

УДК 579.017.8

UDC 579.017.8

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ-
АДАптиРОВАННЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ КАК
ОСНОВА СОЗДАНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ
МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ
ПТИЦЕВОДСТВА**

**INTENSIFICATION OF THE CULTIVATION
PROCESS OF PHYSIOLOGICALLY-ADAPTED
LACTOBACILLI AS A BASIS FOR THE
CREATION OF BIOLOGICAL PRODUCTS OF
MICROBIAL ORIGIN FOR POULTRY
BREEDING**

Кощаев Андрей Георгиевич
д-р биол. наук, профессор
SPIN-код 8508-1224

Koshchayev Andrey Georgiyevich
Dr.Sci.Biol., Professor
RSCI SPIN-code 8508-1224

Лысенко Юрий Андреевич
канд. биол. наук, доцент
SPIN-код 8066-7864

Lysenko Yury Andreevich
Cand. Biol. Sci., assistant professor
RSCI SPIN-code 8066-7864

Мищенко Валентин Андреевич
аспирант

Mishchenko Valentin Andreevich
graduate student

Лунева Альбина Владимировна
канд. биол. наук
SPIN-код 8485-2274

Luneva Albina Vladimirovna
Cand.Biol.Sci.
RSCI SPIN-code 8485-2274

Радченко Виталий Владиславович
канд. биол. наук, научный сотрудник
SPIN-код 9479-5738

Radchenko Vitaly Vladislavovich
Cand. Biol. Sci., Researcher
RSCI SPIN-code 9479-5738

Мачнева Надежда Леонидовна
канд. биол. наук, старший преподаватель
SPIN-код 6931-4477

Machneva Nadezhda Leonidovna
Cand. Biol. Sci., senior lecturer
RSCI SPIN-code 6931-4477

Гнеуш Анна Николаевна
канд. с-х. наук, старший преподаватель
SPIN-код 2342-8682

Gneush Anna Nikolaevna
Candidate of Agricultural Sciences, senior lecturer
RSCI SPIN-code 2342-8682

*Кубанский государственный аграрный
университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар,
Россия*

*Kuban State Agrarian University named after
I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia*

Работа проводилась в научно-исследовательской лаборатории кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики Кубанского ГАУ, с целью которой являлся подбор наиболее подходящей питательной среды, обеспечивающей максимальный прирост биомассы молочнокислых микроорганизмов. Объектом исследований были чистые культуры микрофлоры желудочно-кишечного тракта перепелов – *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus intermedius* и *Lactobacillus salivarius*. Для культивирования микроорганизмов использовали 4 питательные среды: среда для молочнокислых микроорганизмов (г. Углич), меласно-автолизатная среда, глюкозо-пептонная среда и среда МРС. При культивировании бактерий переменными параметрами служили время и температура выращивания. В процессе культивирования проводился анализ динамики потребления редуцирующих веществ и титра

The work was done in the research laboratory of the department of Biotechnology, Biochemistry and Biophysics of Kuban State Agrarian University, the aim of which was to select the most appropriate nutrient medium for maximum growth of lactic acid microorganism growth. The object of the study was its own microflora of gastrointestinal tract of quails – *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus intermedius* and *Lactobacillus salivarius*. As a nutrient substrate there were used 4 of the nutrient media: the medium for lactic acid bacteria (city Uglich), the melasse-autolysis medium, the glucose-peptone medium and the MRS. During the cultivation of the microflora of the variable parameters were the time and temperature of cultivation. During the cultivation of microflora the time and the temperature of growing were the variable parameters. In the process of growing there was carried out the analysis of dynamics of consumption of reducing substances and titers of microorganisms.

микроорганизмов. По результатам выращивания микробных культур выявлено активное потребление углеродного субстрата в используемых вариантах питательных сред, при этом установлено, что к 24 ч культивирования наблюдался максимум клеток. На основании проведенных экспериментов установлено, что при различных параметрах наибольший титр клеток достигался к 24 ч при температуре 38,0 °С на меласно-автолизатной среде. Таким образом, меласно-автолизатная среда может быть рекомендована в производственных условиях как наиболее дешевый субстрат при дальнейшей разработки пробиотических биопрепаратов для птицеводства

Ключевые слова: ЛАКТОБАЦИЛЛЫ, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ТИТР, ДИНАМИКА, ТЕМПЕРАТУРА, ВРЕМЯ, РЕДУЦИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА, МИКРОСКОПИЯ, МОРФОЛОГИЯ

According to the results of growing of microbial cultures there was revealed the active consumption of carbon substrate in used variants of nutrient media, and it was found that there was observed the maximum of cells to 24 h of cultivation. On the basis of carried out results of cultivation on different media and at different parameters there was determined that the most titer of cells was reached to 24 h at the temperature 38,0 °С on the melasse-autolysis medium. So, the melasse-autolysis medium can be recommended in production conditions as the cheaper substrate at the further development of biological preparations for poultry breeding

Keywords: LACTOBACILLES, NUTRIENT ENVIRONMENT, CULTIVATION, TITRE, DYNAMICS, TEMPERATURE, TIME, REDUCING SUBSTANCES, MICROSCOPY, MORPHOLOGY

