



UDC 614.91:615.281.9.038

Bactericidal properties of disinfectant «Enzidez»

V. A. Kozhyn

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Ukraine

Article info

Received 06.05.2021

Received in revised
form

09.09.2021

Accepted

29.11.2021

State Agrarian and
Engineering University
in Podilya, 13,
Schevchenko
str., Kamianets-
Podilskyi, Khmelnytskyi
region, 32300, Ukraine
E-mail:

vlad.kozhyn@gmail.com

Kozhyn, V. A. (2021). Bactericidal properties of disinfectant «Enzidez». *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 8, 27-33, DOI: 10.31890/vttp.2021.08.04.

*Disinfection as a component of veterinary and sanitary measures ensures the well-being of livestock, increasing of animal productivity and obtaining safe raw materials. Therefore, the development of disinfectants that have a wide range of antimicrobial action and at the same time affect bacterial biofilms is relevant. The aim of the study was to determine the minimum bactericidal concentration, phenolic coefficient and protein index of the new disinfectant "Enzidez". Museum strains of test cultures of *E. coli* (055K59 №3912 / 41), *S. aureus* (ATCC 25923) and *P. aeruginosa* (27/99) were used in the experiments. The minimum bactericidal concentration of Enzidez disinfectant solutions, the phenolic ratio and the protein index were determined by generally accepted suspension methods.*

*It was found that the microorganisms *E. coli* and *P. aeruginosa* were more sensitive to the disinfectant "Enzidez" compared to *S. aureus*. By exposure for 15 min the minimum bactericidal dilution against *S. aureus* was on average 1.9 times ($p < 0.05$) higher than the bactericidal dilution against *E. coli* and 3.8 times ($p < 0.05$) in relation to *P. aeruginosa*. By 30-minute exposure the difference between the minimum bactericidal dilution against *S. aureus* and against *E. coli* and *P. aeruginosa* was 1.3 and 2.7 times less ($p < 0.05$), respectively. Thus, with increasing exposure time from 15 to 30 minutes the concentration of the agent for the destruction of gram-positive and gram-negative microorganisms decreases significantly.*

*It was found that the bactericidal activity of the disinfectant "Enzidez" against the strain *S. aureus* №ATCC 25923 was on average 12.7 times stronger than the bactericidal action of the phenol solution. The bactericidal activity of Enzides against *E. coli* and *P. aeruginosa* strains was 24.0 and 28.8 times stronger, respectively compared with the action of phenol.*

*The presence of protein (blood serum) in the medium leads to a slight decrease in the bactericidal activity of Enzides solutions. In particular, the bactericidal activity of Enzides against *S. aureus* is reduced by an average of 1.4 times, provided the presence of 10% of serum in the medium. The bactericidal activity of Enzides against *E. coli* and *P. aeruginosa* in the presence of protein decreased by 1.35 and 1.45 times, respectively. Thus, the disinfectant "Enzidez" is quite active even in the presence of protein in the medium.*

Key words: *Enzidez, minimal bactericidal action, phenolic coefficient, protein index.*

Бактерицидные свойства дезинфицирующего средства «Ензидез»

В. А. Кожин

Подольский государственный аграрно-технический университет, Украина

Дезинфекция, как составляющая всех ветеринарно-санитарных мероприятий, обеспечивает благополучие животноводства, повышение продуктивности животных и получения безопасного сырья. Поэтому разработка дезинфицирующих средств, которые обладают широким спектром антимикробного действия и при этом влияют на бактериальные биопленки является актуальной. Целью работы было определить минимальную бактерицидную концентрацию, фенольный коэффициент и белковый индекс нового дезинфицирующего средства «Ензидез». В опытах использовали музейные штаммы тест-культур *E. coli* (055K59 №3912 / 41), *S. aureus* (ATCC 25923) и *P. aeruginosa* (27/99). Минимальную бактерицидную концентрацию растворов дезинфицирующего средства «Ензидез», фенольный коэффициент и белковый индекс определяли общепризнанным суспензионными методами.

