УДК 619:616.98-076:579.852
DOI: 10.31073/vet_biotech41-01

БЕЗИМЕННИЙ М.В.*, e-mail: nomax@ukr.net,
ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН

ЗАСТОСУВАННЯ ДЕЗІНФЕКЦІЙНОГО ЗАСОБУ В ПОЄДНАННІ З ГЕРМІНАНТОМ ДЛЯ ЗНЕШКОДЖЕННЯ СПОР БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* У ҐРУНТІ

У статті наведені результати вивчення комплексного підходу до знезараження ґрунту, контамінованого спорами бактерій роду Bacillus (B. cereus ATCC10702, B. anthracis UA 07 (непатогенний вакцинний штам), що передбачає застосування запропонованої нами рецептури гермінанту (інозин – 0,05%; L-гістидин – 0,05%; L-валін – 0,05%; L-серин – 0,05%) та комплексного дезінфекційного засобу (суміш 1:1 розчинів бензалконію хлориду (0,5%) та дидецилдиметиламонію хлориду (0,5%), які забезпечують знешкодження збудника (на 99,9%).

Застосування такого підходу до деконтамінації сприятиме зменшенню мікробного фону та знешкодженню патогенної та умовно-патогенної мікрофлори у ґрунтах, контамінованих спороутворюючими мікроорганізмами.

Ключові слова: *Bacillus anthracis, спори, гермінант, деконтамінація, дезінфектант.*

Вступ. Сибірка – це зоонозне захворювання, що викликається грампозитивною бактерією *Bacillus anthracis*, патогеном, який передається головним чином через ґрунт. Збудник реєструється на всіх населених континентах [1].

За оцінками, у світі щорічно реєструється до 150 000 випадків захворювання на сибірку щорічно, при цьому найбільша кількість випадків припадає на країни, що розвиваються [2, 3].

У контексті біологічного тероризму важливе значення має надзвичайна стійкість спор збудника до умов навколишнього середовища та здатність зберігатися у навколишньому середовищі протягом багатьох років [4].

У природі епізоотичний цикл сибірки характеризується тривалою персистенцією спор у ґрунті. Травоїдні домашні тварини заражаються під час випасу або за згодовування рослинного корму, контамінованого спорами сибірки під час заготівлі [5, 6].

* Аспірант, науковий керівник – канд. вет. наук **О.А. Тарасов**

Використання гермінантів, тобто речовин, під впливом яких відбувається швидке проростання спор, може сприяти заходам з деконтамінації субстратів, інфікованих спорами бактерій різних видів. Згідно з літературними даними, композиції складних гермінантів мають певну специфічність у відношенні до родів і навіть видів бактерій, що за застосування препаратів в мікробіоценозах сприяє селективному проростанню спор певних видів бактерій [7–10].

У деяких методичних матеріалах і рекомендаціях зарубіжних авторів зауважується, що зменшення кількості мікроорганізмів на 5 логарифмів (або більше) є достатнім для деконтамінації, оскільки це означає, що після проведення процедур деконтамінації кількість мікроорганізмів у зоні обробки зменшується на п’ять порядків величин у порівнянні з вихідним рівнем (99,9% та більше) [8–11].

Застосування гермінантів має також прикладне значення для забезпечення якісної інактивації спор збудника сибірки, оскільки вегетативні форми мають значно нижчу стійкість до умов навколишнього середовища та дезінфекційних речовин порівняно із споровими формами [11–15].

Оскільки проблема сибірки в Україні нині є актуальною, дослідження направлені на знешкодження спор бактерій, включаючи збудника сибірки, є важливими для успішної ерадикації патогенів на території України.

Мета роботи. Вивчити ефективність деконтамінації спор бактерій роду *Bacillus* за застосування комплексного дезінфекційного засобу (суміш 1:1 розчинів бензалконію хлориду 0,5% та дидецилдиметиламонію хлориду 0,5%) в поєднанні із гермінантом (водний розчин суміші амінокислот, що специфічно впливає на проростання спор бактерій роду *Bacillus*).

Матеріали і методи досліджень. Під час проведення досліджень використовували тестові мікроорганізми *B. cereus ATCC10702, B. anthracis UA 07* (непатогенний вакцинний штам), *Bacillus subtilis 7241* (з колекції ІВМ НААН).

