

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Санкт-Петербург – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный аграрный университет» на «Кафедре кормления и разведения сельскохозяйственных животных»

Научный руководитель: **Лаптев Георгий Юрьевич**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Вертипрахов Владимир Георгиевич,**
доктор биологических наук, профессор,
и.о. заведующего кафедрой физиологии,
этологии и биохимии животных
ФГБОУ ВО «Российского
Государственного аграрного университета -
МСХА имени К.А. Тимирязева» (г. Москва)
Мясникова Ольга Вячеславовна,
кандидат сельскохозяйственных
наук, доцент кафедры зоогигиены
и птицеводства им. А.К. Даниловой
ФГБОУ ВО «Московской государственной
академии ветеринарной медицины и
биотехнологии –
МВА им. К.И. Скрябина» (г. Москва)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение Федеральный научный
центр «Всероссийский научно-
исследовательский и технологический
институт птицеводства» (г. Сергиев Посад)

Защита состоится «09» апреля 2024 г. в 12.30 часов на заседании диссертационного совета 35.2.033.03 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», 196601, Санкт-Петербург, город Пушкин, Петербургское шоссе, д. 2, лит. А., новый лабораторный учебный корпус, ауд. 2113.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО СПбГАУ и на официальном сайте по адресу: <https://spbgau.ru/science/dissertatsionnye-sovety/dissertatsionnyy-sovet-35-2-003-03/protection/melikidi-veronika-khristoforovna/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ года

Ученый секретарь
диссертационного совета 35.2.033.03
доктор биологических наук

Ильина Лариса Александровна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 др. культуры (Рядчиков, 2015; Лисунова, 2011; Коломейченко, 2015).

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. Пестицид глифосат используется повсеместно в мире как гербицид и как десикант. Остаточные количества пестицидов накапливаются в растительных тканях кормовых культур (Борисова и др. 2022; Петрова и др., 2020, Медведев, 2019; Bohn et al., 2013) и через комбикорма могут попадать в рацион птицы.

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), в кормах для сельскохозяйственных животных, птицы и рыб (Сорокин А. и др., 2022). Влияние глифосата на организм птицы изучено в ограниченном количестве исследований (Ruuskanen et al., 2020; Eason et al., 2002; EFSA, 2018). Исследования влияния глифосата на показатели продуктивности и состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы до настоящего времени не проводились.

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;
4. определить биохимический спектр метаболитов, продуцируемых бактериями;
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, содержащих глифосат;
7. определить состав микрофлоры слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров;
8. изучить влияние пробиотика «Целлобактерин +» на зоотехнические показатели кур-несушек в условиях скармливания им кормов, содержащих глифосат;
9. оценить экономическую эффективность использования пробиотика «Целлобактерин+» в кормлении кур-несушек.

Научная новизна исследований. Впервые в широком спектре кормов растительного происхождения было проверено содержание глифосата. Выбраны перспективные пробиотические бактерии, обладающие способностью разрушать молекулу глифосата. Оценена эффективность действия пробиотиков на показатели продуктивности бройлеров и кур-несушек.

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. 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. В основе методологии выполненных исследований лежат научные положения, изложенные в трудах отечественных и зарубежных исследователей. Содержание глифосата в кормах определяли методом ИФА. Бактерии исследовали с помощью классических методов микробиологии. Биохимические свойства культур пробиотических штаммов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, газо-жидкостной хроматомасс-спектрометрии. В одном из этапов работ использованы технологические приемы кормления и содержания птицы, принятые в птицеводстве и зоотехнические методы для оценки эффективности применения кормовых добавок. Микрофлору желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров анализировали с помощью метода полногеномного секвенирования NGS.

Основные положения, выносимые на защиту:

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

- среди пробиотических бактерий выявлены виды, обладающие способностью к биодеструкции 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 скармливании кормов с содержанием глифосата.

Степень достоверности. 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.

Апробация результатов исследования. Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на международной научно-практической конференции «Научное обеспечение развития животноводства в Российской Федерации» (Дубровицы, 2019); на международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в агропромышленном комплексе в современных экономических условиях» (г. Волгоград, 2021); на всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Селекционные и технологические аспекты интенсификации производства продуктов животноводства (г. Москва, 2022); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Охрана окружающей среды. Роль и влияние лекарственных средств и их метаболитов в обеспечении экологической безопасности пищевых продуктов» (г. 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), 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.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая схема исследований представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – общая схема исследований

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ для реализации научного проекта № 22-16-00128 «Изучение токсического действия глифосатов на функциональное состояние микробного сообщества кишечника птиц, их рост и развитие и разработка биопрепарата на основе штамма-деструктора глифосата».

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

Определение глифосата в комбикормах и растительном сырье проводили методом ИФА с помощью тест-систем Glyphosate ELISA Microtiter Plate (США, Abraxis®).

Культивирование бактерий с различными концентрациями глифосатсодержащего препарата или чистого глифосата для определения выживаемости бактерий и биодеструкции глифосата проводили в стеклянных колбах на качалочных платформах при различных температурах культивирования. Степень биодеструкции проверяли методами ИФА и ВЭЖХ.

Определение аминокислот в культуральных жидкостях бактерий проводили методом ВЭЖХ-СФ. Определение молекулярной массы пептидов методом МАЛДИ. Определение метаболического профиля бактерий проводили с помощью ГЖХ-МС.