Установлено, что микроорганизмы *E. coli* и *P. aeruginosa* оказались более чувствительны к действию дезинфицирующего средства «Ензидез» по сравнению с *S. aureus*. По экспозиции в течение 15 мин минимальное бактерицидное разведение относительно *S. aureus* было в среднем в 1,9 раза ($p < 0,05$) больше по сравнению с бактерицидным разведением относительно *E. coli* и в 3,8 раза ($p < 0,05$) относительно *P. aeruginosa*. По экспозиции в течение 30 мин разница между минимальным бактерицидным разведением относительно *S. aureus* и относительно *E. coli* и *P. aeruginosa* была меньше в 1,3 и 2,7 раза ($p < 0,05$) соответственно. То есть с увеличением времени экспозиции с 15 до 30 мин концентрация средства для уничтожения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов существенно снижается.

Выявлено, что бактерицидная активность дезсредства «Ензидез» в отношении штамма *S. aureus* №ATCC 25923 была, в среднем 12,7 раза сильнее по сравнению с бактерицидным действием раствора фенола. Бактерицидная активность Ензидеза в отношении штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* оказалась в 24,0 и 28,8 раза сильнее, соответственно, по сравнению с действием фенола.

Наличие в среде белка (сыворотки крови) приводит к некоторому снижению бактерицидной активности растворов Ензидеза. В частности бактерицидная активность Ензидеза относительно *S. aureus* снижается, в среднем в 1,4 раза, при условии присутствия в среде 10% сыворотки крови. Бактерицидная активность Ензидеза относительно *E. coli* и *P. aeruginosa* при наличии белка снижалась в 1,35 и 1,45 раза соответственно. Таким образом, дезинфицирующее средство «Ензидез» является достаточно высокоактивным даже при наличии в среде белка.

Ключевые слова: «Ензидез», минимальная бактерицидное действие, фенольный коэффициент, белковый индекс.

Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез»

В. А. Кожин

Подільський державний аграрно-технічний університет, Україна

В статті наведено результати дослідження з визначення мінімальної бактерицидної концентрації, фенольного коефіцієнту та білкового індексу нового дезінфікуючого засобу «Ензидез». Встановлено, що розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» є високоактивним відносно тест-культур мікроорганізмів *S. aureus*, *E. coli* і *P. aeruginosa*.

Ключові слова: «Ензидез», мінімальна бактерицидна дія, фенольний коефіцієнт, білковий індекс.

Вступ

Актуальність теми. Дезінфекція, як складова усіх ветеринарно-санітарних заходів, забезпечує благополуччя тваринництва, підвищення продуктивності тварин, та отримання безпечної сировини (Berhilevych et al., 2017; Kovalenko et al., 2020). Проте, вона може бути дієва лише за умови застосування ефективних дезінфікуючих засобів активних щодо широкого кола збудників хвороб тварин і людей (Kukhtyn et al., 2017; Kovalenko et al., 2018). Метою дезінфекції є знищення або зниження мікроорганізмів до прийняттого рівня, а також запобігання та контроль утворення біологічних відкладень на технологічному обладнанні (Salata, Kukhtyn, Pekriy, Horiuk, & Horiuk, 2018; Kovalenko et al., 2020).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Сучасні методи дезінфекції передбачають застосування таких хімічних речовин, як спирти, альдегіди, аніліди, бігуаніди, біс-феноли, діамідини, галоген-вивільняючі агенти, галофеноли, кислоти, похідні важких металів, пероксиди, феноли та крезололи, четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), хлор-вивільняючі агенти та озон (Abdallah et al., 2014; Салата та ін., 2015). Проте мікробні популяції по-різному реагують на кожну хімічну сполуку, зокрема можуть захищатися від антибактеріальних речовин завдяки здатності продукувати ензими, які знищують біоциди, завдяки зміні проникності клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани для запобігання потрапляння біоциду всередину (Augustin, Ali-Vehmas, & Atroshi, 2004 Römmling, & Balsalobre, 2012). Також один із біологічних механізмів захисту мікробних клітин від дії біоцидів – це їх здатність формувати біоплівки (Kozlovska et al., 2017; Kukhtyn et al., 2019). Мікробна біоплівка – це утворення, що складається з одного або декількох видів чи родів бактерій, які прикріплені до біогенної чи абіогенної поверхні та оточені власно продукуючим екзополісахаридним матриксом (Costerton et al., 2003; Horiuk et al., 2019). Тому науковці при створенні дезінфікуючих засобів використовують та поєднують між собою дезінфікуючі субстанції із різних груп, дія яких направлена на пригнічення активності різних ферментних систем бактеріальної клітини, руйнування її структурних елементів та деградації біоплівки (Leroy, Delbarre, Ghillebaert, Compere, & Combes, 2008; El-Azizi, Farag, & Khardori, 2016; Jin et al., 2020).

