

Пробиотическая кормовая добавка с микробным бета-каротином: разработка и свойства

Российский биотехнологический университет, г. Москва, Российская Федерация

В. В. Ядерец, Н. В. Карпова, Е. В. Глаголева, В. В. Джавахия

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Вера Владимировна Ядерец
E-mail: verayaderetz@yandex.ru

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Ядерец, В.В., Карпова, Н.В., Глаголева, Е.В., & Джавахия, В.В. (2025). Пробиотическая кормовая добавка с микробным бета-каротином: разработка и свойства. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 33(1), 141-160. <https://doi.org/10.36107/spfp.2025.1.621>

ПОСТУПИЛА: 16.12.2024

ДОРАБОТАНА: 10.03.2025

ПРИНЯТА: 15.03.2025

ОПУБЛИКОВАНА: 31.03.2025

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.



АННОТАЦИЯ

Введение: Комбинированные кормовые добавки, сочетающие пробиотические микроорганизмы и β -каротин, обладают потенциалом для повышения эффективности питания и укрепления здоровья сельскохозяйственных животных. Однако такие средства отсутствуют среди зарегистрированных препаратов, а микробные источники β -каротина используются крайне ограниченно. Это обуславливает необходимость поиска новых биотехнологических решений в области кормопроизводства.

Цель: Разработка каротинсодержащей пробиотической кормовой добавки (КД) и оценка её безопасности и эффективности при включении в рационы бройлерных цыплят и свиней на откорме.

Материалы и методы: Экспериментальный образец КД включал спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* ВКМ В-3826D и *Bacillus licheniformis* ВКМ В-3825D (по 5×10^7 КОЕ/г каждого штамма) и инактивированную биомассу *Mycolicibacterium neoaurum* ВКМ Ас-3067D (не менее 250 мкг β -каротина/г). Токсикологическая оценка проводилась в соответствии с ГОСТ 32296-2013, класс токсичности определён по ГОСТ 12.1.007-76. Биологическую активность изучали на бройлерах и поросятах стандартными методами.

Результаты: Разработанная пробиотическая добавка отнесена к 4 классу опасности (малотоксичная). При добавлении КД в рацион бройлеров (1,0 кг/г) среднесуточный прирост массы увеличился на 4,3%, а содержание витамина А в печени – в 1,4 раза. У поросят прирост живой массы составил 6,7% по сравнению с контролем.

Выводы: Установлены безопасность и биологическая эффективность новой пробиотической кормовой добавки с микробным β -каротином. Каротинсодержащая пробиотическая добавка может быть рекомендована к использованию в специализированных и фермерских хозяйствах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

пробиотическая кормовая добавка; β -каротин микробного происхождения; *Bacillus subtilis*; *Mycolicibacterium neoaurum*; токсикологическая оценка кормовой добавки; продуктивность животных

Probiotic Feed Additive with Microbial Beta-Carotene: Development and Properties

Russian Biotechnological University,
Moscow, Russian Federation

Vera V. Yaderets, Natalia V. Karpova, Elena V. Glagoleva,
Vakhtang V. Dzhavakhiya

CORRESPONDENCE:

Vera V. Yaderets

E-mail: verayaderetz@yandex.ru

FOR CITATIONS:

Yaderets, V.V., Karpova, N.V., Glagoleva, E.V., & Dzhavakhiya, V.V. (2025). Probiotic feed additive with microbial beta-carotene: Development and properties. *Storage and Processing of Farm Products*, 33(1), 141-160. <https://doi.org/10.36107/spfp.2025.1.630>

RECEIVED: 16.12.2024

REVISED: 10.03.2025

ACCEPTED: 15.03.2025

PUBLISHED: 31.03.2025

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Introduction: Combined feed additives that incorporate probiotic microorganisms and β -carotene have the potential to enhance the nutritional efficiency and health status of farm animals. However, such formulations are not currently represented among registered feed products, and microbial sources of β -carotene are used only to a limited extent. This highlights the need for novel biotechnological solutions in feed production.

Purpose: To develop a carotene-containing probiotic feed additive (FA) and to evaluate its safety and effectiveness when included in the diets of broiler chickens and fattening pigs.

Materials and Methods: The experimental FA sample contained spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* BKM B-3826D and *Bacillus licheniformis* BKM B-3825D (5×10^7 CFU/g of each strain), along with inactivated biomass of *Mycolicibacterium neoaurum* BKM Ac-3067D (containing at least 250 μg of β -carotene per gram). Toxicological evaluation was performed in accordance with GOST 32296-2013, and toxicity class was determined according to GOST 12.1.007-76. Biological activity was assessed using standard methods in broiler chickens and piglets.

Results: The developed probiotic feed additive was classified as hazard class 4 (low toxicity). When included in broiler diets at 1.0 kg/ton, it resulted in a 4.3% increase in average daily weight gain and a 1.4-fold increase in liver vitamin A content. In piglets, live weight gain increased by 6.7% compared to the control group.

Conclusion: The safety and biological effectiveness of the new carotene-containing probiotic feed additive with microbial β -carotene were confirmed. This additive may be recommended for use in specialized and small-scale farming operations.

KEYWORDS

probiotic feed additive; microbial β -carotene; *Bacillus subtilis*; *Mycolicibacterium neoaurum*; toxicological evaluation of the feed additive; animal productivity

ВВЕДЕНИЕ

Запрет на применение антибиотиков в качестве стимуляторов роста для сельскохозяйственных животных и птицы, введенный в 2006 г в Европейском союзе, стал важным шагом в решении проблемы развития устойчивости болезнетворных микроорганизмов (Jha et al., 2020). В 2016 г Генеральная Ассамблея ООН признала использование антибиотических препаратов в сельском хозяйстве одной из основных причин возникновения резистентности к антибиотикам у людей (Буяров, с соавт., 2020; Telhig et al., 2020; Маилян, 2021; Pandey et al., 2024). Однако, согласно ряду исследований, отказ от лекарственных препаратов данной группы привел к возникновению таких последствий, как снижение продуктивности и рост заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), занимающих второе место по распространенности после вирусных (Jha et al., 2019; Jha et al., 2020). В связи с чем, в последнее время активно развиваются и внедряются в практику животноводства и птицеводства новые подходы к лечению и профилактики заболеваний ЖКТ, основанные на использовании пробиотиков (Grant et al., 2018).

Совместная рабочая группа Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций (ФАО) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) определила пробиотики как «живые микроорганизмы, которые при употреблении в адекватных количествах приносят пользу для здоровья хозяина». В литературных данных можно также встретить термин «микробные кормовые добавки прямого внесения (Direct-fed microbials (DFM))» (Jha et al., 2020). Зачастую, пробиотики и DFM считаются синонимичными, или взаимозаменяемыми, и используются для обозначения полезных микроорганизмов, применяемых в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц (Gadde et al., 2017; Lewton et al., 2022). Тем не менее, ряд исследователей разграничивают оба термина, определяя DFM как кормовые добавки, содержащие полезные микроорганизмы, дополняющие применение антибиотиков и используемые для восстановления функции кишечника благодаря стабилизации микрофлоры и повышения продуктивности животных и птицы, путем улучшения процессов переваривания и усвоения кормов (Jha et al., 2020; Ban et al. 2021; Ramirez-Garzon et al., 2024). DFM-продукты приобрели популярность благода-

ря антагонистической активности входящих в их состав микроорганизмов, основанной на секреции противомикробных соединений, конкурентной адгезии к слизистой оболочке и эпителию. Доказана роль кормовых пробиотических добавок в укреплении эпителиального барьера кишечника и модуляции иммунной системы (Grant et al., 2018; Ban et al. 2021; Khalid et al., 2021).

Микрофлора кишечника животных и птицы представляет собой сложную поликомпонентную экосистему (Azad et al, 2018). В связи с чем, в последние годы разрабатываются кормовые добавки на основе консорциума взаимодополняющих друг друга полезных бактерий с разным механизмом биологической активности, что обеспечивает более широкие возможности применения (Pluske et al. 2018). При выборе пробиотических микроорганизмов необходимо учитывать ряд функциональных, безопасных и технологических характеристик. Пробиотические бактерии должны удовлетворять следующим основным аспектам: являться непатогенными и нетоксичными, обладать антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, сохранять жизнеспособность как в ЖКТ, так и при хранении в чистом виде или в составе кормов в производственных условиях (Ma et al., 2018).

Благодаря способности образовывать эндоспоры, сохраняющие жизнеспособность в таких экстремальных условиях, как высокие и низкие температуры, радиация, не оптимальные значения pH и давление, наличие токсичных химических веществ, бактерии рода *Bacillus* являются перспективными микроорганизмами для разработки на их основе кормовых пробиотических добавок (Ruiz Sella et al., 2021). Согласно ряду данных литературы, пробиотики на основе бактерий р. *Bacillus* могут быть использованы для защиты от кишечных и дыхательных патогенов, устранения дисбактериоза при антибиотикотерапии и усиления переваривания и продвижения пищи (Bernardeau et al., 2017; Alagawany et al., 2018).

