



## Научная статья

УДК 635.52/.58:635.082.7

# Влияние глифосата и пробиотика на микробиом цыплят-бройлеров

Георгий Юрьевич Лаптев<sup>1,2</sup>, Дарья Георгиевна Тюрина<sup>3</sup>, Елена Павловна Горфункель<sup>3</sup>, Елена Александровна Йылдырым<sup>1,2</sup>, Лариса Александровна Ильина<sup>1,2</sup>, Валентина Анатольевна Филиппова<sup>1</sup>, Андрей Валерьевич Дубровин<sup>1</sup>, Евгений Александрович Бражник<sup>3</sup>, Наталья Ивановна Новикова<sup>3</sup>, Тимур Петрович Дуняшев<sup>3</sup>, Вероника Христофоровна Меликиди<sup>3</sup>, Ксения Андреевна Калиткина<sup>3</sup>, Екатерина Сергеевна Пономарева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ООО БИОТРОФ+; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный аграрный университет; <sup>3</sup>ООО БИОТРОФ

**Аннотация:** Косвенное воздействие гербицидов глифосатов на здоровье животных и птиц через изменения в их микробиомах могут оказаться не менее важными, чем прямое воздействие на физиологию макроорганизмов. Методом NGS-секвенирования показано, что глифосат, содержащийся в загрязненных кормах для бройлеров, даже в минимальных концентрациях, которые в несколько раз ниже уровней ПДК для кормов, при хроническом воздействии может негативно влиять на микробное сообщество слепых отростков кишечника. Бройлеров кросса Росс-308 разделили на 3 группы по 40 голов в каждой: I контрольная, II опытная, получавшая рацион с добавлением глифосата в количестве 20 мг/кг корма; III опытная, получавшая рацион с добавлением глифосата, а также пробиотического штамма микроорганизма *Bacillus* sp. ГЛ-8. Показано, что патогенные и оппортунистические микроорганизмы, которые, вероятно, менее чувствительны или даже нечувствительны к глифосату, могут увеличивать численность, вытесняя представителей нормофлоры. Так, в группе II, по сравнению с контролем, возрастало количество микроорганизмов семейств *Staphylococcaceae* – в 5,0 раз и *Enterobacteriaceae* – в 1,5 раза ( $P \leq 0,05$ ). Введение в рацион пробиотика на фоне присутствия в кормах глифосата оказало позитивное влияние на разнообразие и численность микроорганизмов различных таксонов. Под влиянием пробиотика в группе III по сравнению с группой II происходило снижение численности таких клостридиальных кластеров, как *Clostridium\_III*, *Clostridium\_IV*, *Clostridium\_sensu\_stricto* *Clostridium\_XIVa*, *Clostridium\_XIVb*, *Clostridium\_XVIII* ( $P \leq 0,05$ ). Вероятно, это связано с антимикробной активностью штамма в составе пробиотика и/или присутствием генов биодеструкции ксенобиотиков, что предполагает будущие исследования в данном направлении.

**Ключевые слова:** глифосат, цыплята-бройлеры, пробиотик на основе *Bacillus*, микробиота слепых отростков кишечника, *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, клостридии.

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

**doi:** 10.33845/0033-3239-2022-71-11-35-43

**Введение.** Повсеместное использование гербицидов с начала их применения увеличилось в геометрической прогрессии, поскольку они обеспечивают простой, эффективный и экономичный способ борьбы с сорняками. Глифосат – наиболее распространенный гербицид широкого спектра действия, который используется при начальной обработке почвы. Кроме того, зерновые, бобовые и семенные культуры перед сбором урожая обычно сушат глифосатом.

Зерновые, прежде всего, кукуруза и соя – основные компоненты кормов для сельскохозяйственных птиц. Показано [17], что устойчивые к глифосату культуры содержат глифосат и/или его метаболиты в широком диапазоне концентраций.

При этом ПДК глифосата в сельскохозяйственных продуктах значительно различаются в зависимости от назначения и вида такого продукта и регулирующего органа. ПДК варьируют в пределах

от 0,05 мг/кг для большинства продуктов животного происхождения (за исключением мясных субпродуктов), 0,1–40 мг/кг для многих растительных продуктов, предназначенных для потребления людьми, и до 530 мг/кг для кормов [3].

Хорошо известно, что нормальное функционирование микробиома играет огромную роль в поддержании основных функций организма людей, животных и птиц. Изменения в составе микробных сообществ не могут



не оказывать влияние на метаболизм организма-хозяина.

Глифосат блокирует ключевой фермент шикиматного пути – 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), которая участвует в синтезе трех незаменимых ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана) у большинства прокариот, растений и грибов. До недавнего времени наличие шикиматного пути и разнообразию фермента EPSPS у многих микроорганизмов значения не придавалось.

В то же время, в последние годы появился ряд публикаций, где содержатся указания на то, что глифосаты могут негативно влиять на кишечные бактериальные сообщества у нескольких модельных макроорганизмов, а также у культур *in vitro* [1,8]. Например, в исследовании на молочных коровах бактерии, продуцирующие молочную кислоту, оказались более чувствительны к глифосату, чем виды *Clostridium*, продуцирующие токсины [7]. В другом исследовании определялось воздействие глифосата на потенциальные патогены и полезных представителей микробиоты домашней птицы, однако эксперимент проводился в условиях *in vitro* [12]. В условиях *in vivo* экспериментов по изучению состава микробиома под влиянием глифосата с помощью NGS-секвенирования на сельскохозяйственной птице практически не проводилось.

