

УДК 579.62: 57.063.8

АКИМЕНКО Л.І., канд. біол. наук, e-mail: larisa_akimenko@mail.ru

ГОЛОВКО А.М., академік НААН, e-mail: anatolii_golovko@mail.ru

ПАРАФІЙНИК Т.В.*, e-mail: tatyana23-08@rambler.ru

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

СИСТЕМА СТАНДАРТНИХ ОПЕРАЦІЙНИХ ПРОЦЕДУР ДЛЯ ПОЧАТКОВИХ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ З ПРОБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

На основі результатів узагальнення міжнародних критеріїв оцінки та методів ідентифікації пробіотичних штамів мікроорганізмів, що застосовують при розробці пробіотиків та кормових добавок, створено систему стандартних операційних процедур для початкових етапів виділення та ідентифікації штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями у відповідності до нормативних документів ЄС та стандартів зарубіжних країн.. Система стандартних операційних процедур (СОП) виділення та ідентифікації штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями дозволить отримати конкурентноспроможний інноваційний продукт та провести його аналіз на різних етапах дослідження, зберігання та контролювання якості.

***Ключові слова:** нормативно - правова база ЄС, пробіотики, стандартизація, штами мікроорганізмів.*

Вступ. У системі контролю якості продуктів харчування за принципом «від лану до столу» здоров'я тварин займає провідне місце [1, 2]. Нові підходи щодо оцінки якості продуктів тваринництва [3, 4] вимагають і нових рішень щодо засобів профілактики і захисту здоров'я тварин [5-7]. Серед дозволених для застосування ветеринарних препаратів, як у традиційному, так і в органічному тваринництві є пробіотичні препарати [8, 9]. Що стосується визначення пробіотиків, то фармацевтична енциклопедія дає формулювання: «Пробіотики (лат. *pro* – для, замість, на захист + грец. *bios* – життя) – лікарські препарати та продукти, які містять живі клітини непатогенних мікроорганізмів і використовуються для відновлення нормальної мікрофлори». Позитивний вплив пробіотичних препаратів на живий організм підтверджується великою кількістю наукових досліджень [10–12] і тому все більшого поширення набувають кормові добавки в складі яких є корисні мікроорганізми. Пробіотики, нормалізуючи мікрофлору кишківника тварин і птиці, пригнічують розвиток патогенної мікрофлори та гнилісних бактерій, стимулюють природну резистентність тварин. Продукти життєдіяльності мікроорганізмів сприятливо впливають на секреторну діяльність шлунково-кишкового каналу, збуджують апетит, стимулюють ріст і розвиток та підвищують збереженість поголів'я тварин і птиці.

В нашій країні традиційно склалося ділення препаратів, що містять живі

* Аспірант

бактерії, на лікарські препарати та харчові добавки. В Законі України «Про ветеринарну медицину» є визначення кормових добавок, де вказуються мікроорганізми, які цілеспрямовано додаються до корму чи води з метою поліпшення характеристик кормів або продуктів тваринного походження, підвищення продуктивності або благополуччя тварин шляхом впливу на їх шлункову та кишкову флору або засвоюваність корму, що стосується ветеринарних імунобіологічних засобів то у визначенні закону - це засоби, отримані з використанням біологічних агентів за допомогою біотехнології, терапевтична та/або діагностична дія яких спрямована на корекцію (стимуляцію, модуляцію) імунної системи [13]. Що стосується Закону «Про виробництво та обіг органічної сільськогосподарської продукції та сировини», то він визначає, що кормові добавки, які використовуються в раціоні тварин, згадані у Статті 22(4) підлягають затвердженню згідно з Регламенту (ЄС) № 1831/2003 [14].

Регламент (ЄС) 1831/2003 «Добавки в годівлі тварин» Європейського Парламенту та Ради ЄС від 22 вересня 2003 року з питань кормових добавок для використання в годівлі тварин у категорії «зоотехнічні добавки» дає визначення «стабілізатори кишкової флори: мікроорганізми або інші отримані хімічним способом речовини, які після згодовування тваринам позитивно впливають на кишкову флору»[15].