Doi: 10.21515/1990-4665-128-076

Широкое использование антибиотиков в составе кормов в настоящее время привело к снижению естественной резистентности организма сельскохозяйственной птицы. Длительная антибиотикотерапия провоцирует угнетение собственной микрофлоры птицы, нарушение обменных процессов организма, оказывает негативное воздействие на репродуктивную систему [2; 5; 9; 11; 14; 15]. Альтернативой применения антибиотиков является коррекция эндомикроэкологии птицы с помощью живых микроорганизмов, которые при введении в физиологических количествах приносят пользу здоровью организма-хозяина [8; 12; 16; 18]. Наиболее предпочтительны для этих целей штаммы, входящие в естественные для данного вида и эволюционно закрепленные микробные ассоциации. Они должны обладать повышенной функциональной адаптацией к физиологическим особенностям выращиваемой птицы [3; 7; 10; 13; 17]. Таким образом, подбор питательных сред для вновь выделенных полезных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта птиц является актуальным исследованием, а разработка новых отечественных

биопрепаратов микробного происхождения, обладающих комплексным действием представляет собой перспективное и экономически обоснованное направление в птицеводстве.

Работа проведена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-961.2017.11 (Договор № 14.W01.17.961-МК).

Материалы и методы исследований. Работа проводилась в научно-исследовательской лаборатории кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ, целью которой являлось определение питательных потребностей и оптимальных условий культивирования используемых лактобацилл для интенсификации процессов получения их биомассы.

Объектами исследований являлись лактобактерии – *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus intermedius* и *Lactobacillus salivarius*, которые независимыми микробиологическим методом, методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени и метагеномными методами были выделены из слепых отростков желудочно-кишечного тракта перепела [1; 4; 6].

Первый этап исследований включал в себя культивирование бактерий на стандартных питательных средах при выращивании на качалочных колбах в лабораторном ротационном шейкере.

Время культивирования для всех бактериальных культур составляло 48 ч, при оптимальной температуре 38 °С и оборотах качалки – 50 об./мин.

Для оптимизации питательных потребностей молочнокислых микроорганизмов использовали среды следующего состава:

1. Среда для молочнокислых бактерий: дрожжевой экстракт – 0,2 %; кукурузный экстракт – 0,3 %; глюкозный сироп – 2 %; аскорбиновая кислота (цитрат натрия) – 4 г/л; $\text{KН}_2\text{PО}_4$ – 2 г/л.

2. Состав среды МРС, г/л: пептон – 10,0; дрожжевой экстракт –

20,0; глюкоза – 20,0; дикалия гидрофосфат – 2,0; натрия ацетат – 5,0; триаммония цитрат – 2,0; магния сульфат – 0,2; марганца сульфат 4-водный – 0,05.

3. Состав среды ГПС, г/л: Na_2HPO_4 12-водный – 3,2; KH_2PO_4 – 0,3; MgSO_4 – 0,5; NaCl – 0,5; пептон – 2,0; дрожжевой экстракт – 0,05; глюкоза – 25.

4. Состав среды МАС: меласса кормовая – 45 г/л; K_2HPO_4 – 2 г/л; дрожжевой автолизат – 10 мл/л.

Вторым этапом исследований являлось определение оптимальной температуры культивирования для каждого штамма микроорганизма.

Культуры *Lb. salivarius*, *Lb. intermedius* и *Lb. agilis* являются термофильными, т. е. растущими при достаточно высоких температурах, что обусловлено их местом обитания, а именно желудочно-кишечным трактом птицы, где нормальная температура колеблется, в зависимости от вида птицы, в пределах 38–41 °С.

Для определения титра микрофлоры брали 1,0 мл выращенной каждой культуры и помещали в колбу объемом 100 см³ и заливали 99,0 мл стерильным физиологическим раствором, оставляли на 1 ч. При этом получали разведение 1:100. После этого готовили ряд последовательных десятикратных разведений до 10⁻⁹. Для каждого разведения применяли отдельные стерильные наконечники. Посев в чашки Петри проводили согласно (ГОСТ 10444.11-89 (пункт 4.2.2) на Лактобакагар из разведений 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹. Из разведений 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ стерильным наконечником автоматического дозатора по 1 мл суспензии переносили в 4 чашки Петри, в которые заливают стерильную, расплавленную питательную среду, охлажденную до 38–40 °С. Круговым движением чашек Петри в них перемешивали среду и оставляют до застывания агара. Чашки с засеянными средами помещали в термостат и выдерживали при

(38±1) °С в течении 72 ч. По количеству выросших колоний согласно (ГОСТ 9225-84 (пункт 4.5.3) определяли общий титр микроорганизмов. Число жизнеспособных клеток в 1 мл препарата (X), вычисляли по формуле:

$$X = N \times P,$$

где: N – среднеарифметическое значение числа колоний в чашках Петри; P – порядковый номер десятикратного разведения, в котором отмечается рост бактерий.