Важно также разработать методы противостояния токсическому действию глифосата на микробиомы сельскохозяйственных животных и птиц. В этом направлении крайне перспективной является экологическая стратегия восстановления микробного баланса с помощью пробиотических микроорганизмов. Кроме того, некоторые микроорганизмы,

в частности, *Bacillus sp.*, обладают выраженной способностью к его биодеструкции.

Таким образом, потенциальное воздействие остатков глифосата на микробиом кишечника все еще нуждается в более детальном изучении. Ведь косвенное воздействие глифосатов на здоровье птиц через изменения в их микробиомах могут оказаться не менее важными, чем прямое воздействие на физиологию макроорганизмов.

В связи с этим целью исследования было изучение состава микробиома слепых отростков цыплят-бройлеров при хроническом воздействии глифосата и введении в рацион пробиотического штамма микроорганизма.

**Материал и методика исследований.** Эксперименты проводили в виварии ООО «БИОТРОФ+» на бройлерах кросса Росс-308 от 1-до 35-суточного возраста в 2022 г. Для проведения эксперимента птиц разделили на 3 группы по 40 голов в каждой: I – интактная (контрольная), получавшая рацион без введения глифосата и штамма микроорганизма; II опытная – получавшая рацион с добавлением глифосата в количестве 20 мг/кг корма; III опытная – получавшая рацион с добавлением глифосата в количестве 20 мг/кг корма, а также пробиотического штамма микроорганизма *Bacillus sp.* ГЛ-8 (получен из коллекции ООО «БИОТРОФ+»).

Глифосат применяли в составе препарата «Агрокиллер» (ЗАО фирма «Август», Россия), содержащего 500 г/л глифосата кислоты (изопропиламинная соль). Для этого готовили рабочий раствор из препарата «Агрокиллер», рабочий раствор наносили на комбикорм методом распыления в соотношении 5 мл рабочего раствора на 1 кг комбикорма, до конечной концентрации чистого глифосата в комбикорме 20 мг/кг. Концен-

трацию глифосата в корме контролировали методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя стриповый иммуноферментный анализатор STAT FAX 303+ (Awareness Technology, LLC, США) и тест-систему Glyphosate ELISA Microtiter Plate (Abraxis, США).

Анализ антимикробной активности штамма *Bacillus sp.* ГЛ-8 с целью оценки потенциальной пробиотической активности проводили методом штрихов (отсроченного антагонизма).

В конце эксперимента проводили отбор проб химуса слепых отростков кишечника от 3 голов из каждой группы. Все образцы были заморожены при температуре -20°C и транспортированы в сухом льду в молекулярно-генетическую лабораторию НПК ООО «БИОТРОФ» для последующего выделения ДНК.

Тотальную ДНК выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Бактериальное сообщество слепой кишки оценивали методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США) с праймерами для V3-V4 региона 16S рРНК. Прямой праймер: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGCWGCGAG-3'; обратный праймер: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. ПЦР проводили при следующих условиях: 3 мин при 95°C; 30 с при 95°C, 30 с при 55°C, 30 с при 72°C (необходимо для удлинения последовательности) (25 циклов); 5 мин при 72°C (окончательное удлинение). Секвенирование осуществляли при помощи реагентов для подготовки библиотек Nextera® XT IndexKit (Illumina, Inc., США), для очистки ПЦР-продуктов Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., США) и для проведения секвенирования

MiSeq® ReagentKit v2 (500 cycle) (Illumina, Inc., США).

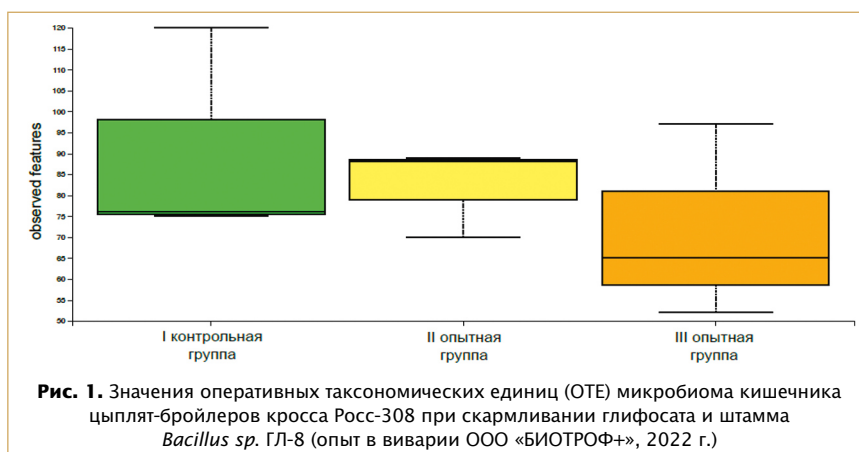
Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения QIIME2 ver. 2020.8 (<https://docs.qiime2.org/2020.8/>). Фильтрацию шумовых последовательностей проводили с помощью встроенного в пакет QIIME2 метода DADA2, включающего информацию о качестве в свою модель ошибок, что делает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

**Результаты исследований и их обсуждение. Антимикробная активность штамма бактерии *Bacillus sp.* ГЛ-8.** Штамм обладал выраженным антагонистическим действием *in vitro* в отношении исследованных тест-культур: протяженность зон задержки роста составляла от 7 до 24 мм (табл. 1). Это позволяет предположить присутствие в составе культуральной жидкости *B. subtilis* ГЛ-8 диффундирующих в агар антимикробных веществ, которые могут обеспечить его пробиотическую активность.

