

СУБЛІМАЦІЙНЕ СУШІННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ
НА ОСНОВІ *LACTOBACILLUS CASEI*Шурай М. О.¹, к.б.н, с.н.с.<https://orcid.org/0000-0003-1844-5967>Чорна Н. А.¹, н.с.<https://orcid.org/0000-0002-2299-323X>¹Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ, Україна<https://doi.org/10.31073/foodresources2021-17-18>

У виробництві ферментованих харчових продуктів важливо забезпечити ефективне і довготривале зберігання клітин мікроорганізмів заквашувальних препаратів. Проблема тривалого зберігання мікроорганізмів зводиться до створення умов анабіозу, тобто гальмування процесів обміну речовин. З відомих способів зберігання біоматеріалів сублімаційне сушіння чи ліофілізація (осушування матеріалу в умовах низького тиску і за низьких температур) вважається одним з найефективніших і найекономічніших методів тривалого зберігання мікроорганізмів. При висушуванні виживання клітин залежить від багатьох факторів, серед яких важливе місце займають їх біологічні особливості пов'язані з видовою і штамовою специфічністю, умови культивування, вік культури, склад середовища сублімаційного сушіння, технологічні параметри цього процесу. Для захисту мікроорганізмів використовують захисні середовища (ЗС), до яких уводять речовини, що зменшують відмирання клітин під час заморожування, сушіння та зберігання. **Мета роботи:** провести підбір компонентів ЗС для стабілізації біомаси *Lactobacillus casei* (L. casei) з високим рівнем антагоністичної дії щодо технічно шкідливої мікрофлори та встановити режими зберігання бакпрепаратів. **Предмет дослідження:** здатність лактобактерій L. casei зберігати життєздатність і властивості під час сублімаційного сушіння та упродовж зберігання. У роботі використані загальнозживані мікробіологічні та технологічні **методи досліджень. Результати дослідження.** Досліджено протекторну дію захисних середовищ на збереження життєздатності клітин L. casei та розчинність бактеріальних препаратів. Найкращих показників досягнуто при використанні сахарозо-цитратного і сахарозо-желатозного середовищ у співвідношенні до біомаси клітин як 2:1. Вироблено ліофілізовані бактеріальні препарати, показники якості яких відповідають сучасним вимогам: чисельність клітин на рівні $(4,5-4,8) \times 10^{11}$ КУО/см³, розчинність - $(0,4-0,5)$ см³ сирого осаду та достатній рівень активності в молоці зі збереженням високої антагоністичної активності до *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і *Bacillus cereus*. При зберіганні упродовж шести місяців за температури (4 ± 2) °C і 9 місяців за температури мінус (18 ± 2) °C бактеріальні препарати зберігали високу чисельність живих клітин та здатність до реактивації. **Сфера застосування результатів дослідження.** Використання бактеріальних препаратів захисної дії від технічно шкідливої мікрофлори дозволить поліпшити показники безпечності та якості отримуваного сиру.

Ключові слова: бактеріальний препарат, захисне середовище, сублімаційне сушіння

FREEZE DRYING OF BACTERIAL PREPARATIONS BASED ON *LACTOBACILLUS CASEI*

*Myroslava Shugai*¹, PhD, Biologocal, Senior Researcher
<https://orcid.org/0000-0003-1844-5967>

