг/т корма для снижения негативных последствий остаточных уровней глифосата в кормах, а также для увеличения продуктивности птиц. Для кормления кур-несушек рекомендовано применять кормовую добавку «Целлобактерин+» в дозировке 1кг /т корма для снижения негативных последствий присутствия глифосата в кормах для кур-несушек, улучшения сохранности и повышения продуктивности птицы.

Перспективы дальнейшей разработки темы: современное сельское хозяйство невозможно без применения пестицидов. На сегодняшний день мы наблюдаем, что остаточные уровни пестицидов накапливаются в кормах. Это явление имеет тенденцию к увеличению. Разработка кормовых добавок, обладающих способностью к биодеструкции различных пестицидов, и изучение влияния таких кормовых добавок на организм и зоотехнические показатели птицы, является перспективным направлением научных исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ардатская, М.Д. Масляная кислота и инулин в клинической практике: теоретические аспекты и возможности клинического применения: пособие / М.Д. Ардатская. – М.: «Форте принт», 2014. – 64 с.: ил.- ISBN 978-5-905757-64-8.
2. Бакулин, В. А. Болезни птиц / В. А. Бакулин. – Санкт-Петербург: Изд.: В. А. Бакулин, 2006. - 688 с., 80 с.- с цв. ил. - ISBN 5-98456-021-6.
3. Бакулин, М. К. Деградация гербицида глифосата бактериями родов *Pseudomonas* и *Proteus* / М.К. Бакулин, Ю.С. Овсянников, А.С. Туманов // Фундаментальные исследования. - 2014. - №8. - С.1377-1382.
4. Белая А. Ни крошки мимо привеса. Как достичь оптимальной конверсии корма // А. Белая // Агроинвестор: электронный журнал. М.: 2019. URL: <https://www.agroinvestor.ru/technologies/article/31686-ni-kroshki-mimo-privesa/> (дата обращения: 14.01.23).
5. Белоусов, В. Контроль безопасности кормовых продуктов ветлабораториями качество и эффективность / В. Белоусов, С. Базарбаев // Комбикорма. – 2013. - №12. -С.57-60.
6. Бессарабов, Б. Ф. Болезни птиц: учебное пособие / Б. Ф. Бессарабов, И. И. Мельникова, Н. К. Сушкова. — 2-е изд. — Санкт-Петербург: Лань, 2009. — 448 с. - ISBN 978-5-8114-0692-0.
7. Бондаренко, В.М. Терапевтический эффект пробиотиков / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2009. - №1. - С.2-3.
8. Борисова, Е.Е. Оценка воздействия химических средств защиты растений и агротехнологий на объекты окружающей среды / Е.Е. Борисова, М.В. Шуварин, Ю. В. Сизова, В.П. Заикин // Вестник НГИЭИ. - 2022. - №10 (137). - С.20-27. - <https://doi.org/10.24412/2227-9407-2022-10-20-27>.

9. Борутова, Р. Четыре принципа биобезопасности / Р. Борутова, Э.Пей Ен Чоу. – Текст: электронный // Животноводство России: научно-практический журнал для руководителей и специалистов АПК. - 2020. -сентябрь.-. URL: <https://zzr.ru/zzr-2020-09-015> (дата обращения: 04.02.2023).

10. Буряков, Н.П. Использование пробиотической добавки «Иммунофлор» в кормлении цыплят-бройлеров / Н.П. Буряков, М.А. Бурякова // Зоотехника Интернешнл. - 2022.-Выпуск 6.- С. 34-36.

11. Буяров, В.С. Научное обеспечение яичного и мясного птицеводства России / В.С. Буяров, А.В. Буяров, Н.А. Алдобаева // Эффективное животноводство. - 2018.-№3 (142). -С.64-68.

12. Гавилей, Е.В. Влияние частичной замены соевого шрота подсолнечным концентратом в рационе цыплят-бройлеров на продуктивность и физиологическое состояние птицы / Е.В. Гавилей, С.Н. Панькова, О.А. Катеринич // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. -2020. -№23 (1). - С.120-127.

13. Гаганов, А.П. Влияние комбикормов, содержащих различные уровни рапсового жмыха, на эффективность их использования цыплятами-бройлерами / А.П. Гаганов, З.Н. Зверкова // Животноводство и кормопроизводство. – 2019. - Т.102. - №4. - С.238-245. - <https://doi.org/10.33284/2658-3135-102-4-238>.

14. Гамко, Л.Н. Использование некоторых эффективных средств в получении экологически чистой продукции животноводства / Л. Н. Гамко // Актуальные проблемы экологии на рубеже третьего тысячелетия и пути их решения / Брянская ГСХА. – Брянск. - 1999. – Ч.1. – С. 294-297.

15. Гиндуллин, А.И. Пробиотики, основанные на *Lactobacterium* и *Bacillus*, при Т-2 токсикозах цыплят / А.И. Гиндуллин, М.Я. Тремасов, С.О. Белицкий, Д.А. Гиндуллина // Птица и птицепродукты. - 2014.-№3.-С.44-46.

16. Грязнева, Т.Н. Биологически активные вещества, продуцируемые бактериями рода *Bacillus* /Т.Н.Грязнева // Лечащий врач. -2013. -№ 4. -С. 54–63.

17. Дармов, И. В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека / И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских // ЭиКГ. - 2011. - №3.-С.6-11.

18. Дарьин, А. И. Природный премикс и сорбент в кормлении животных и птицы / А.И. Дарьин, Н.Н. Кердяшов // Нива Поволжья. - 2017. - №3 (44). - С.21-27.

19. Догадина, М.А. Аспекты снижения пестицидной нагрузки на экосистемы / М.А. Догадина, А.В. Таракин, Г.А. Игнатова, Е.И. Степанова, Н.И. Велкова, М.Ю. Касаточкина, А.И. Правдюк, Е.И. Криворотова // Вестник ОрелГАУ. - 2022. - №5 (98). –С.107-113.

20. Егоров, В.И. Определение остаточных количеств имидаклоприда в мышечной ткани цыплят-бройлеров на фоне применения сорбентов / В.И. Егоров, Д.Д. Хайруллин, Д.В. Алеев, К.Е. Буркин, К.Х. Папуниди // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана.- 2019.- №2. Вып.238. –С.73-76.

21. Егоров, И.А. Замещение кормовых антибиотиков в рационах. Сообщение 1. Микробиота кишечника и продуктивность мясных кур (*Gallus gallus* L.) на фоне энтеросорбента с фито- и пробиотическими свойствами // И.А. Егоров, Т.Н. Ленкова, В.А. Манукян и др. // Сельскохозяйственная биология. - 2019. - Том 54. - №2. - С.280-290.

22. Егоров И.А., Манукян В.А., Ленкова Т.Н., Егорова Т.А. и др. Методическое пособие по кормлению сельскохозяйственной птицы. - Издательство: ООО "Гран-При". - 2021. -360с.

23. Енгашев, С.В. Управление производственными рисками в промышленном птицеводстве / Под науч. редакцией Т.М. Околеловой, С.В. Енгашева. - Москва: РИОР, 2021.- 96 с. – (Наука и практика). - DOI: <https://doi.org/10.29039/02055-5>.

