ВИВЧЕННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА НЕШКІДЛИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ У ПТАХОГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ

О. В. Мачуський³, докторант

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15 м. Київ, 03041, Україна
dr.machuskyi@yahoo.com

Використання пробіотичних препаратів є досить поширеним у птахівництві, оскільки вони дозволяють зменшити використання протимікробних препаратів, покращують травлення птиці та підвищують конверсію корму.

Метою роботи було вивчення пробіотичних властивостей та нешкідливості лактобактерій, виділених в птахогосподарствах України. Для проведення дослідження зразки відбирали в птахогосподарствах України, в чотирьох областях. В кожному з господарств відбирали зразки посліду та змиви з поїлок. Всього було відібрано 40 зразків. Доставлені зразки досліджували в умовах Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. У виділених ізолятів досліджували морфологічні, культуральні, ферментативні властивості, каталазну активність, пробіотичні властивості (синтез органічних кислот, стійкість до жовчі, антагоністичні властивості та адгезивні властивості) і нешкідливість.

*У результаті дослідження відібраних зразків було виділено 56 ізолятів лактобактерій. Оскільки нас цікавили саме ізоляти з пробіотичними властивостями, було проведено дослідження ізолятів за показником «стійкість до жовчі». В результаті даного дослідження було визначено чотири ізоляти, що мали стійкість до 1 % жовчі в середовищі, дані мікроорганізми було вирішено досліджувати за рештою показників. За результатами визначення ферментативних властивостей було визначено, що ізолят 1 належить до *Lactobacillus acidophilus*, ізолят 2 – *Lactobacillus casei*, ізолят 3 – *Lactobacillus delbrueckii*, а ізолят 4 – *Lactobacillus rhamnosus*. Ізолят *Lactobacillus acidophilus* мав середню антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та високу – відносно *Escherichia coli*. Ізолят *Lactobacillus casei* мав середню протимікробну дію щодо *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*. Ізолят *Lactobacillus delbrueckii* володів високою антимікробною дією як щодо *Staphylococcus aureus*, так і відносно *Escherichia coli*. Ізолят *Lactobacillus rhamnosus* мав середню антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та високу – відносно *Escherichia coli*. Усі чотири досліджувані ізоляти мали середній показник адгезії.*

Ключові слова: ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, ІЗОЛЯТИ, ПОСЛІД, АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ.

³Науковий консультант – доктор вет. наук, професор, академік НААН Ушкалов В. О.

STUDY OF PROBIOTIC ACTIVITY AND SAFETY OF LACTOBACTERIA ISOLATED IN POULTRY FARMS OF UKRAINE

O. V. Machuskyy

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine
dr.machuskyy@yahoo.com

The use of probiotics is quite common in poultry, as they reduce the use of antimicrobials, improve poultry digestion and increase feed conversion.

The aim of the study was to study the probiotic properties and safety of lactobacilli isolated in poultry farms in Ukraine. For the study, samples were taken from poultry farms in Ukraine, in four regions. Samples of manure and washes from drinking troughs were taken from each of the farms. A total of 40 samples were taken. The delivered samples were examined in the conditions of the Ukrainian laboratory of quality and safety of agro-industrial complex products. Morphological, cultural, enzymatic properties, catalase activity, probiotic properties (synthesis of organic acids, resistance to bile, antagonistic properties and adhesive properties) and safety were investigated in the isolated microorganisms.

As a result of the study of the selected samples, 56 isolates of lactobacilli were isolated. Since we were interested in isolates with probiotic properties, a study of isolates on the indicator of "resistance to bile" was conducted. As a result of this study, four isolates were identified that were resistant to 1 % bile in the environment, these microorganisms were decided to study the rest of the indicators. According to the results of determining the enzymatic properties, it was determined that isolate 1 belongs to *Lactobacillus acidophilus*, isolate 2 - *Lactobacillus casei*, isolate 3 - *Lactobacillus delbrueckii*, and isolate 4 - *Lactobacillus rhamnosus*. The isolate of *Lactobacillus acidophilus* had a medium antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and a high one against *Escherichia coli*. *Lactobacillus casei* isolate had moderate antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Lactobacillus delbrueckii* isolate had high antimicrobial activity against both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The isolate of *Lactobacillus rhamnosus* had a medium antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and a high one against *Escherichia coli*. All four studied isolates had an average adhesion index.