В процессе культивирования на качалочных колбах проводился анализ динамики потребления редуцирующих веществ (РВ) с исходной концентрацией 4 %. Метод определения редуцирующих веществ основан на восстанавливающей способности моноформ сахаров – глюкозы и фруктозы.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты по количеству исследуемых микробных культур, полученные в лабораторных условиях при культивировании на качалочных колбах, представлены на рисунке 1.

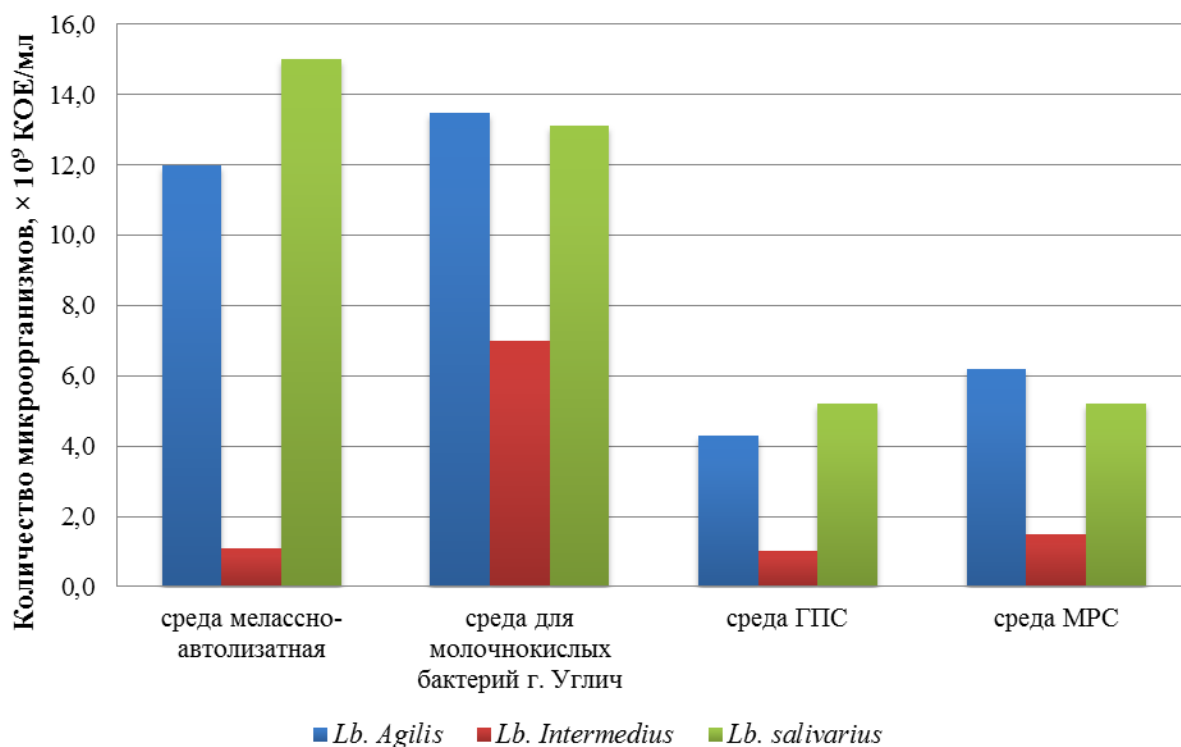


Рисунок 1 – Количество молочнокислых бактерий к 24 часам выращивания при периодическом культивировании

По результатам выращивания микробных культур на качалочных колбах выявлено активное потребление углеродного субстрата в используемых вариантах питательных сред, при этом установлено, что к 24 ч культивирования наблюдался максимум клеток в фазе экспоненциального роста и в дальнейшем отмечался переход в стационарную фазу.

В результате проведенного исследования наиболее эффективными оказались среда МАС (*Lb. agilis* – $2,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мл; *Lb. intermedius* – $1,1 \times 10^9$ КОЕ/мл; *Lb. salivarius* – $5,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мл) и среда для молочнокислых бактерий г. Углич (*Lb. agilis* – $3,5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл; *Lb. intermedius* – $7,0 \times 10^9$ КОЕ/мл; *Lb. salivarius* – $3,1 \times 10^{10}$ КОЕ/мл). При выращивании лактобактерий на среде ГПС были получены следующие результаты: *Lb. agilis* – $4,3 \times 10^9$ КОЕ/мл; *Lb. intermedius* – $1,0 \times 10^9$

КОЕ/мл; *Lb. salivarius* – $5,2 \times 10^9$ КОЕ/мл, а на МРС: *Lb. agilis* – $6,2 \times 10^9$ КОЕ/мл; *Lb. intermedius* – $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл; *Lb. salivarius* – $5,2 \times 10^9$ КОЕ/мл.

Также в процессе культивирования снимали динамику потребления редуцирующих веществ (РВ) на среде МАС, результаты которой представлены на рисунке 2.