24. Железова, А.Д. Изменение функциональных и структурных характеристик прокариотного сообщества почв под воздействием глифосата: специальность 03.02.03 «Микробиология»: диссертация на соискание ученой

степени кандидата биологических наук / Железова Алена Дмитриевна; Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова.-Москва, 2018.-111 с.

25. Задорожная, В. Н. Подбор природных сорбентов юга России для кормовых добавок целевого направления / В.Н. Задорожная, Д.И. Трухачев, В.Ф. Филенко // Науч. тр. ВИЖа. Дубровицы, – 2005. – В.63. - Т.2. – С.24-26.

26. Захаренко, В. А. Использование пестицидов в аграрном секторе России в контексте развития глобальных рынков средств защиты растений / В. А. Захаренко // Агрохимия. – 2020.– № 3.– С. 43-48.– <https://doi.org/10.31857/S0002188121050148>.

27. Захаренко, В. А. Современное состояние и перспективы экономики применения пестицидов в агроэкосистемах России / В. А. Захаренко // Агрохимия. – 2021. – № 5. – С. 68-83. – <https://doi.org/10.31857/S0002188121050148>.

28. Зеленская, О.В. Влияние комбинации Сел-Плекс + Бацелл на продуктивность цыплят-бройлеров / О.В. Зеленская // Аграрный вестник Урала. - 2010. -№11-2.-С. 24-25.

29. Игнатовец, О.С. Способы повышения эффективности деградации пестицидов группы сульфонилмочевины микроорганизмами-деструкторами / О.С. Игнатовец, В.Н. Леонтьев, Е.В. Марцуль // Экология. Химия, технология органических веществ и биотехнология. Труды БГТУ. - 2015. - №4. - С.277-282.

30. Измайлович, И. Б. Корма и кормление сельскохозяйственной птицы: учебно-методическое пособие / И. Б. Измайлович. – Горки: БГСХА, 2021. – 60 с.: ил.-ISBN 987-985-882-073-2.

31. Ёылдырым, Е.А. Можно ли обойтись без пробиотиков? / Е.А. Ёылдырым, Л.А. Ильина, А.В. Дубровин, В.А. Филиппова, Н.И. Новикова, Д.Г. Тюрина, Г.Ю. Лаптев, В.Х. Меликиди // Птицеводство. - 2020.-№3-С. 33-38.

32. Каравайко, Г. И. Микробная деструкция силикатных минералов / Г. И. Каравайко //Труды ин-та микробиологии им. Виноградского. – М., 2004. – Вып. 12: Юбилейный сборник к 30-летию института. – С. 172–196.

33. Карташов, Н. И. Экологические проблемы производства чистой продукции животноводства и здоровье людей / Н.И. Карташов, Н.В. Черный, В.И. Герасимов // Материалы всерос. науч.-произв. конф. – Орёл. - 2000. – С. 61-62.

34. Кердяшов, Н.Н. Зоотехническая оценка применения новых комплексных кормовых добавок в кормлении молодняка свиней / Н.Н. Кердяшов, А.И. Дарьин // Нива Поволжья. – 2014. – № 3(32). – С.93-99.

35. Кильдиярова, И.Д. Использование пробиотиков в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц // Инновационная наука. - 2016.- №6. - ISSN 2410-6070. - С.65-66.

36. Коломейченко, В. В. Кормопроизводство: Учебник. / В.В. Коломейченко. - СПб.: Лань, 2015.—656 с. – ISBN 978-5-8114-1683-7.

37. Кротова, О.Е. Научно-практическое обоснование использования пробиотических, белковых и минеральных кормовых добавок нового поколения в промышленном птицеводстве и свиноводстве: специальность 06.02.10 «Частная зоотехния. Технология производства продукции животноводства» / диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Кротова Ольга Евгеньевна; Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции. - Волгоград, 2021.-319 с.

38. Крюков, В.С. Микотоксины, микотоксикозы и выбор асорбентов / В.С. Крюков, И.В. Глебова, С.В. Зиновьев, О.Н. Мирошниченко, О.И. Севрюкова // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2019. -№8.- С. 164-180.

39. Ксенофонтова, О.Ю. Влияние пестицидов на микроорганизмы почв Саратовской области / Ксенофонтова О.Ю., Иванова Е.В. // Известия Саратовского университета. Новая серия: Химия. Биология. Экология. 2012-Т.12.-вып. 1.-С.75-81.- <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2012-1-75-81>.

40. Кудин, С.М. Влияние фунгицидов на сохранность, структуру и урожайность семян озимой пшеницы / С.М. Кудин, В.В. Кошеляев, И.П. Кошеляева // Нива Поволжья. -2018. -№4 (49). –С.58-66.

41. Кузнецова, Е.М. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков. / Е.М. Кузнецова, В.Д. Чмиль // Современные проблемы токсикологии. - 2010.-№1. - С.87-95.

42. Кузовкова, А.А. Условия подготовки проб при определении остаточных количеств глифосата в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией / А.А. Кузовкова, Т.В. Новицкая, В.П. Филонов // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. - Мин-во здравоохран. Респ. Беларусь. Науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. С.И. Сычик. — Минск: РНМБ, 2016. — Вып. 26. — С. 277-280.

43. Куликова, Н.А. Гербициды и экологические аспекты их применения: Учебное пособие / Н.А. Куликова, Г.Ф. Лебедева. - М.: Книжный дом «Либроком», 2010. – 152с. -ил., табл. - ISBN 978-5-397-01431-1.

44. Лаптев, Г.Ю. Успешная стратегия управления микробиомом кур / Г.Ю. Лаптев, Е.А. Ёылдырым, Л.А. Ильина // Комбикорма. - 2019.- №1.- С. 80-83.

45. Лаптев, Г.Ю. Геномный и фенотипический потенциал антимикробной активности штамма бактерии *Bacillus megaterium B-4801* / Г.Ю. Лаптев, Е.А. Ёылдырым, Т.П. Дуняшев, Л.А. Ильина, Д.Г. Тюрина, В.А. Филиппова, Е.А. Бражник, Н.В. Тарлавин, А.В. Дубровин, Н.И. Новикова, В.Х. Меликиди, С.Н. Биконя // Сельскохозяйственная биология.- 2020а.- том 55.- №4.-С. 816-829.

46. Лаптев, Г.Ю. Резервуары инфекций на птицефабриках / Г.Ю.Лаптев, Е.А. Ёылдырым, Л.А. Ильина, А.В. Дубровин, В.А. Филиппова, Н.И. Новикова, Д.Г. Тюрина, В.Х. Меликиди // Комбикорма. -2020b.-06.-С. 70-74.

47. Лаптев, Г.Ю. Влияние глифосата и пробиотика на микробиом цыплят-бройлеров /Г.Ю Лаптев, Д.Г. Тюрина, Е.П. Горфункель, Е.А. Ёылдырым, Л.А. Ильина, А.В. Дубровин, В.А. Филиппова, Е.А. Бражник, Н.И. Новикова, Т.П. Дуняшев, В.Х. Меликиди, К.А. Калиткина, Е.С. Пономарева // Птицеводство. - 2022.-№11.-С. 35-43.