Keywords: PROBIOTIC PROPERTIES, ISOLATES, LITTER, ANTAGONISTIC PROPERTIES.

Активне застосування препаратів пробіотичного ряду, з метою відновлення якісного та кількісного складу мікробіоценозу кишечника дає підґрунтя по праву називати XXI століття ерою пробіотиків.

Пробіотики складаються з живих мікроорганізмів та речовин мікробного походження, які при пероральному застосуванні надають бактеріотерапевтичну та бактеріопротективну дію. Позитивний ефект пробіотиків на фізіологічні та імунні реакції організму дозволяє широко використовувати їх в якості корисного функціонального харчування та з лікувально-протективною метою (Skrypnyk, 2013).

Baryshnikova N. та Belousova L. відмічають, що використання пробіотиків в доповненні до антибіотикотерапії підвищує безпечність лікування, а також ефективність лікування за рахунок імуномодулюючої дії (Baryshnikova & Belousova, 2012).

Молочнокислі бактерії містяться в природній флорі продуктів, таких як молоко, м'ясо, фрукти і овочі і використовуються як культура у виробництві ферментованих продуктів. Ці бактерії також містяться в мікробіоті кишечника, ротової порожнини, шкіри, сечовидільної системи людини і тварин та може мати сприятливий вплив на ці екосистеми (Demir et al., 2019).

Як зазначає дослідник Holub В. наразі абсолютна більшість пробіотиків належить до майже 10 родів еубактерій та дріжджів. За підтвердженою безпечністю для людини їх можна поділити на три групи – непатогенні (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*), умовно-патогенні (*Enterococcus* та деякі представники *Lactobacillus*), патогенні (*Bacillus cereus*). Бактерії, які застосовуються у виробництві харчових продуктів у вигляді чистих культур, потребують обов'язкового підтвердження своєї безпечності (Holub, 2015).

Найчастіше з метою лікування та профілактики порушень мікробіоценозу використовують пробіотичні препарати на основі *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, які відповідають усім критеріям пробіотичних штамів. (Skrypnik, 2013). Demir E. et al. зазначає, що до цього переліку ще відноситься *Saccharomyces boulardii* (Demir et al., 2019).

Також особливій уваги заслуговують пробіотичні препарати на основі спороутворюючих бактерій. Як зазначає дослідник Skrypnik I.N., бактерії роду *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* пригнічують умовнопатогенну та патогенну флору кишечника, навіть більшою мірою, ніж класичні пробіотики на основі лактобацил та біфідобактерій (Skrypnik, 2013).

Так, *Bacillus cereus* є важливою причиною харчових інфекційних захворювань та харчових отруєнь і водночас *B. cereus* також використовується як пробіотик в медицині та ветеринарії. (Zhu et al., 2016).

Обережність у застосуванні таких пробіотиків зумовлена, насамперед, їх спорідненістю з патогенними та токсигенними видами (*Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *C.botulinum*) і, по-друге, їх чужорідністю до нормальної мікрофлори кишечника.

Таким чином, пробіотики на основі бактерій роду *Bacillus* за рахунок синтезу біологічно активних речовин надають пряму (впливають на патогенну та умовнопатогенну мікрофлору) та опосередковану (шляхом активації імунної відповіді; продукції різних ферментів, амінокислот, що сприяють нормалізації процесів травлення; виділення антибіотикоподібних речовин – діпіколінової кислоти) дії. (Skrypnik, 2013).

Кількість досліджень і публікацій, присвячених питанням використання пробіотиків, регулярно зростає.

Проте, на жаль, пробіотичний препарат не гарантує безпечний та 100 % позитивний результат. Так, в результатах досліджень 15 пробіотичних препаратів з Китаю вчені Zhu K. et al. вказують, що деякі препарати містили незазначені види бактерій, один препарат взагалі не містив життєздатного *B. cereus*. (Zhu et al., 2016).