**Результаты оценки индексов биоразнообразия.** При проведении NGS-секвенирования микробиома слепых отростков кишечника бройлеров было сгенерировано в общей сложности 57,234 секвенированных последовательностей гена 16S рРНК (с медианой считываний 6,134; min = 5,123; max = 7,795).

**Таблица 1. Протяженность зон задержки роста тест-культур микроорганизмом при совместном инкубировании со штаммом *Bacillus sp.* ГЛ-8 *in vitro***

№	Индикаторный штамм	Зона задержки роста, мм (m±M, n=5)
1	<i>C. perfringens</i>	15±0,8
2	<i>E. coli</i>	15±1,2
3	<i>S. tiphymurium</i>	7±0,5
4	<i>St. aureus</i>	22±1,5
5	<i>P. aeruginosa</i>	24±0,9
6	<i>F. oxysporum</i>	10±0,6
7	<i>A. niger</i>	10±1,3
8	<i>Penicillium sp.</i>	5±0,5



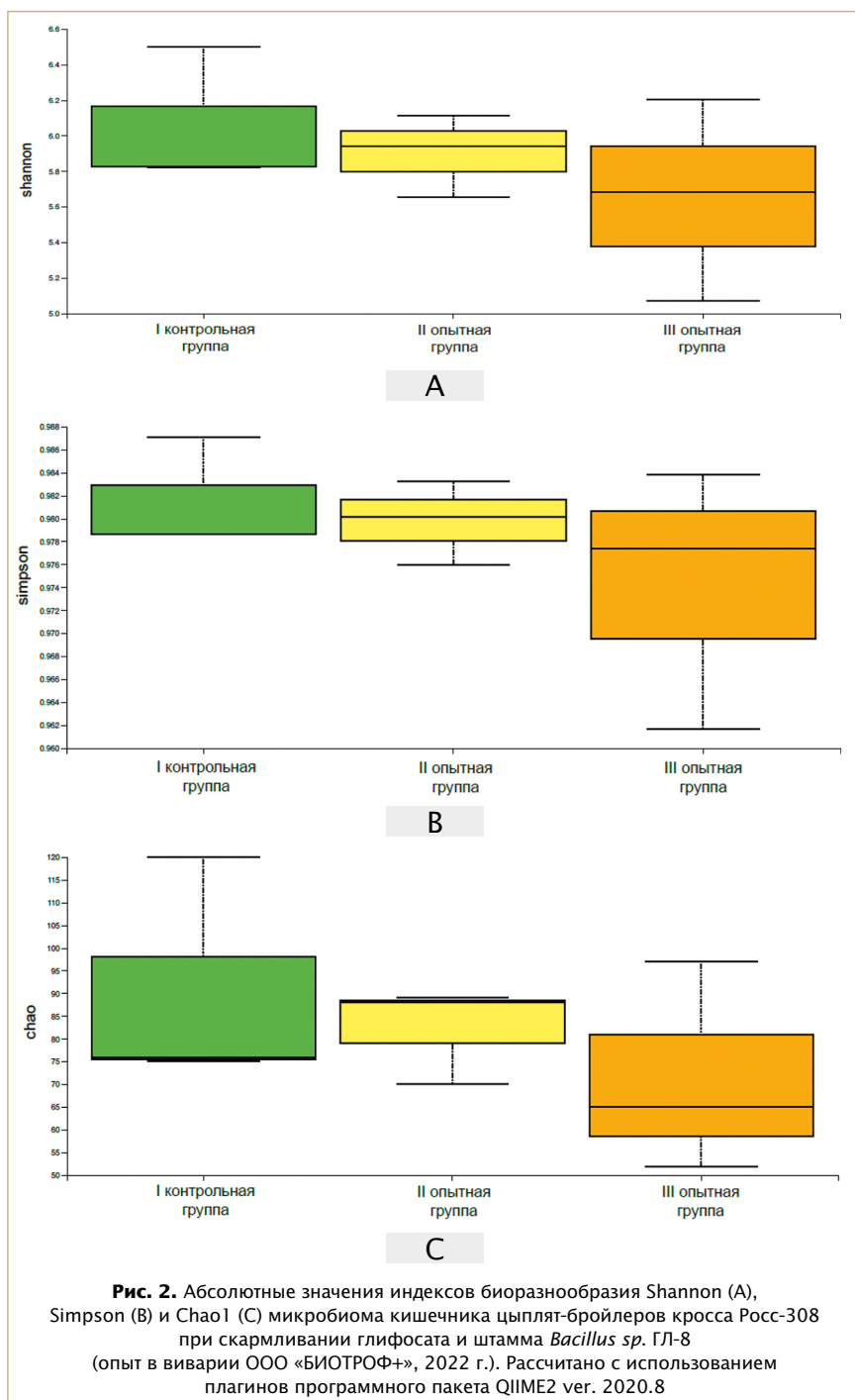
Глифосат без введения пробиотика (опытная группа II) не оказал влияния на число оперативных таксономических единиц (ОТЕ, рис. 1), а также на индексы биоразнообразия – Shannon, Simpson и Chao1 ( $P > 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой I (рис. 2). В то же время, введение в корма штамма бактерии *Bacillus sp.* ГЛ-8 (опытная группа III) было связано со снижением значений ОТЕ (рис. 1) и всех индексов биоразнообразия ( $P \leq 0,05$ ; рис. 2). Снижение биоразнообразия может быть связано со стабилизацией микробиома под влиянием пробиотического штамма микроорганизма, поскольку большое количество взаимодействующих видов нередко имеет тенденцию оказывать дестабилизирующее воздействие на микробиом [6]. Ранее также было показано, что пребиотики, подавляя рост патогенных микроорганизмов, способствовали формированию более