48. Лисунова, Л.И. Кормление сельскохозяйственных животных: учебное пособие / Л.И. Лисунова.; под ред. В.С. Токарева; Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2011. – 294 с.
49. Лопаева, Н.Л. Особенности применения адсорбентов в птицеводстве / Н.Л. Лопаева, О.П. Неверова, А.Р. Ахметьянова и др. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2022. - № 3 (95). - С.363–369. - <https://doi.org/10.37670/2073-0853-2022-95-3-363-369>.
50. Лютых, О. Улучшение конверсии кормов - залог качества и оптимальной цены птицеводческой продукции / О. Лютых. - Текст: электронный // Эффективное животноводство. - 2020.- №7 (164). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/uluchshenie-konversii-kormov-zalog-kachestva-i-optimalnoy-tseny-ptitsevodcheskoj-produktsii> (дата обращения: 28.10.2022).
51. Маркин, Ю.В. Разумная альтернатива антибиотикам. Пробиотики в рационах для птицы / Ю.В. Маркин, Н. Нестеров // Животноводство России. Тем. выпуск. Корма – 2019. – С.35–38. - <https://doi.org/10.25701/ZZR.2019.64.87.009>.
52. Маханькова, Т. А. Ассортимент гербицидов для зерновых культур / Т.А. Маханькова, Е.И. Кириленко, А.С. Голубев // Защита и карантин растений. -2011. - №3. -С. 16-18.
53. Медведев, О.С. Глифосат в сое снова под подозрением / О.С. Медведев // АгроФорум. - 2019. -№2.- С. 60-61.
54. Медведев, О.С. Возрастающее использование глифосата при производстве глифосат-устойчивых сортов сои увеличивает риск негативного влияния на здоровье человека / О. С. Медведев // АгроФорум. – 2021. – № 6. – С. 34-35.
55. Меликиди, В.Х. Выживаемость пробиотических бактерий *Vacillus spp.* и *Enterococcus faecium* в условиях *in vitro*, имитирующих желудочно-кишечный тракт животных / В.Х. Меликиди, Н.И. Новикова, Т.Н. Грудинина и др.// Ветеринария.- 2020.-№10.- С. 55-57.

56. Меликиди, В.Х. Метаболиты пробиотических бактерий отвечают за эффективность действия пробиотика / В.Х. Меликиди, Д.Г. Тюрина, Д.Г. Селиванов и др. // Птицеводство. - 2019а.-№09-10.-С .45-47.

57. Меликиди В.Х. Метаболиты пробиотических бактерий и их применение в животноводстве / В.Х. Меликиди, Г.Ю. Лаптев, Н.И. Новикова, Д.Г. Тюрина, О.Н. Соколова // Материалы международной научно-практической конференции «Научное обеспечение развития животноводства в Российской Федерации», посвященной 90-летию ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Дубровицы, 2019b.- 626с.

58. Молохова, Е.И. Разработки отечественных метаболитных пробиотиков и их стандартизация / Е.И. Молохова, Ю.В. Сорокина // Сибирский медицинский журнал, 2011.- Том 26.- № 1.- Выпуск 1.-С. 29-33.

59. МУК 4.13513— 17. Определение остаточных количеств глифосата в зеленой массе растений, зерне и соломе зерновых колосовых культур, зерне гороха, зерне кукурузы, семенах подсолнечника, рапса, льна, бобах сои, растительном масле, плодах и соке плодовых семечковых и плодовых косточковых, ягодах и соке винограда методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: методические указания: утв. 29.12.17.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—15 с.

60. Мурленков, Н.В. Функциональные особенности биопрепаратов в животноводстве и птицеводстве / Н.В. Мурленков, А.И. Шендаков // Биология в сельском хозяйстве. - 2018.- №4 (21). - С.26-29.

61. Никитченко, Д.В. Мясная продуктивность цыплят-бройлеров при включении в их рацион пробиотика СУБ-ПРО / Никитченко Д.В., Никитченко В.Е., Андрианова Д.В. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021. - №1 (53). – С.198-206.

62. Ноздрин Г.А. Научные основы применения пробиотиков в птицеводстве / Г.А. Ноздрин, А.Б. Иванова, А.И. Шевченко, А.Г. Ноздрин // Новосибирск: Изд. Новосиб. Гос. Агр. Ун-та.- 2005.-123с.

63. Нуралиев, Е.Р. Совершенствование дезинфекционных мероприятий при микоплазмозе птиц / Е.Р. Нуралиев // Вестник Алтайского государственного аграрного университета/- 2018.- № 3 (161). -С.169-175.

64. Общая фармакопейная статья «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» ОФС.1.7.2.0012.15 Министерство здравоохранения РФ

65. Околелова, Т.М. Птицеводство: актуальные вопросы и ответы: монография / Т.М. Околелова, С.В. Енгашев, И.А. Егоров. - М.:РИОР,2020. -268 с.

66. Определение остаточных количеств химических веществ в объектах окружающей среды, атмосферном воздухе, воздухе рабочей зоны и сельскохозяйственной продукции: Методические указания 4.1.1978-05. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. -196 с.

67. Оценка биобезопасности наноматериалов: Методические рекомендации: утв. Приказом №280 от 12.10.07.- Москва: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2007.-59 с.

68. Патент № 2652836 С1 Российская Федерация, СПК А23К 10/16 (2006.01). Кормовая добавка с пробиотической активностью для сельскохозяйственных животных, птиц, лошадей и рыб: № 2017127553: заявл.02.08.2017: опубл. 03.05.2018 Бюл. № 13 / Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., И.Н. Никонов, В.Х. Меликиди [и др.]; патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ». - 24 с.

69. Патент № 2235772 С1 Российская Федерация, МПК А23К 1/165 (2006.01) С12N 1/20 (2006.01). Штамм *Bacillus pantothenicus* 1-85 для использования в гранулированном корме: № 2235772: заявл.30.12.2010: опубл.20.08.2012, Бюл. № 23 / Грудинина Т.Н., Лаптев Г.Ю [и др.]; патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ». - 18 с.

70. Петрова, М.О. Развитие исследований в аналитической лаборатории ВИЗР по оценке остаточных количеств пестицидов / М.О. Петрова, Т.Д. Черменская, В.И. Долженко // Вестник защиты растений. -2020. -№2.- С.93-99.

71. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 2 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания" (зарегистрирован 29.01.2021 № 62296).

72. Похиленко, В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин // Химическая и биологическая безопасность. - 2007. - № 2–3 (32–33). - С.21-41.

73. Решетов, Г. Г. Эффективность метода микробной деструкции пестицида тетраметилтиурамдисульфида / Г.Г. Решетов, Т.А. Тугаева// Промышленность: экономика, управление, технологии. -2012.- №5(44). –С. 220-223.

74. Россельхознадзор усиливает контроль за содержанием глифосата в экспортируемом и импортируемом зерне. Новости // Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. URL: <https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/39621.html> (дата обращения 22.01.23).

75. Рустамова, М. А. Исследование ферментных комплексов местных микробных продуцентов для получения медицинских препаратов / М.А. Рустамова, З.Р. Ахмедова, З.Т. Гулямова // 3–й Московский международ. конг. "Биотехнология: состояние и перспективы развития". - М., 14–18 марта 2005 г. - ч.I. – С.172-175.

76. Рябцева, С.А. Дрожжи как пробиотики: механизмы действия и возможности применения / С.А. Рябцева, С.Н. Сазанова, А.А. Дубинина // Переработка молока. - 2019. - № 6. - С.1-5.

77. Рядчиков, В. Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных: Учебник / В.Г. Рядчиков. - СПб.: Лань, 2022. — 640 с. – ISBN 978-5-8114-1842-8.