Нами на факультеті ветеринарної медицини Подільського державного аграрно-технічного університету було розроблено та апробовано у лабораторних умовах дезінфікуючий засіб «Ензидез» у складі якого наступні діючі речовини: полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду, четвертинно амонієва сполука, протеолітичні і амілолітичні ензими, комплекси та інгібітори корозії. Дезінфікуючий засіб призначений для активної дії на мікроорганізми, які перебувають у біоплівках (Kozhyn, Kukhtyn, Horiuk, Vichko, & Kryzhanivsky, 2021).

При цьому, принципово щоб при виборі одного або декількох біоцидів проводилася оцінка ефективності знищення домінуючих мікроорганізмів, які присутні на кожному конкретно взятому об'єкті. Тільки отримавши інформацію про природу мікробної популяції на поверхнях, що підлягають дезінфекції можна визначити взаємозв'язок між мінімальною бактерицидною концентрацією та тривалістю контакту з біоцидом (Kovalenko et al., 2020, Kovalenko et al., 2020). Адже неправильне застосування дезінфектантів призводить до неефективної дезінфекції та формування стійкості у мікроорганізмів до діючих речовин деззасобів (Kovalenko et al., 2018; Salata, Kukhtyn, Perki, & Suprovych, 2015; Nemati et al., 2020).

Отже, розробка дезінфікуючих засобів, які володіють широким спектром антимікробної дії, при цьому впливають на біоплівкові форми мікроорганізмів та активні за наявності в середовищі органічних речовин є актуальним і перспективним.

Метою роботи було визначити мінімальну бактерицидну концентрацію, фенольний коефіцієнт та білковий індекс нового дезінфікуючого засобу «Ензидез».

Матеріали і методи досліджень

Робота виконана в Подільському державному аграрно-технічному університеті. У досліджах використали музейні штами тест-культур *E. coli* (055K59 №3912/41), *S. aureus* (ATCC 25923) і *P. aeruginosa* (27/99). Мінімальну бактерицидну концентрацію розчинів дезінфікуючого засобу «Ензидез» визначали загальноовизнаним суспензійним методом згідно методичних рекомендацій (Kovalenko et al., 2020). Коротко: використовували по 3 стерильні пробірки (три повторюваності випробувань) кожного розведення дезінфікуючого засобу, що розлитий в об'ємі по 4,5 см³. У всі пробірки з розведеннями дезінфікуючого засобу вносили по 0,5 см³ виготовленої відповідної суспензії тест-культур мікроорганізмів (0,5 см³ суспензії містить 1,0x10⁹ мікробних клітин/см³), ретельно перемішували та витримували їх у розчині дезінфектанту протягом 15 та 30 хв. Після закінчення встановленої експозиції припиняли дію дезінфектанту на тест-культури шляхом застосуванням хімічного нейтралізатору наступного складу: твін-80 (3 %), сапонін (0,5 %), гістидин (0,1 %), цистеїн (0,1 %). Після чого відсівали 1 см³ розчину у 10 см³ м'ясопептонного бульйону та інкубували за температури 37 °С протягом 24 год. Оцінювали ріст мікроорганізмів у м'ясопептонному бульйоні (бульйон прозорий – ріст відсутній (бактерицидна дія)); бульйон каламутний та з осадом – наявність росту тест-культури (відсутність бактерицидної дії).

Фенольний коефіцієнт та білковий індекс деззасобу «Ензидез» визначали загальноовизнаним методом згідно методик, що описані у методичних рекомендаціях (Yakubchak, Khomenko, & Kovalenko, 2005).