Чисту культуру для проведення досліджень отримували, висіваючи її на тверде живильне середовище (агар BHI) та інкубуючи протягом 48 годин за температури 35±0,5°С. Колонії мікроорганізму після мікробіологічного контроля чистоти культури (мікроскопія забарвлених за Грамом мазків), суспендували у фізіологічному розчині до концентрації, що відповідає значенню 0,5 за стандартом МакФарланда (1×10^7 КУО/см^3).

Як гермінант використовували водний розчин наступних діючих речовин: інозин – 0,05%; L-гістидин – 0,05%; L-валін – 0,05%; L-серин – 0,05%, який запатентовано авторами [16, 18]. Гермінант специфічно впливає на проростання спор, викликаючи швидке проростання бактерій роду *Bacillus* у ґрунті, значно полегшуючи наступне знезараження.

Як комплексний дезінфекційний засіб застосовували суміш 1:1 розчинів бензалконію хлориду (алкил диметилбензил амонію хлорид) (ВегаФарм, Китай) – 0,5% та дидецилдиметиламонію хлориду (ВегаФарм, Китай) – 0,5% за активною речовиною. Розчини дезінфекційних засобів готували розведенням 50% концентратів за активною речовиною. Концентрація розчинів дезінфекційних засобів була обрана на основі літературних даних та власних досліджень, у відповідності до яких бактерії роду *Bacillus* складають до 6–10% мікрофлори ґрунту. Тому для забезпечення достатньої активності згідно з експертною оцінкою була застосована концентрація дезінфекційних засобів 0,5% за активною речовиною для надійного знешкодження збудника у складному субстраті, яким є ґрунт.

Визначення ефективності деконтамінації в субстраті (ґрунт). Для дослідження було відібрано по 6 кг поверхневих ґрунтів (15 см в глибину) з різними фізико-хімічними властивостями: сірий лісовий ґрунт (Київська обл.), гірський коричневий (Закарпатська обл.) та чернозем (Полтавська обл.) із типовими фізико-хімічними властивостями. Після просіювання через сито з отворами 2 мм для видалення великих шматків залишків рослин та великого каміння, ґрунти зберігали в холодильнику за температурі 4 ℃ до використання. Зразки ґрунту інкубували при 20% вологості протягом тижня при кімнатній температурі для відновлення мікробної активності перед проведенням експерименту.

Стерилізацію ґрунту проводили шляхом дворазового автоклавування за тиску 2 атм (120°С) протягом 1,5 годин з інтервалом 24 години із контрольним посівом на поживні середовища для підтвердження стерильності, після цього ґрунт штучно контамінували спорами бактерій дослідних видів.

Культури мікроорганізмів (*B. cereus ATCC10702, B. anthracis UA 07*) вирощували протягом 5 діб, змивали з агару фізіологічним розчином, після цього осаджували бактерійну масу центрифугуванням за 14000 об/хв протягом 15 хвилин. Бактерії ресуспендували в 70% етиловому спирті та витримували за кімнатної температури протягом 1 години при струшуванні для знищення вегетативних форм, та промивали центрифугуванням за 10000 об/хв протягом 3 хвилин для видалення залишків клітин. Ізольовані спори ресуспендували в 1 мл фізіологічного розчину.

Аліквоту суспензії спор об’ємом 50 мкл розводили в 10 разів 0,1 М NaCl, щоб отримати кількість спор приблизно 400 клітин у полі зору (відповідає кількості 5×10^7КУО/см^3) та 10 мкл розведеної суспензії спор використовували для виготовлення мазків на очищених предметних скельцях. Висушені мазки термофіксували та забарвлювали малахітовим зеленим і сафраніном за стандартним протоколом для підрахунку спор.

У наважку субстрату (стерильний ґрунт) за допомогою піпетки вносили підготовлене розведення суспензії спор – 1,8–2,3×10^7 КУО/$см^3$, кожного виду мікроорганізмів окремо. Контрольний субстрат складався з стерильного ґрунту з додаванням спор *Bacillus cereus*. Для підрахунку кількості живих мікроорганізмів з тієї ж суспензії проводили посіви на тверде поживне середовище (BHI, BioRad) у послідовних розведеннях. Після інкубування протягом 48 годин за температури 35,5±0,5°С підраховували кількість живих колоній та перераховували середню концентрацію живих мікроорганізмів по кожній групі в 1 $см^3$.

