

Original researches

Study of the disinfectant's «Enzides» toxic effects on infusoria cells

V. A. Kozhyn*, M. D. Kukhtyn**, Y. V. Horiuk*, V. V. Horiuk*, Y. B. Perkiy***, D. F. Gufrij****

*Higher Educational Institution «Podillia State University», Kamianets-Podilskyi, Ukraine

**Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

***Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine of NAAS, Ternopil, Ukraine

****Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Received: 09 December 2021

Revised: 24 December 2021

Accepted: 26 December 2021

Higher educational institution «Podillia State University», Shevchenko Str., 12, Kamianets-Podilskyi, Khmelnytskyi region, 32316, Ukraine

Tel.: +38-038-496-84-42

E-mail: vlad.kozhyn@gmail.com

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ruska Str., 56, Ternopil, 46001, Ukraine

Tel.: +38-035-222-02-21

E-mail: kuchtynnic@gmail.com

Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine of NAAS, Troleibusna Str., 12, Ternopil, 46001, Ukraine

Tel.: +38-035-253-71-14

E-mail: yperkiy@ukr.net

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 50, Pekarska Str., Lviv, 79010, Ukraine

Tel.: +38-032-239-26-14

E-mail: gufrij@gmail.com

Cite this article: Kozhyn, V. A., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Horiuk, V. V., Perkiy, Y. B., & Gufrij, D. F. (2021). Study of the disinfectant's «Enzides» toxic effects on infusoria cells. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 9(4), 191–194. doi: 10.32819/2021.94029

Abstract. Conducting preclinical studies of newly disinfectant's solutions is a prerequisite for their further testing in production conditions. For this, various methods are used to determine the possible toxic effects of disinfectant solutions on the cells of protozoa and warm-blooded animals. The aim of work was to establish the toxic concentration of disinfectant «Enzidez» on laboratory strain WH-14 of infusoria *Tetrachymena pyriformis*. Determination of toxicity has been performed using a certified strain WH-14 of infusoria *Tetrachymena pyriformis*. For this purpose, solutions of disinfectant «Enzidez» have been prepared at +20 and +30°C and infusion strain has been introduced into them, kept for 15 and 30 min, after material was taken for microscopy and the number of surviving *Tetrachymena* cells was counted in Goryaev chamber. It has been found that at 0.25% concentration of «Enzidez» disinfectant solution for 15 min of action, the survival rate of protozoa was $88.7 \pm 0.4\%$. The effect of the agent at a concentration of 0.25% on infusoria for 30 min led to a decrease in their number by 16.9% compared to the control sample. However, this concentration is not classified as toxic. For 0.5% concentration of the agent within 15 minutes of exposure, a decrease of 15.5% in living cells of infusoria was observed, and after 30 minutes of exposure, by 26.7% compared with the control. Accordingly, exposure of this solution for 30 min is considered to be slightly toxic to *Tetrachymena*. The most toxic to infusoria has been 0.75% concentration of «Enzidez» disinfectant. Within 15 minutes of exposure, $61.3 \pm 0.2\%$ of surviving infusoria cells were noted, compared with the control, this regimen has been considered to be slightly toxic to *Tetrachymena*. When exposed for 30 min, only $42.2 \pm 0.2\%$ of infusoria were detected alive, i.e. this regimen is considered toxic to *Tetrachymena pyriformis*. Therefore, the disinfectant «Enzidez» at a concentration of 0.1–0.25% and a temperature of solutions from +20 to +30 °C for 30 minutes of exposure was not toxic to infusoria cells.

Keywords: disinfectant «Enzidez»; infusoria *Tetrachymena pyriformis*; toxicity

Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій

В. А. Кожин*, М. Д. Кухтин**, Ю. В. Горюк*, В. В. Горюк*, Ю. Б. Перкій***, Д. Ф. Гуфрій****

*Заклад вищої освіти «Подільський державний університет», Кам'янець-Подільський, Україна

**Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя, Тернопіль, Україна

***Тернопільська дослідна станція Інституту ветеринарної медицини НААН, Тернопіль, Україна

****Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, Україна

Анотація. Проведення доклінічних досліджень розчинів новостворених дезінфікуючих засобів – це обов'язкова умова для подальшої апробації їх у виробничих умовах. Для цього застосовують різні методи визначення можливого токсичного впливу розчинів деззасобу на клітини найпростіших організмів і теплокровних тварин. Мета роботи – встановити токсичну концентрацію розчинів засобу «Ензидез» відносно лабораторного штаму WH-14 інфузорії *Tetrachymena pyriformis*. Визначення токсичності проводили з використанням паспортизованого штаму WH-14 інфузорії *Tetrachymena pyriformis*. Для цього готували розчини засобу «Ензидез» за температури +20 і +30 °C та вносили у них штамп інфузорії, витримували протягом 15 та 30 хв, відбирали матеріал для мікроскопії і підраховували кількість живих клітин тетрахімен у камері Горяєва. Встановлено, що за 0,25% концентрації розчинів деззасобу «Ензидез» протягом 15 хв дії виживаність найпростіших становила $88,7 \pm 0,4\%$. Вплив засобу у 0,25% концентрації на інфузорій протягом 30 хв зумовив зменшення їх кількості на 16,9%, порівняно з контрольним зразком. Проте ця концентрація згідно класифікації вважається не токсичною. За 0,5% концентрації засобу протягом 15 хв впливу спостерігали зменшення на 15,5% живих клітин інфузорій, а за 30 хв експозиції на 26,7%, порівняно з контролем. Відповідно експозиція цього розчину протягом 30 хв вважається слаботоксичною для тетрахімен. Найбільш токсичною для інфузорій виявилася 0,75% концентрація засобу «Ензидез». За якої протягом 15 хв впливу відмічали $61,3 \pm 0,2\%$ виживших клітин інфузорій, порівняно з контролем, такий режим вважався слаботоксичним для тетрахімен. При експозиції 30 хв, живих виявляли тільки $42,2 \pm 0,2\%$ інфузорій, тобто

такий режим вважається токсичний для *Tetrachymena pyriformis*. Отже, дезінфікуючий засіб «Ензидез» за концентрації 0,1–0,25% та температури розчинів від +20 до +30 °C протягом 30 хв впливу не токсичний щодо клітин інфузорій.

Ключові слова: дезінфікуючий засіб «Ензидез»; інфузорія *Tetrachymena pyriformis*; токсичність

Вступ

Проведення доклінічних досліджень розчинів новостворених дезінфікуючих засобів є обов'язковою умовою для подальшої апробації їх у виробничих умовах. При цьому застосовують різні методи визначення можливого токсичного впливу розчинів деззасобу на клітини найпростіших організмів та теплокровних тварин (Kovalenko et al., 2018).

В Україні використовують велику кількість дезінфікуючих засобів у галузі ветеринарної медицини, в харчовій промисловості, медицині, тощо (Zasekin et al., 2016; Salata et al., 2018; Kozlovska et al., 2018; Kukhtyn et al., 2019). Значна кількість дезінфікуючих засобів на ринку пов'язана з специфікою того чи іншого виробництва або закладу. Крім того постійно підвищуються вимоги до ефективності дезінфікуючих засобів та їхнього впливу на навколишнє середовище і живі організми (Kukhtyn et al., 2016; Shynkaruk et al., 2018). Тому для забезпечення ринку високоєфективними, безпечними та доступними деззасобами є проведення комплексу послідовних досліджень від розробки композиції до виробничих випробувань (Soltys et al., 2020; Paliy et al., 2020). Нами розроблено деззасіб «Ензидез» з вмістом дезінфікуючих речовин та протеолітичних і гліколітичних ензимів, який активний щодо біоплівкових форм бактерій за можливого органічного навантаження. Засіб застосовується для дезінфекції у клініках ветеринарної медицини для стерилізації ветеринарних виробів, інструментів хірургічного призначення та об'єктів ветеринарного нагляду. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект починаючи з 0,1% концентрації, добре проникає в капілярну систему будівельних матеріалів, слабокорозійний та має деякі миїні властивості (Kukhtyn et al., 2021; Kozhyn et al., 2021). Все вище наведене дає підставу до визначення токсичності розчинів засобу, як на клітинах найпростіших організмів, так на теплокровних тваринах.

Отже, з літературних даних видно, що в контексті виконання діючого законодавства щодо контролю за хімічними сполуками, прийнятою Організацією з економічного співробітництва та розвитку, при впровадженні у виробничу практику нового дезінфікуючого засобу токсикологічні дослідження є обов'язковим компонентом під час розробки препаратів.