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

Результати та їх обговорення

Важливим завданням під час розробки нового дезінфікуючого засобу є визначення його мінімальної бактерицидної концентрації відносно музейних тест-культур мікроорганізмів. Адже саме визначена мінімальна бактерицидна концентрація деззасобу вважається першочерговим орієнтиром для проведення подальших досліджень із встановленням робочої концентрації ефективної у виробничих умовах. Тому після конструювання складу дезінфікуючого засобу нами було визначено його мінімальну бактерицидну концентрацію. Результати досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-культури бактерій, n=9

№ п/п	Розведення	Концентрація речовини, %	Ріст тест-культур мікроорганізмів за експозиції, хв.					
			<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
			15	30	15	30	15	30
1	1:50	2	–	–	–	–	–	–
2	1:70	1,428	–	–	–	–	–	–
3	1:98	1,020	–	–	–	–	–	–
4	1:137,2	0,728	–	–	–	–	–	–
5	1:192,8	0,520	–	–	–	–	–	–
6	1:268,8	0,371	–	–	–	–	–	–
7	1:376,5	0,265	–	–	–	–	–	–
8	1:527,1	0,187	–	–	–	–	–	–
9	1:737,9	0,134	–	–	–	–	–	–
10	1:1033,1	0,0968	–	–	–	–	–	–
11	1:1466,3	0,0691	–	–	–	–	–	–
12	1:2024,8	0,0493	+	–	–	–	–	–
13	1:2834,7	0,0352	+	–	–	–	–	–
14	1:3698,0	0,0251	+	+	+	–	–	–
15	1:5566,0	0,01799	+	+	+	+	–	–
16	1:7778,4	0,012856	+	+	+	+	+	–
17	1:10389,8	0,009182	+	+	+	+	+	+
18	1:21343,9	0,006559	+	+	+	+	+	+
Контроль: вода дистильована			+	+	+	+	+	+

Примітки:

1. «+» – наявний ріст тест-культур мікроорганізмів;
2. «–» – відсутній ріст тест-культур мікроорганізмів.

З даних, що отримані та наведені у табл. 1 видно, що з досліджених тест-культур мікроорганізмів взятих у дослід, найбільш стійкий до розчинів дезінфікуючого засобу «Ензидез» виявився *S. aureus*. За 15 хв експозиції мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом). Збільшення часу експозиції з 15 до 30 хв сприяло підвищенню бактерицидної активності Ензидезу, внаслідок чого його мінімальне бактерицидне розведення знизилася відносно *S. aureus* до 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом).

Тест-культура *E. coli* виявилася більш чутлива до деззасобу «Ензидез», у порівнянні з *S. aureus*. Зокрема мінімальне бактерицидне розведення, яке зупиняло ріст і розвиток *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом), а за дії протягом 30 хв на одне розведення нижче 1:3698,0 (0,0251 % за препаратом).

Синьогнійна паличка також була досить чутлива до деззасобу «Ензидез», тому що, мінімальне бактерицидне розведення за експозиції 15 хв становило 1:5566,0 (0,01799 % за препаратом), що у 1,9 раза ($p < 0,05$) менше, у порівнянні з мінімальним бактерицидним розведенням відносно *E. coli*. Аналогічна закономірність щодо зниження мінімальної бактерицидної концентрації, відмічалася і за експозиції протягом 30 хв.

Отже, з проведених досліджень видно, що грамнегативні мікроорганізми *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез», у порівнянні з грампозитивними – *S. aureus*. За експозиції протягом 15 хв мінімальне бактерицидне розведення відносно *S. aureus* було в середньому в 1,9 раза ($p < 0,05$) більше, у порівнянні з бактерицидним розведенням відносно *E. coli* та в 3,8 рази ($p < 0,05$) відносно *P. aeruginosa*, відповідно. За експозиції протягом 30 хв різниця між мінімальним бактерицидним розведенням відносно *S. aureus* та щодо *E. coli* і *P. aeruginosa* була менша в 1,3 та 2,7 рази ($p < 0,05$), відповідно. Тобто із збільшенням часу експозиції з 15 до 30 хв концентрація засобу для знищення грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів суттєво знижується.

Таким чином, дезінфікуючий засіб «Ензидез» є високоактивним відносно широкого спектру мікрофлори у досить низьких концентраціях.