Первый научно-хозяйственный опыт проводили на цыплятах-бройлерах кросса «ROSS-308» для изучения влияния глифосата 20 мг/кг в составе комбикорма и пробиотика «Пробиоцид-Ультра» на зоотехнические показатели. Эксперименты были проведены в виварии ООО «БИОТРОФ» в 2021г. Анализ состава микробиома проводили в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ». Цыплята-бройлеры были распределены на 3 группы по 40 голов в каждой группе. Продолжительность выращивания 35 суток.

Контрольная группа I получала основной рацион в виде стандартного комбикорма. Дополнительно для группы II и III в комбикорм вносили глифосатсодержащий препарат «Агрокиллер» (АО «Август», Россия) до конечной концентрации глифосата в корме 20 мг/кг. Для группы III в дополнение к основному рациону добавляли пробиотик «Пробиоцид-Ультра» в дозировке 1 кг/т комбикорма.

Второй научно-хозяйственный опыт проводили там же в 2021г. Опыт провели на курах-несушках кросса «Декалб Уайт». При этом изучали влияние глифосата в концентрации 40 мг/кг корма и пробиотика «Целлобактерин+» на зоотехнические показатели. Опыт проводили в клеточных блоках БН-1 по 22 головы в каждой группе с 394-дневного возраста в течение 5 недель. Контрольную группу кормили стандартным комбикормом для кур-несушек старше 47-недельного возраста. Опытные группы кормили этим же комбикормом с добавлением глифосата в дозе 40 мг/кг корма. Группа 3 в дополнение к основному рациону получала пробиотик «Целлобактерин+» в дозировке 1 кг/т комбикорма.

Биометрическую обработку данных, полученных в ходе проведения научно-хозяйственных опытов, осуществляли по методике Плохинского Н. А. с использованием программы «Microsoft Excel». Достоверность различий между признаками определяли путем сопоставления с критерием по Стьюденту при двух порогах достоверности (* $P > 0,95$; ** $P > 0,99$).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Образцы кормов отбирали на действующих птицеводческих предприятиях и комбикормовых заводах России. Исследовали следующие виды кормов: комбикорма, премиксы, шроты и жмыхи, пшеницу, ячмень, сою, горох и др. 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, что показано на рисунке 2. В 12,1% образцов обнаружили максимальные количества глифосата от $0,300 \pm 0,038$ мг/кг до $0,687 \pm 0,089$ мг/кг.

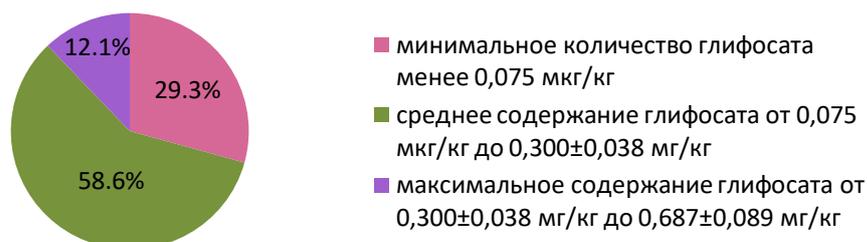


Рисунок 2 - Содержание глифосата в различных видах кормов

Содержание глифосата в растительных кормах сравнивали с действующими нормативами ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна». Из общего числа исследованных образцов комбикормов в 29 образцах обнаружили содержание глифосата менее 0,150 мг/кг, что соответствует МДУ по сое. 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.

3.2 Определение способности бактерий к выживаемости в присутствии глифосатсодержащего препарата

Для определения устойчивости бактерий проводили инкубирование бактерий в присутствии глифосатсодержащего препарата в различных концентрациях. Культивирование проводили в течение двух суток, каждые сутки отбирали пробы для определения количества жизнеспособных клеток бактерий. Результаты представлены на рис. 3, 4, 5.

Все бактерии способны к росту на среде с глифосатсодержащим препаратом в концентрации 0,72 мг/л. При увеличении концентрации до 36 мг/л хороший рост наблюдали у культур *Enterococcus faecium* 1-35 и *Bacillus subtilis* 1-85, одинаковый с ростом бактерий в контрольных колбах. Рост *Bacillus megaterium* -4801 замедляется при концентрации глифосата 36 мг/л.