стабильных микробных сообществ кишечника с низким биоразнообразием [4].

**Состав микробиоты на уровне филумов на основе NGS-секвенирования.** В составе микробиома слепых кишок у птиц всех групп присутствовало 34 бактериальных филума (рис. 3). Среди них доминировали *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Tenericutes*. Самым многочисленным был филум *Firmicutes* (от  $63,9 \pm 4,20$  до  $88,5 \pm 5,34\%$ ).

Введение глифосата в корма (группа II) приводило к увеличению бактерий филума *Proteobacteria* в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой I и снижению численности *Firmicutes* ( $P \leq 0,05$ ). Данные представляются закономерными, поскольку микроорганизмы филума *Proteobacteria* давно известны своей способностью разлагать ксенобиотики, включая сложные аро-





матические соединения, с использованием различных акцепторов электронов [11]. Поэтому данные микроорганизмы на фоне глифосата могли получить конкурентное преимущество по сравнению с другими формами. Что касается *Firmicutes*, то ранее было показано, что у мышей глифосат, вводимый в виде препарата Roundup® перорально в высоких концентрациях (250 или 500 мг/кг массы

тела в день в течение 6 или 12 недель), также снижал численность *Firmicutes* [1].

На фоне введения в рацион с глифосатом пробиотика (опытная группа III) наблюдалось снижение в 2,6 раза численности бактерий филума *Proteobacteria* по сравнению с опытной группой II ( $P \leq 0,05$ ). Возможно, интродуцированный штамм снижал токсическую нагрузку глифосата за счет

предполагаемых свойств биодеструкции. В группе III было также отмечено снижение численности *Firmicutes* на 16,7% и возрастание численности *Bacteroidetes* на 19,1% по сравнению с опытной группой II ( $P \leq 0,05$ ). В последние годы соотношению *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (F/B) в желудочно-кишечном тракте уделяется много внимания [14]. Широко признано, что данное соотношение оказывает значительное влияние на поддержание нормального гомеостаза кишечника. Повышенное или пониженное соотношение F/B рассматривается как дисбиоз. Наблюдаемое в нашем эксперименте снижение *Firmicutes* на фоне возрастания численности *Bacteroidetes* многими исследователями оценивается как благоприятное для здоровья макроорганизма [14].

**Состав микробиоты на уровне семейств.** В опытной группе III увеличивалось содержание бактерий семейства *Vacillaceae* на 1,7 раза по сравнению с контрольной группой I и опытной группой II ( $P \leq 0,05$ ) (рис. 4). Это может свидетельствовать об успешной колонизации желудочно-кишечного тракта интродуцированным штаммом пробиотического микроорганизма.

В кишечнике птиц опытных групп II и III (с введением глифосата) наблюдались дисбиотические нарушения в составе микроорганизмов, ферментирующих растительные полисахариды. Например, в группах II и III снижалось содержание бактерий семейства *Lachnospiraceae* на 5,5 и 5,0% соответственно ( $P \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой I. *Lachnospiraceae* – это важные представители филума *Firmicutes*, которые ферментируют клетчатку до органических кислот, включая летучие жирные кислоты. Это могло негативно сказаться на про-

цессах переваривания и синтеза важных для птиц метаболитов, например, бутирата. Интересно, что введение в рацион пробиотического штамма микроорганизма на фоне глифосата (группа III) оказало сдерживающее воздействие на численность целлюлозолитических бактерий *Ruminococcaceae* по сравнению с группой II ( $P \leq 0,05$ ). Ранее исследователи, напротив, отмечали стимулирующее действие пробиотика на численность *Ruminococcaceae* [15].