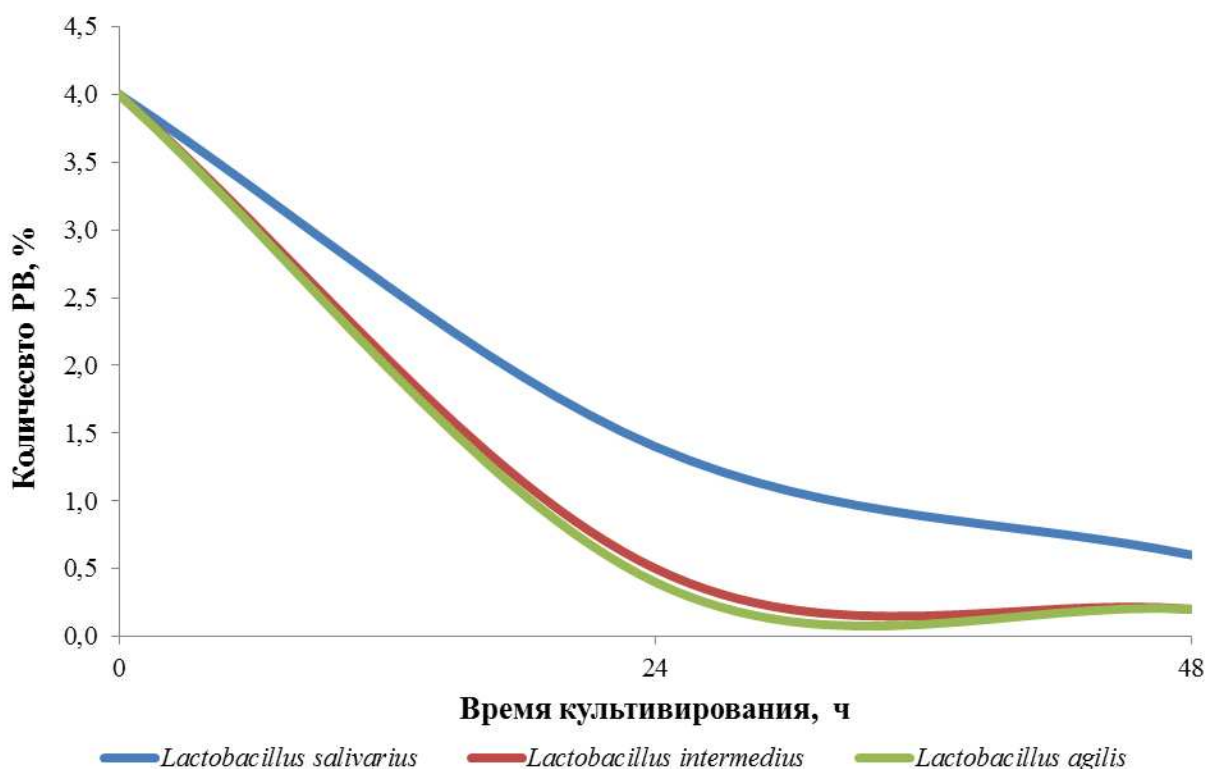


Рисунок 2 – Динамика потребления редуцирующих веществ культурами лактобактерий на МАС

По результатам контроля потребления углеродного субстрата исследуемых микроорганизмов можно сделать вывод о его истощении уже к 24 ч от начала культивирования лактобацилл.

Далее в эксперименте представлялось интересным определить оптимальную температуру культивирования испытуемых микроорганизмов с целью повышения биомассы клеток как можно в

наиболее короткие сроки выращивания. При этом следует отметить, что представленные выше результаты культивирования микроорганизмов получены при температуре выращивания 38 °С.

Затем в научно-исследовательской работе была заложена серия опытов по определению максимальной термотолерантности данных культур при выращивании на меласно-автолизатной среде в течение 48 ч. Результаты зависимости количества клеток молочнокислых бактерий от температуры представлены на рисунках 3 и 4.