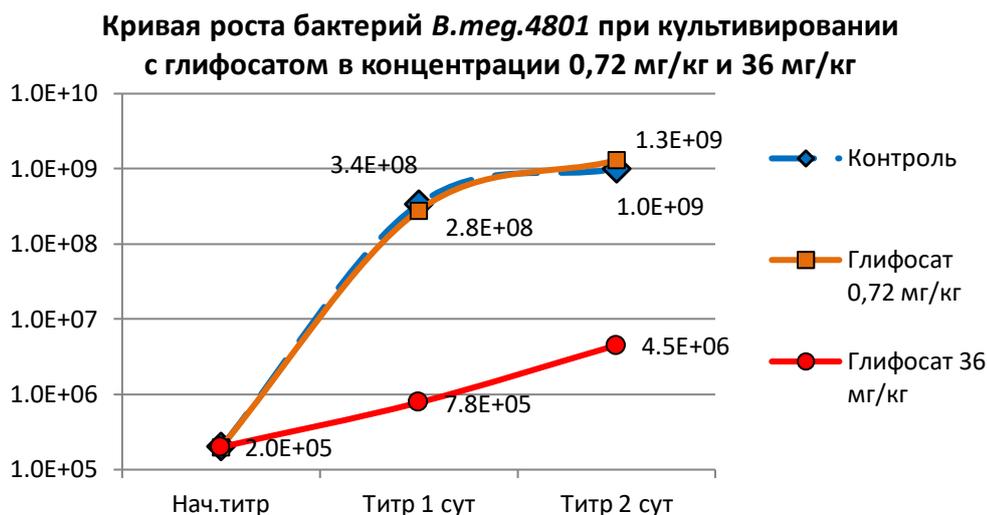


Рис.3 Культивирование *Bacillus megaterium* -4801 с глифосатом

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

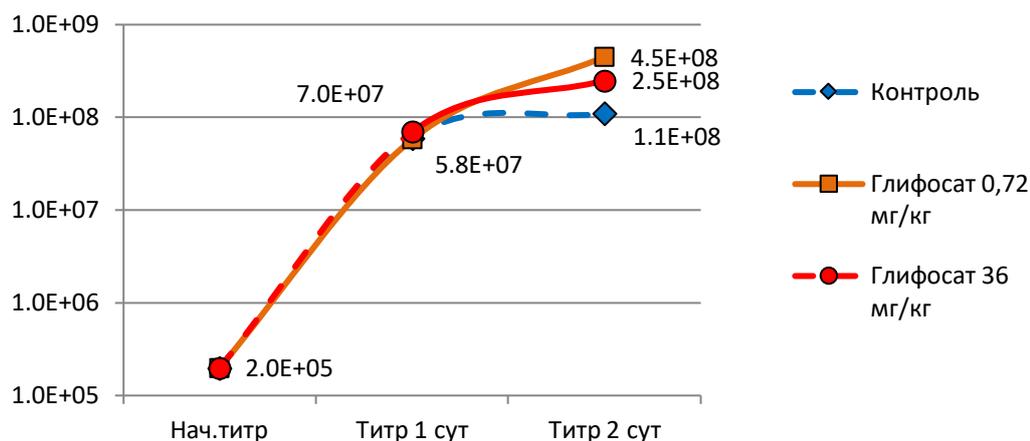


Рис. 4 Культивирование *Enterococcus faecium* 1-35 с глифосатом

Кривая роста бактерий *B.subt.*1-85 при культивировании с глифосатом в концентрации 0,72 мг/кг и 36 мг/кг

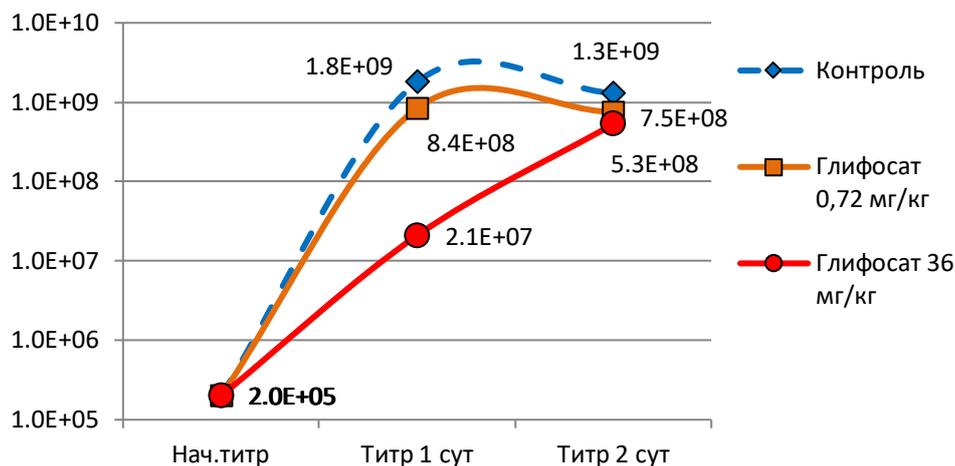


Рис.5 Культивирование *Bacillus subtilis* 1-85 с глифосатом

3.3 Определение биодеструкции глифосата в инкубируемых смесях методом ИФА

Культивирование бактерий для определения возможности биодеструкции глифосата проводили с коммерчески доступным пестицидом «Торнадо ВР», где действующим веществом является глифосат. Результаты представлены на рисунке 6.

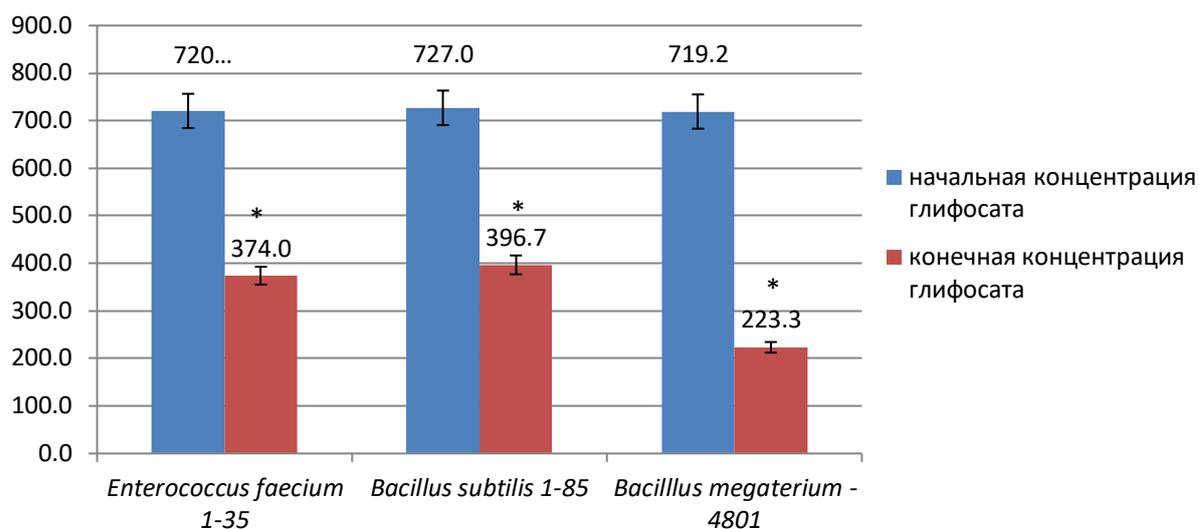


Рисунок 6 - Изменение концентрации глифосата через двое суток инкубирования с бактериями *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus subtilis* 1-85 и *Bacillus megaterium*-4801 соответственно. Отличия в опытных вариантах от контрольных достоверны при $p \leq 0,05$.