За даними Kajbysheva V.O. & Nikonov E.L. при аналізі пробіотичних продуктів у Канаді виявилось, що більше 40% з них містили мікроорганізми, які не були вказані в описах, в Італії – 17 % пробіотиків містили нежиттєздатні бактерії, а 8 % контаміновані *Enterococcus faecium*. До того ж, необхідно знати інформацію не лише про вид мікроорганізму, а й його штам. Гарним прикладом є вид бактерій *Escherichia coli* (*E. coli*). Так, інфікування штамом *E. coli* 0157:H може мати негативні наслідки для здоров'я, в той час як *E. coli* Nissle 1917 володіє виразною пробіотичною активністю. (Kajbysheva & Nikonov, 2019)

Також побічну дію пробіотиків описують вчені Typlynska K.V. et al., зазначаючи, що негативний вплив таких препаратів спостерігається дедалі частіше. Все більше пробіотичних штамів ізолюють під час розвитку різного роду інфекційних уражень, зокрема, було виділено бактерії роду *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*. Автори зазначають, що наразі рід *Lactobacillus* все частіше класифікують як умовно-патогенні мікроорганізми для імунокомпетентних та імунодефіцитних пацієнтів. Було визнано високий рівень вірулентності для ентерококів та *Lactobacillus rhamnosus*. Ризик інфекції іншими молочнокислими бактеріями низький. Однак через широкий спектр потенційно вірулентних мікроорганізмів, відбір промислових штамів має проводитись надзвичайно ретельно. (Typlynska et al., 2012). Безпека кожного нового штаму пробіотика повинна бути показана в

дослідженнях, вивчаючи їх антибіотикорезистентність, токсичність, гемолітичну та метаболічну активність. (Kajbysheva & Nikonov, 2019). Для цього проводяться молекулярні методи ідентифікації молочнокислих бактерій для можливості використання їх в пробіотику. (Demir et al., 2019).

Вчені Vankerckhoven V. et. al. зазначають, що для ідентифікації молочнокислих бактерій, які призначені для використання пробіотиків, має бути чітко визначена таксономія, вивчена стійкість до антибіотиків, а також оцінка вірулентності *in vitro* та оцінка безпеки *in vivo*. Для цього рекомендовано використовувати звичайні біохімічні методи з доповненими молекулярними. (Vankerckhoven et. al., 2008).

Цікавим є напрямок біоінженерних пробіотиків, які представляють наступне покоління цільних клітин - опосередкована біотерапевтика. Досягнення синтетичної біології, геномної інженерії, секвенування та синтезу ДНК дали змогу вченим розробити пробіотики з підвищеною стійкістю до стресу та здатністю націлюватись на специфічні патогени і пов'язані з ними токсини, а також для опосередкування «цільової доставки» вакцин, ліків та імунomodulatorів безпосередньо до клітин. (Sola-Oladokun et al., 2017).

Метою роботи було вивчення пробіотичних властивостей та нешкідливості лактобактерій, виділених у птахогосподарствах України.

Матеріали і методи. Для проведення дослідження зразки відбирали в птахогосподарствах України, в чотирьох областях (табл. 1). Обрані птахогосподарства були різної форми власності та різного напрямлення, при цьому в Київській області зразки було відібрано в трьох господарствах, в Одеській – у двох, в Херсонській – у двох, в Черкаській – в трьох господарствах. В кожному з господарств відбирали зразки посліду та змиви з поїлок. Всього було відібрано 40 зразків.

Таблиця 1

Місця відбору та кількість зразків

Області	Кількість господарств	Місце відбору зразків		Кількість відібраних зразків, всього
		Послід	Змиви з поїлок	
Київська	3	2	2	12
Одеська	2	2	2	8
Херсонська	2	2	2	8
Черкаська	3	2	2	12

Зібрані зразки транспортували в термоконтейнері із холоддовими елементами. Доставлені зразки досліджували в умовах Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. У виділених ізолятах досліджували морфологічні, культуральні, ферментативні властивості та каталазну активність. Також досліджували пробіотичні властивості (синтез органічних кислот, стійкість до жовчі, антагоністичні властивості та адгезивні властивості) і нешкідливість.