Другим фактором, оказывающим негативное влияние на обмен веществ и иммунный статус организма, является недостаток витаминов, а также их пониженное усвоение (мальабсорбция). Из литературных источников известно, что функции витамина А не ограничиваются его влиянием на развитие

зрительной системы животных (Иванова, 2019). Установлена его роль в поддержании нормального роста и дифференцировки клеток, развитии как врожденного, так и адаптивного иммунитета (Shastak et al., 2019). Показана положительная роль витамина А при адаптации организма к стрессовым условиям (Meléndez-Martínez et al, 2019).

Обзор зарегистрированных на российском рынке кормовых витаминных и пробиотических добавок показал доминирование иностранных производителей, особенно в отношении витаминных и провитаминных препаратов. Проведенный анализ данных литературы показал, что микробиологический синтез β-каротина является оправданным промышленным способом получения данного биологически активного соединения. В качестве перспективного продуцента β-каротина может быть рассмотрены непатогенные бактерии рода *Mycolicibacterium*, для которых установлена способность синтезировать β-каротин, а также ряд других пигментов. Была показана высокая эффективность кормовой добавки на основе биомассы *M. phlei*, включенной в кормление сельскохозяйственных животных и птицы¹. Кроме того, бактериальная биомасса может быть рассмотрена в качестве источника протеина, полноценного по аминокислотному составу.

Цель текущего исследования состояла в получении опытного образца пробиотической кормовой добавки (КД) и изучении ее безопасности и эффективности при включении в рацион целевых групп — цыплят-бройлеров и растущих откармливаемых свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект

Опытный образец КД был получен в научно-исследовательской лаборатории биотехнологии промышленных микроорганизмов научно-производственного центра «Индустриальные биотехнологии» ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». КД содержит

спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* ВКМ В-3826D, *Bacillus licheniformis* ВКМ В-3825D, инактивированную биомассу *Mycolicibacterium neoaurum* ВКМ Ас-3067D. В 1 г кормовой добавки содержится не менее 5×10^7 КОЕ/г (колониеобразующих единиц/г) спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (каждого штамма), не менее 250 мкг/г каротиноидов и не менее $21.5 \pm 1.6\%$ сырого протеина.

Оборудование

Для получения опытного образца КД использовали оборудование научно-исследовательской лаборатории биотехнологии промышленных микроорганизмов. Культивирование штаммов вели в биореакторах объемом 10 и 100 л. В устройства измерения параметров культуральной жидкости в процессе ферментации входили: термодатчик для измерения температуры, связанный с контроллером управления («Бук-3», Россия); pH датчик (InPro 3300/225/PT1000. Mettler Toledo, Швейцария) для измерения показателя pH, связанный через управляющий контроллер с перистальтическим насосом, подающим титрующий раствор; датчик измерения растворённого кислорода (InPro 6800/12/220. Mettler Toledo, Швейцария), связанный через управляющий контроллер с механическим перемешивающим устройством. Ферментеры оборудованы фильтрами тонкой очистки сжатого воздуха с диаметром пор 0.2 мкм.

Полученную после центрифугирования биомассу сушили на лиофильной сушилке (Martin Christ ALPHA 2-4LD plus, Германия). Для определения содержания β-каротина использовали спектрофотометр Thermo Spectronic (USA).

Штаммы

Пробиотические штаммы *B. subtilis* ВКМ В-3826D и *B. licheniformis* ВКМ В-3825D способны ингибировать рост патогенных бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. *B. subtilis* ВКМ В-3826D обладает высокой амилолитической и целлюлолитической активностью. Для *B. licheniformis* ВКМ

¹ Дараселия, Г.Я. & Араселия, Г.Я. (1972). Получение мутантов *Mycobacterium phlei* активных по синтезу каротиноидов [дисс. кандидата биологических наук]. Всесоюзная ордена Ленина и ордена трудового красного знамени академия сельскохозяйственных наук им. В.И. Ленина.

В-3825D была определена высокая амилалитическая активность, целлюлозолитическая активность не выявлена. Оба штамма устойчивы к воздействию органических кислот, высоких температур и действию бацитрацина, вирджиномицина, доксициклина, колистина, тилозина, тетрациклина в терапевтических дозах. Определена их чувствительность к фуразолидону, амоксициллину, линкомицину (Yaderets et al., 2023).

Штамм *M. neoaurum* ВКМ Ас-3067D был получен путем УФ-мутагенеза и селекции из лабораторного штамма *M. neoaurum* ВКПМ Ас-1634. Инактивированную биомасса *M. neoaurum* использовали как источник β-каротина и полноценного по аминокислотному составу источника протеина (Yaderets et al., 2023).

Материалы

Сухое обезжиренное молоко (СОМ), гидролизат казеина (HiMedia Laboratories (Mumbai, India)), мочевины (NeoFroxx GmbH, (Einhausen, Germany)), лимонная кислота (ООО Компонент-реактив (г. Москва, Россия)), неорганические соли, глюкоза и органические растворители (гексан, ацетон) (Acros Organics (Geel, Belgium)), агар (Difco, (Detroit, Michigan, USA)), дрожжевой экстракт (Angel Yeast Co., Ltd., China) обезжиренная соевая мука (ООО Соянта, г. Иркутск, Россия), меласса (ООО Русагро, пос. Знаменка, Тамбовский район, Россия), кукурузный экстракт (ООО Амилко, г. Миллерово, Россия), мясопептонный агар (МПА) и среда Гаузе (ФБУН ГНУПМБ, г. Оболенск, Россия), среда БТН-агар (ООО «Биотехновация», г. Электрогорск, Россия.)

Получение КД

Состав сред и условия культивирования пробиотических штаммов

Сухую биомассу пробиотических штаммов получали путем их отдельного культивирования в ферментационной установке объемом 100 л с рабочим объемом не более 70 л. Выращивание посевного материала осуществляли в одну генерацию в колбах емкостью 1 л, используя жидкую вегетативную среду следующего состава (г/л): аминокислотный пептон — 60.0 мл/л; гидролизат казеина — 5.0 г/л; соевый пептон — 1.0 г/л; дрожжевой экстракт — 1.0 г/л.

После засева колбы помещали на качалочную установку «Innova 44» при 220 об/мин (эксцентриситет 5 см) и 37 °С на 2 суток.

Приготовление и стерилизацию питательной среды для культивирования пробиотических штаммов в биореакторе осуществляли непосредственно в аппарате, используя среду следующего состава (г/л): меласса — 25.0; кукурузный экстракт — 12.5; дрожжевой экстракт — 1.0; MgSO₄—0.25; MnSO₄—0.03; CoCl₂—0.046; CaCl₂—1.0; лапрол — 1.0. pH — 6.8–7.0.

Засев ферментера с простерилизованной питательной средой, охлажденной до температуры (37 ± 1)°С производили посевным материалом, объем которого составлял 1 л. Посевной материал подавали в аппарат по посевной линии. Выращивание *B. subtilis* и *B. licheniformis* в ферментере вели в условиях, представленных в Таблице 1.

Таблица 1

Основные параметры культивирования штамма *B. subtilis* и *B. licheniformis* в 100 л биореакторе

Table 1

Main Parameters of *B. subtilis* and *B. licheniformis* Strain Cultivation in a 100 L Bioreactor

Наименование параметра	Значение показателей
Температура	37 ± 0.1 °С
Аэрация	35–70 л/мин
pH	6.8–7.0
Перемешивание	450–600 об/мин
pO ₂	Концентрация растворенного кислорода поддерживается на уровне 50% от насыщения до окончания процесса
Продолжительность культивирования	24 ч
Контроль процесса	Каждые 4–6 ч отбирают пробу для контроля чистоты культуры, количества биомассы по сырому весу, содержанию редуцирующих сахаров.

Поддержание pH питательной среды в процессе культивирования на уровне 7.0–7.2 осуществляли автоматически путем внесения 20- % раствора

NaOH. При сильном вспенивании в аппарат подавали пеногаситель (3%-ая эмульсия Лапрола). Процесс считается законченным, если концентрация клеток в споровой форме составляет 93–95%. Основные параметры культуральной жидкости на момент окончания процесса ферментации представлены в Таблице 2.

Таблица 2

Основные требования к культуральной жидкости *B. subtilis* и *B. licheniformis*

Table 2

Basic Requirements for the Culture Medium of *B. subtilis* и *B. licheniformis*

Наименование параметра	Значение показателей
Содержание в культуральной жидкости свободных от общего количества спор	Не менее 80 %
Оптическая плотность КЖ	20 ± 2 ОП (600 нм)
Посторонняя микрофлора	Не допускается
Значение pH	8.5 ± 0.2
Содержание редуцирующих веществ	(0.1 ± 0.05) %
Содержание жизнеспособных спор	(1.3 ± 0.2) × 10 ¹⁰ КОЕ/мл
Объем культуральной жидкости	10 ± 1 л.

После окончания процесса культуральную жидкость в биореакторе охлаждали путем подачи воды в рубашку аппарата до температуры 10–12°C и передавали на этап центрифугирования и лиофильную сушку. Получаемая сухая биомасса пробиотических штаммов имеет светло-бежевый цвет с характерным для микробиологических продуктов запахом, содержание влаги — не более 8.0%, количество жизнеспособных спор — не ниже (5 ± 1.0) × 10¹¹ КОЕ/мл. Полученную сухую биомассу пробиотических штаммов использовали для приготовления КД.