Помимо этого, в группе II по сравнению с контролем возрастало количество микроорганизмов ряда патогенных и оппортунистических семейств. Так, содержание *Staphylococcaceae* увеличивалось в 5,0 раз, *Enterobacteriaceae* – в 1,5 раза ( $P \leq 0,05$ ). Дело в том, что кишечные прокариоты значительно различаются по чувствительности к глифосату в зависимости от типа фермента EPSPS. Ранее в исследованиях *in vitro* было показано, что высокопатогенные для птицы бактерии, такие как *Salmonella enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *Clostridium perfringens* и *Cl. botulinum*, обладают высокой устойчивостью к глифосату; однако большинство полезных представителей нормофлоры, таких как *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis* и *Lactobacillus sp.*, оказались чувствительны к глифосату [12]. Избирательное действие глифосата связано с тем, что фермент EPSPS делится на четыре группы в зависимости от дифференциальной чувствительности к глифосату. Эта классификация основана на наличии и отсутствии аминокислотных маркеров в активном сайте белка. В целом, виды, содержащие последовательности EPSPS класса I ( $\alpha$  и  $\beta$ ), чувствительны к глифосату, тогда как виды с последовательностями класса II, как правило,

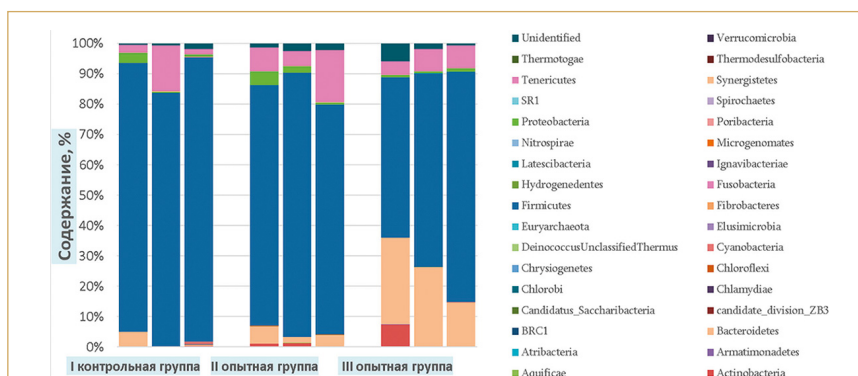


Рис. 3. Состав кишечного микробиома цыплят-бройлеров кросса Росс-308 при скармливании глифосата и штамма *Vacillus sp.* ГЛ-8 на уровне бактериальных филумов по данным NGS-секвенирования ампликонов 16S рРНК (опыт в виварии ООО «БИОТРОФ+», 2022 г.)

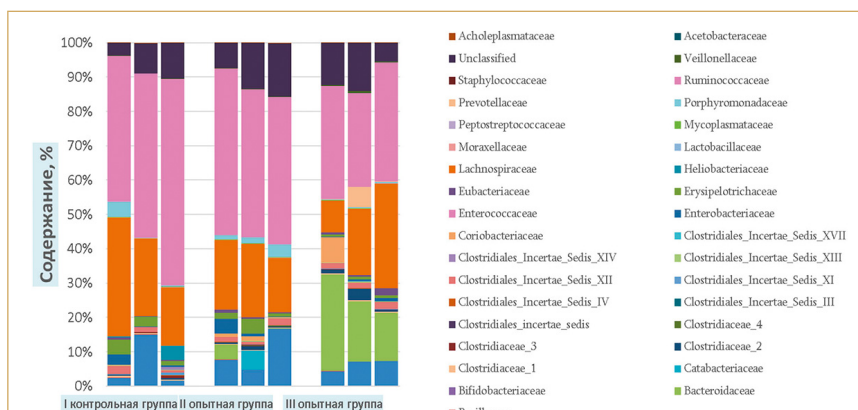


Рис. 4. Состав кишечного микробиома цыплят-бройлеров кросса Росс-308 при скармливании глифосата и штамма *Vacillus sp.* ГЛ-8 на уровне бактериальных семейств ( $P \leq 0,05$ ) по данным NGS-секвенирования ампликонов 16S рРНК (опыт в виварии ООО «БИОТРОФ+», 2022 г.)

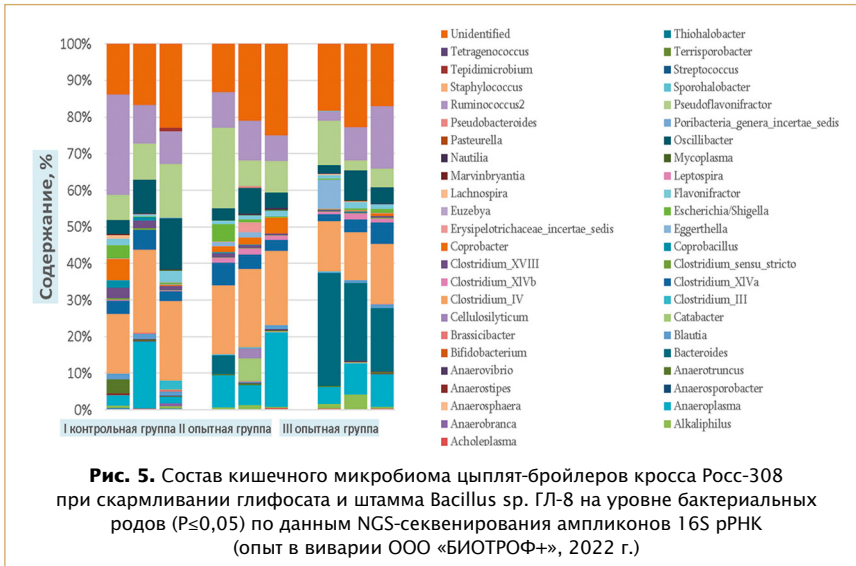
устойчивы. Белки EPSPS, принадлежащие к классам III и IV, предположительно приводят к устойчивости к глифосату и относительно редки в природе (<5% последовательностей). У прокариот большинство видов имеют ферменты класса I и, таким образом, чувствительны к глифосату (82% у архей и 57% у бактерий), тогда как ферменты класса III (устойчивые к глифосату) имеются только у 2 и 32% видов архей и бактерий соответственно.