Нормативна база щодо ідентифікації, характеристики мікроорганізмів і визначення пробіотичного ефекту має свою історію. Однією з основних вимог, що сформульовані в документах ЄС (Директиви 70/524/ЕЕС, 87/153/ЕЕС, 94/40/ЕС, 95/11/ЕС) є вимога щодо депонування референтних матеріалів (мікробіологічних штамів, що використовують в складі кормових добавок) в колекціях у відповідності до Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів з метою патентної процедури для забезпечення стабільності властивостей штамів мікроорганізмів на період їхнього промислового використання [16]. Реєстрація ветеринарних препаратів в Україні проходить у відповідності до вимог «Переліку матеріалів реєстраційного досьє та порядку його формування», що затверджений наказом Державного комітету ветеринарної медицини України № 133 від 14.07.2008 та зареєстрований в Міністерстві юстиції України 7 серпня 2008 р. за № 727/15418 і однією з вимог у відповідності до Закону «Про ветеринарну медицину», розділу Х, ст. 63. п.11. є визначення, що при реєстрації вітчизняного ветеринарного імунобіологічного засобу заявник повинен депонувати штами (культури) мікроорганізмів, які використовуються для виробництва та контролю такого імунобіологічного засобу, в Національному центрі штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) [17].

Мета роботи. У відповідності до вимог міжнародних нормативних документів розробити систему стандартних операційних процедур для початкових етапів виділення та ідентифікації штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження характеристик штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями за показниками, визначеними паспортом на штам мікроорганізмів проводили з використанням методів гармонізованих з вимогами ЄС: для визначення особливостей росту мікроорганізмів з пробіотичними властивостями за культурально-морфологічними характеристиками робили висіви глибинним чи поверхневим методом згідно з ГОСТ 26670, ДСТУ ISO 7218 та ГОСТ 10444.11 [18–20]. Морфологію колоній визначають візуальним методом згідно з ДСТУ ISO 7218 [21]. Фізіолого-біохімічні особливості штаму вивчали у відповідності до міжнародних норм (ГОСТ 10444-11, ГОСТ 26670, ГОСТ 28566, ДСТУ ISO 7932, ДСТУ ISO 7889, ДСТУ ISO 9232, ДСТУ ISO 7954 [18, 21–25]. Нешкідливість штаму мікроорганізмів досліджували згідно з ГСТУ 46.024-2002 [26].

Результати досліджень та їх обговорення. Виділені від певних видів тварин штами мікроорганізмів з пробіотичними властивостями мають видоспецифічні особливості та переваги щодо ефективності препаратів, розроблених на їхній основі, при застосуванні для виду тварин від яких були виділені [27, 28]. Тому, особливості видового складу корисної мікрофлори певних видів тварин повинні бути враховані на етапі виділення культур мікроорганізмів. Ідентифікація і паспортизація виділених культур мікроорганізмів з пробіотичними культурами проводиться вітчизняними науковцями з використанням великої кількості традиційних та сучасних підходів, методів і методик. У відповідності до вимог Інструкції про порядок депонування в Україні штамів мікроорганізмів культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні, генетичні характеристики штаму мікроорганізмів повинні відповідати чіткій системі подачі результатів дослідження, що гарантують правильність таксономічного визначення мікроорганізму, його активності та безпечності [29]. В основу роботи експерта, який досліджує властивості штамів мікроорганізмів покладено умову конфіденційності і нерозголошення отриманих результатів. Тому для прикладу взято перелік показників, за якими досліджували штами мікроорганізмів *Lactobacillus acidophilus A* та *Lactobacillus acidophilus B*.

Характеристика штаму мікроорганізмів *Lactobacillus acidophilus A*, що має довгу історію використання включає показники морфології колоній, клітин, визначення рухливості мікроорганізмів, тинкторіальні властивості. Фізіолого-біохімічні характеристики включають показник цукролітичних властивостей, стійкості до фенолу. Щодо генетичних особливостей вказано стійкість штаму до двох антибіотиків. Досліджено, що штам непатогенний для тварин і людини. Визначено показник активності кислотоутворення.