Для виділення лактобактерій використовували готові стандартизовані середовища Рогоза (бульйон та агар). Морфологічні властивості вивчали в мазках, виготовлених із 18-22 годинної бульйонної чи агарової культур, зафарбованих за Грамом. Ферментативні властивості виділених ізолятів вивчали шляхом їх культивування в рідкому індикаторному середовищі з додаванням наступних цукрів: арабінози, целобіози, галактози, лактози, ксилози, мальтози, маніту, маннози, мелізітози, мелібіози, раффінози, рібози, саліцину, сахарози та сорбіту. Культивування проводили за температури 37 °С протягом 18-24 годин. Облік результатів ферментації проводили візуально за системою чотирьох хрестів. Каталазну активність вивчали за загальноприйнятою методикою з перекисом водню. Синтез органічних кислот визначали культивуючи ізоляти за температури 37 °С протягом 18-24 годин на агарі з додаванням карбонату кальцію. Стійкість до жовчі вивчали шляхом культивування в рідкому поживному середовищі з додаванням 0,3 %, 0,5 % та 1 % нативної профільтрованої жовчі.

Інгібіцію росту визначали через 18-22 годин інкубації, фотоколориметричним методом при довжині хвилі 560 нм. Антагоністичні властивості вивчали відповідно до ДСТУ ISO 13969:2005 з культурами *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* із музею Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Адгезивні властивості досліджували за методикою Брилса з еритроцитами півня. Нешкідливість визначали відповідно до ГСТУ 46.024-2002 «Препарати ветеринарні. Методи визначення нешкідливості», при цьому дослідження проводили на білих мишах, масою 19-21 грам кожна. Перед проведенням дослідження тварин утримували на карантині протягом 10 діб на збалансованому раціоні з дотриманням мікрокліматичних вимог. Перед початком досліду тварин поділили на 4 дослідні і одну контрольну групу за принципом аналогів. Тваринам дослідних груп вводили *per os* по 0,5 см³ добової бульйонної культури відповідного ізоляту, тваринам контрольної групи вводили стерильну дистильовану воду тим же методом і в тих же об'ємах. Облік результатів проводили через 48 годин. Дане дослідження проводили згідно з етичними принципами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.).

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за загально прийнятими методиками.

Результати й обговорення. В результаті дослідження відібраних зразків було виділено 56 ізолятів лактобактерій відповідно до таблиці 2.

Таблиця 2

Виділені ізоляти лактобактерій

Області	Кількість ізолятів		Кількість виділених ізолятів, всього
	Послід	Змиви з поїлок	
Київська	11	5	16
Одеська	7	4	11
Херсонська	12	6	18
Черкаська	6	5	11
Всього			56

Усі виділені мікроорганізми були каталазонегативними, фарбувалися грампозитивно, мали паличкоподібний вигляд, середні розміри та розміщувалися в мазках поодинокі, попарно та короткими ланцюжками. На агаризованому середовищі Рогози після 18-24 годин культивування, ізоляти мали вигляд маленьких, гладеньких біло-сірих колоній S-форми.

Враховуючи велику кількість виділених ізолятів та той факт, що нас цікавили саме ізоляти з пробіотичними властивостями, було прийнято рішення провести дослідження ізолятів за показником «стійкість до жовчі». Зведені результати даного дослідження наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Кількість ізолятів, стійких до різних концентрацій жовчі

Показник	Не стійкі до жовчі	Стійкі до 0,3 % жовчі	Стійкі до 0,5 % жовчі	Стійкі до 1 % жовчі
Кількість ізолятів	20	32	0	4

Таким чином, в результаті цього дослідження було визначено чотири ізоляти, що мали стійкість до 1 % жовчі в середовищі, дані мікроорганізми було вирішено досліджувати за рештою показників. На агаризованому середовищі з додаванням карбонату кальцію усі чотири ізоляти викликали просвітління середовища навколо колоній, отже всі вони продукували органічні кислоти.