Спочатку в субстрат вносили гермінант у кількості 0,5 $см^3$ на 10,0 г субстрату за експозиції 2 години. Після цього застосовували комплексний дезінфекційний засіб у кількості 0,5 $см^3$ на 10 г субстрату протягом експозиції, передбаченої дизайном експерименту (12, 24 та 48 годин). Далі проби субстрату суспендували в фізіологічному розчині та після центрифугування (10 тис обертів 2 хв) надосад в кількості 0,5 $см^3$ висівали на поживні середовища для підрахунку колоній мікроорганізмів, що виросли. Після інкубування протягом 48 годин за температури 35,5±0,5°С підраховували кількість живих колоній та перераховували середню концентрацію живих мікроорганізмів по кожній групі в 1 $см^3$.

Бактерицидний вплив комплексного дезінфекційного засобу визначали за зменшенням кількості мікроорганізмів від початкових значень (*B. cereus ATCC 10702* – 1,8×10^7±0,9×10^4; *B. anthracis UA07* – 2,3×10^7±0,3×10^4), який виражали в логарифмах (*log)*. Дослідження проводили за температури 25°С, що відповідає температурі навколишнього середовища в теплу пору року.

Нейтралізацію дії розчину дезінфектанту проводили за допомогою 0,05% водного розчину ПАР – поліоксиетилен (20) сорбітан моноолеат в кількості 0,3 мл на 10 г ґрунту.

Статистичну обробку результатів методом описової статистики здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel та Statplus (https://www.analystsoft.com/ua/products/statplus/).

Результати досліджень та їх обговорення. Результати вивчення антимікробної активності поєднаного застосування гермінанту та комплексного дезінфекційного засобу у відношенні до *B. cereus ATCC10702* та *B. anthracis UA 07* в субстраті (сірий лісовий ґрунт) представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Вивчення антимікробної активності спільного застосування гермінанту та комплексного дезінфекційного засобу у відношенні до *B. cereus ATCC10702* та *B. anthracis UA 07* в субстраті (сірий лісовий ґрунт), M±м, n=3

Група	*B. cereus ATCC10702*			*B. anthracis UA 07*		
	КУО/ см³	Ріст культури, log	Пригні-чення росту, log	КУО/ см³	Ріст культури, log	Пригнічення росту, log
Контроль росту культури	$1,8\times10^7\pm 0,9\times10^4$	7,25±0,4	0,0	$2,3\times10^7\pm 0,3\times10^4$	7,36±0,2	0,0
Експозиція 12 годин	$1,2\times10^2\pm 0,9\times10^2$	2,07±0,5	5,18±0,4*	$0,7\times10^3\pm 0,3\times10^2$	2,84±0,2	4,52±0,3*
Експозиція 24 годин	$0,2\times10^2\pm 0,03\times10^2$	1,30±0,3	5,95±0,3*	$0,2\times10^2\pm 0,03\times10^2$	1,30±0,2	6,06±0,21*
Експозиція 48 годин	$0,2\times10^2\pm 0,03\times10^2$	1,30±0,3	5,95±0,3*	$0,1\times10^2\pm 0,03\times10^2$	1,0±0,2	6,26±0,23*

Примітка: *p<0,05 порівняно з контрольною групою.

У результаті проведення досліджень встановлено, що застосування гермінанту (інозин – 0,05%; L-гістидин – 0,05%; L-валін – 0,05%; L-серин – 0,05%) впливає на проростання спор бактерій роду *Bacillus* в умовах *in vitro*, при цьому майже всі інокульовані спори проростали, утворюючи вегетативні форми бактерій протягом перших двох годин від внесення гермінанту, після чого застосування комплексного дезінфекційного засобу (суміш 1:1 розчинів бензалконію хлориду (0,5%) та дидецилдиметиламонію хлориду (0,5%) дозволяє їх знешкодити, при цьому застосування 0,5% концентрації є достатнім для знешкодження збудника в тестованому субстраті (сірий лісовий ґрунт).