На сучасному етапі дослідження нових виділених штамів роду *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus B*) паспортні характеристики включають визначення морфології колоній, морфології клітин, рухливості клітин, здатності рости за різних температур, каталазної активності, амілазної активності, нітратредуктазної активності, казеїназної активності, желатиназної активності,

здатності утворювати індол та сірководень, зброджувати вуглеводи, утворювати газ з глюкози, кількості кислоти, що утворюється в рідкому середовищі, особливості росту мікроорганізмів на молоці з лакмусом, здатності викликати зсідання молока та рости на середовищі з вмістом натрію хлориду від 2,4 до 6,5 %, антагоністичну активність, нешкідливість для тварин. В обох наведених прикладах відсутні показники поглибленого наукового опису штамів мікроорганізмів: показники генетичної стабільності виробничого штаму, відсутність здатності синтезувати токсичні метаболіти та антибіотики, відсутність генів антибіотикорезистентності.

На сучасному етапі міжнародні вимоги галузі розробки і реєстрації нових пробіотичних препаратів, що сформульовані у директиві 1831/2003 знайшли своє трактування в Регламенті Комісії (ЄС) № 429/2008 від 25 квітня 2008 року про детальні правила застосування Регламенту (ЄС) № 1831/2003 Європейського парламенту та ради з підготовки і представлення заявок, а також проведення оцінки та видачі дозволів щодо кормових добавок [30]. В основу покладено вимоги щодо роботи з мікроорганізмами з дотриманням правил GLP, вимог стандартів ISO та EN/ISO 17025 [31–32]. Як результат проведеної роботи повинно бути надане свідоцтво про депонування штаму мікроорганізму і номер депозиту. Крім того, колекція повинна гарантувати відповідність морфологічних, фізіологічних та генетичних характеристик паспортним даним. Колекція використовує запропоновані депозитором методи контролю стабільності виробничого штаму протягом значного періоду зберігання.

Розробка структури системи стандартних операційних процедур (СОП) з урахуванням вимог ДСТУ EN/ISO 17025 дозволять отримати результати дослідження властивостей штамів мікроорганізмів і провести їхній аналіз на різних етапах дослідження та зберігання. Структура СОП відповідає вимогам розділу 4.3-02. «Вимоги до змісту процедури» стандарту де визначено, що процедура повинна складатися з розділів: мета; галузь застосування; нормативні посилання; терміни та визначення; скорочення; відповідальність; основна частина; супутня документація (інструкції, бланки, протоколи тощо, пов'язані з реалізацією цієї процедури); протокол погодження «Процедуру погоджено»; протокол ознайомлення «З процедурою ознайомлені». Ідентифікація розроблених СОП формується за розділами паспортних характеристик, визначених Інструкцією і включає в себе інформацію щодо типу документу, підрозділу ДНКІБШМ, який видав документ, назву, зазначення розділу паспортних характеристик, до якого належить даний документ, порядковий номер документу в даному розділі [29].

Стандартизація методів дослідження, створення матеріально-технічної бази і відповідної нормативної бази в ДНКІБШМ буде сприяти поглибленому науковому опису штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями та збереженню цінних виробничих штамів без зміни їхніх властивостей.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Розроблено систему стандартних операційних процедур виділення та ідентифікації штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями на

початкових етапах, яка дає можливість отримати конкурентноспроможний продукт і провести його аналіз на різних етапах дослідження та зберігання.

2. Використання міжнародних нормативних документів розробниками препаратів дозволить стандартизувати перевірку властивостей штамів мікроорганізмів на відповідність паспортним даним і передбачає впровадження у виробництво інноваційних продуктів з поглибленим науковим описом характеристик та методів контролювання виробничих штамів.

3. Стандартизація початкових етапів виділення та ідентифікації штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями створює оптимальні передумови для розробки реєстраційного досьє на препарат та проведення реєстраційних випробувань.