Состав сред и условия культивирования *M. neoaurum*

Сухую биомассу *M. neoaurum* получали путем последовательного культивирования в биореакторах объемом 10 и 100 л. Выращивание посевного материала осуществляли в 1 генерацию в колбах емкостью 1 л, используя жидкую вегетативную среду следующего состава (г/л): глицерин — 20.0, СОМ — 10.0, лимонная кислота — 2.2, мочевины — 1.0,

NH₄Cl — 1.0, KH₂PO₄—0.5, MgSO₄ 7H₂O — 0.5, FeSO₄ 7H₂O — 0.05, CaCO₃—1.5 (pH среды до стерилизации 6.8–7.2). Колбы с культурой помещали на качалочную установку «Innova 44» при 220 об/мин и температуре 35°C. Выращивание вели в течение 2 суток. Полученные колбы с посевным материалом в стерильных условиях объединяли в одну колбу объемом 2.0 л, снабженную нижним сливом. Объем посевного составлял 1.0 л. Перед засевом ферментационной установки, посевной материал микроскопировали (микроскоп Carl Zeiss Primo Star (Германия)) для контроля качества инокулята. В биореактор объемом 10 л посевной материал передавали по стерильной посевной линии.

Приготовление и стерилизацию питательной среды для культивирования в биореакторах осуществляли непосредственно в аппарате, используя среду следующего состава (г/л): глицерин — 25.5, сухое молоко — 12.8, лимонная кислота — 2.2, мочевины — 1.0, NH₄Cl — 1.0, KH₂PO₄—0.5, MgSO₄ 7H₂O — 0.5, FeSO₄ × 7H₂O — 0.05, CaCO₃—1.5 (pH среды до стерилизации 6.8–7.2).

Режим в биореакторе объемом 10 л перед посевом представлен в Таблице 3. Регулировку уровня рО₂ осуществляли путем изменения объема подачи воздуха на объем культуральной жидкости в ручном режиме с изменением количества оборотов перемешивающего устройства в автоматическом режиме. Продолжительность процесса культивирования *M. neoaurum* составляет 72 ч.

Таблица 3

Режим в ферментере объемом 10 л.

Table 3

Parameters in a 10-L Fermenter.

Наименование параметра	Значение показателя
Объем среды	7.0 л
Температура	(35 ± 1) °C
Аэрация	3.5–7.0 л/л/мин
Скорость перемешивания среды	250 об/мин
Значение рО ₂	50 % от насыщения
pH среды	6.8–7.2

После окончания ферментации, 3-суточную биомассу микалицебактерий по посевной линии пе-

редавали в биореактор объемом 100 л, рабочий объем — 70 л. Режим культивирования представлен в Таблице 4.

Таблица 4

Основные параметры культивирования штамма *M. neoaurum* в 100 л ферментере

Table 4

Main Parameters of *M. neoaurum* Strain Cultivation in a 100 L Bioreactor

Наименование параметра	Значение показателей
Температура	35°C
Аэрация	35–70 л/мин
pH	pH поддерживали на уровне 6.8–7.2, используя стерильный раствор HCl
Перемешивание	400–450 об/мин
pO ₂	Концентрация растворенного кислорода поддерживается на уровне 50 % от насыщения до окончания процесса.
Продолжительность культивирования	До 72–80 часов
Внесение подпитки	Глюкоза (2.5 г/л) через 24 ч и 48 ч роста

В случае нежелательного пенообразования изменяли скорость перемешивания среды или применяли пеногаситель. Выращенную на 3 сутки биомассу микроцебаكتерии инактивировали при температуре 80–85°C в течение 40 мин. Затем, биомассу сливали в приемник, центрифугировали на высокоскоростной центрифуге и сушили на лиофильной сушилке.

Определение острой и хронической токсичности

Изучение острой и хронической токсичности было проведено в ООО «Международный научно-исследовательский центр охраны здоровья человека, жи-

вотных и окружающей среды (ООО МНИЦ «ОЗОС»). Токсикологические свойства кормовой добавки в условиях острого эксперимента при её однократном внутрижелудочном введении лабораторным аутбредным мышам изучали в соответствии с методикой, описанной в ГОСТ 32296–2013.² Класс токсичности кормовой добавки в соответствии с СГС (согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции) был изучен на основе ГОСТ 12.1.007–76.³ В эксперименте по изучению острой пероральной токсичности были использованы белые аутбредные мыши самки массой 18.2–21.3 г в количестве 5 голов. Изучение острой пероральной токсичности на мышах проводили, используя начальную дозу 5000.0 мг/кг.² Для испытания данной дозы была сформирована опытная группа животных, состоящая из 5 мышей.

Для изучения хронической пероральной токсичности были использованы белые аутбредные мыши самки массой 18.2–21.9 г в количестве 60 голов. Дозы КД, вводимые опытным животным, составляли 1000.0 мг/кг (1/5 от LD₅₀) и 500.0 мг/кг (1/10 от LD₅₀). Животным контрольной группы внутрижелудочно вводили дистиллированную воду в объеме 0.1 мл/10 г массы животного. Продолжительность эксперимента составила 90 дней. В течение указанного времени проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, возможной гибелью, а также проявлением симптомов интоксикации. Контроль массы тела животных опытных и контрольной групп проводили на 1-е, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е, 50-е, 60-е, 70-е, 80-е и 90-е сутки.

На следующие сутки после последнего введения кормовой добавки (91 сутки опыта) половину животных из каждой группы ($n = 10$) подвергали эвтаназии и отбирали пробы крови (в пробирки с антикоагулянтом и без) для определения морфологических и биохимических показателей. Через 10 суток после последнего внутрижелудочного введения кормовой добавки (100 сутки опыта) подвергали эвтаназии вторую половину животных ($n = 10$) и отбирали пробы крови для оценки степени обратимости возможных токсических процессов после

² ГОСТ 32296–2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы

³ ГОСТ 12.1.007–76 — Межгосударственный стандарт ГОСТ 12.1.007–76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» (утв. постановлением Госстандарта СССР от 10 марта 1976 г. N 579)

многократного применения кормовой добавки. От каждой партии животных, состоящих из 10 особей, 5 мышей использовали для получения крови для общего клинического анализа, 5 мышей — для биохимического анализа.

После эвтаназии и отбора проб крови была проведена аутопсия экспериментальных животных. Макроскопическому исследованию подвергнуты: кожа с подкожной жировой клетчаткой, печень, легкие, почки, сердце, селезенка, желудок, толстый и тонкий отделы кишечника.

Функциональное состояние ЦНС оценивали визуально по наблюдению за двигательной активностью и реакцией на внешние раздражители.

В рамках оценки местнораздражающего действия кормовой добавки была проведена макроскопическая оценка органов желудочно-кишечного тракта мышей (желудок, тонкий и толстый отделы кишечника) при аутопсии через 1 и 10 суток после последнего введения кормовой добавки.

Этические аспекты

Все болезненные манипуляции с животными были проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных. Условия содержания животных и работы с ними соответствовали ГОСТ 33044–2014.⁴

Изучение эффективности КД, включенной в рацион цыплят-бройлеров

Исследования биологической активности кормовой добавки выполняли в отделе кормления ФНЦ «ВНИТИП» и в СГЦ «Загорское ЭПХ» в 2023 году. Научно-производственный опыт проводили на бройлерах кросса «Смена 9» с суточного до 35-дневного возраста. Цыплят содержали в клеточных батареях, по 30 голов в каждой группе. Кормление бройлеров осуществляли в две фазы (6–21 день — первый период и с 22 дня до конца выращивания — второй период). Химический состав кормов, помета, мышц,

содержание витаминов А и Е был определен в биохимической лаборатории ФНЦ «ВНИТИП» (Ядерец с соавт., 2024). Количество пробиотика составило 1.0 кг/т корма. К анализируемым показателям относились: сохранность поголовья (%); изменение живой масса цыплят; оценка расхода корма; убойный выход мяса, %; масса внутренних органов, г; содержание общего азота в кормах, помете, мышцах; содержание сырого жира в кормах, помете, мышцах; содержание сырой клетчатки в кормах, помете; содержание витаминов А, Е, В₂ в печени; переваримость сухого вещества корма, протеина, клетчатки, жира, использование азота, кальция, фосфора; химический состав ножных и грудных мышц.

Изучение эффективности КД, используемой в кормлении растущих откармливаемых поросят

Изучение возможности использования КД в кормлении растущих откармливаемых свиней проведено в Физиологические исследования проведены в виварии и лаборатории иммунобиологии и микробиологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. Академика Л.К. Эрнста». В работу были включены 12 голов помесных боровков (F-1:(дюрок × ландрас)) в период откорма с начальной живой массой 20–25 кг, приобретенных в ООО «ЭКО ФЕРМА «Климовская» Калужская обл., Боровский район, дер. Климовское. По принципу пар аналогов было сформировано 2 группы животных — опытная и контрольная — по 6 голов в каждой. Продолжительность исследования составила 30 суток. Количество вносимого пробиотика — 1.0 кг/т корма. К анализируемым параметрам относились: продуктивность растущих свиней; переваримость питательных веществ кормов рациона, баланс азота у растущих свиней; гематологические и биохимические показатели крови; показатели неспецифической резистентности; изменение микрофлоры кишечника растущих свиней.