Применение штамма микроорганизма *Vacillus sp.* ГЛ-8 (группа III) способствовало снижению количества бактерий семейств *Staphylococcaceae* в 1,75 раза и *Enterobacteriaceae* – в 3,3 раза ( $P \leq 0,05$ ).

**Изменения состава микробиоты на уровне родов и видов.** На уровне более низких

таксономических рангов (родов) также были отмечены выраженные отличия между группами по численности микроорганизмов ( $P \leq 0,05$ ; рис. 5). Основной тенденцией по-прежнему являлось снижение некоторых представителей нормофлоры на фоне возрастания численности нежелательных микроорганизмов.

Так, на фоне глифосата в опытных группах II и III снижалось количество представителей филума *Firmicutes* – бактерий рода *Oscillibacter* ( $4,1 \pm 0,24$  и  $4,1 \pm 0,32$  соответственно против  $7,5 \pm 0,48$  в контрольной группе I,  $P \leq 0,05$ ). Представители этого рода являются активными продуцентами валериановой кислоты как основного конечного продукта метаболизма глюкозы. Валериановая кислота –



**Рис. 5.** Состав кишечного микробиома цыплят-бройлеров кросса Росс-308 при скормливании глифосата и штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8 на уровне бактериальных родов ( $P \leq 0,05$ ) по данным NGS-секвенирования ампликонов 16S рПНК (опыт в виварии ООО «БИОТРОФ+», 2022 г.)



это ценное для метаболизма птиц вещество, поскольку оно участвует в предотвращении последствий окислительного стресса, снижении экспрессии провоспалительных цитокинов и  $\alpha$ -синуклеина с последующим увеличением активности жизненно важных антиоксидантных ферментов.

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

На фоне глифосата (группа II) вытеснение описанных полезных видов сопровождалось увеличением численности нежелательных таксонов. Так, например, в группе II возросла численность

представителей *Pseudoflavonifractor* по сравнению с контролем до  $10,7 \pm 0,82$  против  $8,7 \pm 0,39\%$  ( $P \leq 0,05$ ). Увеличение численности *Pseudoflavonifractor* связывают с возникновением метаболических расстройств [16]. В группе III происходило снижение численности представителей *Pseudoflavonifractor* по сравнению с группой II (до  $5,8 \pm 0,45\%$ ;  $P \leq 0,05$ ).

Кроме того, в группе II возросла численность родов *Staphylococcus*, *Terrisporobacter* и вида *Mycoplasma conjunctivae* по сравнению с контролем ( $P \leq 0,05$ ). *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. Давно известно, что ксенобиотики индуцируют окислительный стресс, при этом образуется ряд метаболитов, которые приводят к выделению супероксида при условии сохранения способности восстанавливать образующиеся дионы (хиноны) в гидрохиноны. Гидроксильные радикалы являются высокореак-

тивными, но недолговечными молекулами; известно, что они вызывают повреждение ДНК. Мутагенез является основным фактором, способствующим риску канцерогенеза, связанному с условиями повышенного окислительного стресса. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что канцерогенез на фоне глифосатов имеет возможную связь с изменением микробиоты кишечника.

Важно также отметить, что под влиянием пробиотического штамма *Bacillus* sp., в группе III происходило снижение численности таких кластридиальных кластеров, как *Clostridium\_III*, *Clostridium\_IV*, *Clostridium\_sensu\_stricto*, *Clostridium\_XIVa*, *Clostridium\_XIVb*, *Clostridium\_XVIII* по сравнению с группой II ( $P \leq 0,05$ ). В сумме эта разница достигала 6,4%. Известно, что виды *Clostridium* sp. среди кишечной микробиоты имеют более высокую способность к образованию токсичных или канцерогенных метаболитов, которые могут приводить к избытку дофаминовых хинонов, образуя активные формы кислорода, что приводит к окислительному стрессу и митохондриальной дисфункции. К тому же, ранее на моногастричных животных показано, что воздействие глифосата приводило к выраженной бактериемии *Clostridium* [18]. Ранее у цыплят, которые подвергались воздействию глифосата ( $370 \pm 92$  мкг/кг корма), наблюдали типичные симптомы кластридиоза, связанные с повышенным уровнем кишечных кластридий, причем симптомы кластридиоза подавлялись гуминовыми кислотами, которые связываются с молекулами глифосата в кишечном тракте [13].