Встановлено статистично значиме (p<0,05) зниження життєздатних бактерій на 5,18±0,4 log (*B. cereus ATCC10702*) та 4,52±0,3 log (*B. anthracis UA 07*) відповідно через 12 годин експозиції та 5,95±0,3 log (*B. cereus ATCC10702*) та 6,26±0,23 log (*B. anthracis UA 07*) відповідно через 48 годин експозиції. При цьому в контрольній групі ріст культури складав від 7,25±0,4 до 7,36±0,2 log.

Наступним етапом було вивчення впливу типу ґрунту на якість деконтамінації тестованих мікроорганізмів, для цього були використані зразки трьох типів ґрунтів, які є поширеними в умовах України.

Результати досліджень викладені в таблиці 2.

Таблиця 2

Вивчення антимікробної активності спільного застосування гермінанту та комплексного дезінфекційного засобу у відношенні до *B. cereus ATCC10702, B. anthracis UA 07* в ґрунтах різних типів за експозиції 24 години, M±м, n=3

Група	*B. cereus ATCC10702*			*B. anthracis UA 07*		
	КУО/ см³	Ріст культури, log	Пригнічення росту, log	КУО/ см³	Ріст культури, log	Пригнічення росту, log
Контроль росту культури	$2,1\times10^7$	7,32±0,30	0,0	$2,4\times10^7$	7,38±	0,0
Чорнозем	$0,3\times10^2$	1,47±0,12	5,95±0,18*	$0,34\times10^2$	1,53±0,23	5,85±0,3*
Лісовий сірий ґрунт	$0,2\times10^2$	1,30±0,22	6,02±0,23*	$0,32\times10^2$	1,50±0,32	5,88±0,47*
Коричневий гірський ґрунт	$0,15\times10^2$	1,17±0,16	6,15±0,2*	$0,19\times10^2$	1,28±0,16	6,10±0,16*

Примітка: *$p<0,05$ порівняно з контрольною групою.

За застосування комплексного підходу із використанням гермінанту з наступним внесенням комплексного дезінфекційного засобу (суміш 1:1 розчинів бензалконію хлориду 0,5% та дидецилдиметиламонію хлорид 0,5%) встановлено, що досліджені типи ґрунтів мають слабкий вплив на ступінь деконтамінації модельних мікроорганізмів. При цьому деконтамінація модельного мікроорганізма *B. cereus ATCC10702* складала від 5,95±0,18 log до 6,15±0,2 log у порівнянні із початковими значеннями, а *B. anthracis UA 07* – від 5,85±0,3 log до 6,10±0,16 log, що дозволяє забезпечити практично повне знешкодження збудника.

Результати, отримані в результаті проведених досліджень, покращують відомі способи знезараження ґрунтів, які передбачають застосування розчинів хімічних сполук або фізичних методів [4, 8, 9]. Недоліками цих методів є недостатньо висока активність проти спор збудника та негативний елімінуючий вплив на мікробіоценоз ґрунту, особливо на неспороутворюючу мікрофлору.

Значною проблемою, яку необхідно вирішити, є надзвичайна стійкість спор збудника сибірки до фізичних та хімічних факторів. На нашу думку, застосування гермінанту, який специфічно впливає на проростання спор бактерій та викликає масове утворення вегетативних форм, значно зменшує негативний вплив дезінфектанту на ґрунт, оскільки для знищення вегетативних форм необхідна нижча концентрація, ніж для надійного знищення стійких спор.

Важливим позитивним моментом вбачається менший негативний вплив на екологію ґрунту та рекреаційні заходи.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Встановлено, що комплексний підхід до знезараження ґрунту, контамінованого спорами бактерій роду *Bacillus*, що передбачає застосування запропонованої нами рецептури гермінанту (водний розчин активних речовин: інозин – 0,05%; L-гістидин – 0,05%; L-валін – 0,05%; L-серин – 0,05%), в поєднанні із комплексним дезінфекційним засобом (суміш розчинів бензалконію хлориду (0,5%) та дидецилдиметиламонію хлориду (0,5%) забезпечують знешкодження збудника.

Деконтамінація проведена на трьох типах ґрунту у відношенні до модельного мікроорганізму *B. cereus ATCC10702* забезпечувала зменшення життєздатних мікроорганізмів від 5,95±0,18 log до 6,15±0,2 log у порівнянні із початковими значеннями, а *B. anthracis UA 07* – від 5,85±0,3 log до 6,10±0,16 log, що дозволяє забезпечити достатній ступінь знешкодження.