⁴ ГОСТ 33044–2014 Принципы надлежащей лабораторной практики (введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии №1700-ст от 20 ноября 2014 г)

Процедура исследования

Представленная работа состояла из четырех этапов. На первом был получен опытный образец КД, состоящий из двух пробиотических штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* и инактивированной биомассы *M. neoaurum* ВКМ Ас–3067D. На втором этапе, согласно общепринятым методам, проведено токсикологическое исследование готовой формы опытного образца КД при внутрижелудочном введении. На третьем и четвертом этапах проведено изучение биологической эффективности КД в опытах на бройлерах кросса «Смена 9» с суточного до 35-дневного возраста и поместных боровках (F1: (дюрок×ландрас)) в период откорма соответственно.

Анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica10. Уровень достоверности отличий между контролем и обработками ($p < 0.05$) определяли, используя t-тест для независимых переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение опытного образца КД

Для получения опытного образца КД было проведено раздельное глубинное культивирование штаммов в ферментационной установке объемом 100 л с последующим концентрированием культуральных жидкостей, высушиванием полученных биомасс и их смешиванием. Основные характеристики полученной КД представлены в Таблице 5.

Оценка токсичности КД в эксперименте на мышах

Оценка острой токсичности КД

Согласно требованиям, выбранная экспериментальная доза 5000.0 мг/кг сначала была введена 1 животному (предварительное исследование). Так как признаки интоксикации у экспериментальной мыши отсутствовали в течение 4 часов после травмы, указанное количество было введено еще 4 животным (основное исследование). В результа-

Таблица 5

Основные характеристики готовой формы КД

Table 5

Main Characteristics of the Feed Additive

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид, цвет, запах	Однородный мелкодисперсный порошок от бежевого до светло-оранжевого цвета
Запах	Запах специфический, свойственный микробиологическим продуктам, без постороннего, плесневелого и гнилостного
Массовая доля влаги, не более %	8.0
Количество жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , не менее	5×10^7 каждого штамма
Концентрация каротиноидов, не менее мг/кг	200.0
Содержание сырого протеина, %	18–25
Подлинность	При микрокопировании должен содержать штаммы <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>
Микробиологическая чистота, наличие: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Посторонних микроорганизмов, в т.ч. грибов, тыс.	Не допускается Не допускается Не допускается 300.0

те установлено, что внутрижелудочное введение КД в дозе 5000.0 мг/кг животным опытной группы не вызвало их гибели.

Общее состояние животных опытной группы было удовлетворительным. Признаков интоксикации у мышей не наблюдалось. Целостность и эластичность кожного и шерстного покрова были сохранены, окраска видимых слизистых оболочек соответствовала норме. Частота и глубина дыхательных

движений не изменены. Координация движений не нарушена, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители адекватна. Изменений в поведении не отмечено. На 14 сутки эксперимента мыши были подвергнуты эвтаназии и аутопсии, в результате которой патологоанатомические изменения выявлены не были.

В соответствии с полученными данными, было сделано заключение, согласно которому LD₅₀ исследуемой КД при внутрижелудочном введении превышает 5000.0 мг/кг, что, согласно ГОСТ 32296–2013, не позволяет классифицировать ее по СГС (Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ). В соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 КД при внутрижелудочном введении была отнесена к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

Оценка хронической токсичности КД

При изучении хронической токсичности в течение 90 дней введение КД в дозах 1000.0 мг/кг и 500.0 мг/кг не вызвало гибели опытных животных. Изменения в поведении не выявлены, аппетит и жажда не изменены, судороги не наблюдались; координация движений не нарушена; реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители была адекватной; окраска видимых слизистых оболочек соответствовала норме; частота и глубина дыхательных движений не изменены; каловые массы темно-коричневого цвета, плотной консистенции, характерной овально-продолговатой формы со специфическим запахом.

Результаты взвешивания животных в течение хронического эксперимента представлены в Таблице 6.

Согласно полученным данным, было выявлено достоверное уменьшение массы тела животных опытных групп по сравнению с контролем.

Относительная масса органов является одним из показателей токсического действия кормовой добавки при её длительном применении. Результаты расчетов массовых коэффициентов органов после 90 суток внутрижелудочного введения кормовой добавки приведены в Таблице 7.

Среди изученных органов и тканей значимых различий между опытными группами и контрольными

Таблица 6

Динамика массы тела мышей в хроническом эксперименте, $X_{cp} \pm \sigma$; $n = 20$

Table 6

Dynamics of Body Weight of Mice in a Chronic Experiment, $X \pm \sigma$; $n = 20$

Сутки эксперимента	Контрольная группа	1 опытная группа (1000 мг/кг)	2 опытная группа (500 мг/кг)
1	20.3 ± 1.1	20.3 ± 1.0	20.3 ± 1.3
10	24.4 ± 2.4	24 ± 2.9	23.6 ± 1.7
20	27.7 ± 3.0	25.7 ± 3.1	24.9 ± 2.2*
30	29.7 ± 3.3	25.7 ± 2.5*	26.6 ± 4.0*
40	31.5 ± 3.1	27.1 ± 2.4*	27.6 ± 3.3*
50	31.7 ± 3.6	27.2 ± 4.3*	27.3 ± 2.3*
60	32.8 ± 3.8	28.4 ± 4.8*	28.6 ± 2.5*
70	34.4 ± 4.2	29.7 ± 4.3*	30.1 ± 2.6*
80	34.9 ± 4.9	30.3 ± 4.9*	31.2 ± 2.9*
90	35.7 ± 4.9	31.1 ± 5.0*	32.2 ± 2.8*

Примечание. * $p \leq 0.05$

Note. * $p \leq 0.05$

Таблица 7

Массовые коэффициенты органов мышей после 90 дней введения кормовой добавки, $X_{cp} \pm \sigma$; $n = 10$

Table 7

Relative Organ Weights in Mice Following 90-day supplementation, $X \pm \sigma$; $n = 10$

Органы	Контрольная группа	Доза кормовой добавки, мг/кг	
		1 опытная группа (1000 мг/кг)	2 опытная группа (500 мг/кг)
Печень	5.88 ± 0.11	5.85 ± 0.08	5.9 ± 0.09
Почки	1.34 ± 0.05	1.34 ± 0.04	1.37 ± 0.04
Селезенка	0.65 ± 0.09	0.67 ± 0.07	0.65 ± 0.08
Легкие	1.08 ± 0.03	1.09 ± 0.04	1.07 ± 0.02
Сердце	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.01

Примечание. * $p \leq 0.05$

Note. * $p \leq 0.05$

ми аналогами не установлены, поэтому данные некропсии мышей представлены как средние для всех групп. Видимые слизистые оболочки у исследуемых животных были бледно-розовые, блестящие, гладкие. Деформации или отека конечностей не выявлено. Развитие наружных половых органов соответствовало физиологической норме. Результаты общего клинического анализа крови, проведенного на 91 и 100 сутки опыта, обобщены в Таблицах 8 и 9. Согласно полученным данным, после 90 дневного курса внутрижелудочных введений кормовой добавки у мышей опытных групп значимые отличия в морфологии крови по сравнению с контрольными аналогами выявлены не были.

Таблица 8

Морфологические показатели крови мышей после 90 суток введения кормовой добавки, $X_{cp} \pm \sigma$; $n = 5$

Table 8

Morphological Parameters of Mice Blood after 90 Days of Feed Additive Administration, $X \pm \sigma$; $n = 5$

Показатель	Контрольная группа	Дозы кормовой добавки, мг/кг	
		1 опытная группа (1000 мг/кг)	2 опытная группа (500 мг/кг)
Гематокрит, %	41.58 ± 4.95	42.1 ± 1.42	37.84 ± 11.3
Гемоглобин, г/л	135 ± 19.53	141 ± 6.4	134.6 ± 31.13
Эритроциты, ×10 ¹² /л	8.11 ± 1.09	8.36 ± 0.68	7.65 ± 2.29
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	5.26 ± 4.59	13.38 ± 6.14	11.42 ± 7.62
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	1267.6 ± 600.41	995 ± 496.55	777 ± 364.48
Лейкоцитарная формула			
Гранулоциты, %	39.22 ± 16.41	19.48 ± 20.79	17.06 ± 19.61
Моноциты, %	5.3 ± 5.78	12.26 ± 4.73	10.86 ± 6.29
Лимфоциты, %	55.48 ± 13.74	68.26 ± 17.67	72.08 ± 16.94

Примечание. * $p \leq 0.05$

Note. * $p \leq 0.05$

При статистической обработке результатов морфологических исследований крови животных через 10 суток после последнего введения кормовой добавки, у мышей опытных групп достоверные от-

личия результатов общего клинического анализа крови по сравнению с контрольными аналогами выявлены не были (Таблица 9).