78. Салеева, И.П. Продуктивные показатели бройлеров при снижении бактериальной нагрузки путем аэрозольной санации воздуха / И. П. Салеева, Е. В. Журавчук, А.А. Заремская, А.В. Иванов, В.Ю. Морозов // Вестник АПК Ставрополья. -2018. -№4 (34). –С.50-54.

79. Сафронова, Л. А. Бактерии рода *Bacillus* – Активные продуценты гидролитических ферментов / Л.А. Сафронова, А.И. Осадчая, В.М. Иляш, Е.В. Мишак // Научный вестник Ужгородского университета. Серия Биология. – 2006. - Выпуск 19. - С.155–159.

80. Семенов, Э.И. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению микотоксикозов животных. / Э.И. Семенов, М.Я. Тремасов и др. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2017. – 68 с. - ISBN 978-5-7367-1225-0.

81. Смирнов, В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / В. В. Смирнов, С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова. – Киев, 1983. – 49 с.

82. Сорокин, А.В. Глифосат в сырье растительного происхождения и кормах / А.В. Сорокин, Д. Некрасов, И. Батов, А. Петров, Л. Киш // Комбикорма. – 2022. - №3. - С.58-60. - <https://doi.org/10.25741/2413-287X-2022-03-4-171>.

83. Суринский, Д.О. Тенденции развития интегрированного способа защиты растений от насекомых-вредителей / Д.О. Суринский, И.В. Савчук, Е.В. Соломин, А.Г. Возмилов // Альтернативная энергетика и экология. - 2013. -№9 (131). - С.65-71.

84. Сухорукова Е. Россияне съели в 2022 году рекордное количество мяса // RBC. RU: ежедневн. интернет- изд. 2023. 14 фев. URL: <https://www.rbc.ru/business/14/02/2023/63ea294d9a79471fe72ea2d7> (дата обращения:06.05.2023).

85. Сычева, М.В. Регуляция антимикробными пептидами чувствительности микроорганизмов к антагонистически активным представителям мутуалистической микрофлоры / М.В. Сычева, Ю.И. Пешкова, Карташова О.Л.,

А.В. Андреева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2017.-№6 (том 94).- С.21-25.

86. Технический регламент таможенного союза ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» // Росстандарт: Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии: офиц. сайт.- URL: <https://www.rst.gov.ru/portal/gost/home/standarts/technicalregulationses> (дата обращения: 12.06.23).

87. Ткачева, И.В. Научно-практическое обоснование использования биофлавоноидов, водорастворимых полисахаридов, пробиотических препаратов в птицеводстве и прудовом рыбоводстве: специальность 06.02.10 «Частная зоотехния, технология производства продукции животноводства»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Ткачева Ирина Васильевна; Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясо - молочной продукции. – Волгоград, 2019. – 302 с.

88. Толстых, Н.А. Влияние кормовых добавок на основе органических кислот на бактериальное обсеменение комбикорма / Н.А. Толстых, С.В. Леонов, Ю.В. Итэсь // Ветеринария. -2016.- №4.- С.69-74.

89. Тюрина, Д.Г. Глифосат в комбикормах для птицы / Д.Г. Тюрина, В.Х. Меликиди, Т.М. Околелова, Е.А. Ёылдырым, Г.Ю. Лаптев, Н.И. Новикова, Л.А. Ильина, С.Н. Биконя // Птицеводство. - 2021.- №3 - С. 27-31.

90. Федеральный закон от 30.12.2021 №463-ФЗ «О внесении изменений в Закон Российской Федерации «О ветеринарии» и Федеральный Закон «Об обращении лекарственных средств» // Государственная система правовой информации. Официальный интернет-портал правовой информации: 2005-2023 гг. URL:<http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202112300122?index=0&rangeSize=1> (дата обращения: 14.01.23).

91. Феоктистова, Н. В. Пробиотики на основе бактерий рода *Vacillus* в птицеводстве / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г. Ф. Хадиева // Ученые

записки Казанского Университета. Серия естественные науки. - 2017. - Т.159. - Книга 1. – С.85-107.

92. Фисинин, В.И. Научные основы кормления сельскохозяйственной птицы / В.И. Фисинин, И.А. Егоров, Т.М. Околелова, Ш.А. Имангулов. Сергиев Посад: ФГУП «Типография» Россельхозакадемии. -2011.-349с.

93. Фисинин, В.И. Получение продукции птицеводства без антибиотиков с использованием перспективных программ кормления на основе пробиотических препаратов / И.В. Фисинин, И.А. Егоров, Г.Ю. Лаптев, Т.Н. Ленкова, И.Н. Никонов, Л.А. Ильина, В.А. Манукян, А.А. Грозина, Т.А. Егорова, Н.И. Новикова, Е.А. Ёылдырым // Вопр. питания. - 2017. -Т. 86. -№ 6. -С. 114–124. - <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00013>

94. Фисинин В.И., Лукашенко В.С., Салеева И.П., Чернуха И.М., Волик В.Г., Исмаилова Д.Ю., Овсейчик Е.А., Журавчук Е.В. Качество мяса бройлеров при различных способах выращивания // Вопр. питания. 2018. Т. 87, № 5. С. 77–84. - <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10056>.

95. Фисинин, В.И. Мировое и российское птицеводство: реалии и вызовы будущего: монография / В.И. Фисинин. – Москва: Хлебпродинформ, 2019.- 469 с.: цв.ил.; ISBN 978-5-93109-134-1.

96. Фисинин, В.И. Нарастаем производство мяса и яйца. Основные тенденции в мировом и отечественном птицеводстве / В.И. Фисинин // Птицеводство. - 2022.- С.2-4.

97. Хвостик, Е. Bayer заплатит \$10 млрд компенсации за канцерогенный гербицид Roundup // Коммерсант: Электронный журнал. Обновляется в течение суток. URL: <https://www.kommersant.ru/doc/4391420> (Дата обращения 25.01.23).

98. Царенко, П.П. Методы оценки и повышения качества яиц сельскохозяйственной птицы: учебное пособие/ П.П. Царенко, Л.Т. Васильева. - СПб.: «Лань», 2016. – 280 с.:ил. - ISBN 978-5-8114-2203-6.

99. Цурикова, Н. В. Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* – продуцента термостабильной альфа–амилазы / Н.В. Цурикова, Л.И. Нефедова, Е.В. Костылева и др. // Прикл. биохимия и микробиол. – 2002. – 38, №5. – С. 502–508.

100. Шимкус, А. Влияние пробиотических препаратов на продуктивность сельскохозяйственных животных / А. Шимкус, В. Юкна // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функцион. продукты питания: – Матер. международ. конф. – М., 2004. – С.167–168.

101. Патент № 2571852 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/744 (2015.01) C12R 1/01 (2006.01). Штамм бактерий *Enterococcus faecium*, обладающий антагонистической активностью в отношении бактерий рода *Listeria* и вида *Enterococcus faecalis*: № 2014145033/10: заявл.: 06.11.2014: опубл. 10.02.2015 Бюл. № 35 / М.В. Сычева, О.Л. Карташова, Н.Е. Щепитова: заявитель ОГАУ. - 6 с.