Мета роботи – встановити токсичну концентрацію розчинів засобу «Ензидез» відносно лабораторного штаму WH-14 інфузорії *Tetrachymena pyriformis*.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено в лабораторії факультету ветеринарної медицини Подільського державного аграрного університету. Визначення токсичності розчинів розробленого нами дезінфікуючого засобу «Ензидез» проводили з використанням паспортизованого штаму WH-14 інфузорії *Tetrachymena pyriformis* згідно методики описаної в методичних рекомендаціях (Lemesh et al., 1997). Тобто готували розчини засобу «Ензидез» за температури 20 і 30°C та вносили у них штамі інфузорії, витримували протягом 15 та 30 хв, відбирали матеріал для мікроскопії і підрахування кількості виживших клітин тетрахімен в камері Горяєва. Час 15 та 30 хв експозиції було обрано з огляду на те, що засіб «Ензидез» використовують для дезінфекції поверхонь об'єктів ветеринарного нагляду протягом 15 та 30 хв. Усі дослідження проведено у трьох разовій повторності. Оцінку токсичності визначеної концентрації роз-

чину засобу «Ензидез» проводили враховуючи класифікацію наведену в табл. 1.

Статистичну обробку отриманих даних здійснено з використанням комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Отримані дані вважали достовірними при $P < 0,05$.

Результати

Розробка дезінфікуючих засобів – це складний етап проведення послідовних лабораторних і виробничих досліджень спрямованих на максимальне отримання даних щодо механізму дії засобу, його впливу на живі клітини та обґрунтованого вибору оптимальних і ефективних режимів використання за різних умов. Токсикологічні дослідження це обов'язкові дослідження, які визначають міру токсичності самого нативного засобу та його різних концентрацій. Саме токсикологічні дослідження дуже часто вносять корективи щодо робочої концентрації деззасобу, яку можна апробувати у виробничих умовах. Одним із методом токсикологічних досліджень є визначення міри токсичності розчинів дезінфікуючих засобів на клітинах інфузорій *Tetrachymena pyriformis*. Результати дослідження з визначення показників токсичності розчинів засобу «Ензидез» за температури +20 °C наведено в табл. 2.

З даних досліджень (табл. 2) видно, що за 0,1% концентрації засобу протягом 15 хв впливу кількість живих клітин інфузорій в полі зору мікроскопа становила $31,0 \pm 1,6$ штук, що достовірно не відрізнялося від кількості в контрольному зразку. Усі клітини тетрахімен були живим, активно рухливими, рухи природні, поступальні, деформації тіла та різних випячувань не відмічали. За такої кількості інфузорій дана концентрація розчину вважається не нетоксичною. Збільшення часу витримки інфузорій у розчині до 30 хв зумовило зменшення кількості тетрахімен, проти контрольного зразка. Зокрема, у досліді їх кількість становила $30,8 \pm 1,5$ штук у полі зору мікроскопа, що на 12,2% менше, ніж у контрольному зразку. Також відмічаються клітини інфузорій із сповільненим та не характерним рухом. Хоча відповідно до класифікації токсичності (табл. 1) за такої кількості живих клітин інфузорій розчини вважаються не токсичними.

З даних досліджень (табл. 2) видно, що за 0,1% концентрації засобу протягом 15 хв впливу кількість живих клітин інфузорій в полі зору мікроскопа становила $31,0 \pm 1,6$ штук, що достовірно не відрізнялося від кількості в контрольному зразку. Усі клітини тетрахімен були живим, активно рухливими, рухи природні, поступальні, деформації тіла та різних випячувань не відмічали. За такої кількості інфузорій дана концентрація розчину вважається не нетоксичною. Збільшення часу витримки інфузорій у розчині до 30 хв зумовило зменшення кількості тетрахімен, проти контрольного зразка. Зокрема, у досліді їх

Таблиця 1 – Класифікація міри токсичності засобу «Ензидез» за кількістю живих клітин інфузорій *Tetrachymena pyriformis* відповідно до методичних рекомендацій (Lemesh et al., 1997)

Показники токсичності	Кількість клітин живих інфузорій через 30–60 хв впливу, (%)
Нетоксичний	100–81
Слаботоксичний	80–50
Токсичний	49–0