Регламент (ЄС) 1831/2003 «Добавки в годівлі тварин» Європейського Парламенту та Ради ЄС від 22 вересня 2003 року з питань кормових добавок для використання в годівлі тварин висуває вимоги щодо якості, безпечності, ефективності препаратів, які повинні підтверджуватись результатами досліджень референс-лабораторій. Впровадження в роботу розробників кормових добавок і пробіотиків валідованих методів досліджень сприятиме визнанню відчизняних препаратів на міжнародному ринку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Грищенко В.Ф. Система простежуваності у кормових і харчових ланцюгах: основні вимоги / В.Ф. Грищенко // *Зернові продукти і комбікорми. Якість. Виробництво. Використання. Технології, Обладнання. Автоматизація, Управління. Економіка: науково-виробничий журнал.* – 2012. – № 2. – С. 25–29.
2. Слюсарева Л.В. Європейські системи оцінки якості і безпечності продуктів харчування: перспективні вимоги до українських сільськогосподарських виробників : научное издание / Л.В. Слюсарева // *Вісник Сумського національного аграрного університету. серія "Економіка та менеджмент"* : науково методичний журнал. – 2010. – № 5/2. – С. 55–58.
3. Єфімова О.М. Аналіз даних про мікробіологічні ризики в імпортованій до України продукції тваринного походження / О.М. Єфімова, В.В. Касянчук // *Ветеринарна медицина України.* – 2013. – № 11. – С. 30–32.
4. Закон України «Про безпечність та якість харчових продуктів» N 67–VIII від 28.12.2014. – Режим доступу : <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/> – Назва з екрану.
5. Роль ЭМ–технологий в повышении и продуктивности и сохранности сельскохозяйственных животных / Н.М. Новицкий и др. // *Ветеринария.* – 2014. – № 8. – С. 52–54.
6. Ханеев В.В. Діарея новонароджених телят: лікування та профілактика без антибіотиків / В.В. Ханеев // *Ветеринарна медицина України.* – 2013. – № 12. – С. 30–31.
7. Білик Р.І. Вимоги до ветеринарного обслуговування органічних молочних господарств / Р.І. Білик, С.А. Ткачук // *Ветеринарна медицина України.* – 2015. – № 3 – С. 29–33.
8. Стегний Б.Т. Перспектива использования пробиотиков в животноводстве/ Б.Т. Стегний, С.А. Гужвинская // *Ветеринария.* – 2005. – № 11. – С. 10 12.
9. Овод А.С. Направленное формирование бактериоценоза кишечника / А.С. Овод // *Ветеринария.* – 2003. – № 2. – С. 23–26.
10. Панин А.Н. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных / А.Н. Панин, Н.И. Малик // *Ветеринария.* – 2006. – № 7 – С. 3–6.

11. Литвин В.П. Порівняльна ефективність вітчизняних пробіотиків при кишкових захворюваннях молодняку тварин / В.П. Литвин, В.В. Поліщук // Вісник Полтавської державної аграрної академії.– 2008.– № 1.– С. 123–127.
12. David C.B. Taras, Lohmann Animal Health. The desired ideal: healthy gut and microbiota stability. Lohmann–information. – April 2009. – Vol. 44 (1). – Page 30. – Electronic resource. – Access: <http://lohmann-information.com/23.complete-issues-2006-2013.html>
13. Закон України «Про ветеринарну медицину» N 193–VIII (193–19) від 12.02.2015. – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/2498-12> – Назва з екрану.
14. Закон України «Про виробництво та обіг органічної сільськогосподарської продукції та сировини» № 191–VIII від 12.02.2015. – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/425-18> – Назва з екрану.
15. Регламент Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2003 г. № 1831/2003 " О добавках для использования в кормлении животных". – Режим доступу: <http://chrome-extension://oemmnclbldboiebfnladdacbfmadadm/http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/laws/eu/1831-2003.pdf> – Назва з екрану.
16. Будапештський договір про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів з метою патентної процедури. Дата підписання: 28.04.77 р. Дата приєднання Україною: 01.11.96 р. – Режим доступу : http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=995_039 Назва з екрану.
17. «Перелік матеріалів реєстраційного досьє та порядку його формування», що затверджений наказом Державного комітету ветеринарної медицини України 14.07.2008 № 133 та зареєстрований в Міністерстві юстиції України 7 серпня 2008 р. за № 727/15418.– Режим доступу: http://search.ligazakon.ua/l_doc2.nsf/link1/RE15418.html – Назва з екрану.
18. ГОСТ 26670 – 91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.
19. ДСТУ/ISO 7218 – 2008 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень.
20. ГОСТ 10444.11 – 013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов.
21. ГОСТ 28566 – 90 Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков.
22. ДСТУ ISO 7932:2007 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод визначення кількості ймовірного *Bacillus cereus*.
23. ДСТУ ISO 7889/IDF117:2014 Йогурт. Метод підрахування характерних колоній мікроорганізмів за температури 37 °С
24. ДСТУ ISO 9232/IDF 146:2012 Йогурт. Ототожнення характеристичних мікроорганізмів (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*)
25. ДСТУ ISO 7954:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів.
26. ГСТУ 46.024 – 2002. Препарати ветеринарні. Методи визначення нешкідливості. – Режим доступу: <http://ua-info.biz/legal/basene/ua-smelvr.htm> – Назва з екрану.
27. Nete Bernbom, Birgit Norrum, Peter Saadbye. Comparison of methods and animal vjdels commonly used for investigation of fecal microbiota: Effect of time, host and gender/ Nete Bernbom, Birgit Norrum, Peter Saadbye //Journal of Microbiological methods. – 2006. – Vol. 66. – P. 87–95.
28. Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы / Б.В.Тараканов – Москва: Научный мир. – 2006. – 188с.
29. Інструкція про порядок депонування в Україні штамів мікроорганізмів з метою здійснення патентної процедури. Затверджено наказом держпатенту України і національної