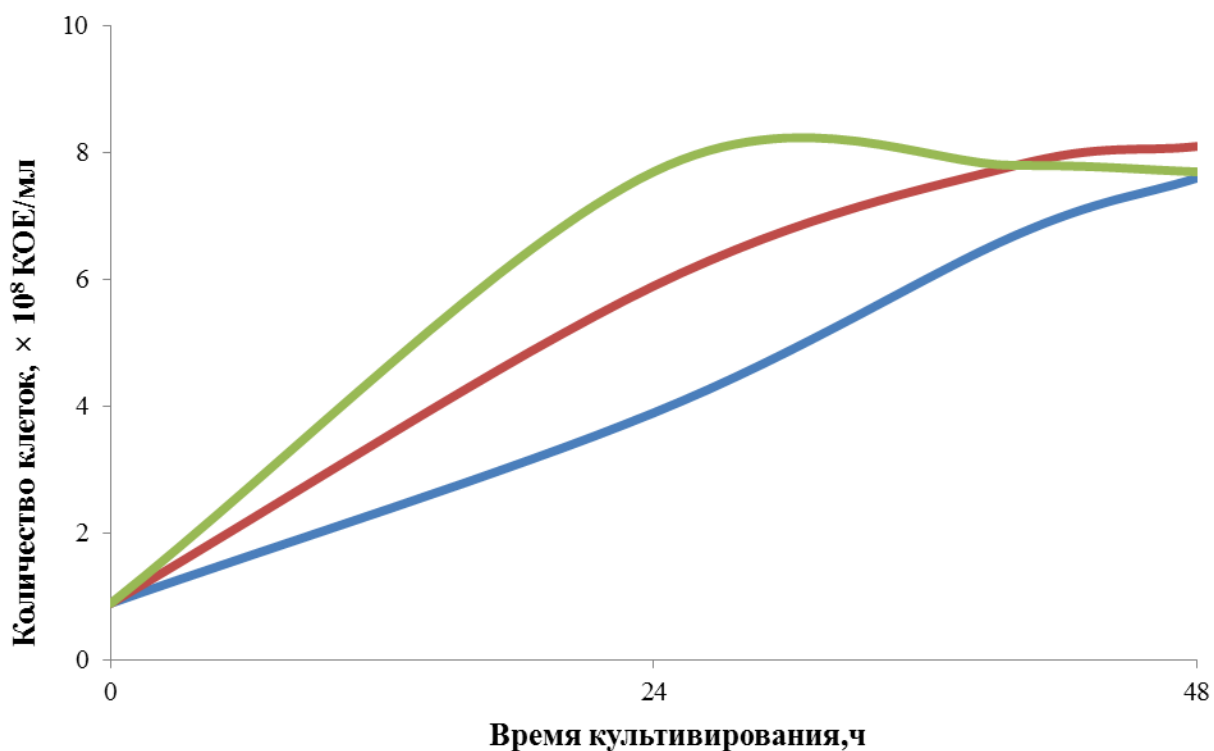


Рисунок 3 – Динамика изменения количества клеток молочнокислых бактерий при 39 °С.

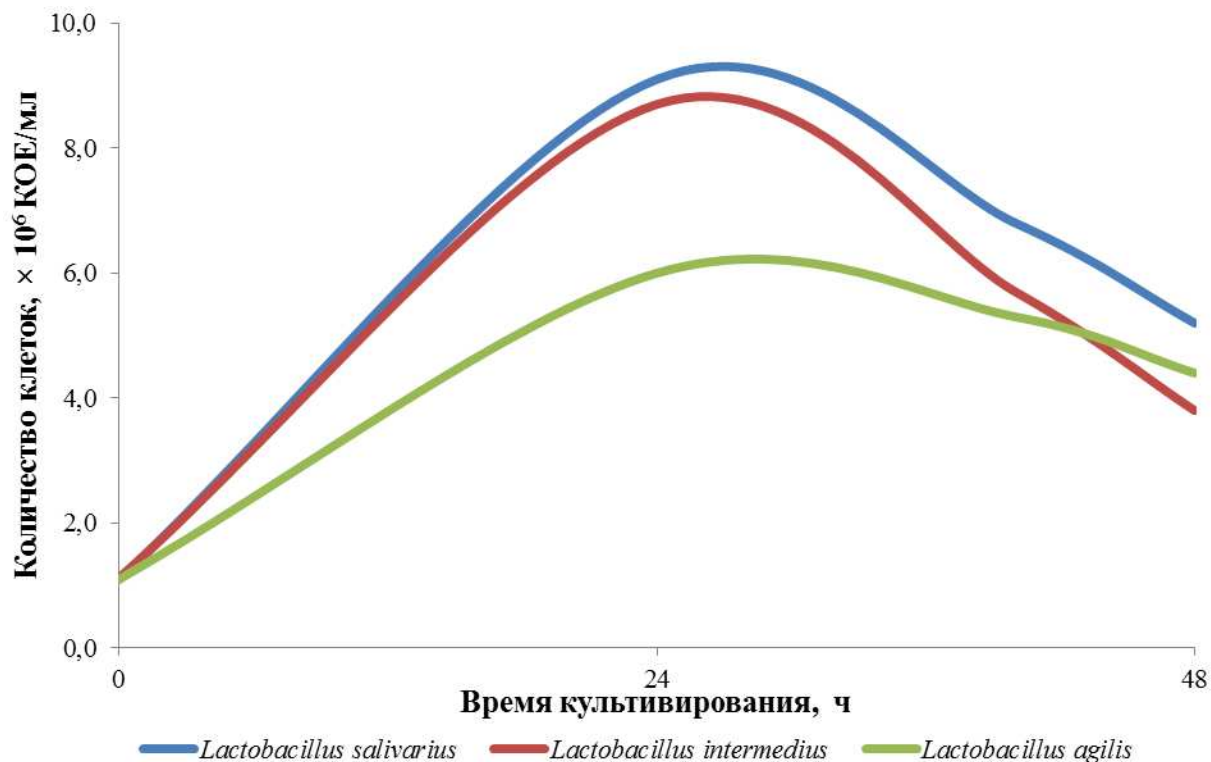


Рисунок 4 – Динамика изменения количества клеток молочнокислых бацилл при 40 °С:

Итог культивирования при 41 °С не представлен, так как при этой температуре ни одна культура не выявила роста относительно засевого титра. Однако после снижения температуры культивирования до 38° С рост восстановился в прежнем объеме, что свидетельствует о том что культура не отмерла, а перешла в фазу задержки роста, продолжавшуюся до снижения температуры на 2–3 °С.