Имеет существенное значение тот факт, что в числе прочих, в нашем эксперименте под влиянием пробиотического штамма *Bacillus* sp. (группа III) снижалась числен-



ность таких видов, как *C. bolteae* и *C. leptum* по сравнению с группой II в 2,2 и 1,7 раза соответственно ( $P \leq 0,05$ ). Известно, что *C. bolteae* обладает высококонсервативным ускорителем поглощения глицерина и родственным белком аквапорином (p59-71), который имеет гомологию последовательности с пептидом AQP4 (p92-104), расположенным в иммунодоминантном (специфичном для AQP4) Т-клеточном эпитопе (p91-110). Наличие *C. bolteae* коррелирует с экспрессией воспалительных генов, связанных как с врожденным, так и с адаптивным иммунитетом и, в частности, участвующих в дифференцировке плазматических клеток, хемотаксисе В-клеток и активации Th17 [10]. В свою очередь, *C. leptum* создавал иммуносупрессивную среду при воспалении легких у мышей. Было отмечено увеличение CD4 + CD25 + FOXP3+, нарушение выработки Т-эффекторных клеток, включая Th1, Th2, Th9 и Th17, и секреции цитокинов *in vivo* [5].

Интересно, что на фоне введения глифосата (группы II и III) пищеварительную систему птиц колонизировали представители экстремально галофильных [2] родов микроорганизмов *Tetragenococcus* и *Sporohalobacter*, которые не присутствовали в контрольной группе I. Интересно, что представи-

тели *Sporohalobacter sp.* известны выраженной способностью к деградации сложных органических соединений, таких, как нитробензол, нитрофенолы, нитроанилины, 2,4-динитрофенол, 2,4-динитроанилин [9]. Возможно, стрессовое воздействие в виде поступления в организм птиц глифосата связано с выживаемостью микроорганизмов, повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям и присутствием в геноме генов биодеструкции, что позволяет микробиому, по крайней мере, частично, противодействовать токсическому эффекту и разлагать ксенобиотики.

**Выводы.** Наши исследования показали, что глифосат, содержащийся в загрязненных кормах для птиц, даже в минимальных концентрациях, которые в несколько раз ниже уровней ПДК для кормов, при хроническом воздействии может негативно влиять на микробные сообщества кишечника. Патогенные и оппортунистические микроорганизмы, которые, вероятно, менее чувствительны или даже нечувствительны к глифосату, могут увеличивать численность, вытесняя представителей нормофлоры. Вытеснение симбиотической нормобиоты может негативно сказаться на процессах переваривания клетчатки и синтеза важных для птиц метаболитов. Увеличение доли патогенов может вызывать распро-

странение инфекционных заболеваний. Поэтому мы предполагаем, что оценка проблем, связанных с крупномасштабным и интенсивным использованием глифосата и других пестицидов, является гораздо более сложной задачей, чем первоначально предполагалось регулируемыми органами.

Поскольку точные причины дифференциальной чувствительности к глифосату у макроорганизмов неизвестны, это предстоит выяснить в дальнейшем.

Введение в рацион пробиотического штамма микроорганизмов на фоне присутствия в кормах глифосата оказало позитивное влияние на разнообразие и численность микроорганизмов различных таксонов. Вероятно, это связано с антимикробной активностью штамма в составе пробиотика и/или присутствием генов биодеструкции ксенобиотиков, что предполагает будущие исследования в данном направлении.

**Исследование выполнено при поддержке гранта РФ №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».**

### Литература / References

1. Aitbali Y, Ba-M'hamed S, Elhidar N, Nafis A, Soraa N, Bennis M (2018) *Neurotoxicol. Teratol.*, **67**:44-9; doi 10.1016/j.ntt.2018.04.002.
2. Chun BH, Han DM, Kim KH, Jeong SE, Park D, Jeon CO (2019) *Food Microbiol.*, **83**:36-47; doi 10.1016/j.fm.2019.04.009.
3. CODEX Alimentarius (2013), Pesticide residues in food and feed: 158 Glyphosate, Food Agric. Organ., World Health Organ., [accessed: 3/25/2020] <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en>
4. de Vrese M, Marteau PR (2007) *J. Nutr.*, **137**(3 Suppl. 2):803S-11S; doi 10.1093/jn/137.3.803S.
5. Huang F, Qiao HM, Yin JN, Gao Y, Ju YH, Li YN (2015) *PLoS One*, **10**(11): e0141717; doi 10.1371/journal.pone.0141717.
6. Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Groß S, Helm K, Klarczyk M, Schöpfer H, Böckler H-M, Wells J (2005) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **40**(1):36-42; doi 10.1097/00005176-200501000-00007.