академії наук України від 26 червня 1995 року №106/115 // Бібліотека «Закон і бізнес» 22.11.1995 року. – № 70. – С. 3–21.

30. Регламент Комиссии (ЕС) № 429/2008 от 25 апреля 2008 года о подробных правилах применения Регламента (ЕС) № 1831/2003 Европейского парламента и совета по подготовке и представлению заявок, а также проведению оценки и выдачи разрешений в отношении кормовых добавок. – Режим доступа: <http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/laws/registration/429-2008.pdf> – Назва з екрану.

31. ДСТУ 7198:2010 Препарати ветеринарні. Належна лабораторна практика. 32. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій. – Режим доступу :<http://text.normativ.ua/doc8738.php>

СИСТЕМА СТАНДАРТНЫХ ОПЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕДУР ДЛЯ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ / Акименко Л.И., Головки А.Н., Парафийник Т.В.

На основании результатов обобщения международных критериев оценки и методов идентификации штаммов микроорганизмов с пробиотическими свойствами, которые применяют при разработке пробиотиков и кормовых добавок создана система стандартных операционных процедур для начальных этапов выделения и идентификации штаммов микроорганизмов в соответствии с нормативными документами ЕС и стандартами зарубежных стран.

Система стандартных операционных процедур (СОП) выделения и идентификации штаммов микроорганизмов со свойствами пробиотиков позволит получить конкурентноспособный инновационный продукт и провести его анализ на разных этапах исследования, хранения и контроля качества.

Ключевые слова: *нормативно-правовая база ЕС, пробиотики, стандартизация, штаммы микроорганизмов.*

THE SYSTEM OF STANDARD OPERATING PROCEDURES FOR THE INITIAL STAGES OF SELECTION AND AUTHENTICATIONS OF MICROORGANISMS STRAINS WITH PROBIOTIC PROPERTIES / Акуменко Л.И., Головки А.Н., Парафийник Т.В.

Introduction. *Probiotic is a veterinary preparation applied both in traditional and in an organic stock-raising. The preparations, that contain live bacteria, are divided on medicinal preparations and food additions in our country. The registration of preparations in Ukraine is the requirement of "List of materials of registration dossier and order of his forming", which is ratified by the order of the State committee of veterinary medicine of Ukraine № 133 from 14.07.2008 and registered in Ministry of Justice of Ukraine on August, 7 in 2008 № 727/15418 and one of requirements in accordance with Law "About veterinary medicine", to the division of X, century 63. p. 11.*

The goal of the work. *To form the system of standard operating procedures for the initial stages of selection and authentication of strains of microorganisms with properties of probiotic.*

Materials and methods of research. *Study of the microorganisms strains with probiotic properties conducted using methods harmonized with the requirements of EU: ISO 7218, ISO 7889, ISO 7932, ISO 7954, ISO 9232.*

Results of research and discussion. *The example of the list of Lactobacillus acidophilus A (10) and Lactobacillus acidophilus B(21) indexes were taken.*

Adherence test indexes, genetic stability of productive strains, absence of ability to synthesize toxic metabolites and antibiotics are absent in both examples.

The development of system of the standard operating procedures (SOP) taking into account the requirements of EN/ISO 17025 will allow to get the results of research microorganisms strains properties and to conduct their analysis on the different stages of research and storage.