На основании приведенных результатов культивирования на различных средах и при различных температурах установлено, что наибольший титр клеток достигался к 24 ч от начала выращивания независимо от состава сред. Более длительное выращивание и повышение температуры ведет к снижению титра и, как правило, увеличению количества нежизнеспособных клеток.

Отдельно во время культивирования проводили микроскопический контроль состояния клеток, изменение их морфологии и наличия посторонней микрофлоры.

Для микроскопического контроля использовали исследовательские микроскопы Carl Zeiss серии Axio Imager как в светлпольном, так и фазовоконтрастном режимах. Препараты фиксировали в фиксаторе Карнуа и окрашивали по Граму. Микроскопию осуществляли с масляной иммерсией с объективом 100× и окуляром 10× (рисунок 5–7).

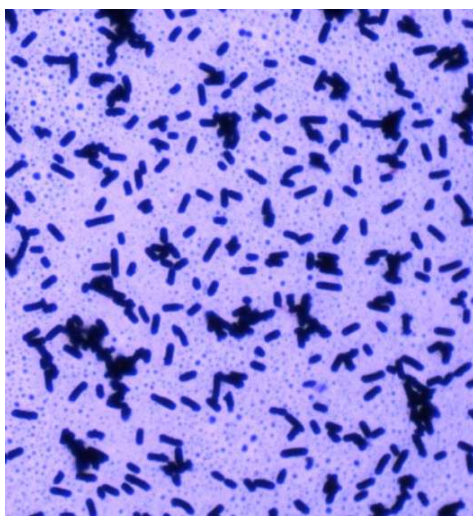


Рисунок 5 – *Lactobacillus salivarius*, 24 ч роста, окраска по Граму, 1200-кратное увеличение

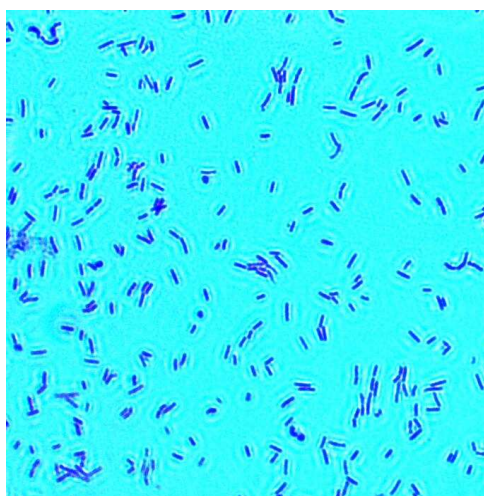


Рисунок 6 – *Lactobacillus agilis*, 24 ч роста, окраска по Граму, 1200-кратное увеличение

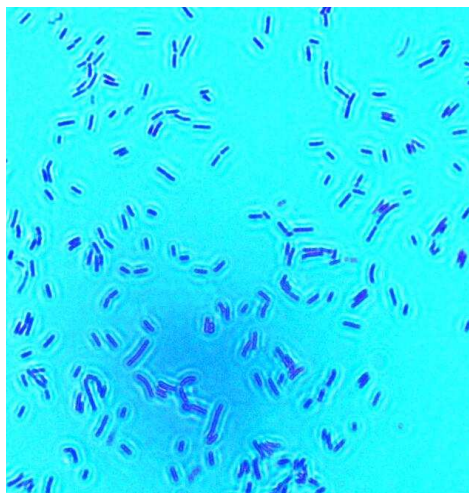


Рисунок 7 – *Lactobacillus intermedius*, 24 ч роста, окраска по Граму, 1200-кратное увеличение

Морфология клеток имеет постоянный размер практически у всех используемых культур – это короткие палочки от 3–4 мкм и толщиной до 0,5 мкм. Полиморфизм, присущий некоторым видам молочнокислых бактерий, отсутствует. По мере старения культуры все клетки имеют тенденцию к некоторому укорочению и измельчанию.

Вывод. Результаты проведенных исследований показали, что наиболее экономически выгодной питательной средой является меласно-автолизатная, при этом оптимум температурного и временного режимов составляют 38 °С и 24 ч, соответственно. Меласно-автолизатная среда может быть использована в производственных условиях при дальнейшей разработке биопрепаратов для птицеводства.

Список литературы

1. Автохтонная микрофлора дикой птицы – основа препаратов лечебно-профилактического действия для промышленной птицы / А. С. Родионова, Е. В. Ильницкая, В. В. Радченко, А. В. Лихоман, Ю. А. Лысенко, А. Г. Коцаев // XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Сборник тезисов. – М.: ФАНО России, 2016. – С. 151
2. Донник И. М. Состояние желудка и кишечника цыплят-бройлеров при использовании пробиотического препарата моноспорин / И.М.Донник, И.А.Лебедева // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 3. – С. 15–16.

3. Донник И. М. Сохранность и однородность стада цыплят при использовании моноспорина / И.М.Донник, И.А.Лебедева // Аграрный вестник Урала. – 2011. – № 7. – С. 27–28.