Застосування такого підходу до деконтамінації сприятиме зменшенню мікробного фону та знешкодженню патогенної та умовно-патогенної мікрофлори в ґрунтах, контамінованих спороутворюючими мікроорганізмами.

У подальших дослідженнях планується проведення випробувань в польових умовах на дослідних ділянках із оцінкою загального екологічного впливу препарату на мікробіоценоз та біорізноманіття мікрофлори ґрунту за використання методу секвенування мікробіому за16S-РНК геном.

THE USE OF A DISINFECTANT IN COMBINATION WITH A GERMICIDE TO NEUTRALIZE BACTERIAL SPORES OF THE GENUS BACILLUS IN THE SOIL / Bezymennyi M., Tarasov O.

Introduction. *Anthrax is a zoonotic disease caused by the gram-positive bacterium Bacillus anthracis, a pathogen transmitted primarily through soil. The pathogen has been registered on all inhabited continents. The use of germinants is of practical importance to ensure high-quality inactivation of anthrax pathogen spores, since germinated forms are significantly less resistant to environmental conditions and disinfectants compared to spore forms.*

Since the problem of anthrax in Ukraine is currently relevant, research on the disinfection of bacterial spores, including the causative agent of anthrax, is important for the successful eradication of pathogens in Ukraine.

The goal of the work. *To study the decontamination effectiveness of Bacillus genus bacterial spores using a disinfectant in combination with a germinant.*

Materials and methods. *The test microorganisms B. cereus ATCC10702, B. anthracis UA 07 (non-pathogenic vaccine strain), Bacillus subtilis 7241 (from the collection of IVM NAAS) were used in the research. A solution of the following composition was used as a germinant: inosine – 0.05%; L-histidine – 0.05%; L-valine – 0.05%; L-serine – 0.03% and water – up to 100%, which specifically affects the germination of Bacillus spores in the soil. The germinant*

was used in 2 hours exposure, after which the substrate was treated with disinfectants: benzalkonium chloride (alkyl dimethylbenzyl ammonium chloride) (VegaPharm, China); didecyldimethylammonium chloride (VegaPharm, China), and their equal part mixture in a concentration 0,5%.

The required estimated number 5.0×10^7 CFU/cm^3 of microorganisms of each species was separately introduced into the weighing substrate (sterile soil) using a pipette. The control substrate consisted of sterile soil with the addition of Bacillus cereus spores.

The bactericidal effect of the disinfectant was determined by the decrease in the number of microorganisms from the initial values, which was expressed in logarithms (Log). The research was conducted at 25°C, which corresponds to the ambient temperature in warm season.

Statistical processing of the results by descriptive statistics method was performed using Microsoft Excel and Statplus programs.

Results of research and discussion. *A significant ($p<0.05$) reduction of viable bacteria by 5.18±0.4 log (B. cereus ATCC10702) and 4.52±0.3 log (B. anthracis UA 07) was established, respectively, after 12 hours of exposure and 5, 95±0.3 log (B. cereus ATCC10702) and 6.26±0.23 log (B. anthracis UA 07), respectively, after 48 hours of exposure. At the same time, in the control group, the culture growth ranged from 7.25±0.4 to 7.36±0.2 log.*

Conclusions and prospects for further research. *It has been established that an integrated approach to the disinfection of soil contaminated with spores of Bacillus bacteria, involving the use of a germinant in combination with a disinfectant (quaternary ammonium compounds), provides almost complete neutralization of the pathogen.*

Decontamination performed on three soil types against the model microorganism B. cereus ATCC10702 provided a reduction in viable microorganisms from 5.95±0.18 log to 6.15±0.2 log compared to baseline values, and B. anthracis UA 07 – from 5.85±0.3 log to 6.10±0.16 log.

Using this approach will improve and significantly reduce the abundance of pathogenic and opportunistic spore-forming microorganisms in soils.

Keywords: *Bacillus anthracis, spores, germinant, decontamination.*

REFERENCES

1. Carlson, C.J., et al. (2018). Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (Bacillus anthracis). *Biological Reviews*, 93(4), 1813-1831.