В результате инкубирования бактерий *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus subtilis* 1-85 и *Bacillus megaterium*-4801 в питательных средах, содержащих глифосат, обнаружили снижение концентрации глифосата на 48%, 45% и на 69% соответственно в течение 48 часов.

3.4. Определение биодеструкции глифосата в инкубируемых смесях методом ВЭЖХ

Для подтверждения результатов, полученных методом ИФА в исследовании биодеструкции глифосата, провели дополнительное исследование методом ВЭЖХ.

Результаты проведения эксперимента по биодеструкции чистого вещества глифосата с помощью бактерий в смесях простых питательных сред представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Содержание глифосата в инкубируемой смеси с бактериями.

Наименование пробы	Количество глифосата в пробах, мкг/мл	Изменение содержания глифосата от первоначального уровня содержания глифосата в пробе, %
Анаэробные условия культивирования бактерий, полусинтетическая питательная среда №1 (сахароза, дрожжевой экстракт и др.)		
Проба 1 начальная (<i>Enterococcus faecium</i> 1-35+ глифосат стандартный раствор 5 мкг/мл)	4,77 ± 0,18	100% -принимаем за первоначальный уровень
Проба 2 конечная (<i>Enterococcus faecium</i> 1-35+ глифосат стандартный раствор 5 мкг/мл)	2,46 ± 0,09**	-48% убыль глифосата в культуральной жидкости <i>Enterococcus faecium</i> 1-35
Аэробные условия культивирования, синтетическая питательная среда №2 (сахароза, неорг. соли – фосфат, сульфат, хлорид и т.д.)		
Проба 3 начальная (<i>Bacillus subtilis</i> 1-85+ глифосат стандартный раствор 5 мкг/мл)	5,05 ± 0,19	100% -принимаем за первоначальный уровень
Проба 4 конечная (<i>Bacillus subtilis</i> 1-85 + глифосат стандартный раствор 5 мкг/мл)	3,61 ± 0,14**	-28% убыль глифосата в культуральной жидкости

		<i>Bacillus subtilis</i> 1-85. С поправкой на испарение жидкости в пробе убыль составляет 32,8%
--	--	--

** При $p \leq 0,01$

При проведении инкубирования *Enterococcus faecium* 1-35 и *Bacillus subtilis* 1-85 с глифосатом определили, что концентрация глифосата в конечных образцах через двое суток уменьшилась на 48% и на 32,8% соответственно от первоначальной концентрации.

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

Результаты способности бактерий выживать в имитируемых условиях желудка и кишечника птиц представлены в таблицах 2, 3.

Таблица 2 – 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</i> 1-35					
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%
<i>Bacillus megaterium</i> 4801					
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%
<i>Bacillus subtilis</i> 1-85					
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 3 – 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</i> 1-35					
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</i> 4801					
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</i> 1-85					
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

Бактерии *Enterococcus faecium* 1-35 сохранились на 80% в условиях желудка и на 100% в условиях кишечника, кроме того, показали способность к росту 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 количество этих видов бактерий увеличивается на два порядка по сравнению с исходным титром.

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 7.

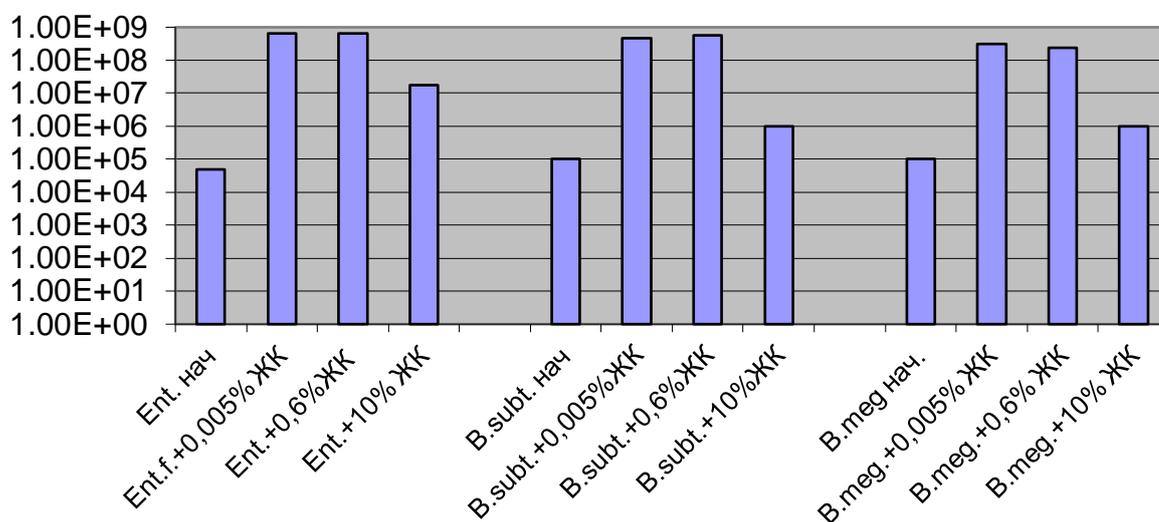


Рисунок 7 - Выживаемость бактерий при инкубировании в присутствии 0,005%; 0,6% и 10% желчных кислот

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 метаболического профиля пробиотических бактерий *Bacillus megaterium* - 4801 и *Enterococcus faecium* 1-35

В таблице 4 представлены общие характеристики культуральной жидкости бактерий рода *Bacillus megaterium*-4801 и *Enterococcus faecium* 1-35 и соответствующих питательных сред, на которых были выращены эти бактерии.