*Natalia Tshorna*¹, Researcher
<https://orcid.org/0000-0002-2299-323X>

¹Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine

<https://doi.org/10.31073/foodresources2021-17-18>

For the production of fermented food products, it is important to ensure efficient and long-term storage of microorganism cells of starter preparations. The problem of long-term storage of microorganisms is reduced to the creation of conditions for suspended animation, that is, inhibition of metabolic processes. Of the known methods for storing biomaterials, freeze drying or lyophilization (drying of the material under low pressure and at low temperatures) is considered one of the most effective and economical methods of long-term storage of microorganisms. During drying, cell survival depends on many factors, among which their biological characteristics associated with species and strain specificity, cultivation conditions, culture age, composition of the freeze drying medium, and technological parameters of this process occupy an important place. To protect microorganisms, protective media are used, into which substances are introduced that promote cell survival during freezing, drying and storage. **The aim of this work:** to select the components of a protective environment to stabilize the biomass of *Lactobacillus casei* (*L. casei*) with a high level of antagonistic action to technically harmful microflora and to establish storage regimes for the bacterial preparation. **Subject of research:** the ability of *L. casei* lactobacilli to maintain viability and properties during freeze drying and storage. The work used commonly used microbiological and technological **research methods. Research results.** The protective effect of protective media on maintaining the viability of *L. casei* cells and the solubility of bacterial preparations was studied. The best performance was achieved when using sucrose-citrate and sucrose-gelatinous media in a ratio to cell biomass of 2: 1. Lyophilized bacterial preparations were produced, the quality indicators of which meet modern requirements: the number of cells at the level of $(4.5-4.8) \times 10^{11}$ CFU / cm³, solubility - (0.4-0.5) cm³ of raw sediment and a sufficient level of activity in milk while maintaining a high antagonistic activity to *E. coli*, *S. aureus* and *Bacillus cereus*. When stored for six months at a temperature of (4 ± 2) °C and 9 months at a temperature of minus (18 ± 2) °C, bacterial preparations retained a high number of living cells and the ability to reactivate. **Scope of research results application.** The use of bacterial preparations with a protective effect against technically harmful microflora will improve the safety and quality of cheese.

Key words: bacterial preparation, protective environment, freeze drying

Постановка проблеми.

У виробництві ферментованих харчових продуктів важливо забезпечити ефективне і довготривале зберігання клітин мікроорганізмів заквашувальних препаратів. З відомих способів зберігання біоматеріалів найбільш придатним для промислового виробництва вважається сублімаційне чи ліофільне сушіння – осушування матеріалу в умовах низького тиску і за низьких температур. В основі методу лежить явище сублімації – випаровування вологи з оминанням рідкої фази. Низька температура, за якої тривалий час знаходиться висушуваний матеріал, оберігає білки від денатуруючої дії підвищених концентрацій електролітів, що виникають внаслідок видалення води. Виживання клітин під час

ліофілізації забезпечується природною здатністю мікроорганізмів впадати в анабіоз за несприятливих для життєдіяльності умов [1].

Сушіння виморожуванням – давній спосіб сушіння. Його використовували ще в 16-му столітті південно-американські індіанці, які жили на великих висотах в Андах. Вони отримували ліофілізований картопляний продукт з довгим терміном придатності шляхом заморожування картоплі протягом ночі і сушіння її на схилах.

Використання ліофілізації як експериментального методу збереження мікробних культур розпочалось з кінця минулого – початку нинішнього століття. Зокрема, 1909-го року американський дослідник Л. Шеккель вперше застосував метод заморожування в суміші льоду й солі з подальшим поглинанням вологи сірчаною кислотою під вакуумом для висушування комплементу сироватки крові морської свинки та вірусу сказу [2]. У 1914-му році Роджерс [3] ліофілізував молочнокислі бактерії. Хоча більшість клітин швидко втратили життєздатність, на підставі чого дослідник висловив сумнів у можливості тривалого збереження бактерій за допомогою ліофілізації, однак він перший відзначив дуже важливий вплив на виживання клітин залишкової вологи.

Виживання мікроорганізмів при висушуванні залежить від багатьох факторів, серед яких важливе місце займають біологічні особливості мікроорганізмів, пов'язані з їх видовою і штамовою специфічністю, умови культивування та вік культури, склад середовища, в якому вони перебувають під час сублімаційного сушіння, та технологічні параметри цього процесу [4, 5].

Донедавна вважалось, що ростові середовища не впливають на виживання мікроорганізмів під час сушіння. Тому дослідження насамперед були зосереджені на впливі захисних речовин і фаз росту, а не рецептурі ростового середовища. Однак було виявлено, що середовище росту може суттєво вплинути на виживання ліофілізованих клітин *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* та *Lactobacillus bulgaricus* [6, 7]. Також показано, що результат залежить від штаму і використаних вуглеводів: клітини *Lactobacillus bulgaricus* менше втрачали життєздатність після ліофілізації за умов, коли їх вирощували в присутності маннози, порівняно з фруктозою, лактозою або глюкозою. Водночас додавання до захисного середовища будь-якого з цих вуглеводів підвищувало захист клітин від висихання під час зберігання [7].

До захисних середовищ зазвичай уводять речовини, що зменшують відмирання мікроорганізмів під час заморожування, сушіння та зберігання у сухому вигляді. Речовини, що використовуються з цією метою, можуть відрізнятися захисною дією щодо окремих несприятливих факторів. З огляду на це варто використовувати комплексні захисні середовища з двох чи кількох компонентів. **Мета роботи** полягала у підборі компонентів захисного середовища для стабілізації біомаси *L. casei*, що входять до препаратів для виробництва сиру та встановленні режимів зберігання бакпрепаратів.