Таблиця 2 – Показники токсичності дезінфікуючого засобу «Ензидез» за температури розчинів $+20 \pm 1$ °C на інфузоріях *Tetrachytena pyriformis* (лабораторний штам WH-14), n = 12

Концентрація засобу, %	Кількість живих інфузорій через 15 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 15 хв, %	Кількість живих інфузорій через 30 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 30 хв, %
0,1	31,0 ± 1,6	92,1 ± 0,5	30,8 ± 1,5	87,8 ± 0,4
0,25	29,9 ± 1,5	88,7 ± 0,4	29,1 ± 1,4	83,1 ± 0,4
0,5	28,5 ± 1,5	84,5 ± 0,4	27,1 ± 1,3	77,3 ± 0,3*
0,75	20,6 ± 1,2	61,3 ± 0,2*	14,8 ± 1,1	42,2 ± 0,2*
Контроль (вода)	33,7 ± 1,8	100	35,1 ± 1,8	100

Примітка: * – $P < 0,05$ – порівняно з контролем

кількість становила $30,8 \pm 1,5$ штук у полі зору мікроскопа, що на 12,2% менше, ніж у контрольному зразку. Також відмічаються клітини інфузорій із сповільненим та не характерним рухом. Хоча відповідно до класифікації токсичності (табл. 1) за такої кількості живих клітин інфузорій розчини вважаються не токсичними.

За 0,25% концентрації розчинів деззасобу «Ензидез» протягом 15 хв дії виживаність найпростіших становила $88,7 \pm 0,4\%$. Хоч кількість живих клітин була і меншою, як за 0,1 % концентрації розчину, проте дане зменшення не вважається токсичним для інфузорій. Вплив засобу у 0,25% концентрації на інфузорій протягом 30 хв зумовив зменшення їх кількості на 16,9%, порівняно з контрольним зразком. За такого режиму дії засобу відмічали деякі зміни руху інфузорій та незначні деформації, проте дана концентрація також згідно класифікації вважається не токсичною, хоча і знаходяться на нижній межі визначеного нормативного показника.

За 0,5% концентрації засобу протягом 15 хв впливу спостерігали зменшення на 15,5% живих клітин інфузорій, а за 30 хв експозиції на 26,7%, порівняно з контролем. Відповідно експозиція даного розчину протягом 30 хв вважається слаботоксичною для тетрахімен. У полі зору мікроскопа відмічали інфузорії з деформованими клітинами – наявність різних випячувань, сповільнення та наявність хаотичних рухів.

Найбільш токсичною для інфузорій виявилася 0,75% концентрація засобу «Ензидез». За якої протягом 15 хв впливу відмічали $61,3 \pm 0,2\%$ виживших клітин інфузорій, порівняно з контролем, такий режим вважався слаботоксичним для тетрахімен. При експозиції 30 хв, живих виявляли тільки $42,2 \pm 0,2\%$ інфузорій, тобто такий режим вважається токсичний для життєдіяльності *Tetrachytena pyriformis*. У даному випадку при мікроскопії наявна значна кількість інфузорій з патологічними змінами форми (короткі клітини) та з порушенням природного руху.

Отже, з досліду підсумовуємо, що за температури розчинів засобу «Ензидез» $+20 \pm 1$ °C слаботоксичною концентрацією для інфузорій вважається 0,5% з впливом 30 хв, а 0,75% концентрація виявилася слаботоксичною протягом 15 хв дії та токсичною протягом 30 хв експозиції.

Попередні наші дослідження виявили, що з підвищенням температури розчинів засобу «Ензидез» з $+20$ до $+40-60$ °C значно посилюється його протеолітична активність та мийна здатність внаслідок активізації ензимів засобу. Тому нами було досліджено токсичність розчинів дезінфектанту за температури $+30$ °C, так як за вищої температури інфузорія гине. Результати дослідження наведено в табл. 3.