Таблица 4 – Общие характеристики культуральной жидкости бактерий

№ п/п	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
1	pH (24,5 °C)	6,30±0,01	8,70±0,02	6,87±0,03	5,12±0,01
2	Общий белок, мг/мл	3,80±0,09	6,80±0,07	4,8±0,09	2,7±0,02
3	Сухой остаток (105°C), %	3,25±0,04	1,60±0,02	1,65±0,03	1,2±0,03

Снижение сухого остатка в питательных средах указывает на расходование питательных веществ на синтез различных органических соединений и биомассы бактериями. Изменение кислотности среды в кислую или щелочную область указывает пути направления синтеза метаболитов. Так, при анализе *Enterococcus faecium* 1-35 определили накопление кислот. У

бактерии *Bacillus megaterium* -4801 регистрировали синтез белковых соединений и смещение значения pH в щелочную сторону. На рисунке 8 представлены основные метаболиты, синтезируемые в питательную среду бактериями.

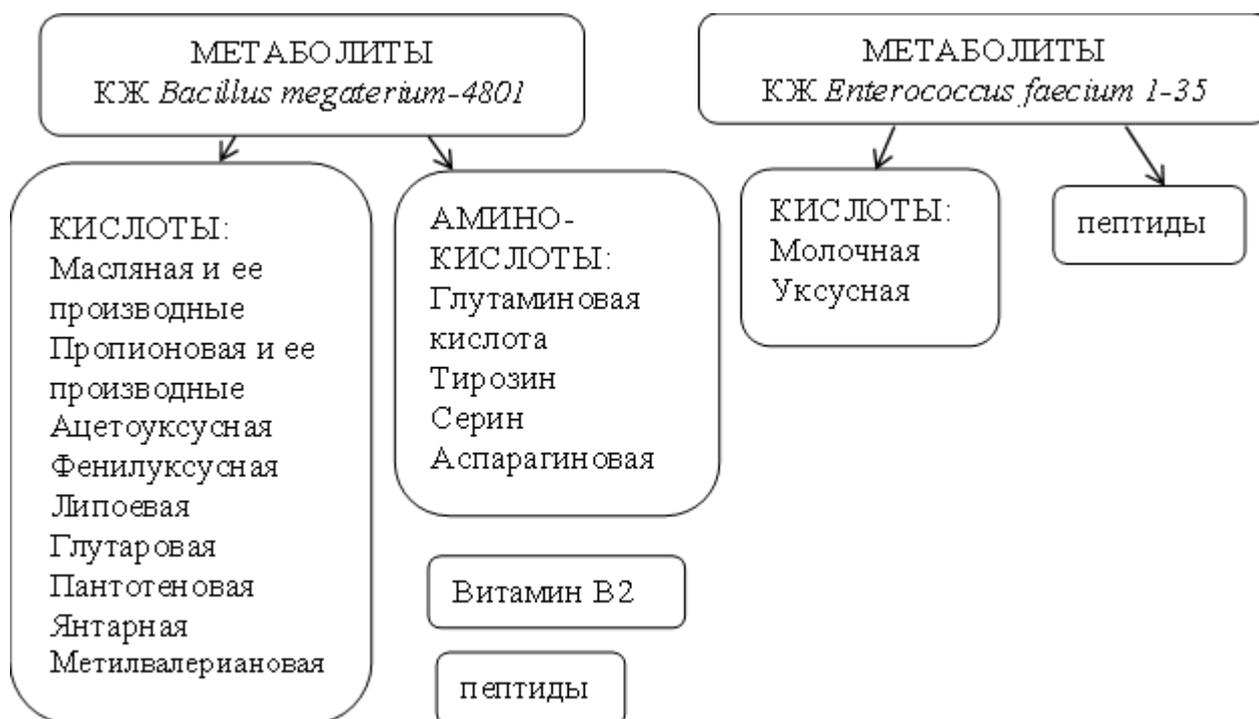


Рисунок 8 – Содержание вторичных метаболитов в образце КЖ *Bacillus megaterium*-4801 и *Enterococcus faecium* 1-35

Для бактерии *Bacillus megaterium* - 4801 характерен синтез значительного ассортимента органических кислот. При этом основной метаболит - масляная кислота и ее производные, которые составляют до 47% от общего количества метаболитов. Также бактерия синтезирует глутаминовую кислоту - 100,6 мкг/мл; тирозин 3,5 мкг/мл, серин 2,0 мкг/мл, аспарагиновую кислоту 6,1 мкг/мл; рибофлавин (витамин В2) в количестве 1,7 мкг/мл. В образце КЖ *Bacillus megaterium* - 4801 преобладают пептиды с массой около 2330 Да и в интервале от 1200 до 1800 Да. В результате исследования проб КЖ *Enterococcus faecium* 1-35 обнаружено, что она синтезирует молочную и уксусную кислоты, а также пептиды с молекулярной массой в диапазоне от 1650 до 1800 Да.

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 5.