102. Шувалова, Н.Е. Оценка воздействия глифосата при низких концентрациях в кормовых зерновых культурах на биохимические показатели крови и органы лабораторных мышей / Н.Е. Шувалова, Е.А. Прутенская, М.Г. Сульман // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. - 2021. – Т.35. – С.97-107.

103. Яруллина, Д.Р. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.

104. Abd El-Hack, M.E. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review // M.E. Abd El-Hack, M.T. El-Saadony, M.E. Shafi et al. // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. - 2020. - V.104. - P.1835–1850.- <https://doi.org/10.1111/jpn.13454>.

105. Abd El-Moneim. Assessment of *in ovo* administration of *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* on performance, ileal histomorphometry, blood hematological, and biochemical parameters of broilers / A. El-Moneim, E. A. El-Wardany, I. Abu-Taleb et al // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.- 2020. - 12(2).-P. 439–450. - <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09549-2>.

106. Asgari, F. Probiotic feeding affects T cell populations in blood and lymphoid organs in chickens / F. Asgari, Z. Madjd, R. Falak et al // *Benef. Microbes.* - 2016.-30; 7(5).-P. 669–675.- <https://doi.org/10.3920/BM2016.0014>.

107. Bai, S.H. Glyphosate: Environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination / S.H. Bai, S.M. Ogbourne // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2016. -23(19). - <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7425-3>.

108. Barnett, J.A. Separating the Empirical Wheat From the Pseudoscientific Chaff: A Critical Review of the Literature Surrounding Glyphosate, Dysbiosis and Wheat-Sensitivity / J.A. Barnett, D.L. Gibson // *Frontiers in Microbiology.* - 2020. - V.11:556729. - P.1-8.- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556729>.

109. Baruzzi, F. Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus* spp. and Applications in Food / F. Baruzzi, L. Quintieri, M. Morea et al // *Formatex Microbiology Series Publication, Spain: Formatex.* - 2011. -P. 1102–1111.

110. Benbrook, Ch.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally / Charles M. Benbrook // *Environmental Sciences Europe.* - 2016.-28 (3). - P.1-15.- <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.

111. Bento, C.P.M. Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness/ C. P.M. Bento, X. Yang, G. Gort et al // *Science of The Total Environment.* - 2016. (572). - P.301–311.- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>.

112. Bøhn, T. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans / T. Bøhn, M. Cuhra, T. Traavik, M. Sanden, J. Fagan, R. Primicerio // *Food Chemistry.* -2013.- Volume 153.- P.207-215.- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.054>.

113. Bonnet J.L. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis* / J.L. Bonnet, F. Bonnemoy, M. Dusser et al // *Environmental Toxicology.*- 2007.- 22.- P.78–91.- <https://doi.org/10.1002/tox.20237>.

114. Boudergue, C. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety / C. Boudergue, C. Burel, S. Dragacci // Scientific report submitted to EFSA. - 2009. – V.01. - CFP/EFSA/FEEDAP. - P.192.

115. Brurberg, M.B. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. / M.B. Brurberg, I.F. Nes, V.G.H. Eijsink // Molecular Microbiology. – 1997. - 26 (2). - P.347–360.

116. Castrejon-G., M.L. Glyphosate Pollution Treatment and Microbial Degradation Alternatives, a Review / M.L. Castrejon-G., E. Tovar-Sánchez, L. Valencia-Cuevas et al // Microorganisms. - 2021. - V-09.-P.1-22. - <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112322>.

117. Cerdeira, A.L. The Current Status and Environmental Impacts of Glyphosate-Resistant Crops / A.L. Cerdeira, S.O. Duke // Journal of Environment Quality. - 2006. - № 5 (35). - P.1633–1658. - <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0378>.

118. Cheng, J. Review on biological degradation of mycotoxins / J. Cheng, Y. Fan, L. Zhao et al. / Animal Nutrition.- 2016.-v.2 (issue 3).-P.127-133.- <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.003>.

119. Chiesa, L.M. Detection of glyphosate and its metabolites in food of animal origin based on ion-chromatography-high resolution mass spectrometry (IC-HRMS) / L.M. Chiesa, M Nobile, S. Panseri, F. Arioli // Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. - 2019, - 36, P.592–600.

120. Clair, E. Effects of Roundup and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* / E. Clair, L. Linn, C. Travert et al // Curr Microbiol.- 2012.- 64.- P.486–491.- <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0098-3>.

121. Chun, B.H. Genomic and metabolic features of *Tetragenococcus halophilus* as revealed by pan-genome and transcriptome analyses / B.H. Chun, D.M. Han, K.H. Kim, S.E. Jeong, D. Park, C.O. Jeon // Food Microbiol, 2019. - 83: P. 36-47.- <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.009>.

122. Correa, L. O. Amazonian soil fungi are efficient degraders of glyphosate herbicide; novel isolates of *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichoderma* / L.O. Correa, A.F.M. Bezerra, L.R.S. Honorato et al. // *Brazilian Journal of Biology*. - 2022. - vol. 83. - P.1-7. - <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242830>.

123. De Clerck, E. Study of the bacterial load in a gelatin production process focussed on *Bacillus* and related endosporeforming genera / E. De Clerck, P. De Vos // *Syst.and Appl. Microbiol.* – 2002. – 25, №4. – P.611–617.

124. Dick, R.E. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation / R.E. Dick, J.P. Quinn // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 1995. - № 3 (43). - P.545–550.- <https://doi.org/10.1007/BF00218464>.

125. Dill, M.G. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties / M.G. Dill, R. D. Sammons, P. C. C. Feng et al.- US: John Wiley & Sons, Inc.- 2010.- P.-33.

126. Ding W. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate/ W.Ding, K.N.Reddy, R.M. Zablotowicz et al. // *Chemosphere*. - 2011. - №4 (83). – P.593–598.- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.008>.

127. Duke, S.O. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide (mini-review) / S.O. Duke, S.B. Powles // *Pest Management Science*. - 2008 (64). - P.319–325.- <https://doi.org/10.1002/ps>.

128. Duke, S.O. *Biotechnology: Herbicide-Resistant Crops* / S.O. Duke // *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. – 2014:(2). - P.94–116.

129. Duke, S. O. Glyphosate – How it Became a Once in a Hundred Year Herbicide and Its Future / Duke S.O., S. B. Powles, D. R. Sammons // *Outlooks on PestManagement*.-2018.-V.29.-P.247-251(5).- https://doi.org/10.1564/v29_dec_03.

130. Eason, T.H. Effects of atrazine and glyphosate ingestion on body weight and nutritional well-being of Coturnix quail / T.H. Eason, P.F. Scanlon // *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* – 2002.- 48.- P. 281-285.- <https://doi.org/10.1007/BF02192419>.

131. EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Scientific Report on evaluation of the impact of glyphosate and its residues in feed on animal health // EFSA Journal. - 2018. - 16(5):5283, 22p.-<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5283>.

132. Ezaka, E. Glyphosate Degradation by Two Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) Isolated from Rhizosphere of Maize /E. Ezaka, A.K. Akintokun, P.O. Akintokun et al. //Microbiology Research Journal International. -2019.- 26(6) -P.1-11.-<https://doi.org/10.9734/mrji/2018/v26i630081>.

133. Fan, J. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil / J. Fan, G. Yang, H. Zhao et al. // The Journal of General and Applied Microbiology. - 2012. - № 4 (58). - P.263–271. -<https://doi.org/10.2323/jgam.58.263>.