Матеріали та методи. Етап сублімаційного сушіння біомаси потребує вирішення ряду питань, пов'язаних із визначенням впливу кріозахисних компонентів на виживання мікроорганізмів, їх активність та якість отриманих бакпрепаратів. Під час патентного пошуку було визначено, що ефективними ліопротекторами можуть бути:

- вуглеводневі сполуки – цукроза, лактоза, тригалола, мальтоза, манноза, сорбіт, агар-агар;
- білкові компоненти – желатин, сухе знежирене молоко, пептон;
- солі – цитрат натрію, глутамат натрію, фосфатний буфер.

Також було відзначено, що найвищим рівнем захисту відзначаються комплексні ЗС, які містять компоненти, представлені речовинами різної хімічної будови – вуглеводи, білки та солі. Виходячи з цього було скомбіновано п'ять комплексних ЗС, до складу яких входили у різних співвідношеннях сахароза, цитрат натрію, сухе знежирене молоко, желатин (табл. 1).

Нарощені в ростовому середовищі мікроорганізми осаджували за допомогою

центрифугування та змішували з ЗС. Суспензії бактеріальних клітин заморожували при температурі мінус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж (16 ± 2) год, після чого висушували в сублімаційній сушарці ТГ-15 протягом (18 ± 2) годин за таких режимів: початок сушіння – за температури мінус $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, закінчення – за температури $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Якість отриманих бактеріальних концентратів оцінювали за показниками виживання лактобактерій після ліофілізації та за індексом розчинності, який визначали відповідно до ГОСТ 30305.4-95.

Чисті культури лактобактерій підтримували методом субкультивування, між пересівами зберігали за температури холодильника. Визначення титру життєздатних клітин визначали чашковим методом в агаризованому середовищі МРС; активну кислотність середовища культивування лактобактерій – потенціометрично; титровану кислотність – згідно з ГОСТ 3624-92; наявність БГКП – у середовищі Кесслер; наявність дріжджів та плісені – на середовищі Сабуро. Розчинність сухих бакпрепаратів – згідно з ГОСТ 30305.4-95 і виражали в см^3 сирого осаду; вміст вологи – згідно з ГОСТ 24061-88. Антагоністичну активність відновлених після висушування культур лактобактерій визначали методом «дифузії в агар» [8]. Активність відновлених препаратів оцінювали за приростом титрованої кислотності через 3 години культивування та за часом сквашування 1 дм^3 стерильного молока за оптимальної температури росту культур $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Контроль чистоти культур проводили методом світлової мікроскопії фарбованих метиленовою синькою мікропрепаратів, обчислення ступеня виживання клітин після сублімаційного сушіння (N) – згідно з [9] за формулою:

$$N = \frac{\lg N_2}{\lg N_1} \times 100\%, \quad (1), \text{ де}$$

N_1 – чисельність клітин до висушування біомаси з захисним середовищем, КУО/ см^3 ;

N_2 – чисельність клітин після висушування біомаси з захисним середовищем, КУО/ см^3 . (До початкового об'єму суху біомасу доводили фізіологічним розчином).

Оцінку результатів досліджень проводили за рівнем значимості P . Результати вважали достовірними при $P < 0,05$.

ЗС для сублімаційного сушіння №1, №2, №3, №5 готували відповідно до таблиці 1.

Таблиця 1

Склад захисних середовищ для сублімаційного сушіння біомаси *L. Casei*

Компоненти	Вміст компонентів у захисному середовищі, %				
	№1	№2	№3	№4	№ 5
Сахароза	10	5	20	25	-
Цитрат натрію	5	5	5	-	-
Сухе знежирене молоко	-	10	5	5	16
Желатин	-	-	-	2	-

Результати та обговорення. Аналіз отриманих даних (табл. 2) показав, що залучення до складу ЗС сухого знежиреного молока хоча й забезпечувало порівняно високі показники виживання молочнокислих бактерій (до 91% – 95 % КУО/ см^3 після ліофілізації), однак значно погіршувало розчинність бакпрепаратів (індекс розчинності з використанням середовищ №2 та №5 перевищував $0,5 \text{ см}^3$ сирого осаду). Використання ЗС №3 і №4 дозволило отримати бактеріальні препарати з низькими індексами розчинності – $0,5 \text{ см}^3$ і $0,4 \text{ см}^3$ сирого осаду, відповідно) та обумовлювало ступінь виживання бактерій на рівні 96 % – 97 %. Вихід сухих бакконцентратів із застосуванням ЗС №3 і №4 становив 4,3 – 4,6 г з 1 дм^3 ростового середовища.