Таблица 5 - Зоотехнические результаты выращивания бройлеров

Показатель	Группа		
	I-Контроль	II-Глифосат	III-Глифосат и Пробиоцид-Ультра
1	2	3	4
Поголовье, гол. на начало опыта	40	40	40

1	2	3	4
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
Живая масса на 14-й день, г	387,2±8,9	415,2±9,0**	394,9±7,5**
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 $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Внесение в корма группы II глифосата в дозировке 20 мг/кг привело к снижению живой массы бройлеров при убое на 1,4% по сравнению с контролем. Живая масса бройлеров в группе III была на 4,2% и на 2,8% больше по сравнению с группой II и с группой I соответственно. Среднесуточный прирост цыплят за период опыта в группе III, получавшей дополнительно к глифосату пробиотик «Пробиоцид-Ультра», был выше на 2,9% по сравнению с контролем и на 4,3% по сравнению с группой II. При этом коэффициент конверсии корма в группе III был ниже на 0,6% и 2,4% по сравнению с группой I и II соответственно.

3.8. Микрофлора цыплят-бройлеров

Состав микробного сообщества слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров оценивали методом NGS-секвенирования. Результаты представлены на рисунке 9.

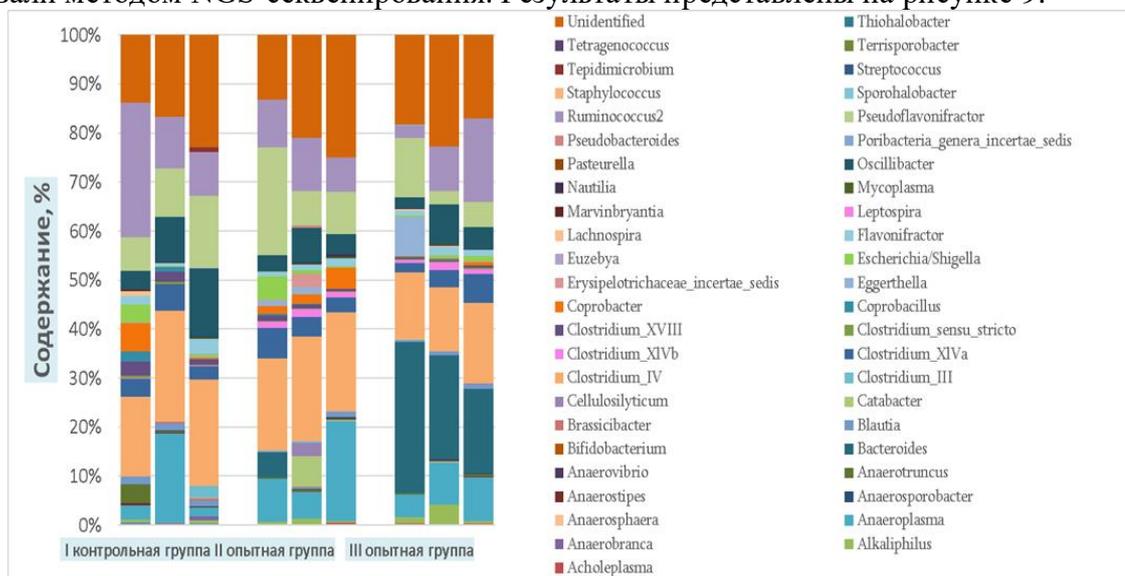


Рисунок - 9 Состав кишечного микробиома цыплят-бройлеров кросса «Росс 308» на уровне бактериальных родов ($P \leq 0,05$) по данным NGS-секвенирования ампликонов 16S рРНК при скармливания глифосата и пробиотика «Пробиоцид-Ультра».

Были отмечены выраженные отличия между группами по численности микроорганизмов ($P \leq 0,05$). Основной тенденцией являлось снижение некоторых

представителей нормофлоры на фоне возрастания численности нежелательных форм микроорганизмов.

Так, на фоне глифосата в опытных группах II и III снижалось количество 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, которая участвует в предотвращении последствий окислительного стресса. На фоне применения глифосата (группа II) происходило также практически полное вытеснение бактерий *Tepeidimicrobium* из состава микробиома. Данный микроорганизм способен к ферментации труднопереваримых полисахаридов, включая ксилан и целлобиозу до таких важных продуктов, как ацетат, бутират, пропионат. 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 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 пробиотических бактерий в составе препарата «Пробиоцид-Ультра», в группе III происходило снижение численности бактерий рода *Clostridium* 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 метаболитов среди кишечной микробиоты.

Интересно, что на фоне введения глифосата (группы II и III) пищеварительную систему птиц колонизировали представители галофильных родов микроорганизмов *Tetragenococcus* и *Sporohalobacter*. Известно, что представители *Sporohalobacter spp.* обладают выраженной способностью к деструкции сложных органических соединений, таких, как нитробензол, нитрофенолы.

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

Зоотехнические показатели, полученные в опыте на курах-несушках, представлены в таблице 6.

Таблица 6. Зоотехнические показатели в опыте на курах-несушках за 35 дней продуктивности.

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	$1734,05 \pm 30,1$	$1708,00 \pm 29,0$	$1736,59 \pm 31,8$
Живая масса в конце опыта, г	$1756,50 \pm 16,3$	$1704,50 \pm 30,1^*$	$1781,91 \pm 17,9^*$
Средняя масса яиц на начало опыта, г	$63,35 \pm 0,48$	$61,86 \pm 0,49^*$	$62,93 \pm 0,41^*$
Средняя масса яиц на конец опыта, г	$64,00 \pm 0,39$	$61,17 \pm 0,57^*$	$63,69 \pm 0,44^*$

1	2	3	4
Интенсивность яйценоскости до начала опыта (1 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, шт.	33,03	32,82	33,46
% 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 * $p \leq 0,05$

В группе 2 с глифосатом наблюдали снижение яйценоскости на 0,64% по сравнению с контролем. В группе 3 с применением глифосата и добавки «Целлобактерин®+» яйценоскость на среднюю несушку за период опыта была выше контроля на 1,3%. В контрольной группе 1 затраты корма на 10 яиц составили 1,28 кг. Затраты кормов в группе 2 с глифосатом были выше и составили 1,30 кг. Наименьшее потребление корма на 10 яиц было зафиксировано в группе 3 и составило 1,23 кг корма.