Таблица 9

Морфологические показатели крови мышей через 10 дней после последнего введения кормовой добавки, $X_{cp} \pm \sigma$; $n = 5$

Table 9

Morphological Parameters of Mice Blood after 10 Days since the Last Administration of the Feed Additive, $X \pm \sigma$; $n = 5$

Показатель	Контрольная группа	Дозы кормовой добавки, мг/кг	
		1 опытная группа (1000 мг/кг)	2 опытная группа (500 мг/кг)
Гематокрит, %	43.22 ± 3.06	42.18 ± 1.2	42.38 ± 4.79
Гемоглобин, г/л	146.4 ± 10.33	145 ± 8.89	150.8 ± 15.14
Эритроциты, ×10 ¹² /л	7.77 ± 0.54	7.9 ± 0.32	7.59 ± 1.22
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	9.36 ± 1.89	13.64 ± 4.67	13.82 ± 7.7
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	766.6 ± 266.6	820.6 ± 340.46	1057.6 ± 323.22
Лейкоцитарная формула			
Гранулоциты, %	10.76 ± 2.32	16.86 ± 7.31	12.68 ± 3.35
Моноциты, %	12.24 ± 1.55	13.92 ± 3.67	11.78 ± 2.4
Лимфоциты, %	77 ± 3.86	69.22 ± 9.94	75.54 ± 3.14

Примечание. * $p \leq 0.05$

Note. * $p \leq 0.05$

При анализе полученных результатов было установлено, что исследуемые дозы кормовой добавки при ежедневном внутрижелудочном введении в течение 90 суток не вызвали статистически значимых отличий в показателях общего клинического анализа крови мышей.

Результаты биохимического анализа крови, проведенного на 91 и 100 сутки опыта, обобщены в таблицах 10 и 11. При статистической обработке результатов биохимических исследований сыворотки крови мышей на 1 сутки после 90 дневного внутрижелудочного введения кормовой добавки были выявлены ряд достоверных отличий между мышами из 1 и 2 опытных групп и контрольными особями

(Таблица 10). Указанные отклонения были связаны с более интенсивно протекающими обменными процессами на фоне применения КД.

Таблица 10

Биохимические показатели сыворотки крови мышей после 90 суток введения кормовой добавки, $X_{cp} \pm \sigma$; $n = 5$

Table 10

Biochemical Parameters of Blood Serum of Mice after 90 Days of Feed Additive Administration, $X \pm \sigma$; $n = 5$

Показатель	Контрольная группа	Дозы кормовой добавки, мг/кг	
		1 опытная группа (1000 мг/кг)	2 опытная группа (500 мг/кг)
Билирубин общий, мкмоль/л	5.16 ± 2.47	5.42 ± 1.79	5.04 ± 1.58
Билирубин прямой, мкмоль/л	1.46 ± 0.65	1.76 ± 0.75	1.56 ± 0.52
АСТ, Ед/л	264.8 ± 71.54	403.4 ± 144.72	455.8 ± 163.92
АЛТ, Ед/л	139 ± 37.74	186.8 ± 89.66	335 ± 204.73*
Мочевина, ммоль/л	4.72 ± 0.13	4.8 ± 0.47	5.56 ± 0.88*
Креатинин, мкмоль/л	46.2 ± 3.27	48.2 ± 2.17	55.4 ± 11.91
Общий белок, г/л	82.2 ± 11.69	81.6 ± 8.5	84.4 ± 9.24
ЩФ, Ед/л	41.4 ± 36.09	57 ± 23.12	70.4 ± 10.85
Глюкоза, ммоль/л	6.92 ± 0.5	8.54 ± 2.43	8.92 ± 0.81*

Примечание. * $p \leq 0.05$

Note. * $p \leq 0.05$

При проведении биохимического исследования крови через 10 суток после последнего введения кормовой добавки достоверные отличия мышей опытных групп от контрольных аналогов не были выявлены (Таблица 11).

На основании проведенных исследований было сделано заключение о безопасности разработанной КД. В соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 КД при внутрижелудочном введении относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

Таблица 11

Биохимические показатели сыворотки крови мышей через 10 дней после последнего введения кормовой добавки, $X_{cp} \pm \sigma$; $n = 5$

Table 11

Biochemical Parameters of Blood Serum of Mice after 10 Days since the Last Administration of the Feed Additive, $X \pm \sigma$; $n = 5$

Показатель	Контрольная группа	Дозы кормовой добавки, мг/кг	
		1 опытная группа (1000 мг/кг)	2 опытная группа (500 мг/кг)
Билирубин общий, мкмоль/л	5.26 ± 1.84	5.8 ± 1.46	6.42 ± 0.82
Билирубин прямой, мкмоль/л	1.56 ± 0.55	1.54 ± 0.43	1.94 ± 0.35
АСТ, Ед/л	657.6 ± 401.44	491.4 ± 160.97	404.2 ± 103.5
АЛТ, Ед/л	609 ± 497.76	226 ± 111.94	177.6 ± 123.1
Мочевина, ммоль/л	7.36 ± 0.76	7.06 ± 1.04	6.62 ± 1.09
Креатинин, мкмоль/л	51 ± 3.67	47.4 ± 6.88	49.8 ± 5.63
Общий белок, г/л	81.6 ± 7.44	77.4 ± 2.88	84.2 ± 8.38
ЩФ, Ед/л	59.4 ± 26.76	70.8 ± 13.44	56 ± 38.81
Глюкоза, ммоль/л	10.4 ± 1.97	7.92 ± 1.8	9.86 ± 1.18

Примечание. * $p \leq 0.05$

Note. * $p \leq 0.05$

Изучение эффективности КД, включенной в рацион цыплят-бройлеров

Результаты научно-производственного опыта по изучению эффективности КД представлены в Таблице 12.

Благодаря использованию КД, бройлеры отреагировали улучшением переваримости и использования питательных веществ корма. Что отразилось в увеличении живой массы бройлеров по сравнению с контрольной группой. Вследствие того, что препарат включали в комбикорма с первого дня выращивания птицы, в 7-дневном возрасте было отмечено увеличение ее живой массы в опытной группе — на 1.3%. В дальнейшем данная тенденция

Таблица 12

Показатели эффективности КД, включенной в рацион цыплят-бройлеров

Table 12

Efficiency Indicators of Feed Additive Included in the Diet of Broiler Chickens

Показатель	Группа	
	1 контрольная	2 опытная
Сохранность поголовья, %	100.0	100.0
Живая масса (г) в возрастах:		
суточном	41.8 ± 0.15	41.7 ± 0.16
7-дневном	207.60 ± 2.18	210.30 ± 2.60
% к контролю	100.0	101.3
21-дневном	986.3 ± 14.04	1009.2 ± 20.8
% к контролю	100.0	102.3
35-дневном (в среднем)	2074.9	2165.1
% к контролю	100.0	104.3
в т.ч. курочки	1931.0 ± 31.2	2018.6 ± 27.2*
% к контролю	100.0	104.5
петушки	2218.7 ± 32.4	2311.6 ± 31.3*
% к контролю	100.0	104.2
Среднесуточный прирост живой массы, г	58.1	60.7
Потребление корма на 1 голову за период выращивания, кг	3.437	3.393
% к контролю	100.0	98.7
Затраты корма на 1 кг прироста живой массы, кг	1.691	1.598
% к контролю	100.0	94.5

Примечание. * $p \leq 0.05$

Адаптировано из Ядерец с соавт. (2024).

Note. * $p \leq 0.05$

Adapted from Yaderetz et al. (2024a).

сохранилась. Так, в 21-дневном возрасте различия по данному показателю в пользу опытной группы составили 2.3%. К концу периода выращивания разница по средней живой массе бройлеров опытной группы достигла 4.3%, причем и по курочкам, и по петушкам разность была статистически достоверна. У 35-дневных курочек опытной группы она

превысила таковую на 4.5% ($p \leq 0.05$), у петушков — на 4.2% ($p \leq 0.05$). В результате среднесуточный прирост живой массы в опытной группе птицы оказался на 2.6 г выше. Отмечено сокращение затраты корма на 1 кг прироста живой массы в опытной группе на 5.5%, чем в контрольной группе.

Исследования мясных качеств бройлеров показали, что в опытной группе был выше убойный выход мяса на 0.6% и выход наиболее ценной части тушки — грудных мышц — на 0.6%. При анализе количества витаминов А, Е и В₂ в печени бройлеров отмечена тенденция к их более интенсивному накоплению в опытной группе, получавшей добавку пробиотика (Таблица 13).

Таблица 13

Содержание витаминов в печени бройлеров, мкг/г (Ядерец с соавт., 2024).

Table 13

Vitamin Content in Broiler Chickens Liver, mcg/g

Показатель	Группа	
	1 контрольная	2 опытная
Витамин А	177.23	255.36
Витамин Е	18.52	20.07
В ₂	10.10	10.96

Согласно данным, представленным в Таблице 13, наиболее значительные различия наблюдались по количеству витамина А в печени цыплят опытной группы — в 1.4 раза (на 78.13 мкг/г) по сравнению с контролем. Таким образом, может быть сделано заключение об эффективности КД при её включении в рацион цыплят-бройлеров.