Таблиця 2

Вплив захисних середовищ на якість бактеріального препарату

Варіанти захисних середовищ (ЗС)	Ступінь виживання клітин (N),%		Kp^1 , см ³ сирого осаду
	Композиція 1	Композиція 2	
ЗС №1	80,53±1,82	85,34±2,11	0,4±0,1
ЗС №2	90,28±1,76	92,86±1,76	0,6±0,1
ЗС №3	96,91±1,43	96,75±0,37	0,5±0,1
ЗС №4	98,07±0,89	98,10±0,95	0,4±0,1
ЗС №5	87,06±1,54	91,54±1,84	0,6±0,1
Концентрат без ЗС	49,18±3,40	57,07±2,01	—

Kp – коефіцієнт розчинності

На наступному етапі досліджень проводили підбір найбільш раціонального з точки зору збереження життєздатності клітин співвідношення біомаси та ЗС. З цією метою концентровану біомасу змішували з сахарозно-цитратним і сахарозно-желатозним ЗС у співвідношеннях: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:4 частин і ліофілізували за вище наведених умов. Найкращих результатів (рис. 1) досягнуто при співвідношенні біомаси і ЗС 1:2 і 1:4, які забезпечували виживання клітин на рівні 96,8 % – 98,0 %. Однак, вважаємо за доцільне використовувати співвідношення 1:2, оскільки воно дозволяє зберегти високу чисельність лактобактерій без зайвих витрат реактивів та уникнути надмірного розбавлення клітин.

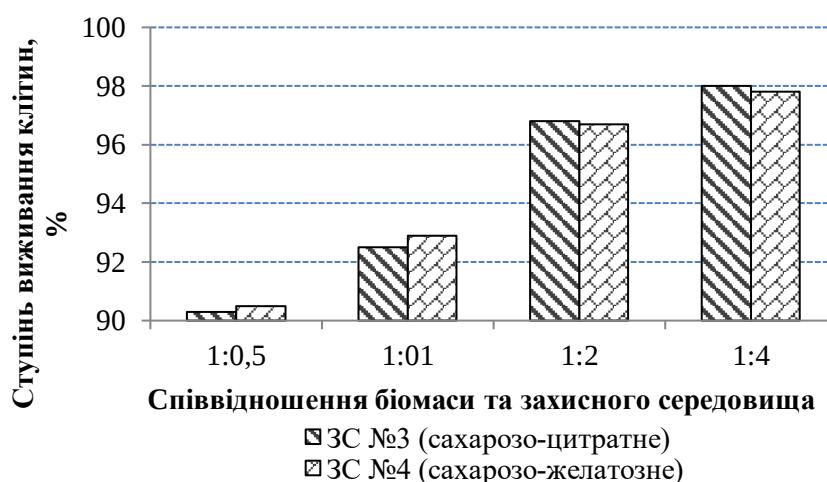


Рис. 1. Залежність виживання лактобактерій БК №1 під час ліофілізації від співвідношення біомаси і захисного середовища

Враховуючи опрацьовані технологічні режими, у напівпромислових умовах було вироблено бактеріальні препарати прямого внесення №1 та №2, які містили лактобактерії виду *L. casei* різного штамового складу.

У процесі ліофілізації клітини мікроорганізмів потрапляють в екстремальні умови, внаслідок чого частина їх гине. Тому виникає необхідність контролювати життєздатність та активність висушуваних зразків препаратів. У результаті проведених досліджень було встановлено, що отримані препарати містили значну кількість живих клітин молочнокислих бактерій. Свіжовироблені препарати характеризувались такими показниками якості (табл. 3): чисельність молочнокислих бактерій на рівні $(4,5-4,8) \times 10^{11}$ КУО/г; достатню активність у молоці; добру розчинність. Сторонньої

мікрофлори - коліформ, дріжджів та плісені - у бакпрепаратах виявлено не було. Вихід сухих бактеріальних концентратів з 1 дм³ ростового середовища становив 4,3–4,6 г.