134. Fei, Y.Y. Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of Enterobacter / Y.Y. Fei, J.Y. Gai, T.J. Zhao // FEMS Microbiology Letters. - 2013. - № 2 (349). - P.135–143.-<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12306>.

135. Franz, J.K. Glyphosate: A Unique Global Herbicide / J.K. Franz, M.K. Mao, J. A. Sikorski // American Chemical Society. — 1997. — Chap. 4.— P. 65 — 97.

136. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic microbiota, introducing the concept of prebiotics / G.R. Gibson, M.B. Roberfroid // Journal of Nutrition. - 1995. - 125(6). - P.1401–1410. - <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.

137. Gillezeau, C. The evidence of human exposure to glyphosate: a review / Ch. Gillezeau, M. van Gerwen, R. M. Shaffer et al // Environmental Health. - 2019.- 18(2).- P.1-14.- <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>.

138. Gimsing, A.L. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils / A.L. Gimsing, O.K. Borggaard, O.S. Jacobsen et al. // Applied Soil Ecology. - 2004. - №3 (27). - P.233–242. - <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.05.007>.

139. Glyphosate: EFSA and ECHA update timelines for assessments. European Food Safety Authority. May 10, 2022 / EFSA Journal. URL:

<https://www.efsa.europa.eu/en/news/glyphosate-efsa-and-echa-update-timelines-assessments> (дата обращения: 01.04.2023).

140. Jha, R. Probiotics (Direct-Fed Microbials) in Poultry Nutrition and Their Effects on Nutrient Utilization, Growth and Laying Performance, and Gut Health: A Systematic Review / R. Jha, R. Das, S. Oak et al. // *Animals*. – 2020. - 10, 1863. - P.1-18. - <https://doi.org/10.3390/ani10101863>.

141. Jung, A., A review of *Enterococcus cecorum* infection in Poultry / A. Jung, LR. Chen, M.M. Suyemoto et al. // *Avian Dis*. – 2018. - 62 (3). – P.261-271.- <https://doi.org/10.1637/11825-030618>.

142. Hove-Jensen, B. Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase / B. Hove-Jensen, D.L. Zechel, B. Jochimsen // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2014. - №1 (78). – P. 176–197. - <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-13>.

143. Khan, R.U. Prospects of organic acids as safe alternative to antibiotics in broiler chickens diet / R.U. Khan, S. Naz, F. Raziq et al // *Environmental Science and Pollution Research*. - 2022.- 29.-P.32594–32604.- <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19241-8>.

144. Lewis, K.A. An international database for pesticide risk assessments and management / K.A. Lewis, J. Tzilivakis, D.J. Warner et al. // *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. -2016. -22(4). -P.1-15.- <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.

145. Marques, M.R. The Inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase as a Model for Development of Novel Antimicrobials / M.R. Marques, J.S. Oliveira, L.A. Basso et al.// *Curr Drug Targets*. - 2007. - № 8 (3). - P.445–457.- <https://doi.org/10.2174/138945007780058951>.

146. McDonald, P. *Animal Nutrition* / P. McDonald, R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh et al.- Harlow, England: Pearson Books, 2010.- 7 th edn. - p.692

147. Memorandum. Glyphosate in/on pasture and rangeland grasses, round UP Ready® wheat, and nongrass animal feeds. Health Effect Division (HED) Risk.

Assessment. / 20 February 2002// OPP Official Record Health Effects division Data Reviews EPA Series 361.

148. Mousa, N. *Bacillus megaterium* biodegradation glyphosate / N. Mousa, A. – J. Ali, M. Hussein// Iraqi Journal of Agricultural Sciences. – 2019. - 50(6). - P.1674-1680. - <https://doi.org/10.5772/intechopen.96919>.

149. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. / Task Force Report Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA. - 2003. - No. 139. - P.199

150. Oren, A. Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui* / A. Oren, P. Gurevich, Y. Henis // Appl Environ Microbiol. - 1991.-57(11): P.3367-70. - <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3367-3370.1991>.

151. Pollegioni, L. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering / L. Pollegioni, E. Schonbrunn, D. Siehl // The FEBS journal. - 2011. -278(16). - P.2753–2766.- <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>.

152. Rodríguez, M.P. Glyphosate Bioremediation through the Sarcosine Oxidase Pathway Mediated by *Lysinibacillus sphaericus* in Soils Cultivated with Potatoes. / M.P. Rodríguez, C. Melo, E. Jiménez et al. // Agriculture. - 2019. – 9. - P.1-16. - <https://doi.org/10.3390/agriculture9100217>.

153. Rocha, T. S. Evaluation of in vitro and in vivo adhesion and immunomodulatory effect of Lactobacillus species strains isolated from chickens / T. S. Rocha, A. A. S. Baptista, T. C. Donato et al //Poult. Sci. -2012. – 91.-P.362–369. - <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01803>.

154. Ruttanavut, J. Growth performance and intestinal histomorphology in egg-type growing roosters fed recycled food waste containing effective microorganisms. / J. Ruttanavut, K. Yamaucci // Turk. J. Vet. Anim. Sci. – 2012. - 36(5). - P.509-518. - <https://doi.org/10.3906/vet-1010-529>.

155. Ruuskanen, S. Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term

experiment in an avian model. / S. Ruuskanen, M.J. Rainio, C. Gomez-Gallego et al // Environmental Pollution. – 2020.-V.266 (115108). - P. 1-10.- <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115108>.

156. Sander, J. Fully automated derivatization and quantification of Glyphosate and AMPA in beer using a standard UHPLC-MS/MS system / J. Sander, A. Grüning, R. Ludwig // Excellence in Science, ©Shimadzu Corporation. - 2017. - V1. - P.1-6.

157. Shehata A.A. The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro / A.A. Shehata, W. Schrödl, A. A. Aldin et al. // Current microbiology. - 2012.-V.66 (4).-P. 350-358.- <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2>.

158. Singh, S. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation / S. Singh, V. Kumar, JPK Gill et al. // International Journal of Environmental Research and Public Health. - 2020. - V.17 (20). - <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>.

159. Soares, D. Glyphosate Use, Toxicity and Occurrence in Food / D. Soares, L. Silva; S. Duarte et al// Foods – 2021. – 10(11): 2785. – P.1-22. - <https://doi.org/10.3390/foods10112785>.

160. Sorokulova, I. Modern Status and Perspectives of Bacillus Bacteria as Probiotics / I. Sorokulova // J Prob Health. -2013.- Vol. 1(4)e106-P.1-5.- <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000e106>.

161. Soukup, S.T. Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany / S.T. Soukup, B. Merz, A. Bub et al // Archives of Toxicology. -2020. - V94. - P.1575–1584. - <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02704-7>.

162. Stenrod, M. Spatial variability of glyphosate mineralization and soil microbial characteristics in two Norwegian sandy loam soils as affected by surface topographical features / M. Stenrod, M.P. Charnay, P. Benoit et al. // Soil Biology and Biochemistry. - 2006. - № 38 (5). - P.962–971.- <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.014>.