Изучение эффективности КД, включенной в рацион поместных боровков в период откорма

В ходе проведенных исследований было установлено, что применение изучаемой КД способствует интенсификации роста животных опытных групп (Таблица 14). Поросята, получавшие в составе комбикорма КД, поедали корм на уровне поросят контрольной группы, отклонений в количестве потребленного комбикорма зафиксировано не было. По результатам взвешивания в конце опыта наблюдалась тенденция к увеличению живой массы поросят опытных групп: среднесуточный прирост у животных в опытной группы за весь период был

выше на 6.7% ($p < 0.05$), по сравнению с аналогами из контрольной группы. На момент окончания исследования валовой прирост поросят опытной группы был больше на 17.4% ($p < 0.05$) соответственно по сравнению с показателями в контрольной группе.

Таблица 14

Динамика роста опытных поросят ($M \pm m, n = 6$)

Table 14

Growth Dynamics of Experimental Piglets ($M \pm m, n = 6$)

Показатель	Группа	
	контрольная	опытная
Дней опыта	Период – 30 суток	
Живая масса в начале опыта, кг	25.4 ± 0.7	25.1 ± 0.9
Живая масса в конце периода, кг	43.7 ± 1.24	46.6 ± 1.11*
Абсолютный прирост живой массы, кг	18.30 ± 2.0	21.5 ± 1.01*
Среднесуточный прирост, г	610 ± 60	717 ± 34*
Живая масса в % к контролю	100.0	106.7

Примечание. * $p \leq 0.05$

Адаптировано из Ядерец с соавт. (2024).

Note. * $p \leq 0.05$

Adapted from Yaderetz et al. (2024a).

Проведенные исследования показали, что включение в рацион подопытных боровков КД способствовало лучшему использованию и отложению азота, и, как следствие, более высоким приростам живой массы, а также использованию кальция и фосфора. Изучаемые показатели крови в целом находились в пределах референсных значений. Однако, наблюдалась тенденция к повышению содержания общего белка и в опытной группе относительно контроля. Отмечалось повышение содержания белковых фракций в сыворотке крови животных опытной группы относительно контрольных животных. Что может быть связано с более интенсивными обменными процессами у животных опытных групп (Ядерец с соавт, 2024).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди факторов, обеспечивающих рост и развитие сельскохозяйственных животных и птицы, лидирующая роль принадлежит качеству кормов, состав которых должен обеспечивать необходимым количеством энергии и являться источником микро- и макронутриентов. Следствием введения ограничений на использование кормовых антибиотиков стало активное внедрение в системы кормления пробиотических препаратов, эффективность которых определяется такими факторами, как составом, направленностью селекции штаммов и технологией производства. Положительный эффект применения пробиотиков, включенных в рацион животных и птиц, отражается в поддержании у них нормального физиологического статуса и повышения продуктивности.

Анализ научных работ за последние десятилетия показывает, что к настоящему времени разработано достаточное количество пробиотических кормовых добавок, направленных на нормализацию процессов ЖКТ, улучшение перевариваемости кормов и общих экономических показателей. Значительные продвижения достигнуты в области изучения спектра пробиотической активности *B. subtilis* и *B. licheniformis*, что сделало указанные бактерии наиболее привлекательными при разработке препаратов ветеринарного назначения. Тем не менее, исследования по поиску и селекции высокоактивных штаммов с целью разработки пробиотических КД, чья активность сопоставима с действием антибиотических препаратов, продолжается. Особенно актуальны разработки добавок на основе консорциума полезных бактерий взаимодополняющих друг друга и исключающих их антагонизм, возможностью размножаться в кислой и щелочной среде, с продуцированием антибиотических и биологически активных веществ и обладать антибиотикорезистентностью. Последнее свойство особенно ценно, поскольку в сочетании с антибиотиками при комплексной терапии целого ряда заболеваний может позволить разработать принципиально новые схемы лечения. В связи с чем, в последние годы предлагаются поликомпонентные пробиотические препараты, включающие индигенные микроорганизмы с разным механизмом биологической активности и обогащенными белковой и витаминной составляющей, что обеспечивает более широкие возможности применения.

Разработанная в процессе реализации государственного задания КД содержит сухую биомассу пробиотических штаммов *B. subtilis* ВКМ В-3826D и *B. licheniformis* ВКМ В-3825D и инактивированную биомассу *M. neoaurum* ВКМ Ас-3067D в качестве источника β -каротина (Таблица 5). Благодаря способности входящих в состав КД пробиотических штаммов синтезировать ферменты, соединения с антибиотической активностью и другие биологически активные соединения, происходит активизация обменных процессов, следствием которых является улучшение перевариваемости корма, повышение сохранности поголовья и рост продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы.

Согласно реестру зарегистрированных в России кормовых добавок, в составе витаминных препаратов в качестве источника β -каротина, в большинстве случаев, используют или растительные экстракты, или субстанцию, полученную химическим или биотехнологическим способом. Анализ показал, что только в добавке «Панаферд-АХ» (ACS Dobfar S.p.A., Италия), рекомендованной для кормления лососёвых рыб, источником β -каротина являются инактивированные клетки бактерий *Paracoccus carotinifaciens*. Добавки на основе комбинации пробиотических штаммов и β -каротина в вышеуказанном списке отсутствуют.

Наиболее трудоемким этапом в разработке КД является изучение безопасности и биологической активности в опытах *in vivo*. Данный этап необходим для выявления или подтверждения отсутствия побочных эффектов и является обязательным при регистрации продукта в Россельхознадзоре. Безопасность КД изучалась путем изучения острой и хронической токсичности на белых аутбредных мышцах. В результате проведенного исследования установлено, что введении КД в дозе 5000.0 мг/кг не привело к гибели животных, не выявлено каких-либо признаков интоксикации или нарушений со стороны строения и функционирования внутренних органов.

При дальнейшем изучении безопасности КД в хроническом эксперименте также не было выявлено выраженного токсического действия на организм опытных мышей. Не были выявлены изменения функционирования пищеварительной и мочевыделительной системы. К концу эксперимента (см. таблица 6), зафиксировано достоверное уменьшение

массы тела животных опытных групп по сравнению с контролем. Однако, статистически достоверных отличий в значении величины относительной массы органов (Таблица 7), что является одним из показателей токсического действия кормовой добавки при ее длительном применении, не установлено. Достоверных различий между морфологическими показателями образцов крови опытных групп (Таблица 9) относительно контрольных животных не зарегистрированы. Биохимическая оценка сыворотки крови показала, что различия между группами по содержанию билирубина, мочевины, общего белка, АСТ, креатинина, общего белка и щелочной фосфатазы) не являются значимыми. Общая тенденция увеличения уровня АСТ и АЛТ, а также концентрации глюкозы в организме опытных животных при сравнении с контролем может свидетельствовать о значительной интенсификации обменных процессов вследствие приема КД в дозировке, значительно превышающей рекомендованную. Проведенные патоморфологические исследования подтвердили отсутствие токсического воздействия на органы и ткани подопытных мышей, видимых изменений макроскопической структуры не наблюдалось, состояние органов как подопытных, так и контрольных крыс соответствовали нормам.

Основываясь на данных, полученных в процессе исследования острой и хронической токсичности, можно утверждать, что среднелетальная доза LD_{50} кормовой добавки превышает 5000.0 мг/кг. В связи с чем, по степени воздействия на организм полученная КД относится к малоопасным веществам (IV класс опасности по ГОСТ⁵).

Эффективности выращивания цыплят-бройлеров можно оценивать по двум основным параметрам: среднесуточный прирост живой массы и затраты корма на 1 кг ее прироста. Изучение эффективности КД, включенной в рацион цыплят-бройлеров кросса «Смена 9» было проведено в условиях СГЦ «Загорское ЭПХ». Согласно результатам научно-производственного опыта (таблица 12), к концу 35-дневного периода выращивания разница по средней живой массе бройлеров опытной группы достигла 4.3%, причем и по курочкам, и по петушкам разность была статистически достоверна. Отмечено снижение затрат потребления корма на 5.5%. Полученные значения результатов исследований совпадают с имеющимися данными литературы, аналогичны-

ми по используемым компонентам (Злепкин с соавт.; Овчарова с соавт.). Так, например, Злепкиным В.А. с соавторами было исследовано влияние совместного применения бета-каротинсодержащего препарата с пробиотиками на основе *B. subtilis* и *B. licheniformis* (препараты “Субтилис Ж”, “Бацелл-М”, “Целлобактерин-Т”) на переваримость и использование питательных веществ рационов цыплят-бройлеров кроссе “Росс-308”. В результате установлено улучшение поедаемости кормов, отмечено увеличение коэффициента переваримости сухого вещества в рационе цыплят, улучшение усвояемости азота, кальция, фосфора. Отмечено сокращение расхода корма до 3.85%. (Злепкин с соавт., 2020). Однако, при сравнении итогов опытов следует принять во внимание возможные различия по продуктивности между используемыми в исследованиях кроссами цыплят.