Conclusions and prospects for further research:

1. *The system of standard operating procedures for the initial stages of selection and authentication of strains of microorganisms with probiotic properties enables to get product with scientific description and controlling methods of productive strains.*

2. *The use of international normative documents will allow to standardize properties test of microorganisms strains and foresees applying innovative foods in agriculture.*

3. *The standardization of the initial stages of selection and authentication of strains of microorganisms with probiotic properties creates optimal preconditions for development of registration dossier for preparation and realization of registration tests.*

Keywords: *EU legal and regulatory framework, probiotics, standardization strains of microorganisms*

REFERENCES

1. Gryshhenko, V.F. (2012). Systema prostezhuvanosti u kormovyh i harchovyh lancjugah: osnovni vymogy [System of supervision in forage and food chains: the basic requirements]. *Zernovi produkty i kombikormy. Jakist'. Vyrobnictvo. Vykorystannja. Tehnologii', Obkladnannja. Avtomatyzacija, Upravlinnja. Ekonomika : naukovo-vyrobnychyj zhurnal – Grain-growing foods and mixed fodders. Quality. Production. Use. Technologies, Equipments. Automation, Management. Economy: scientifically-industry magazine, 2, 25-29 [in Ukraine]*ю

2. Sljusareva, L.V.(2010)ю Jevropejs'ki systemy ocinky jakosti i bezpechnosti produktiv harchu-vannja: perspektyvni vymogy do ukrai'ns'kyh sil'skogospodars'kyh vyrobnykiv [The European system of estimation of quality and unconcern of foods of feed: perspective requirements to the Ukrainian agricultural producers]. *Visnyk Sums'kogo nacional'nogo agrarnogo universytetu. – Announcer of the Sumy national agrarian university, 5/2, 55-58 [in Ukraine].*

3. Jefimova, O.M., & Kasjančuk, V.V. (2013). Analiz danyh pro mikrobiologichni ryzyky v importo-vanij do Ukrai'ny produkcii' tvarynnogo pohodzhennja [Analysis of data about microbiological risks in the products of animal origin]. *Veterynarna medycyna Ukrai'ny – Veterinary medicine of Ukraine, 11, 30-32 [in Ukraine].*

4. Zakon Ukrai'ny «Pro bezpechnist' ta jakist' harchovyh produktiv» N 67-VIII vid 28.12.2014 [Law of Ukraine of 28.12.2014 N 67-VIII "On an unconcern and quality of food foods"] <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/> Retrieved from <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/> [in Ukraine].

5. Novyckyj, A.A., Kolichev, N.M., Pleshakova, V.Y., & Mytrakov, N.V. (2014). Rol' ET-tehnologyj v povyshenny y produktyvnosty y sohrannosty sel'skohozhajstvennyh zhyvotnyh [Role of EM-technology in an increase and productivity and safety of agricultural animals]. *Veterynaryja – Veterinary, 8, 52-54 [in Russian].*

6. Hanejev, V.V. (2013). Diareja novonarodzhenyh teljat: likuvannja ta profilaktyka bez antybio-tykiv [Diarrhoea of new-born calves: treatment and prophylaxis without the antibiotics]. *Veterynarna medycyna Ukrai'ny – Veterinary medicine of Ukraine, 12, 30-31 [in Ukraine].*

7. Bilyk, R.I., & Tkachuk, S.A. (2015). Vymogy do veterynarnogo obslugovuvannja organichnyh molochnyh gospodarstv [Requirements to veterinary maintenance of organic dairying]. *Veterynarna medycyna Ukrai'ny – Veterinary medicine of Ukraine, 3, 29-33 [in Ukraine].*

8. Stegnyj, B.T., & Guzhvynskaja, S.A. (2005). Perspektyva yspol'zovanyja probyotykov v zhyvotnovodstve [A prospect of the probiotics use in a stock-raising]. *Veterynaryja – Veterinary science, 11, 10-12 [in Russian].*

9. Ovod, A.S. (2003). Napravlennoe formirovanye bakterycenoza kyshechnyka [Directed forming of bowels bacteriacenosis]. *Veterynaryja – Veterinary science, 2, 23-26 [in Russian].*