163. Sumi, C.D. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for Antibiotics / C. D. Sumi, B.W. Yang, I.-C. Yeo // *Can J Microbiol.* - 2015.- 61(2).-p.- 93-103. - <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>.
164. Sviridov, A.V. New approaches to identification and activity estimation of glyphosate degradation enzymes / A.V. Sviridov, N.F. Zelenkova, N.G. Vinokurova et al. // *Biochemistry. Moscow* - 2011. - №6 (76). - P.720–725.- <https://doi.org/10.1134/S0006297911060149>.
165. Sviridov, A. V Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review) / A.V. Sviridov, T.V. Shushkova, I.T. Ermakova et al. // *Applied Biochemistry and Microbiology.* -2015. -51 (2).-P.183–190.-<https://doi.org/10.1134/S0003683815020209>.
166. Tanasupawat, S. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand / S. Tanasupawat, S. Sukontasing, J.-S. Lee // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* - 2008.- 58.-P.1630–1634.- <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65535-0>.
167. Umesaki, Y. Interactions between epithelial cells and bacteria, normal and pathogenic / Y. Umesaki, Y. Okada, A. Imaoka, et al. // *Science.* - 1997.- 276(5314). - P.964-965.- <https://doi.org/10.1126/science.276.5314.964>.
168. Upadhaya, S.D. Effects of inclusion of *Bacillus subtilis* (Gallipro) to energy- and protein-reduced diet on growth performance, nutrient digestability, and meat quality and gas emission in broilers. / S.D. Upadhaya, F. Rudeaux, I.H. Kim // *Poultry Science.* - 2019. - v.98(E-suppl-2). - <https://doi.org/10.3382/ps/pey573>.
169. Vieco-Saiz, N. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. / N. Vieco-Saiz, Y. Belguesmia, R. Raspoet et al // *Frontiers in Microbiology.* - 2019. - V.10. – P.57. - <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>.
170. Wang, J. Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins /J. Wang, Y.Xie // *Grain & Oil Science and Technology.*-2020. V3.- Issue 5.-P. 117–125.- <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.05.002>.

171. Wardle, D.A., Parkinson D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity / D.A. Wardle, D. Parkinson // *Plant and Soil*.- 1990. - 122. - P.21–28.- <https://doi.org/10.1007/BF02851906>.
172. WHO. Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides // International Agency for Research of Cancer.: WHO// *Monographs*. - Volume 112. – 2015.
173. Wu, Q.K. Biological degradation of aflatoxins / Q.K. Wu, A. Jezkova, Z. Yuan et al // *Drug metabolism review*. - 2009. -41.- P.1-7.- <https://doi.org/10.1080/03602530802563850>.
174. Wuxing, L. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture / L.Wuxing, X. Xushi, X. Wu et al // *Environmental Geochemistry and Health*. – 2006. –V.28. – P. 133–140.- <https://doi.org/10.1007/s10653-005-9022-0>.
175. Yi, S. A Novel Naturally Occurring Class I 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Janibacter* sp. Confers High Glyphosate Tolerance to Rice / S. Yi, Y. Cui, Y. Zhao et al // *Scientific Reports*. - 2016. - Jan 12; 6: 19104. - <https://doi.org/10.1038/srep19104>.
176. Yirga, H. The Use of Probiotics in Animal Nutrition / H. Yirga // *Journal of Probiotics & Health*. - 2015. - Volume 3.- Issue 2.- P. 1-10. - <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000132>.
177. Zabaloy, M.C. Herbicides in the Soil Environment: Linkage between Bioavailability and Microbial Ecology / M.C. Zabaloy, G. P. Zanini, V. Bianchinotti et al. // *Herbicides, Theory and Applications*. - 2011. – P.161–192. <https://doi.org/10.5772/12880>.
178. Zaghari, M. Effect of *Bacillus subtilis* spore (GalliPro®) nutrients equivalency value on broiler chicken performance / M. Zaghari, N. Zahroojianm, M. Riahi et al // *Italian Journal of Animal Science*. - 2015. –V. 14: 3555.- P. 94-98 <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3555>.

179. Zeiger, K. Lauric acid as feed additive - An approach to reducing *Campylobacter* spp. in broiler meat / K. Zeiger, J. Popp, A. Becker et al // PLoS ONE. - 2017.- 12(4): e0175693. – P. 1-10.-<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175693>.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Условия хроматографирования для определения витаминов группы В представлены в таблице А1.

Таблица А.1 – Условия хроматографирования

Колонка	Acquity ВЕН (100 x 2,1) мм, 1,7 мкм		
Подвижная фаза	– компонент А– 0,05% ТФУ в воде –компонент В – 0,05% ТФУ в ацетонитриле		
Режим хроматографического элюирования	Градиентный		
	Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы А, % В, %	Скорость потока, мкл/мин
	0	100 0	200
	10	10 90	200
	11	10 90	200
	11,5	100 0	200
Рабочая длина волны УФ-детектора	220 нм		
Объем пробы	10 мкл		

Условия хроматографического анализа ФИТЦ-производных аминокислот представлены в таблице А2.

Таблица А.2 – Условия хроматографического анализа

Колонка	Acquity ВЕН (100 x 2,1) мм, 1,7 мкм		
Подвижная фаза	Компонент А – калия дигидрофосфат 0,05 М (рН 6,84) Компонент В – ацетонитрил.		
Режим хроматографического элюирования	Градиентный		
	Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы	Скорость потока, мкл/мин
	1	2	3

	1	2	3	
	0,0	95	5	200
	9	65	35	200
	11	65	35	200
	12,5	95	5	200
Рабочая длина волны УФ-детектора	254 нм			
Объем ввода пробы	5 мкл			
Время анализа	15 мин			

Условия хроматографирования проб А – В для определения метаболитов по методу ГЖХ-МС в таблице А.3.

Таблица А.3 – Условия хроматографирования

Наименование показателя	Значение показателя
Температура инжектора и детектора	280°С
Начальная температура колонки	50°С
Время при начальной температуре	3 мин
Скорость нагрева	10°С/мин
Конечная температура колонки	300 С
Время при конечной температуре	7 мин
Газ носитель He	1 мл/мин
Деление потока	1 : 6

Приложение Б

Б.1. Определение молекулярной массы пептидов в культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* – 4801 и *Enterococcus faecium* 1-35 продемонстрированы на рисунках Б.1 и Б.2.