Результати дослідження (табл. 3) показують, що з підвищенням температури розчинів засобу «Ензидез» з $+20$ °C до $+30$ °C посилюється їх токсичний вплив на клітини *Tetrachytena pyriformis*. Зокрема, видно, що розчини засобу за концентрації 0,1–0,25% та експозиції 15–30 хв незначно впливали на життєдіяльність інфузорій, так як кількість живих клітин становила не менше 80%, що аналогічно, як за температури $+20 \pm 1$ °C. Водночас, за концентрації деззасобу 0,5% токсичний вплив був сильніший, ніж за даної концентрації та температури $+20 \pm 1$ °C. Протягом 15 та 30 хв впливу засобу на інфузорії кількість виживших клітин становила $72,8 \pm 0,3\%$ та $64,5 \pm 0,3\%$ ($P < 0,05$), відповідно. За такої кількості інфузорій розчини даної концентрації вважаються слаботоксичними. У той же час за температури розчинів даної концентрації $+20$ °C їх вплив на інфузорій був нетоксичним (експозиція 15 хв) та слаботоксичним (експозиція 30 хв). Посилення токсичного впливу з підняттям температури, очевидно пов'язано з інтенсифікацією обмінних процесів в клітинах найпростіших, що виражається більшим споживанням засобу.

За 0,75% концентрації Ензидезу кількість живих клітин становила $45,6 \pm 0,1\%$ протягом 15 хв впливу та $31,3 \pm 0,06\%$ протягом 30 хв дії, тобто дана концентрація виявилася токсичною за обох режимів впливу.

Таблиця 3 – Показники токсичності дезінфікуючого засобу «Ензидез» за температури розчинів $+30 \pm 1$ °C на інфузоріях *Tetrachytena pyriformis* (лабораторний штам WH-14), n = 12

Концентрація засобу, %	Кількість живих інфузорій через 15 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 15 хв, %	Кількість живих інфузорій через 30 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 30 хв, %
0,1	29,8 ± 1,3	90,0 ± 0,4	30,1 ± 1,3	86,2 ± 0,4
0,25	28,8 ± 1,2	87,1 ± 0,3	28,4 ± 1,2	81,4 ± 0,3
0,5	24,1 ± 1,1	72,8 ± 0,3*	22,5 ± 1,2	64,5 ± 0,3*
0,75	15,1 ± 0,8	45,6 ± 0,1*	10,9 ± 0,6	31,3 ± 0,06*
Контроль (вода)	33,1 ± 1,6	100	34,9 ± 1,5	100

Примітка: * – $P < 0,05$ – порівняно з контролем

Обговорення

Розробка дезінфікуючих засобів передбачає проведення токсикологічних досліджень на різних живих модельних об'єктах для встановлення класу його токсичності та впливу на навколишнє середовище. У цьому дослідженні було визначено токсичність новоствореного дезінфікуючого засобу «Ензидез» з вмістом четвертиноамонієвих сполук, похідних бігуанідину та ензимами на культуру лабораторного штаму *Tetrachymena pyriformis*. Встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» за концентрації 0,1–0,25% та температури розчинів від +20 до +30°C протягом 30 хв впливу не був токсичний щодо клітин інфузорій. Розчини деззасобу «Ензидез» за концентрації 0,5% проявляли слаботоксичний вплив тільки за експозиції протягом 30 хв., а з підвищенням температури до +30°C і за 15 хв впливу. Дезінфектант у 0,75% концентрації спричиняв слаботоксичну дію на тетрахімени за +20°C протягом 15 хв впливу та токсичну протягом 15 і 30 хв дії за температури розчинів +30°C. Це вказує на те, що при застосуванні для дезінфекції розчинів у 0,5% концентрації та вище необхідно використовувати рукавички та засоби індивідуального захисту. У дослідженнях (Salata et al., 2018) зазначається, що мийно-дезінфікуючий «Сан-актив», який містить четвертиноамонієві сполуки також був слаботоксичним та токсичним за концентрації розчинів 1,5 та 2,0% на клітини тетрахімен. Дезінфікуючі засоби Barez, Biochlor і Geocide (Kovalenko et al., 2018), які у своєму складі мають діючі речовини похідні бігуанідину також проявляли токсичний вплив за використання у робочих концентраціях на *Tetrachymena pyriformis*. Водночас у дослідженнях мийний засіб на основі ферментів не проявляв токсичного впливу за робочої концентрації на клітини найпростіших (Shynkaruk et al., 2018). Тому ми вважаємо, що дезінфікуючі субстанції із класу похідних бігуанідину та ЧАС є токсичними на клітини тетрахімен за використання їх у деззасобах у бактерицидних концентраціях. Тому за проведення дезінфекції даними засобами необхідно дотримуватися загальних правил охорони праці з використанням рукавиць, окулярів та захисного одягу.