Изучение возможности применения КД в кормлении растущих откармливаемых свиней было проведено в условиях вивария ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. Академика Л.К. Эрнста». Согласно данным литературы, о степени удовлетворения потребности животных в энергии, питательных, минеральных и биологически активных веществах, количественной и качественной оценке кормовых рационов у подопытных поросят судят по динамике живой массы и величине ее прироста. На начало опыта, средняя живая масса опытных и контрольных животных была практически одинаковой — 25.1 и 25.4 кг соответственно (Таблица 14). К концу опыта (через 30 суток) средняя живая масса поросят, получавших пробиотическую кормовую добавку составила 46.6 ± 1.11 , что на 2.9 кг выше контроля (см. Таблицу 14). Анализ величины среднесуточного прироста живой массы подопытных животных оказался на 17.4% выше по сравнению с контролем. Анализ полученных данных демонстрирует, что включение в рационы растущего откармливаемого молодняка свиней КД способствует лучшему использованию питательных веществ корма, и, как следствие, более высоким приростам живой массы (Ядерец с соавт., 2024). Полученные в представленном исследовании результаты совпадают с имеющимися данными литературы (Морозова с соавт., 2021; Токарев с соавт., 2017). Так, например, Токаревым И.Н. с соавт. при введении в рацион пробиотика на основе двух штаммов *B. subtilis* 12В и *B. subtilis* 11В, вводимого в дозе 0.5, 1.0 и 1.5

кг/т корма, отмечено увеличение среднесуточных приростов на 1.2–12.6% при сравнении с контрольными группами. Животные опытных групп в конце эксперимента с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) превосходили по живой массе сверстников контрольной группы на 3,1–7,6%, что отразилось на интенсивности роста молодняка в период дорастивания, которая была выше контроля на 21,9–54,8 г или 4,5–11,3%. (Токарев с соавт., 2017)

Очевидное улучшение прироста живой массы тела и эффективности конверсии корма в группах, получавших КД может быть связано с несколькими причинами. Согласно данным литературы, улучшение показателей продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы в результате введения КД на основе пробиотических штаммов связано с изменением метаболических процессов, выраженных в биосинтезе пищеварительных ферментов, противомикробных веществ и витаминов. Установлено, что пробиотические штаммы являются продуцентами ферментов, способствующих как перевариванию растительного корма, так и усвоению образующихся питательных веществ (Al-Seraih et al., 2022) Кроме того, известно, что пробиотические бактерии р. *Bacillus* оказывают положительное влияние на состояние ворсинок кишечника, следствием чего является увеличение площади всасывания питательных веществ и увеличение массы животных и птиц (Awad et al., 2009). Дополнительное содержание в КД β-каротина способствовало в 1.4 раза увеличению содержания витамина в печени бройлеров, что является ценным экономическим показателем и говорит о достаточном усвоении данного вещества из корма (Таблица 14).

Таким образом, отсутствие отклонений со стороны обмена веществ и состояния внутренних органов белых аутбредных мышей, включенных в исследование, подтвердили безопасность КД, состоящей из консорциума пробиотических штаммов — *B. subtilis* и *B. licheniformis* и β-каротина микробного происхождения. Результаты, полученные в процессе комплексного изучения эффективности КД на цыплятах-бройлерах и поросятах на откорме позволяют сделать вывод об эффективности КД и целесообразности ее включения в рационы сельскохозяйственных животных и птицы. Следует отметить важность проведения подобных исследований пробиотических препаратов в рамках формирования более глубоких знаний о взаимосвязи,

которая существует между пробиотическими микроорганизмами, структурой микробных сообществ и общего состояния здоровья сельскохозяйственных животных и птицы. Продемонстрирована перспективность внедрения микробной биомассы как источника провитаминов в рационы кормления.

Ограничения исследования

При изучении эффективности и безопасности кормовых добавок важно учитывать ряд факторов, которые могут повлиять на результаты и интерпретацию данных. Одним из ограничений является размер выборки животных, поскольку исследования на небольших группах могут привести к недостаточной статистической мощности проведенного эксперимента и невозможности сделать обобщающие выводы. В представленной работе число животных во всех экспериментах соответствовало общепринятым методикам, что позволило сформулировать заключение о биологической эффективности. Тем не менее, следовало бы повторить исследования для получения более точных данных и подтверждения полученных первоначальных выводов.

Важно также учитывать возможное влияние кормового рациона на результаты эксперимента. Поскольку введение КД осуществлялось на фоне приема полноценных кормов, представляется перспективным изучение эффективности добавки в условиях ограниченного поступления питательных веществ, в первую очередь витамина А. Не следует также исключать влияние на полученные результаты внешних факторов, связанных с содержанием животных и птиц, контроль которых в реальных условиях чрезвычайно затруднен.

Для более точной оценки эффективности разработанной КД необходимо провести ее апробацию в условиях реальных хозяйств. Это позволит оценить влияние таких факторов, как условия содержания, рацион и видовые особенности животных и птиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение острой и хронической токсичности на лабораторных животных продемонстрировали безопасность разработанной КД, содержащей спо-

рообразующие бактерии *B. subtilis* ВКМ В-3826D, *B. licheniformis* ВКМ В-3825D и инактивированную биомассу *M. neoaurum* ВКМ Ас-3067D.

Результаты производственных опытов, полученные при изучении биологической эффективности КД на цыплятах-бройлерах и поросятах на откорме, позволяют сделать вывод о ее эффективности при введении в рацион животных и птицы. Увеличение средней живой массы бройлеров опытной группы составляло 4.3%, отмечено снижение затрат потребления корма на 5.5%. Среднесуточный прирост живой массы поросят на откорме был на 17.4% выше по сравнению с контролем. К концу опыта средняя живая масса поросят, получавших пробиотическую кормовую добавку составила 46.6 ± 1.11 , что на 2.9 кг выше контроля. В связи с чем, могут быть сформулированы рекомендации специализированным и фермерским хозяйствам по включению разработанной КД в системы кормления сельскохозяйственных животных и птицы. Полученные результаты также свидетельствуют о перспективности производства КД и ее востребованности среди производителей безопасной агропродукции. В дальнейшем научные исследования будут направлены на изучение эффективности КД и определение ее влияния на обменные процессы, иммунный статус, продуктивные показатели молодняка крупного рогатого скота в разные возрастные периоды. Также планируется изучить варианты скармливания КД в других дозировках.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Вера Владимировна Ядерец: формулирование идеи исследования; осуществление научно-исследовательского процесса; проверка воспроизводимости результатов экспериментов; визуализация; создание и редактирование рукописи.

Наталья Викторовна Карпова: проведение исследований; создание черновика рукописи; методология; применение статистических методов для анализа данных.

Елена Викторовна Глаголева: контроль; научное руководство; курирование данных; проведение исследования.

Вахтанг Витальевич Джавахия: административное управление планированием и проведением исследований, контроль; научное руководство; получение финансовой поддержки исследовательского проекта.

Natalia V. Karpova: investigation; writing — original draft preparation; methodology; formal analysis

Elena V. Glagoleva: supervision; data curation; investigation

Vakhtang V. Dzhavakhiya: project administration; supervision; funding acquisition

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Vera V. Yaderets: conceptualization; investigation; validation; writing-review & editing

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Буяров, В. С., Червонова, И. В., Меднова, В. В., & Ильичева, И. Н. (2020). Эффективность применения фитобиотиков в птицеводстве (обзор). *Вестник аграрной науки*, 3(84), 44–59. <https://doi.org/10.17238/issn2587-666X.2020.3.44>
- Buyarov, V.S., Chervonova, I.V., Mednova, V.V., & Ilyicheva, I.N. (2020). Efficiency of application of phytobiotics in poultry farming (Review). *Bulletin of Agrarian science*, 3(84), 44–59. (In Russ.) <https://doi.org/10.17238/issn2587-666X.2020.3.44>
- Злепкин В. А., Злепкин Д. А., Рудаков А. В., & Злепкина Н. А. (2020). Влияние бета-каротинсодержащего препарата совместно с пробиотиками на переваримость и использование питательных веществ рационов цыплятами-бройлерами. *Птицеводство*, (7–8), 34–38. <https://doi.org/10.33845/0033-3239-2020-69-7-8-34-38>
- Zlepkin V. A., Zlepkin D. A., Rudakov A.V., & Zlepkina N. A. (2020). The effects of the combined supplementation of diets for broilers with a beta-carotene preparation and different probiotics on the digestibility and assimilation of dietary nutrients. *Ptitsevodstvo*, (7–8), 34–38. (In Russ.) <https://doi.org/10.33845/0033-3239-2020-69-7-8-34-38>
- Иванова, Н. В., & Раджабов, Р. Г. (2019). Ресурсосберегающие технологии в свиноводстве. *Вестник Донского государственного аграрного университета*, (3–1), 5–9
- Ivanova, N.V., & Radjabov, R.G. (2019). Resource-saving technologies in pig production. *Bulletin of Don State Agrarian University*, (3–1), 5–9. (In Russ.)
- Маилян, Э. С. (2021). Проблема использования антибиотиков в животноводстве и пути контроля микробной антибиотикорезистентности. *БИО*, 12(255), 4–16.
- Mailyan, E. S. (2021). The problem of the use of antibiotics in animal husbandry and ways to control microbial antibiotic resistance. *BIO*, 12(255), 4–16. (In Russ.)
- Морозова, Е. С., & Мурленков Н. В. (2021). Эффективность влияния биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в технологии выращивания поросят-отъемышей. *Биология в сельском хозяйстве*, 1(30), 21–24.
- Morozova, E. S., & Tulenkov N. V. (2021). The effectiveness of biologics based on bacteria of the genus *Bacillus* in the technology of rearing weaned piglets. *Biology in agriculture*, 1(30), 21–24. (In Russia).
- Овчарова, А. Н. & Петраков Е. С. (2018). Физиологические показатели и продуктивность цыплят-бройлеров при использовании пробиотического препарата на основе бацилл. *Проблемы биологии продуктивных животных*, 1, 94–101. <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.1.94-101>
- Ovcharova, A. N. & Petrakov E. S. (2018). Physiological parameters and productivity of broiler chickens when using a probiotic preparation based on bacilli. *Problems of Biology of Productive Animals*, 1, 94–101. (In Russ.) <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.1.94-101>