Наступним етапом було визначення ферментативних властивостей ізолятів та їх типізація. Результати даного дослідження наведено в таблиці 4.

Таблиця 4

Результати вивчення ферментативних властивостей

Цукри	Ізолят 1	Ізолят 2	Ізолят 3	Ізолят 4
Арабіноза	-	-	-	++
Целобіоза	++++	++++	-	++++
Галактоза	++++	-	-	-
Лактоза	++++	-	-	-
Ксилоза	-	-	-	-
Мальтоза	++++	-	++	-
Маніт	-	++++	-	++++
Манноза	++++	-	++++	-
Мелітітоза	-	++++	-	++++
Мелібіоза	++	-	-	-
Раффіноза	++	-	-	-
Рібоза	-	++++	-	++++
Саліцин	++++	-	-	-
Сахароза	++++	++++	++++	++++
Сорбіт	-	++++	-	++++
Трегалоза	++	-	++	-
Ескулін	-	++++	-	++++

За результатами даного дослідження встановлено, що ізолят 1 ферментував з утворенням кислоти без газу: целобіозу, галактозу, лактозу, мальтозу, маннозу, саліцин та сахарозу. Слабко ферментував: мелібіозу, раффінозу та трегалозу. Не ферментував: арабінозу, ксилозу, маніт, мелітітозу, рібозу, сорбіт та ескулін.

Ізолят 2 ферментував з утворенням кислоти без газу: целобіозу, маніт, мелітітозу, рібозу, сахарозу, сорбіт та ескулін. Не ферментував: арабінозу, галактозу, лактозу, ксилозу, мальтозу, маніт, мелібіозу, раффінозу, саліцин та трегалозу.

Ізолят 3 ферментував з утворенням кислоти без газу: маннозу та сахарозу, слабко ферментував – мальтозу та трегалозу. Не ферментував: арабінозу, целобіозу, галактозу, лактозу, ксилозу, маніт, мелітітозу, мелібіозу, раффінозу, рібозу, саліцин, сорбіт та ескулін.

Ізолят 4 ферментував з утворенням кислоти без газу: целобіозу, маніт, мелітітозу, рібозу, сахарозу, сорбіт та ескулін. Слабко ферментував арабінозу та не ферментував галактозу, лактозу, ксилозу, мальтозу, маннозу, мелібіозу, раффінозу, саліцин та трегалозу.

На основі отриманих даних, за допомогою визначника бактерій Берджі, було визначено, що ізолят 1 належить до *Lactobacillus acidophilus*, ізолят 2 – *Lactobacillus casei*, ізолят 3 – *Lactobacillus delbrueckii*, а ізолят 4 – *Lactobacillus rhamnosus*.

У подальшому було вивчено антагоністичні та адгезивні властивості цих ізолятів. Результати дослідження антагоністичних властивостей наведено в таблиці 5.

Таблиця 5

Результати вивчення антагоністичних властивостей виділених ізолятів

Ізоляти	Зона затримки росту, мм <i>Staphylococcus aureus</i>	Зона затримки росту, мм <i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	14	20
<i>Lactobacillus casei</i>	10	13
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	16	22
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12	16

Аналітичні дані таблиці 5 вказують, що ізолят *Lactobacillus acidophilus* має середню антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та високу – відносно *Escherichia coli*. Ізолят

Lactobacillus casei має середню протимікробну дію щодо *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*. Ізолят *Lactobacillus delbrueckii* володіє високою антимікробною дією як щодо *Staphylococcus aureus*, так і відносно *Escherichia coli*. А ізолят *Lactobacillus rhamnosus* має середню антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та високу – відносно *Escherichia coli*.

Також необхідно зазначити, що усі чотири досліджувані ізоляти мали середні адгезивні властивості, а саме: середній показник адгезії *Lactobacillus acidophilus* склав 3,8; *Lactobacillus casei* – 3,2; *Lactobacillus delbrueckii* – 3,9; а *Lactobacillus rhamnosus* – 3,0.

