

Original researches

Determination of the level of safety of Humilid during biotesting at ciliates

L. M. Stepchenko, O. A. Kryvaya, V. O. Chumak

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Received: 27 October 2019
Revised: 21 November 2019
Accepted: 03 December 2019

Dnipro State Agrarian and Economic
University, Sergii Efremov Str., 25, Dnipro,
49600, Ukraine
Tel.: +38-050-568-78-55
E-mail: chumak.v.o@dsau.dp.ua

Cite this article: Stepchenko, L. M., Kryvaya, O. A., & Chumak, V. O. (2019). Determination of the level of safety of Humilid during biotesting at ciliates. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(4), 210–214. doi: 10.32819/2019.74037

Abstract. The «Humilide» – Biologically Active Feed Supplement is a 10 % solution of humic acids that, by its antioxidant, immunostimulatory and antimicrobial properties, affects feed conversion, productivity and meat quality of farm animals. It is made according to TU In 15.7-00493675 004: 2009 in the conditions of the Research Laboratory of Humic Substances named of prof. L. A. Khristeva. Most of the work on the effects of the supplement has been done on poultry of different species and pigs. The available data on the safety of the feed additive «Humilide» were analyzed and biotested on *Paramecium caudatum* in accordance with the requirements of the current legislation in the field of control of veterinary preparations and feed additives. A series of Humilide dilutions of 0.1–100 g/l on the culture medium at ciliates were prepared for toxicological studies. Acute toxicity data of the tested concentrations were obtained according to the recommended methods of rapid bioassay. LC_{50} values were determined by probit analysis of lethality curves. In solutions of «Humilide» 1.0 and 10 g/l within 1 hour of observation, the death of the protozoa was less than 10 % of the total number. A concentration of 100 g/l causes a decrease their quantity. According to the calculation of the toxicity of «Humilide» by the method of Bliss & Prozorovsky LC_{50} for *Paramecium caudatum* is 104 g/l. Using the graphical method for calculating LC_{50} from the obtained regression line, the result was 124 g/l. Thus, «Humilide» at a concentration of less than 1 % is non-toxic to protozoa, NOEC (No Observed Effect Concentration) is 2 g/l and EC_{50} (Half maximal effective concentration) is 104–124 g/l. Therefore, the results on the activity of «Humilide» in relation to the *Paramecium caudatum* allow to classify it as a non-toxic substance, LC_{50} – over 5 000 mg/kg. It is IV class acute toxicity according to SP 8.8.1.2.002-98 (Ukraine) and international criteria – 5 toxicity category. When converted to the content of humic acids in the composition of the sample, this corresponds to 10.4–12.4 g/l.

Keywords: humic acids; acute toxicity; *Paramecium caudatum*; LC_{50} .

Рівень безпечності Гуміліду, визначений біотестуванням на інфузоріях

Л. М. Степченко, О. А. Крива, В. О. Чумак

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Анотація. Біологічно активна кормова добавка «Гумілід» – це 10 % розчин гумінових кислот, який своїми антиоксидантними, імуностимулювальними та антимікробними властивостями впливає на конверсію корму, продуктивність і якість м'яса сільсько-господарських тварин. Вона виготовлена згідно з ТУ У 15.7-00493675 004:2009 в умовах Науково-дослідної лабораторії з гумінових речовин ім. проф. Л. А. Христевої Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Більшість робіт за впливу Гуміліду була виконана на птиці різних видів і свинях. Проаналізовано наявні дані щодо безпечності кормової добавки «Гумілід» та проведено біотестування на інфузоріях *Paramecium caudatum* відповідно до вимог чинного законодавства у галузі контролю ветеринарних препаратів та кормових добавок. Для токсикологічних досліджень підготовлено серію розведень Гуміліду 0,1–100 г/л на культуральному середовищі для простіших. Дані про гостру токсичність досліджуваних концентрацій були отримані згідно з рекомендованими методами швидкого біологічного аналізу. Показники LC_{50} визначали пробітним аналізом кривих летальності. У розчинах Гуміліду 1,0 та 10 г/л протягом 1 години спостереження загинуть інфузорії склали менше ніж 10 % від загальної чисельності. Концентрація 100 г/л зумовлює зниження кількості парамецій. За даними розрахунку токсичності Гуміліду методом С. Bliss та В. Б. Прозоровського LC_{50} для *Paramecium caudatum* становить 104 г/л. Графічний метод обчислення LC_{50} з отриманої лінії регресії дав результат 124 г/л. Таким чином з'ясовано, що, Гумілід за концентрації менше 1 % нетоксичний для найпростіших, NOEC (концентрація без спостережуваного ефекту) становить 2 г/л, а EC_{50} (половина максимальної ефективної концентрації) – 104–124 г/л. Отже, результати активності Гуміліду щодо *Paramecium caudatum* дозволяють класифікувати його як нетоксичну речовину, LC_{50} – понад 5 000 мг/кг. У перерахунку добавки на вміст власне гумінових кислот у складі зразка LC_{50} відповідає 10,4–12,4 г/л.