Висновки

Дезінфікуючий засіб «Ензидез» виявився слаботоксичним щодо клітин паспортизованого штаму *Tetrachymena pyriformis* у 0,5% концентрації протягом 30 хв впливу за температури розчинів +20°C та протягом 15 хв за температури розчинів +30°C. За 0,75% концентрації засіб проявляв в основному токсичний вплив на клітини інфузорій, як за температури розчинів +20°C, так +30°C протягом 15 та 30 хв дії.

Перспективи подальших досліджень полягають у проведенні подальших токсикологічних досліджень (гострої і хронічної токсичності) розчинів засобу «Ензидез» з використанням теплокровних тварин для встановлення безпечної його концентрації.

References

Kovalenko, V. L., Kovalenko, P. L., Ponomarenko, G. V., Kukhtyn, M. D., Midyk, S. V., Horiuk, Y. V., & Garkavenko, V. M. (2018). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells under the influence of disinfectants Barez®, Biochlor® and Geocide®. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 547–550.

- Kozhyn, V., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Vichko, O., & Kryzhanivsky, Y. (2021). The activity of the disinfectant “Enzidez” against bacteria in biofilms. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 23(101), 67–74.
- Kozlovskaya, I., Kornaga, S., Kykhtyn, M., Horiuk, Y., & Karatieieva, S. (2018). Formation of biofilms by bacteria excreted from chronic anal fissure and the influence of the direct current electric field on them. *Georgian Medical News*, (279), 12–18.
- Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Malimon, Z., Horiuk, Y., Yashchuk, T., & Kernychnyi, S. (2021). Activity of disinfecting biocides and enzymes of proteases and amylases on bacteria in biofilms. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 27 (4), 495-502.
- Kukhtyn, M., Kravcheniuk, K., Beyko, L., Horiuk, Y., Skliar, O., & Kernychnyi, S. (2019). Modeling the process of microbial biofilm formation on stainless steel with a different surface roughness. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 2(11 (98)), 14–21.
- Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Stravskyy, Y. S. (2016). Bacterial biofilms formation of cattle mastitis pathogens. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 2(4), 30–32.
- Lemesh V. M., Pakhomov P. I., Yanchenko A. Ye., Titova L. G., & Anisimova N. N. (1997). *Metodicheskie ukazaniya po toksikobiologicheskoy otsenke myasa, myasnykh produktov i moloka s ispolzovaniem infuzorii Tetrakhimeny periformis (ekspresmetod)* [Methodical instructions for toxic biological evaluation of meat, meat products and milk using infusoria *Tetrachimenes periformis* (express method)] Guidelines. Vitebsk (in Russian).
- Paliy, A. P., Kovalenko, V. L., Ponomarenko, G. V., Kukhtyn, M. D., Paliy, A. P., Bodnar, O. O., Rebenko, H. I., Kozzytska, T. G., Makarevich, T. V., & Ponomarenko, O. V. (2020). Evaluation of acute toxicity of the «Orgasept» disinfectant. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(4), 273–278.
- Salata, V., Kukhtyn, M., Pekriy, Yu., Horiuk, Yu., & Horiuk, V. (2018). Activity of washing-disinfecting means “San-active” for sanitary treatment of equipment of meat processing enterprises in laboratory and manufacturing conditions. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 1(1), 10–16.
- Shynkaruk, O. Yu., Kukhtyn, M. D., Vichko, O. I., Shved, O. V., Marintsova, N. H. (2018). Kharakterystyka myinoho zasobu “enzymy” za zdatnistiu ruinuвання mikrobykh bioplivok. *Visnyk Natsionalnoho universytetu «Lvivska politekhnika». Seriya Khimii, tekhnologii rehovyn ta yikh zastosuvannya*, 886, 158–162 (in Ukrainian).
- Soltys, M. P., Gunchak, V. M., Rudyk, H. V., & Vasiv, R. O. (2020). Dynamics of morphological and biochemical parameters in the blood of white mice under the action of the drug “Vitosept.” *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 22(99), 167–172.
- Zasekin, D., Dymko, R., Serdyukov, J., & Kovalenko, V. (2016). Pathological changes in white mice organism under the influence of various doses of disinfectant “Univayt.” *Naukovi Dopovidi Nacional'nogo Universitetu Bioresursiv i Prirodokoristuvannâ Ukraini*, 3(60).