4. Идентификация штаммов автохтонной микрофлоры – основы биопрепаратов лечебно-профилактического действия / В. В. Радченко, Е. В. Ильницкая, А. С. Родионова, Т. М. Шуваева, Ю. А. Лысенко, Г. А. Плутахин, А. И. Манолов, И. М. Донник, А. Г. Кощаев // Биофармацевтический журнал. – 2016. Том . – 8, № 1. – С. 3–12

5. Кощаев А. Г. Пробиотик трилактобакт в кормлении перепелов / А. Г. Кощаев, О. В. Кощаева, С. А. Калюжный // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 95. – С. 633–647.

6. Метагеномное профилирование бактериозноза пищеварительного тракта различных линий перепелов / Е. Р. Кириллова, Т. В. Григорьева, М. Н. Синягина и др. // Материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященная 40-летию кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского университета. – Казань. – 2016. – С. 55–56.

7. Мигина Е. И. Изучение токсикологического и раздражающего действия пробиотической кормовой добавки Трилактосорб для использования в перепеловодстве / Е. И. Мигина, Ю. А. Лысенко, А. Г. Кощаев // Ветеринария Кубани. – 2014. – № 4. – С. 13–16.

8. Продуктивное действие пробиотика на молодняк кур-несушек / А. Чиков, С. Кононенко, Н. Пышманцева, Д. Осепчук // Комбикорма. – 2012. – № 2. – С. 96–97.

9. Семенов В. В. Способ улучшения конверсии корма / В. В. Семенов, С. И. Кононенко // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2012. – Т. 1. № 5. – С. 114–117.

10. Способы повышения продуктивности рационов при помощи кормовых добавок / Е. А. Максим, Н. А. Юрина, В. В. Ерохин, Н. Н. Есауленко, А. А. Келейников, С. И. Кононенко, А. А. Пышманцева, З. В. Псхациева, В. А. Бараников // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 47. – С. 109–112.

11. Хлорелла и триходерма в качестве функциональных кормовых добавок перепелам / А. Г. Кощаев, А. И. Петенко, Г. А. Плутахин, Н. Л. Мачнева, Г. В. Фисенко, И. В. Пятиконов // Аграрная наука. – 2012. – № 7. – С. 28–29.

12. Эффективность пробиотика при повышенном содержании клетчатки в рационе свиней / А. Чиков, С. Кононенко, Н. Омельченко, Н. Пышманцева, Д. Осепчук // Комбикорма. – 2012. – № 7. – С. 95–96.

13. Koshchayev A. G. Peculiarities of formation of the charolais cattle gene pool in the south of Russia / A. G. Koshchayev, I. V. Shchukina, O. V. Koshchayeva // Advances in agricultural and biological sciences. – 2016. – V. 2. – № 3. – P. 23–32.

14. Koshchayev A. G. Perspectives of use a polystrain feed probiotic in poultry / A. G. Koshchayev, Y. A. Lysenko, O. V. Koshchayeva // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2015. – V. 1. – № 2. – P. 44–52.

15. Kuzminova E. V. Influence of the carotenoid-based preparations on the metabolic and antioxidant protection of the cows' body / E. V. Kuzminova, M. P. Semenenko, A. G. Koshchayev // Advances in agricultural and biological sciences. – 2015. – V. 1. – № 3. – P. 33–40.

16. Selection optimum substratum for creating proteinenzyme feed additive based on the fungus of kind Trichoderma / Y. A. Lysenko, A. V. Luneva, A. G. Koshchayev, K. P. Fedorenko,

V. V. Petrova // *Advances in Agricultural and Biological Sciences*. – 2015. – V. 1. – № 1. – P. 3–10.

17. Semenenko M. P. Mechanisms of biological activity of bentonites and possibilities of their use in veterinary medicine / M. P. Semenenko, E. V. Kuzminova, A. G. Koshchaev // *Advances in Agricultural and Biological Sciences*. – 2015. – V. 1. – № 2. – P. 3–10.

18. Sharavev P. V. Chemical composition and incubatory qualities of eggs from laying hens of the hisex brown cross when using absorbent toxinon and probiotic batsell-m / P. V. Sharavev, O. P. Neverova, G. V. Zueva // *Advances in Agricultural and Biological Sciences*. – 2016. – V. 2. – № 4. – P. 21–30.

References

1. Avtohtonnaja mikroflora dikoj pticy – osnova preparatov lechebno-profilakticheskogo dejstvija dlja promyshlennoj pticy / A. S. Rodionova, E. V. Il'nickaja, V. V. Radchenko, A. V. Lihoman, Ju. A. Lysenko, A. G. Koshhaev // XXVIII zimnjaja molodezhnaja nauchnaja shkola «Perspektivnye napravlenija fiziko-himicheskoj biologii i biotehnologii». Sbornik tezisov. – M.: FANO Rossii, 2016. – S. 151

2. Donnik I. M. Sostojanie zheludka i kishechnika cypljat-brojlerov pri ispol'zovanii probioticheskogo preparata monosporin / I.M.Donnik, I.A.Lebedeva // *Veterinarija Kubani*. – 2011. – № 3. – S. 15–16.