Результаты оценки качества яиц представлены в таблице 7.

Таблица 7. Качество яиц в опыте на курах-несушках

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
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
Загрязнение скорлупы (в т.ч. пометом)			
начало опыта	3,00	5,00	1,00
окончание	3,00	7,00	3,00

*При $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

По данным в таблице 7 можно увидеть, что в группе 2 с глифосатом масса яйца снизилась

на 0,69г по сравнению с первоначальной массой. Средняя масса яиц в контрольной группе 1 увеличилась на 0,65г по сравнению с началом опыта. наибольшее увеличение средней массы яйца произошло на фоне использования кормов с глифосатом и «Целлобактерином®+» (на 0,76 г за период 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 достоверно увеличилась, но максимальное увеличение произошло в группе с применением пробиотика «Целлобактерин®+». Яйца с большей толщиной скорлупы менее подвержены бою. Доля яиц с загрязненной скорлупой осталась стабильной в контроле, увеличилась в группе с глифосатом, а также в группе 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 в течение 140 дней. Взрослая птица содержалась в клетках, плотность посадки, световой режим и рацион – согласно рекомендациям к кроссу. Уровень содержания глифосата в кормах не превышал МДУ. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8. Экономическая эффективность «Целлобактерин+» в кормлении кур-несушек

Особенности кормления	Контроль	Опыт
	ОР	ОР + «Целлобактерин+» (1 кг/г)
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

1	2	3
Валовый доход от продажи яиц за период опыта, тыс. руб.	17 023	17 256
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 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. Кормовая добавка «Целлобактерин+» способствует повышению яйценоскости на среднюю несушку с 332 до 335 шт. яиц, при этом снижается расход кормов на 19686 кг за период опыта в опытной группе и себестоимость яиц с 29,6 до 28,4 руб./10 штук. Экономический эффект за счет использования добавки составил 559 тыс. рублей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование содержания глифосата в кормах и изучению влияния пробиотиков на зоотехнические показатели сельскохозяйственной птицы при скармливании им глифосатсодержащего корма позволяет сделать следующие выводы:

1. В 70% образцов кормов обнаружили глифосат в диапазоне концентраций от $0,075 \pm 0,005$ мкг/кг до $0,687 \pm 0,089$ мг/кг.

2. Выявлены пробиотические культуры, способные выживать в присутствии 0,72; 36,0 мг/л глифосата в жидкой питательной среде. Обнаружена способность биодеструкции глифосата бактериями *Enterococcus faecium* 1-35, *Bacillus subtilis* 1-85, *Bacillus megaterium* -4801 на 48%, 45% и 69% соответственно от начальной концентрации 0,72 мг/л.

3. Обнаружена способность штамма *Enterococcus faecium* 1-35 продуцировать молочную и уксусную кислоты. Штамм *Bacillus megaterium* -4801 синтезирует ряд важнейших для птицы метаболитов: масляную, липоевую, ацетоуксусную, пантотеновую, глутаровую, фенилпропионовую, янтарную кислоты, а также витамин B2, глутамин, аспарагин, пептиды. Подтверждена способность исследуемых бактерий выживать в условиях ЖКТ птиц, имитируемых *in vitro*.

4. При введении в корм глифосата живая масса цыплят к 35- суточному возрасту снизилась на 1,4% по сравнению с контролем. В группе III с глифосатом, получавшей дополнительно пробиотик «Пробиоцид-Ультра», живая масса бройлеров в 35 дней была выше на 4,2% и на 2,8% по сравнению группой II с глифосатом и с контрольной группой I соответственно. Себестоимость 1 кг привеса цыплят-бройлеров в группе III составила 74,81 рубля, что было ниже на 1,1% и на 3,5% по сравнению с группами I и II соответственно.

5. При кормлении бройлеров глифосатсодержащими кормами увеличивается количество патогенных микроорганизмов в кишечнике цыплят-бройлеров. Пробиотик «Пробиоцид-Ультра» снижает количество патогенных микроорганизмов и способствует сохранению полезных видов бактерий.

6. При введении в комбикорма для несушек глифосата в концентрации 40мг/кг корма наблюдали снижение яйценоскости на 0,64% по сравнению с контролем. Яйценоскость на среднюю несушку за период опыта в группе 3 с применением глифосата и добавки «Целлобактерин®+» была выше контроля на 1,3%. Максимальное увеличение толщины скорлупы яиц произошло в группе с применением пробиотика «Целлобактерин®+». Применение добавки «Целлобактерин®+» позволило сгладить реакцию птицы на введение

загрязненных кормов, в результате чего удалось не только избежать падения продуктивности, но и получить дополнительную продукцию. При этом были снижены затраты корма на 10 яиц, они составили 1,23 кг, что было ниже на 3,9% по сравнению с контрольной группой 1 и на 5,5% ниже по сравнению с группой 2, получавшей только глифосат.