Результати вивчення нешкідливості виділених ізолятів наведено в таблиці 6.

Таблиця 6

Результати визначення нешкідливості на білих мишах

Група	1	2	3	4	Контроль
Ізолят	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
Відсоток тварин, що вижили	100	100	100	100	100

Як бачимо, тварини у всіх дослідних та контрольній групах залишилися живими, що свідчить про нешкідливість ізолятів.

Таким чином, в результаті проведених досліджень виділено 56 ізолятів лактобактерій з посліду та змивів з поїлок в птахогосподарствах України. Серед 56 ізолятів чотири виявилися стійкими до 1 % жовчі тварин. Проведено серію дослідів, за результатами яких здійснено типізацію стійких до жовчі ізолятів, це були: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* та *Lactobacillus rhamnosus*.

ВИСНОВКИ

1. Виділено 56 ізолятів лактобактерій з посліду та змивів з поїлок у птахогосподарствах України, серед яких 4 були стійкими до жовчі.

2. Типізовано стійкі до жовчі ізоляти, це *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* та *Lactobacillus rhamnosus*.

3. Встановлено, що ізолят *Lactobacillus acidophilus* мав середню антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та високу – відносно *Escherichia coli*. Ізолят *Lactobacillus casei* мав середню протимікробну дію щодо *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*. Ізолят *Lactobacillus delbrueckii* володів високою антимікробною дією як щодо *Staphylococcus aureus*, так і відносно *Escherichia coli*. А ізолят *Lactobacillus rhamnosus* мав середню антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та високу – відносно *Escherichia coli*.

Перспективи досліджень. Перспективним є подальше вивчення виділених мікроорганізмів, а саме вивчення факторів патогенності. З подальшим депонуванням у національних депозитаріях України.

References

Baryshnikova, N. & Belousova, L. (2012). Antibiotiki i probiotiki: obespechenie jeffektivnosti i bezopasnosti. Vrach. 1:26-8. [in Russian].

Demir E., Kılıç, G.B., Özbalcı, D. (2019). Biosafety Assessment of Probiotics “Probiotics”. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 7(4):639-45.

Holub, B. (2015). Vyvchennia mikrobiolohichnoi bezpechnosti probiotyktiv. *Tovary i rynky*. 2. 132-39. [In Ukrainian].

Kajbysheva, V.O. & Nikonov, E.L. (2019). Probiotiki s pozicii dokazatel'noj medicyny. *Dokazatel'naja gastrojenterologija*. 8(3):45-54.

Available from: <https://doi.org/10.17116/dokgastro2019803145>. [in Russian].

Pro zatverdzhennia HSTU 46.024-2002 «Preparaty veterynarni. Metody vyznachennia neshkidlyvosti»: nakaz Ministerstva ahrarynoi polityky Ukrainy vid 05.12.2002 r. № 371. Available from: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0371555-02#Text> . [In Ukrainian].

Skrypnik, I.N. (2013). Jeffektivnost i bezopasnost sovremennyh sporoobrazujushhih probiotikov pri lechenii narushenij mikrobiocenoza kishchnika. *Medichna gazeta «Zdorovja Ukraïni»*. 2013, listopad; 22(323):28-30. [In Russian].

Sola-Oladokun, B., Culligan, E.P., Sleator, R.D. (2017). Engineered Probiotics: Applications and Biological Containment. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 8:16.1–16.18.

Typlinska, K.V., Oriabinska, L.B., Horchakov, V.Iu., Duhan, O.M. (2012). Pobichna diia probiotyktiv. *Problemy ekolohichnoi ta medychnoi henetyky i klinichnoi imunolohii*. 3:319-28. [In Ukrainian].

Vankerckhoven, V., Huysb, G., Vancanneytc, M., Vaela, C., Klared, I., Romonde, M.-B., et al. (2008). Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science & Technology*. 19:102-14.

Zhu K., Hölzel C.S., Cui Y., Mayer R., Wang Y., Dietrich R., et al. (2016). Probiotic *Bacillus cereus* strains, a potential risk for public health in China. *Frontiers in microbiology*. 7:718-27.