- Токарев, И. Н., & А. В. Блинецов. (2017) Влияние пробиотической добавки Ветоспорин на интенсивность роста, конверсию корма и гематологические показатели поросят-отъёмышей. *Российский электронный научный журнал*, 1(23), 23–31.
- Tokarev, I. N., & Kuznetsov, A.V. (2017) The effect of the probiotic supplement Vetosporin on the growth rate, feed conversion, and hematological parameters of weaned piglets. *Russian Electronic Scientific Journal*, 1(23), 23–31. (In Russia).
- Ядерец, В.В., Карпова, Н.В., Глаголева, Е.В., Джавахия, В.В., Карташов, М.И., Ленкова, Т.Н., & Егорова, Т.А. (2024а). Влияние каротинсодержащей пробиотической добавки на продуктивные показатели бройлеров. *Птицеводство*, 6, 19–24. <https://doi.org/10.33845/0033-3239-2024-73-6-19-24>
- Yaderetz, V.V., Karpova, N.V., Glagoleva, E.V., Dzhavakhiya, V.V., Kartashov, M.I., Lenkova, T.N., & Egorova, T.A. (2024а). The effect of a carotene containing probiotic feed additive on the productive performance in broilers. *Ptitsevodstvo*, 73(6), 19–24. (In Russ.) <https://doi.org/10.33845/0033-3239-2024-73-6-19-24>
- Ядерец, В.В., Карпова, Н.В., Джавахия, В.В., Глаголева, Е.В., & Остренко, К.С. (2024б). Белково-каротиновая пробиотическая добавка в рационе свиней на откорме. *Свиноводство*, 7, 45–48. <https://doi.org/10/37925/0039-713X-2024-7-45-48>
- Yaderetz, V.V., Karpova, N.V., Dzhavakhiya, V.V., Glagoleva, E.V., & Ostrenko, K.S. (2024б). Investigation of the effectiveness of a carotene-containing probiotic supplement in feeding growing fattened pigs. *Pigbreeding*, 7, 45–48 (In Russ.) <https://doi.org/10/37925/0039-713X-2024-7-45-48>
- Ядерец, В.В., Карпова, Н.В., Глаголева, Е.В., Джавахия, В.В., & Остренко, К.С. (2024с). Влияние кормовой белково-каротиновой пробиотической добавки на гемато-биохимические показатели и кишечный биоценоз поросят на откорме. *Ветеринария*, 12, 44–48. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2024.27.12.44-48>
- Yaderetz, V.V., Karpova, N.V., Glagoleva, E.V., Dzhavakhiya, V.V., & Ostrenko, K.S. (2024с). The influence of feed protein-carotene probiotic additive on hemato-biochemical parameters and intestinal biocenosis of fattening piglet. *Veterinary Medicine*, 12, 44–48. (In Russ.) <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2024.27.12.44-48>
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., Farag, M.R., Sachan, S., Karthik, K., & Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 10611–8. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1687-x>
- Al-Seraih, A.A., Alsereah, B.A., Alwaely, W.A., Al-Hejaj, M.Y. (2022). Effect of *Bacillus subtilis* as a Probiotic on the productive and physiological performance of broilers. *Archives of Razi Institute*, 77(5), 1647–1653. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.357803.2100>
- Awad, W.A., Ghareeb., K., Abdel-Raheem, S., Bohm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 49–56. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00244>
- Azad, M.A.K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic species in the modulation of gut mmicrobiota: An overview. *BioMed Research International*, 8, 9478630. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Ban, Y., & Guan, L.L. (2021). Implication and challenges of direct-fed microbial supplementation to improve ruminant production and health. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00630-x>
- Bernardeau, M., Lehtinen, M.J. Forssten, S.D., & Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2570–2584. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2688-3>
- Grant, A., Gay, C.G., & Lillehoj, H.S. (2018). *Bacillus spp.* as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. *Avian Pathology*, 47(4), 339–351. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1464117>
- Jha, R., Foughse, J.M., Tiwari, U.P., Li, L., & Willing, B.P. (2019). Dietary fiber and intestinal health of monogastric animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 48. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00048>

- Jha, R., Das R, Oak, S., & Mishra, P. (2020). Probiotics (Direct-Fed Microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. *Animals*, 10(10), 1863. <https://doi.org/10.3390/ani10101863>
- Gadde, U.D., Oh, S., Lee, Y., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T., & Lillehoj, H.S. (2017). Dietary *Bacillus subtilis*- based direct-fed microbials alleviate LPS-induced intestinal immunological stress and improve intestinal barrier gene expression in commercial broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 114, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.004>
- Grant, A., Gay, C.G., & Lillehoj, H.S. (2018) *Bacillus spp.* as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. *Avian Pathology*, 47(4), 339–351. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1464117>
- Khalid, F., Khalid, A., Fu, Y., Hu, Q., Zheng, Y., Khan, S., & Wang, Z. (2021) Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: a review. *J Microbiol.*, 59(7), 627–633. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1161-1>
- Lewton, J.R., Woodward, A.D., Moser, R.L., Thelen, K.M., Moeser, A.J., Trottier, N.L., Tempelman, R.J., & Rozeboom, D.W. (2022). Effects of a multi-strain *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbial on immunity markers and intestinal morphology in diets fed to weanling pigs. *Translational Animal Science*, 6(3), txac083. <https://doi.org/10.1093/tas/txac083>
- Ma, T., Suzuki, Y., & Guan, L.L. (2018). Dissect the mode of action of probiotics in affecting host-microbial interactions and immunity in food producing animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 205, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.004>
- Meléndez-Martínez, A. J. (2019) An Overview of carotenoids, apocarotenoids, and vitamin A in agro-food, nutrition, health, and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63, e1801045. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801045>
- Pandey, S., Doo, H., Keum, G.B., Kim, E.S., Kwak, J., Ryu, S., Choi, Y., Kang, J., Kim, S., Lee, N.R., Oh, K.K., Lee, J.H., & Kim, H.B. (2024). Antibiotic resistance in livestock, environment and humans: One Health perspective. *Journal of Animal Science and Technology*, 66(2), 266–278. <https://doi.org/10.5187/jast.2023.e129>
- Pluske, J. R., Turpin, D.L., & Kim J.C. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, 4(2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004>
- Ramirez-Garzon, O., Barber, D., Meneses, L., & Soust, M. (2024) Effect of gestational direct-fed microbials supplementation on the metabolic profile in periparturient dairy cows. *Animals*, 14(20), 2928. <https://doi.org/10.3390/ani14202928>
- Ruiz Sella, S.R.B.R., Bueno, T., de Oliveira, A.A.B., Karp, S.G., & Soccol, C.R. (2021). *Bacillus subtilis natto* as a potential probiotic in animal nutrition. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41, 355–369. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1858019>
- Sarsour, A.H., Koltés, D.A., Kim, E.J., Persia, & M.E. (2022). Effects of a direct fed microbial (DFM) on broiler chickens exposed to acute and chronic cyclic heat stress in two consecutive experiments. *Poultry Science Journal.*, 101(4), 101705. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101705>
- Shastak, Y., & Pelletier, W. (2023). Review: Vitamin A supply in swine production: Current science and practical considerations. *Applied Animal Science*, 39(5), 289–305. <https://doi.org/10.15232/aas.2023-02409>
- Telhig, S., Ben Said, L., Zirah, S., Fliss, I., & Rebuffat, S. (2020). Bacteriocins to thwart bacterial resistance in gram negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 586433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586433>
- Yaderets, V., Karpovam, N., Glagoleva, E., Shibaeva, A., & Dzhavakhiya, V. (2023). *Bacillus subtilis* RBT-7/32 and *Bacillus licheniformis* RBT-11/17 as new promising strains for use in probiotic feed additives. *Microorganisms*, 11(11), 2729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112729>
- Yaderets, V., Karpova, N., Glagoleva, E., Shibaeva, A., & Dzhavakhiya, V. (2023). Enhanced β -Carotene production in *Mycolicibacterium neoaurum* Ac-501/22 by combining mutagenesis, strain selection, and subsequent fermentation optimization. *Fermentation*, 9(12), 1007. <https://doi.org/10.3390/fermentation9121007>