7. Применение кормовой добавки «Целлобактерин+» в рационе кур-несушек способствует повышению яйценоскости на среднюю несушку с 332 до 335 шт. яиц; позволило снизить 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 дозировке 1 кг/т, для повышения уровня продуктивности, в т.ч. в присутствии глифосата в комбикормах. Для кормления кур-несушек рекомендовано применять кормовую добавку «Целлобактерин+» в дозировке 1 кг/т, для повышения уровня продуктивности и улучшения качества продукции, в т.ч. в присутствии глифосата в комбикормах.

Перспективы дальнейшей разработки темы: Разработка кормовых добавок, обладающих способностью к биодеструкции различных пестицидов, и изучение влияния таких добавок на зоотехнические показатели сельскохозяйственной птицы, является перспективным направлением научных исследований.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России:

1. Меликиди, В.Х. Метаболиты пробиотических бактерий отвечают за эффективность действия пробиотика / В.Х. Меликиди, Д.Г. Тюрина, Д.Г. Селиванов, Н.И. Новикова // Птицеводство - 2019.- №09-10.-с.45-47

2. Йылдырым, Е.А. Почему не все пробиотики работают? / Е.А.Йылдырым, Л. А. Ильина, А.В. Дубровин, В.А. Филиппова, Н.И. Новикова, Д. Г.Тюрина, Г. Ю.Лаптев, **В. Х. Меликиди** // Комбикорма.-2020.-№2.-с.95-98

3. Бражник, Е.А. Моделирование процессов контроля качества готовой продукции при производстве микробиологических добавок для животных / Е. А. Бражник, **В. Х. Меликиди**, Г. Ю. Лаптев [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – 2020. – № 2(58). – С. 295-306. – DOI 10.32786/2071-9485-2020-02-29.

4. Йылдырым, Е.А. Можно ли обойтись без пробиотиков? / Е.А. Йылдырым, 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

5. Лаптев, Г.Ю. Резервуары инфекций на птицефабриках / Г.Ю.Лаптев, Е.А. Йылдырым, Л.А. Ильина, А.В. Дубровин, В.А. Филиппова, Н.И. Новикова, Д.Г. Тюрина, **В.Х. Меликиди** // Комбикорма. – 2020 - 06.- с. 70-74

6. Йылдырым, Е.А. Метапробиотики вместо антибиотиков / Е. А. Йылдырым, Л. А. Ильина, Д. Г. Тюрина, А.В. Дубровин, В.А. Филиппова, Н.И. Новикова, Г.Ю. Лаптев, В.А. Манукян, Н.В. Тарлавин, **В.Х. Меликиди**, С.Н. Биконя, К.В. Васильева // Птицеводство. – 2020. – № 11. – С. 33-39. – DOI 10.33845/0033-3239-2020-69-11-33-39.

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

8. Лаптев, Г.Ю. Влияние глифосата и пробиотика на микробиом цыплят-бройлеров / Г.Ю. Лаптев, Д.Г. Тюрина, Е.П. Горфункель, Е.А. Ыылдырым, 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

9. Лаптев, Г.Ю. Геномный и фенотипический потенциал антимикробной активности штамма бактерии *Bacillus megaterium B-4801* / Г.Ю. Лаптев, Е.А. Ыылдырым, 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. - 2020 - том 55. - №4. - с. 816-829 (индексируется в МБД Scopus).

10. **Меликиди, В.Х.** Выживаемость пробиотических бактерий *Bacillus spp.* и *Enterococcus faecium* в условиях *in vitro*, имитирующих желудочно-кишечный тракт животных / В.Х. Меликиди, Н.И. Новикова, Т.Н. Грудинина, Е.П. Горфункель, Д.Г. Тюрина // Ветеринария. - 2020. - №10. - с. 55-57 (**ВАК по другой специальности**)

11. **Меликиди, В.Х.** Обнаружение пестицида глифосата в кормах и способы снижения его содержания для сельскохозяйственной птицы / В.Х. Меликиди, Г.Ю. Лаптев, Д.Г. Тюрина // Формулы Фармации. - 2023. - том 5. - №2. - с. 20-21

12. **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, 2019. - 626с.

13. Кочеткова, О.В. Применение цифровых технологий для создания новых кормовых продуктов и добавок для животных / О. В. Кочеткова, Е. А. Бражник, С. Н. Биконя, **В. Х. Меликиди** // Инновационные технологии в агропромышленном комплексе в современных экономических условиях: материалы Международной научно-практической конференции, Волгоград, 10–12 февраля 2021 года. Том III. – Волгоград: Волгоградский государственный аграрный университет, 2021. – С. 415-419.

14. Бражник, Е.А. Микробиологические кормовые добавки для обеспечения ресурсосберегающего производства в птицеводстве / Е. А. Бражник, **В. Х. Меликиди**, Н. В. Тарлавин [и др.] // Селекционные и технологические аспекты интенсификации производства продуктов животноводства: по Материалам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика М.Ф. Иванова, Москва, 03–04 марта 2022 года. Том ЧАСТЬ II. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – С. 199-203.

15. 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.

16. Енгатев, С.В. Управление производственными рисками в промышленном птицеводстве / Енгатев С.В., Околелова Т.М., Енгатева Е.С., Лесниченко И.Ю., Титов В.А., Салгереев С.М., Дорогова О.А., Лаптев Г.Ю., Тюрина Д.Г., **Меликиди В.Х.**, Струк А.Н., Струк Е.А., Шевяков А.Н., Гогина Н.Н., Хребтова Е.В., Мансуров Р.Ш./под науч. ред. Т.М. Околеловой, С.В. Енгатева.- Москва: РИОР, 2021.-96с. – (Наука и практика).-DOI: <https://doi.org/10.29039/02055-5>.