Таблиця 3

Мікробіологічні та фізико-хімічні показники бакпрепаратів № 1 та № 2

№	Показник	БП № 1	БП № 2
1	Чисельність лактобактерій	$4,5 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^{11}$
2	Мікроскопічний препарат	Маленькі палички, ланцюжки	Маленькі палички, ланцюжки
3	БГКП (коліформи), в 1 г	Відсутні	Відсутні
4	Дріжджі та плісені, в 1 г	Відсутні	Відсутні
5	Активність бакпрепарату: тривалість сквашування молока при внесенні 1 г на 1 дм ³ при 37 °С, год титрована к-ть через 3 год., °Т	12,2 31	12,5 30
6	Антагоністична активність до тест-культур: <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i>	+ + +	+ + +
7	Масова частка води, %	5	5

Важливою ознакою якості розроблених бакконцентратів є збереження антагоністичних властивостей реактивованими лактобактеріями. *In vitro* встановлено, що після сублімаційного сушіння мікроорганізми зберігали високий рівень антагоністичної активності до технічно шкідливої та умовно патогенної мікрофлори виробництва сичужних сирів, про що свідчать наявність на газонах тест-культур стерильних зон навколо лунок з метаболітами лактобактерій (Рис. 2).

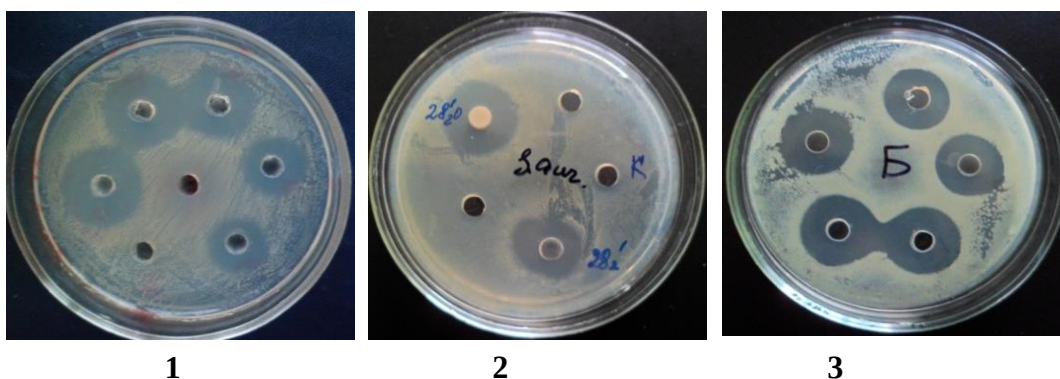


Рис. 2. Антагоністична активність (метод «дифузії в агар») метаболітів відновлених з бактеріальних концентратів лактобактерій на газонах:
1 - *Escherichia coli*, 2 - *Staphylococcus aureus*, 3 - *Bacillus cereus*

Досліджено вплив режимів зберігання і об'єму захисного середовища на збереження життєздатності лактобактерій. З цією метою бакконцентрати закладали на зберігання за температурних режимів: мінус 18 ± 2 °С (температура морозильної камери) і (4 ± 2) °С (камера побутового холодильника) при відносній вологості повітря 80 %. Стабільність препаратів оцінювали за чисельністю життєздатних клітин та їх біохімічною активністю - часом, необхідним для утворення молочного згустку.

Отримані дані (табл. 4) свідчать, що ефективнішим було зберігання бакпрепаратів за від'ємних температур, забезпечуючи загальну чисельність лактобактерій через 9 місяців зберігання на рівні $1,1 \times 10^{11}$ КУО/г, тоді як при зберіганні за температур від 2 до 6 °С аналогічні показники бакпрепарати мали вже через 6 місяців.

Таблиця 4

**Здатність до зберігання бакпрепаратів № 1 та № 2
(за співвідношення біомаси до захисного середовища як 1:2)**

Термін зберігання	БП № 1		БП № 2	
	Чисельність, КУО/г	Активність, год	Чисельність, КУО/г	Активність, год
за температури (4±2) °С				
2 місяці	$2,6 \times 10^{11}$	12,6	$3,4 \times 10^{11}$	12,8
3 місяці	$2,1 \times 10^{11}$	13,3	$2,9 \times 10^{11}$	13,5
6 місяців	$1,6 \times 10^{11}$	14,0	$1,3 \times 10^{11}$	14,0
за температури мінус (18±2) °С				
3 місяці	$3,4 \times 10^{11}$	12,2	$3,8 \times 10^{11}$	12,6
6 місяців	$1,9 \times 10^{11}$	13,0	$2,1 \times 10^{11}$	13,0
9 місяців	$1,3 \times 10^{11}$	14,0	$1,4 \times 10^{11}$	14,0