10. Panyn, A.N., & Malyk, N.Y. (2006). Probyotyky-neotemlemyj komponent racyonal'nogo kormlenyja zhyvotnyh [Probiotics is an inalienable component of the rational animals feeding]. *Veterynaryja – Veterinary science*, 7, 23-26 [in Russian].
11. Lytvyn, V.P., & Polishhuk, V.V. (2008). Porivnjal'na efektyvnist' vitchyznjanyh probiotykyv pry kyshkovykh zahvorjuvannjah molodnjaku tvaryn [Comparative efficiency of domestic probiotics at intestinal diseases to the saplings of animals]. *Visnyk Poltavs'koi' derzhavnoi' agrarnoi' akademii' – Announcer of Poltava state agrarian academy*, 1, 123-127 [in Ukraine].
12. David, C.B. Taras. (2009). Lohmann Animal Health. The desired ideal: healthy gut and microbiota stability [Lohmann Animal Health. The desired ideal: healthy gut and microbiota stability]. *Lohmann-information – Lohmann-information*, 44 (1), 30. Retrieved from <http://lohmann-information.com/23.complete-issues-2006-2013.html>.
13. Zakon Ukrai'ny «Pro veterynarnu medycynu» N 3522-VI (3522-17) vid 16.06.2011 [Law of Ukraine of 12.02.2015 .N 193 – VIII (193 – 19) "On veterinary medicine"]. *Announcer of the Verkhovna rada*, 4, 17 [in Ukraine].
14. Zakon Ukrai'ny «Pro vyrobnyctvo ta obig organichnoi' sil'skogospodars'koi' produk-cii' ta syrovyny» № 191-VIII vid 12.02.2015 [Law of Ukraine "On a production and appeal of organic agricultural produce and raw material" № 191 - VIII from 12.02.2015]. <http://zakon2.rada.gov.ua>. Retrieved from <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/425-18> [in Ukraine].
15. Reglament Evropejskogo Parlamenta y Soveta ot 22 sentjabrja 2003 g. № 831/2003 "O dobavkah dlja yspol'zovanyja v kormlenyy zhyvotnyh" [About additions for the use in animals feeding]. [www.fsvps.ru](http://fsvps.ru) Retrieved from <http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/laws/eu/1831-2003.pdf>. [in Russian].
16. Budapeshts'kyj dogovir pro mizhnarodne vyznannja deponuvannja mikroorganizmiv z metoju patentnoi' procedury. Data pidpysannja: 28.04.77 r.Data pryjednannja Ukrai'noju: 01.11.96 r. [Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure]. [www.zakon.rada.gov.ua](http://zakon.rada.gov.ua). Retrieved from http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=995_039 [in Ukraine].
17. «Perelik materialiv rejestracijnogo dos'je ta porjadku jogo formuvannja», shho zatverdzhе-nyj nakazom Derzhavnogo komitetu veterynarnoi' medycyny Ukrai'ny 14.07.2008 № 133 ta zarejestrovanyj v Ministerstvi justycii' Ukrai'ny 7 serpnja 2008 r. za № 727/15418. ["List of materials of registration dossier and order of his forming", which is ratified by the order of the State committee of veterinary medicine of Ukraine 14.07.2008 № 133 and registered in Ministry of Justice of Ukraine on August, 7 in 2008 for № a 727/15418]. [www.search.ligazakon.ua](http://search.ligazakon.ua). Retrieved from http://search.ligazakon.ua/1_doc2.nsf/link1/RE15418.html.
18. Produkty pyshhevye. Metody kul'tyvyrovanyja mykroorganizmiv [Foods food. Methods of microorganisms cultivation]. (1991). *HOST 26670 – 91*. Moscow: Standartinform Rossiiskoi Federatsii [in Russian].
19. Mikrobiologija harchovyh produktiv i kormiv dlja tvaryn. Zagal'ni nastanovy shhodo mikrobiologichnyh doslidzhen' [Microbiology of food foods and forage for animals. General options are in relation to microbiological researches].(2008). *SSTU/ISO 7218:2008*. Kyev. National standard of Ukraine [in Ukraine].
20. Mykrobyologija pyshhevyh produktov y kormov dlja zhyvotnyh. Metody vyjavlenyja y podscheta kolychestva mezofyl'nyh molochnokyslyh mykroorganizmiv [Microbiology of foods and forage for animals. Methods of exposure and count of amount of lactate microorganisms]. (2013). *HOST 10444.11 – 2013*. Moscow: Standartinform Rossiiskoi Federatsii [in Russian].
21. Produkty pyshhevye. Metody vyjavlenyja y opredelenyja kolychestva enterokokkov [Foods of food. Method of exposure and determining the amount of enterococcus]. (1990). *HOST 28566-90*. Moscow: Standartinform Rossiiskoi Federatsii [in Russian].
22. Mikrobiologija harchovyh produktiv i kormiv dlja tvaryn. Goryzon-tal'nyj metod vyznachennja kil'kosti jmovirno Bacillus cereus [Microbiology of food and animal feeding stuffs.

Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony-count technique at 300C]. (2007), *SSTU ISO 7932:2007*, Kyev. National standard of Ukraine [in Ukraine].

23. Jogurt. Metod pidrahuvannja harakternyh kolonij mikroorganizmiv za temperatury 37 °S Yogurt. [Enumeration of characteristic microorganisms. Colony-count technique at 37 °C]. (2014). *SSTU/ISO 9232:2014*. Kyev. National standard of Ukraine [in Ukraine].

24. Jogurt. Ototozhnennja harakterystychnyh mikroorganizmiv (*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) [Yogurt. Identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*)]. (2012). *SSTU/ISO 9232:2012*. Kyev. National standard of Ukraine [in Ukraine].

25. Mikrobiologija harchovyh produktiv i kormiv dlja tvaryn. Zagal'ni nastanovy z pidrahunku drizhdzhiv i mikroskopichnyh grybiv. [Microbiology. General guidance for enumeration of yeasts and moulds. Colony count technique at 25 degrees C]. (2006). *SSTU ISO 7954:2006*. Kyev. National standard of Ukraine, [in Ukraine].

26. Preparaty veterynarni. Metody vyznachennja neshkidlyvosti [The veterinary preparations. Methods of determination of harmlessness]. (2002). *GSU 46.024-2002*. Retrieved from <http://ua-info.biz/legal/basene/ua-cmelvr.htm> [in Ukraine].

27. Bernbom, N., Norrum, B., & Saadbye, P. (2006). Comparison of methods and animal vjdels commonly used for investigation of fecal microbiota: Effect of time, host and gender [Comparison of methods and animal vjdels commonly used for investigation of fecal microbiota: Effect of time, host and gender]. *Journal of Microbiological methods*, 66, 87-95 [in English].

28. Tarakanov, B.V. (2006). *Metody yssledovanyja mykroflory pyshhevarytel'nogo trakta sel'skoho-zhajstvennyh zhyvotnyh y ptycy* [Methods of digestive tract microflora research of agricultural animals and bird]. Moskva.: Nauchnyj myr, [in Russian].

29. Porjadok deponuvannja v Ukrai'ni shtamiv mikroorganizmiv z metoju zdijsnen-nja patentnoi' procedury [The order of depositing in Ukraine of strains of microorganisms with the purpose of patent procedure]. (1995). Regulations from 26th June 1995. *Biblioteka «Zakon i biznes» – A library is "Law and business"*, 70, 3-21 [in Ukraine].

30. Reglament Komysyy (ES) № 429/2008 ot 25 aprelja 2008 goda o podrobnyh pravylah prymerenyja Reglamenta (ES) № 1831/2003 Evropejskogo parlamenta y soveta po podgotovke y predstavleniju zajavok, a takzhe provedenyju ocenky y vydachy razreshenyj v otnoshenyy kormovyh dobavok [Commission regulation (EC) No 429/2008 of 25 April 2008 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the preparation and the presentation of applications and the assessment and the authorisation of feed additives]. *www.fsvps.ru*. Retrieved from <http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/laws/registration/429-2008.pdf>.

31. Preparaty veterynarni. Nalezha laboratorna praktyka [The veterinary preparations. Proper laboratory practice]. (2010). *SSTU 7198:2010*, Kyev. National standard of Ukraine [in Ukraine].

32. Zagal'ni vymogy do kompetentnosti vyprobuval'nyh ta kalibruval'nyh laboratorij [General requirements for the competence of testing and calibration laboratories]. (2006). *DSTU ISO/IEC 17025:2006*. Kyev. National standard of Ukraine, [in Ukraine]. *www.text.normativ.ua*. Retrieved from <http://text.normativ.ua/doc8738.php> [in Ukraine].