У виробничих умовах дезінфікуючі засоби при нанесенні на різні поверхні контактують і вступають в реакцію із різними біологічними субстратами, внаслідок чого їхня бактерицидна активність може дещо знижуватися. Тому доцільно провести дослідження, які показують зниження бактерицидної активності деззасобу за наявності на дезінфікуючій поверхні білкових речовин. Це дасть змогу опосередковано отримати дані у лабораторних умовах можливого зниження дезінфікуючої дії при нанесенні на поверхні у виробничих реаліях. Результати дослідження з визначення фенольного та білкового індексу дезінфікуючого засобу "Ензидез" щодо тест-культур мікроорганізмів наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Фенольний та білковий індекс дезінфікуючого засобу "Ензидез" щодо тест-культур *E. coli*, шт. 055K59 №3912/41, *S. aureus* шт. ATCC 25923 та *P. aeruginosa* шт. 27/99, n=9

Розчин деззасобу у спів-відношенні	Бактерицидне розведення Бактерицидна концентрація		Середній фенольний коефіцієнт	Білковий індекс
	експозиція 15 хв.	експозиція 30 хв.		
щодо <i>S. aureus</i> шт. ATCC 25923				
Фенол 1:50	1 : 137,2 0,72 %	1 : 192,8 0,52 %	-	-
Ензидез 1:50	1 : 1466,3 0,069%	1 : 2834,7 0,035 %	12,7	-
Ензидез + білок	1 : 1033,1 0,1 %	1 : 2024,8 0,05 %	-	1,4
щодо <i>E. coli</i> , шт. 055K59 №3912/41				
Фенол 1:50	1 : 98 1,01 %	1 : 192,8 0,52 %	-	-
Ензидез 1:50	1 : 2834,7 0,035 %	1 : 3698,0 0,025 %	24,0	-
Ензидез + білок	1 : 2024,8 0,051 %	1 : 2834,7 0,035 %	-	1,35
щодо <i>P. aeruginosa</i> шт. 27/99				
Фенол 1:50	1 : 192,8 1,52 %	1 : 268,8 0,37 %	-	-
Ензидез 1:50	1 : 5566,0 0,017 %	1 : 7778,4 0,012 %	28,8	-
Ензидез + білок	1 : 3698,0 0,025 %	1 : 5566,8 0,017 %	-	1,45

З даних досліджень, що наведені в табл. 2 видно, що бактерицидна активність деззасобу «Ензидез» відносно штаму *S. aureus* №ATCC 25923 була, в середньому 12,7 раза сильніша, порівняно з бактерицидною дією розчину фенолу. Бактерицидна активність Ензидезу відносно штамів *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилася в 24,0 та 28,8 раза сильніша, відповідно, порівняно з дією фенолу.

Наявність у середовищі білка (сироватки крові) призводить до деякого зниження бактерицидної активності розчинів Ензидезу. Зокрема бактерицидна активність Ензидезу відносно *S. aureus* знижується, в середньому в 1,4 раза, за умови присутності у середовищі 10 % сироватки крові. Бактерицидна активність Ензидезу відносно *E. coli* і *P. aeruginosa* за наявності білка знижувалася в 1,35 та 1,45 раза, відповідно.

Отже, з даних, що отримані впливає, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» досить високоактивний навіть за наявності у середовищі білка. Це пояснюється наявністю у складі засобу протеолітичних ензимів, які розкладають білки і тим самим сприяють кращому контакту дезінфікуючої субстанції з мікробними клітинами.

Висновки

1. Встановлено, що розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» є високоактивним відносно тест-культур мікроорганізмів. Мінімальне бактерицидне розведення деззасобу за експозиції 15 хв відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом), а за 30 хв – 1:2834,7 (0,0352 %). *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез», у порівнянні з *S. aureus*. Зокрема мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом), а відносно *P. aeruginosa* в 1,9 раза ($p < 0,05$) нижче, у порівнянні з розведенням відносно *E. coli*.

2. Наявність у середовищі білка призводить до деякого зниження бактерицидної активності розчинів Ензидезу. Зокрема бактерицидна активність Ензидезу відносно *S. aureus* знижується, в середньому в 1,4 рази, за умови присутності у середовищі 10 % сироватки крові. Бактерицидна активність Ензидезу відносно *E. coli* і *P. aeruginosa* за наявності білка знижувалася в 1,35 та 1,45 рази, відповідно.