7. Krüger M, Shehata AA, Schrödl W, Rodloff A (2013) *Anaerobe*, **20**:74-8; doi 10.1016/j.anaerobe.2013.01.005.
8. Mesnage R, Teixeira M, Mandrioli D, Falcioni L, Ducarmon QR, Zwitter RD, Mazzacuva F, Caldwell A, Halket J, Amiel C, Panoff JM, Belpoggi F, Antoniou MN (2021) *Environ. Health Perspect.*, **129**(1):17005; doi: 10.1289/EHP6990.
9. Oren A, Curevich P, Henis Y (1991) *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(11):3367-70; doi 10.1128/aem.57.11.3367-3370.1991.
10. Pandit L, Cox LM, Malli C, D'Cunha A, Rooney T, Lokhande H, Willocq V, Saxena S, Chitnis T (2020) *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **8**(1):e907; doi 10.1212/NXI.0000000000000907.
11. Rabus R, Kube J, Heider A, Beck K, Heitmann F, Widdel R, Reinhardt R (2005) *Arch. Microbiol.*, **183**(1):27-36; doi 10.1007/s00203-004-0742-9.
12. Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez HM, Krüger M (2013) *Curr. Microbiol.*, **66**(4):350-8; doi 10.1007/s00284-012-0277-2.
13. Shehata AA, Schrödl W, Schledorn P, Krüger M (2014) *J. Poult. Sci.*, **51**(3):333-7; doi 10.2141/jpsa.0130169.
14. Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B (2020) *Microorganisms*, **8**(11):1715; doi 10.3390/microorganisms8111715.
15. Wang L, Liao Y, Yang R, Zhu Z, Zhang L, Wu Z, Sun X (2021) *Bioeng. Transl. Med.*, **6**(3):e10219; doi 10.1002/btm2.10219.
16. Wang Y, Ouyang M, Gao X, Wang S, Fu C, Zeng J, He X (2020) *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **13**:835-50; doi 10.2147/DMSO.S240728.
17. Xu J, Smith S, Smith G, Wang W, Li Y (2019) *Food Control*, **106**:106710; doi 10.1016/j.foodcont.2019.106710.
18. You MJ, Shin GW Lee CS (2015) *Am. J. Case Rep.*, **16**:4-7; doi 10.12659/AJCR.891287.

Статья поступила в редакцию 06.10.2022; одобрена после рецензирования 18.10.2022; принята к публикации 19.10.2022.

#### Research article

### The Effects of Glyphosate and Probiotic on Cecal Microbiota in Broilers

Georgy Y. Laptev<sup>1,2</sup>, Darya G. Tuirina<sup>3</sup>, Elena P. Gorfunkel<sup>3</sup>, Elena A. Yildyrym<sup>1,2</sup>, Larisa A. Ilyina<sup>1,2</sup>, Valentina A. Filipova<sup>1</sup>, Andrey V. Dubrovin<sup>1</sup>, Evgeny A. Brazhnik<sup>3</sup>, Natalya I. Novikova<sup>3</sup>, Timur P. Dnyashev<sup>3</sup>, Veronika Kh. Melikidi<sup>3</sup>, Ksenia A. Kalitkina<sup>3</sup>, Ekaterina S. Ponomareva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>BIOTROF+, LCC; <sup>2</sup>St. Petersburg State Agrarian University; <sup>3</sup>BIOTROF, LCC

**Abstract.** *The impact of herbicides glyphosates on health status in animals and human via the effects on the composition of their gastrointestinal microbiotas is possibly no less important than their direct physiological impact. In the study involving microbiome-wide new-generation sequencing (NGS) of microbial 16S rRNAs the detrimental effect of dietary glyphosate on cecal microbiota in broilers was found even at concentrations well below the levels permissible for feedstuffs. Broilers (120 birds, cross Ross-308, 1-35 days of age) were allotted to three treatments (40 birds per treatment): control treatment I was fed diets without glyphosate and probiotic; similar diets for treatments II and III were supplemented with glyphosate (20 ppm); diets for treatment III was additionally supplemented with a probiotic based on Bacillus strain GL-8. It was found that dietary glyphosate can increase cecal populations of pathogenic and/or opportunistic species which are probably less sensible or even insensible to glyphosate; e.g. in treatment II the amount of Staphylococcaceae and Enterobacteriaceae were significantly 5.0-fold and 1.5-fold higher, respectively, in compare to control (p<0.05). Supplementation of glyphosate-contaminated diet with the probiotic beneficially affected the biodiversity and amounts of different microbial taxons. In treatment III as compared to treatment II the amounts of different clostridial clusters (Clostridium\_III, Clostridium\_IV, Clostridium\_sensu\_stricto Clostridium\_XIVa, Clostridium\_XIVb, Clostridium\_XVIII) were significantly reduced (p<0.05). This effect was presumably related to antimicrobial activity of the probiotic strain and/or to the presence in the latter of genes providing biodestruction of xenobiotics; further investigations are required to elucidate the exact mechanism.*

**Keywords:** *glyphosate, broilers, Bacillus-based probiotic, cecal microbiota, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae, Clostridia.*

**For Citation:** Laptev G.Y., Tuirina D.G., Gorfunkel E.P., Yildyrym E.A., Ilyina L.A., Filippova V.A., Dubrovin A.V., Brazhnik E.A., Novikova N.I., Dunnyashev T.P., Melikidi V.Kh., Kalitkina K.A., Ponomareva E.S. (2022) The effects of glyphosate and probiotic on cecal microbiota in broilers. *Ptitsevodstvo*, 71(11): 35-43. (in Russ.)  
**doi: 10.33845/0033-3239-2022-71-11-35-43**

(For references see above)

Submitted 06.10.2022; revised 18.10.2022; accepted 19.10.2022.

© Лаптев Г.Ю., Тюрина Д.Г., Горфункель Е.П., Ыылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Дубровин А.В., Бражник Е.А., Новикова Н.И., Дуняшев Т.П., Меликиди В.Х., Калиткина К.А., Пономарева Е.С., 2022