Висновки. Проведено підбір компонентів захисного середовища для стабілізації біомаси *L. casei*, що входять до препаратів для виробництва сиру. Найкращі показники отримано при використанні сахарозо-цитратного і сахарозо-желатозного ЗС у співвідношенні до біомаси клітин як 2:1. Використання зазначених ЗС забезпечило виживання лактобактерій під час сублімаційного сушіння на рівні (96,8±0,1) %, що відповідає чисельності клітин (4,5-4,8)×10¹¹ КУО/г. Сухі бактеріальні препарати не містили сторонньої мікрофлори, їх розчинність становила 0,4±0,1 см³ і 0,5±0,1 см³ сирого осаду, у разі використання сахарозо-желатозного і сахарозо-цитратного ЗС, відповідно.

Реактивовані лактобактерії мали достатню кислотоутворюючу активність (при внесенні 1 г сухого бакпрепарату в 1 дм³ стерильного молока за температури 37 °С утворювали згусток через 12,2÷12,5 годин), зберігали високий рівень антагоністичної активності до технічно шкідливої та умовно патогенної мікрофлори виробництва сичужних сирів.

Найефективнішим було зберігання сублімованих бактеріальних препаратів за мінус 18±2 °С, забезпечуючи через 9 місяців загальну чисельність лактобактерій на рівні $1,1 \times 10^{11}$ КУО/г, тоді як при зберіганні за температури 4±2 °С бакпрепарати мали аналогічні показники через 6 місяців.

Бібліографія

1. Uzunova-Doneva T., Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of Culture Collections*. 2005. №4. P. 17-28.
2. Смит О. Влияние низких температур на живые ткани и клетки. В кн.: Применение замораживания-высушивания в биологии. Под ред. Р. Харриса. Москва. 1956. 432 с.
3. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. М.: Колос. 1979. 337 с.
4. Celikand O.F., O'Sullivan D.J. Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 2013. №96. P. 3506–3516.
5. Coulibaly I., Kouassi E.K., N'guessan E., Destain J., Béra F., Thonart P. Lyophilization (Drying Method) Cause Serious Damages to the Cell Viability of Lactic Acid Bacteria. *Annual Research & Review in Biology*. 2018. №24(4). P. 1-15.

6. Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*. 2003. №94. P. 947–952.

7. Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Biotechnology Progress*. 2004. №20. P. 248–254.

8. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности М.: Высш. шк. 1975. 208 с.

9. T. Kimprasit, S. Sukontasing Amavisit P. In Vitro Selection of Potential Lactic Acid Bacteria Isolated from Ducks and Geese in Thailand. *Nat. Sci.* 2013. №47. P. 261–270.

References

1. Uzunova-Doneva T., Donev T. (2005). Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of Culture Collections*. №4. P. 17–28.

2. Smit O. , (Kharrisa R. Ed)(1956). Vliyanie nizkikh temperatur na zhivy'e tkani i kletki. V kn.: Primenenie zamorazhivaniya-vy'sushivaniya v biologii. [The effect of low temperatures on living tissues and cells].. Moskva. 432 p. [in Russian].

3. Nikitin E.E., Zvyagin I.V. (1979). Zamorazhivanie i vysushivanie biologicheskikh preparatov [Freezing and drying biological products]. M.: Kolos. 337 p. [in Russian].

4. Celikand O.F., O'Sullivan D.J. (2013). Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* № 96. P. 3506–3516.

5. Coulibaly I., Kouassi E.K., N'guessan E., Destain J., Béra F., Thonart P. (2018). Lyophilization (Drying Method) Cause Serious Damages to the Cell Viability of Lactic Acid Bacteria. *Annual Research & Review in Biology* № 24(4). P. 1–15.

6. Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. (2003). Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*. № 94. P. 947–952.

7. Carvalho A.S., Silva J., Ho, P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. (2004). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Biotechnology Progress*. № 20. P. 248–254.

8. Egorov N.S. (1975). Mikroby-antagonisty i biologicheskie metody opredeleniya antibioticheskoi aktivnosti [Microbes-antagonists and biological methods for detecting antibiotic activity]. M.: Vyssh. shk. 208 p. [in Russian].

9. T. Kimprasit, S. Sukontasing Amavisit P. (2013). In Vitro Selection of Potential Lactic Acid Bacteria Isolated from Ducks and Geese in Thailand. *Nat. Sci.* №47. P. 261–270.