References

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, 196(7), 453–472. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroschi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of pharmacy and pharmaceutical science* 7, 55-64.
- Berhilevych O. M., Kasianchuk, V. V., Kukhtyn, M. D., Lotskin, M., Garkavenko, T. O., & Shubin, P. A. (2017). Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 559–563. <https://doi.org/10.15421/021786>.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., & Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of clinical investigation*, 112(10), 1466–1477. <https://doi.org/10.1172/JCI20365>.
- El-Azizi, M., Farag, N., & Khardori, N. (2016). Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 47, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.06.002>.
- Hemati, S., Kouhsari, E., Sadeghifard, N., Maleki, A., Omid, N., Mahdavi, Z., & Pakzad, I. (2020). Sub-minimum inhibitory concentrations of biocides induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *New microbes and new infections*, 38, 100794. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100794>.
- Horiuk, Yu., Kukhtyn, M., Kovalenko, V., Kornienko, L., Horiuk, V., Liniichuk, N. (2019). Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. *Independent journal of management and production (IJM&P)*, 7 (10), 897-910. <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012>.
- Jin, M., Liu, L., Wang, D. N., Yang, D., Liu, W. L., Yin, J., Yang, Z. W., Wang, H. R., Qiu, Z. G., Shen, Z. Q., Shi, D. Y., Li, H. B., Guo, J. H., & Li, J. W. (2020). Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *The ISME journal*, 14(7), 1847–1856. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0656-9>.
- Kovalenko, A. M., Tkachev, A. V., Tkacheva, O. L., Gutyj, B. V., Prystupa, O. I., Kukhtyn, M. D. ... Kotelevych, V. A. (2020). *Analgesic effectiveness of new nanosilver drug*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(1), 300–306. https://doi.org/10.15421/2020_47
- Kovalenko, V. L., Garkavenko, T. O., Gorbatyuk, O. I., Kozytska, T.G., Garkavenko, V. M., & Ordynska D. O. (2019). *Metodychni rekomendatsii z vyznachennia bakterytsydnoi aktyvnosti ta kontroliu vidsutnosti bakteriostatychnoho efektu dezinfikuiuchykh zasobiv*. Metodychni rekomendatsii. Kiev. [in Ukrainian].
- Kovalenko, V. L., Kovalenko, P. L., Ponomarenko, G. V., Kukhtyn, M. D., Midyk, S. V., Horiuk, Yu. 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. http://dx.doi.org/10.15421/2018_248
- Kovalenko, V.L., Ponomarenko, G.V., Kukhtyn, M.D., Paliy, A.P., Bodnar, O.O., Rebenko, H.I., Kozytska, T.G., Makarevich, T.V., Ponomarenko, O.V., Paliy, A.P. (2020). Evaluation of acute toxicity of the "Orgasept" disinfectant. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(4), 273-278. http://dx.doi.org/10.15421/2020_1982.
- Kozhyn, V., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Vichko, O., & Kryzhanivsky, Y. (2021). The activity of the disinfectant "Enzidez" against bacteria in biofilms. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23(101), 67-74. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10112>.
- Kozlovska, I. M., Romanjuk, N. Y., Romanjuk, L. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., & Karpyk, G. V. (2017). The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 577–582. <https://doi.org/10.15421/021789>.
- Kukhtyn, M., Berhilevych, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 5(11 (89)), 26–33. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488>.
- 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. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.160142>.

- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., & Combes, D. (2008). Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling*, 24(1), 11–22. <https://doi.org/10.1080/08927010701784912>.
- Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine*, 272(6), 541–561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>.
- Salata, V. Z., Kukhtyn, M. D., Perkii, Yu. B. & Suprovych, T. M. (2015). Bakterytsydna aktyvnist myino-dezinfikuiuchoho zasobu «San-aktyv» na test-obiektakh vidnosno *E. coli* ta *S. aureus*. *Problemy zooinzhenerii ta veterynarnoi medytsyny: Zbirnyk naukovykh prats Kharkivskoi derzhavnoi zooveterynarnoi akademii*. «*Veterynarni nauky*», 31 (2), 245–248. [in Ukrainian].
- Salata, V., Kukhtyn, M., Pekriy, Y., Horiuk, Y., & 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.32718/ujvas1-1.02>.
- Yakubchak, O. M., Khomenko, V. I., & Kovalenko, V. L. (2005). *Rekomendatsii shchodo sanitarno-mikrobiolohichnoho doslidzhennia zmyviv z poverkhon test-obiektiv ta obiektiv veterynarnoho nahliadu i kontroliu: metodychni rekomendatsii*. Metodychni rekomendatsii. Kiev. [in Ukrainian].