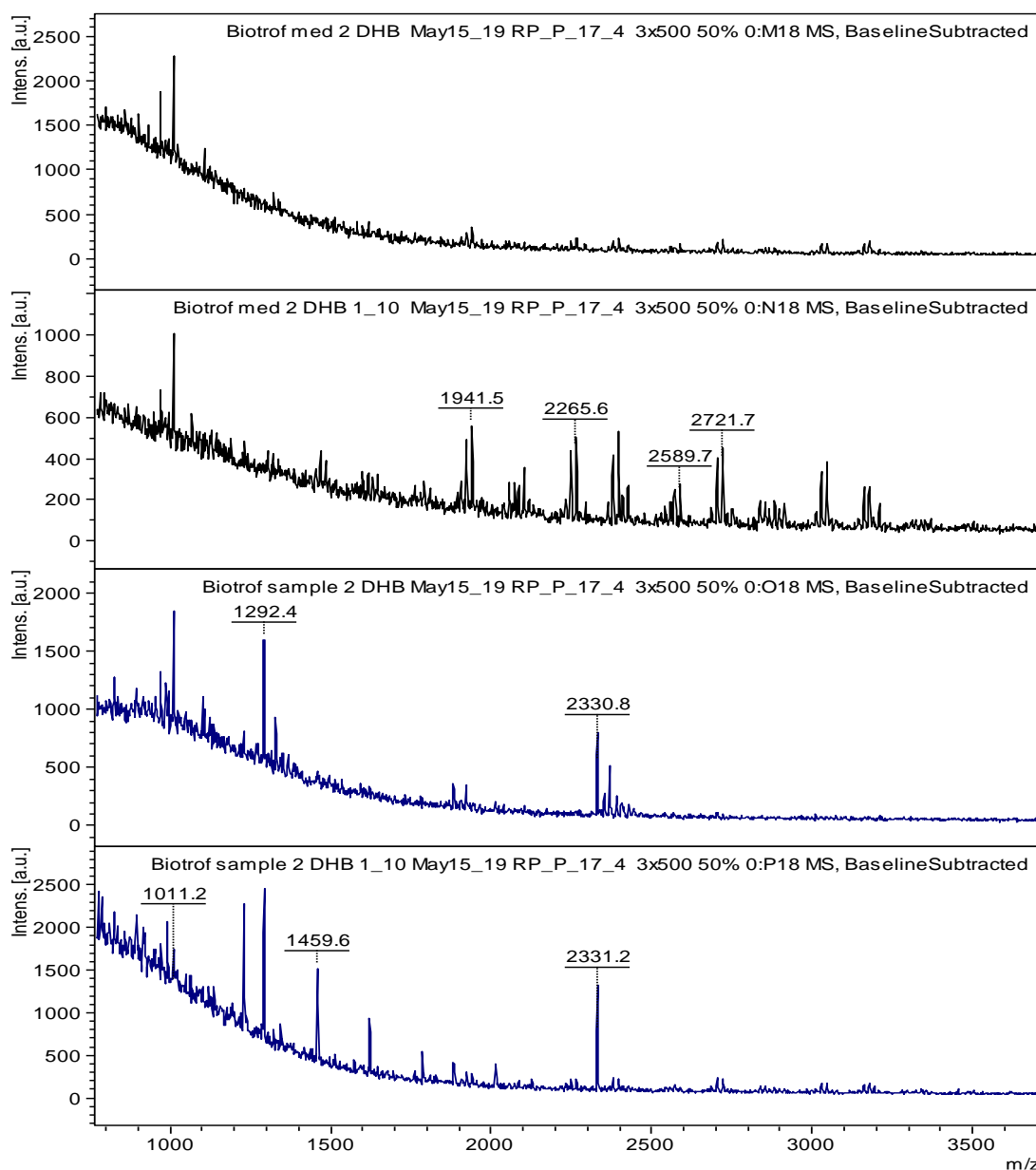


Рисунок Б.1 - Сравнение пептидных профилей образца КЖ *Bacillus megaterium*-4801 и питательной среды. Сверху вниз:

- неразбавленная питательная среда;
- питательная среда, разбавленная 0,1% ТФУ в 10 раз;
- неразбавленный образец КЖ *Bacillus megaterium*-4801;
- образец, разбавленный 0,1% ТФУ в 10 раз.

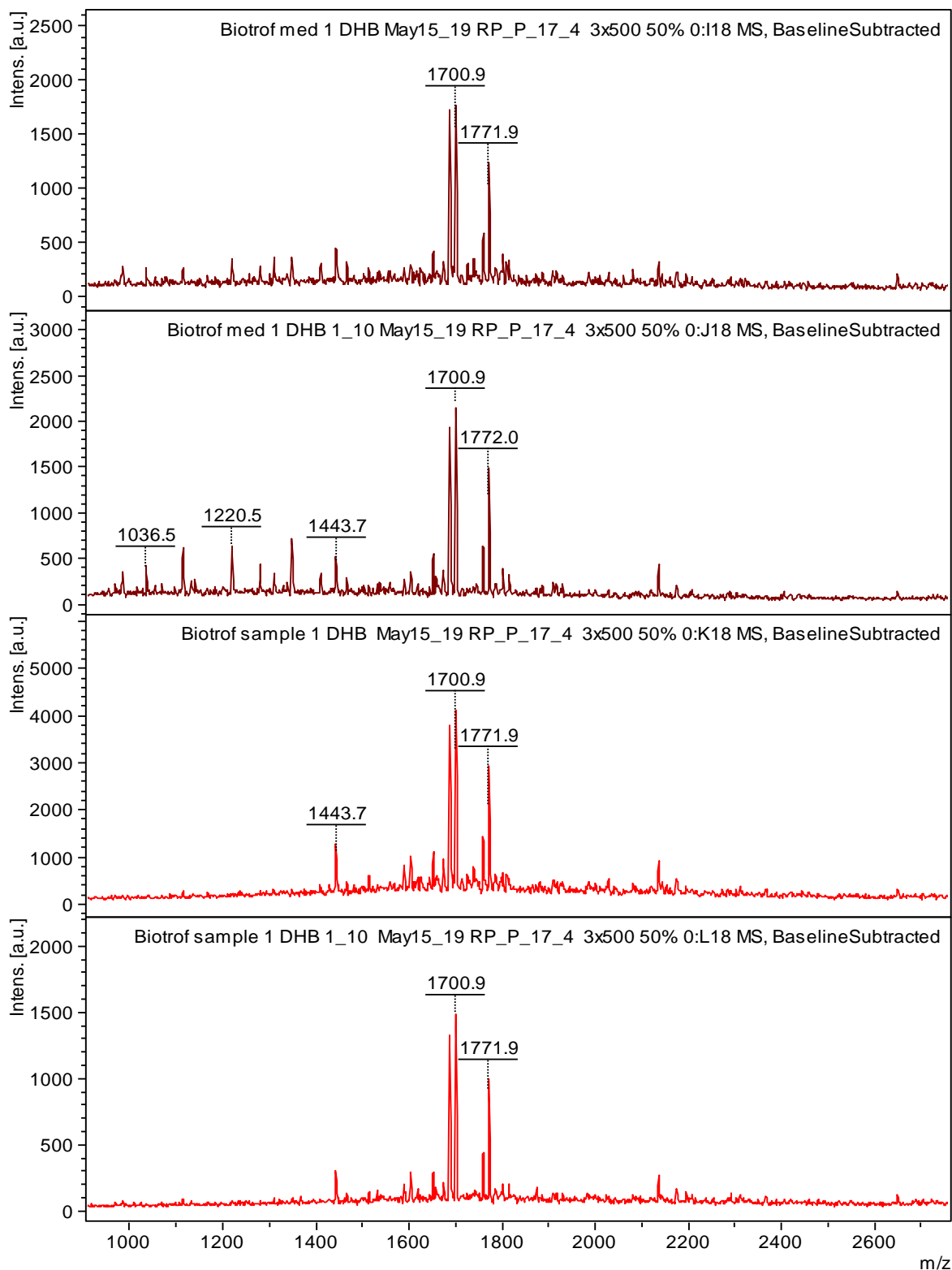


Рисунок Б.2 - Сравнение пептидных профилей образца КЖ *Enterococcus faecium* 1-35 и питательной среды. Сверху вниз:

- неразбавленная питательная среда;
- питательная среда, разбавленная 0,1% ТФУ в 10 раз;
- неразбавленный образец КЖ *Enterococcus faecium* 1-35;
- образец, разбавленный 0,1% ТФУ в 10 раз.