3. Donnik I. M. Sohrannost' i odnorodnost' stada cypljat pri ispol'zovanii monosporina / I.M.Donnik, I.A.Lebedeva // *Agrarnyj vestnik Urala*. – 2011. – № 7. – S. 27–28.

4. Identifikacija shtammov avtohtonnoj mikroflory – osnovy biopreparatov lechebno-profilakticheskogo dejstvija / V. V. Radchenko, E. V. Il'nickaja, A. S. Rodionova, T. M. Shuvaeva, Ju. A. Lysenko, G. A. Plutahin, A. I. Manolov, I. M. Donnik, A. G. Koshhaev // *Biofarmaceuticheskij zhurnal*. – 2016. Tom . – 8, № 1. – S. 3–12

5. Koshhaev A. G. Probiotik trilaktobakt v kormlenii perepelov / A. G. Koshhaev, O. V. Koshhaeva, S. A. Kaljuzhnyj // *Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. – 2014. – № 95. – S. 633–647.

6. Metagenomnoe profilirovanie bakteriozenoza pishhevaritel'nogo trakta razlichnyh linij perepelov / E. R. Kirillova, T. V. Grigor'eva, M. N. Sinjagina i dr. // *Materialy vserossijskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem, posvjashhennaja 40-letiju kafedry genetiki Instituta fundamental'noj mediciny i biologii Kazanskogo universiteta*. – Kazan'. – 2016. – S. 55–56.

7. Migina E. I. Izuchenie toksikologicheskogo i razdrazhajushhego dejstvija probioticheskoy kormovoj dobavki Trilaktosorb dlja ispol'zovanija v perepelovodstve / E. I. Migina, Ju. A. Lysenko, A. G. Koshhaev // *Veterinarija Kubani*. – 2014. – № 4. – S. 13–16.

8. Produktivnoe dejstvie probiotika na molodnjak kur-nesushek / A. Chikov, S. Kononenko, N. Pyshmanceva, D. Osepchuk // *Kombikorma*. – 2012. – № 2. – S. 96–97.

9. Semenov V. V. Sposob uluchshenija konversii korma / V. V. Semenov, S. I. Kononenko // *Sbornik nauchnyh trudov Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta ovcevodstva i kozovodstva*. – 2012. – T. 1. № 5. – S. 114–117.

10. Sposoby povyshenija produktivnosti racionov pri pomoshhi kormovyh dobavok / E. A. Maksim, N. A. Jurina, V. V. Erohin, N. N. Esaulenko, A. A. Kelejnikov, S. I. Kononenko,

A. A. Pyshmanceva, Z. V. Pshacieva, V. A. Baranikov // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2014. – № 47. – S. 109–112.

11. Hlorella i trihoderma v kachestve funkcional'nyh kormovyh dobavok perepelam / A. G. Koshhaev, A. I. Petenko, G. A. Plutahin, N. L. Machneva, G. V. Fisenko, I. V. Pjatikonov // Agrarnaja nauka. – 2012. – № 7. – S. 28–29.

12. Jeffektivnost' probiotika pri povyshennom sodержanii kletchatki v racione svinej / A.Chikov, S.Kononenko, N.Omel'chenko, N.Pyshmanceva, D.Osepchuk // Kombikorma. – 2012. – № 7. – S. 95–96.

13. Koshchaev A. G. Peculiarities of formation of the charolais cattle gene pool in the south of Russia / A. G. Koshchaev, I. V. Shchukina, O. V. Koshchaeva // Advances in agricultural and biological sciences. – 2016. – V. 2. – № 3. – P. 23–32.

14. Koshchayev A. G. Perspectives of use a polystrain feed probiotic in poultry / A. G. Koshchayev, Y. A. Lysenko, O. V. Koshchayeva // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2015. – V. 1. – № 2. – P. 44–52.

15. Kuzminova E. V. Influence of the carotenoid-based preparations on the metabolic and antioxidant protection of the cows' body / E. V. Kuzminova, M. P. Semenenko, A. G. Koshchaev // Advances in agricultural and biological sciences. – 2015. – V. 1. – № 3. – P. 33–40.

16. Selection optimum substratum for creating proteinyzyme feed additive based on the fungus of kind Trichoderma / Y. A. Lysenko, A. V. Luneva, A. G. Koshchayev, K. P. Fedorenko, V. V. Petrova // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2015. – V. 1. – № 1. – P. 3–10.

17. Semenenko M. P. Mechanisms of biological activity of bentonites and possibilities of their use in veterinary medicine / M. P. Semenenko, E. V. Kuzminova, A. G. Koshchaev // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2015. – V. 1. – № 2. – P. 3–10.

18. Sharavev P. V. Chemical composition and incubatory qualities of eggs from laying hens of the hisex brown cross when using absorbent toxinon and probiotic batsell-m / P. V. Sharavev, O. P. Neverova, G. V. Zueva // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2016. – V. 2. – № 4. – P. 21–30.