2. Kracalik, I., et al. (2014). Changing patterns of human anthrax in Azerbaijan during the post-Soviet and preemptive livestock vaccination eras. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2985.

3. Doganay, M., Demiraslan, H. (2015). Human anthrax as a re-emerging disease. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 10(1), 10-29.

4. Imperiale, M. J., Casadevall, A. (2011). Bioterrorism: Lessons learned since the anthrax mailings. *MolBio*, 2(6), e00232-11.

5. Girault, G., Blouin, Y., Vergnaud, G., & Derzelle, S. (2014). High-throughput sequencing of Bacillus anthracis in France: investigating genome diversity and population structure using whole-genome SNP discovery. *BMC Genomics*, 15, 288.

6. Fasanella, A., et al. (2013). Ground anthrax Bacillus refined isolation (GABRI) method for analyzing environmental samples with low levels of Bacillus anthracis contamination. *BMC Microbiology*, 13(1), 167.

7. Bishop, A. (2014). Germination and persistence of Bacillus anthracis and Bacillus thuringiensis in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 1274-1282.

8. Buhr, T.L., Young, A.A., Barnette, H.K., et al. (2015). Test methods and response surface models for hot, humid air decontamination of materials contaminated with dirty spores of Bacillus anthracis Sterne and Bacillus thuringiensis Al Hakam. *Journal of Applied Microbiology,* 119, 1263-1277.

9. Celebi, O., Buyuk, F., Pottage, T., et al. (2016). The use of germinants to potentiate the sensitivity of Bacillus anthracis spores to peracetic acid. *Frontiers in Microbiology,* 7, 18.

10. Mikelonis, A. M., Abdel-Hady, A., Aslett, D., et al. (2020). Comparison of surface sampling methods for an extended duration outdoor biological contamination study. *Environmental Monitoring and Assessment,* 192(1), 1-13.

11. Richter, W.R., Wood, J.P., Wendling, M.Q., & Rogers, J.V. (2018). Inactivation of Bacillus anthracis spores to decontaminate subway railcar and related materials via the fogging of peracetic acid and hydrogen peroxide sporicidal liquids. *Journal of Environmental Management,* 206, 800-806.

12. Wood, J.P., & Adrion, A.C. (2019). Review of decontamination techniques for the inactivation of Bacillus anthracis and other spore-forming bacteria associated with building or outdoor materials. *Environmental Science & Technology,* 53, 4045-4062.

13. Wood, J.P., Meyer, K.M., Kelly T.J., et al. (2015). Environmental persistence of Bacillus anthracis and Bacillus subtilis spores. *PLOS ONE,* 10(9), e0138083.

14. Wood, J.P., Wendling, M.Q.S., Richter, W.R. et al. (2016). Evaluation of the efficacy of methyl bromide in the decontamination of building and interior materials contaminated with Bacillus anthracis spores. *Applied and Environmental Microbiology,* 82(7), 2003-2011.

15. Choi, Y.W., Sunderman, M.M., McCauley, M.W., et al. (2021). Decontamination of Bacillus spores with formaldehyde vapor under varied environmental conditions. *Applied Biosafety,* 26(3), 139-153.

16. Bezymennyi, M.V., Tarasov, O.A., Hudz, N.V., & Zakharova, O.M. (2022). Doslidzhennia vplyvu herminantu na prorostannia spor bakterii rodu Bacillus [Study of the germinant impact on the germination of Bacillus genus bacteria spores]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary biotechnology,* 41, 8-16. https://doi.org/10.31073/vet_biotech41-01.

17. Tarasov, O.A., Bezimenniy, M.V., & Zakharova, O.M. (2023). Vyvchennya vplyvu dodecylaminu na prorostannya spor bakteriy rodu Bacillus [Study of the effect of dodecylamine on the germination of Bacillus spores]. Veterinarna biotekhnolohiya, 42, 98–106. DOI: 10.31073/vet_biotech42-11 [in Ukrainian].

18. Tarasov, O.A., Bezimenniy, M.V., & Zakharova, O.M. (2023). Patent No. 152902. Ukraine. Method for soil decontamination contaminated with B. anthracis spores. Institute of Veterinary Medicine NAAS. Published April 27, 2023. Bulletin No. 17/2023.c.