Ключові слова: гумінові кислоти; гостра токсичність; *Paramecium caudatum*, LC_{50} .

Вступ

Кормові добавки, що містять у своєму складі гумінові речовини, створюють із бурого вугілля, торфу та інших доступних видів сировини у різних країнах світу. Для зручності згодування тваринам кожен виробник надає більш зручну лікарську форму — порошок, розчин, паста. В Україні переважно застосовують Гумілід — 10 % розчин гумінових кислот із торфу. Більшість робіт щодо ефектів цієї добавки виконана на птиці різних видів та свинях, вивчені її антиоксидантні та імуностимуляторні властивості, вплив на конверсію корму, продуктивність та якість м'яса сільськогосподарських тварин.

У курчат-бройлерів кросу «Кобб 500», яким у воду додавали Гумілід, у загальному гомогенаті печінки загальна кількість протеїну збільшувалась на 15 %, а у водорозчинній фракції — на 45 %. Інтенсивне використання амінокислот для біосинтезу протеїну підтверджене підвищенням активності гамма-глутамілтрансепептидази на 17 % у водорозчинній фракції, яка саме бере участь у транспорті амінокислот у клітину, та аланінамінотрансферази — на 20 %, що вказує на прискорення трансамінування, глюконеогенезу у печінці та глюкозо-аланінового циклу у м'язовій тканині курчат за умови застосування Гуміліду (Myhajlenko et al., 2016).

Загальною реакцією організму гусенят на згодовування Гуміліду з 10-ї по 30-ту добу вирощування було зменшення, а з 40-ї по 60-ту добу — збільшення добових приростів, а також умісту еритроцитів, лейкоцитів, гемоглобіну, загального білка, БАСК і лізоциму. Встановлено прямий корелятивний зв'язок між приростами живої маси гусенят і досліджуваними показниками природної резистентності організму, а також тривалу ростостимуляторну післядію застосованої кормової добавки (Kushch et al., 2015).

Випоювання перепілкам препарату «Гумілід» протягом 10 діб у період з 20-, 34-, і 64-ї доби позитивно впливає на функціональний стан організму, інтенсифікує процеси травлення й білкового синтезу, підвищує протеолітичну та амілолітичну, але не ліполітичну активність у тканинах слизової оболонки дванадцятипалої кишки, позитивно впливає на середньодобові прирости маси тіла та несучість перепілок (Gunchak et al., 2017).

Кормова добавка, отримана з біомаси червоних каліфорнійських черв'яків, вирощених на поживному субстраті з умістом Гуміліду, активізує білковий обмін у фазанят. Це проявляється збільшенням умісту загального білка, альбумінів, креатиніну та сечової кислоти, але вміст глобулінів крові залишався однаковим. Кореляційний аналіз підтвердив наявність тісних зв'язків між показниками загального білка плазми крові та маси тіла фазанят за умови згодовування їм кормової добавки вермикюльтури (Geysun & Stepchenko, 2018).

За впливу Гуміліду в крові поросят спостерігали зниження вмісту молочної та піровиноградної кислот, але зросла активність сироваткової α -амілази, глюкози, загального білка та вмісту глобулінів, еритроцитів і гемоглобіну. У тварин, яким призначали Гумілід, середньодобовий приріст маси тіла був більшим на 10,8 % порівняно з контролем (Garashuk & Stepchenko, 2010).

За дії Гуміліду в комбінації з органічною кислотою в поросят уміст початкових продуктів кисневого пошкодження ліпідних компонентів клітини (гідропероксидів) вірогідно знижувався в крові в 20-добовому віці тварин у 1,5 раза, а на 40-ву добу життя — в 1,3 раза. Вірогідне зниження концентрації ТБК-активних продуктів спостерігали в плазмі 20-добових поросят на 19 %, а на 30-ту і 40-ву доби життя — на 8 % відносно контролю. Виявлено вірогідне підвищення активності глутатіонпероксидази стосовно контролю у 20-добових поросят у 2,3 раза, а в 30- та 42-добовому віці — в 1,4 і 1,9 раза відповідно. Активність глутатіонредуктази вірогідно зростала стосовно

контролю в еритроцитах поросят в 1,4 раза в 20-добовому віці, а на 30-ту і 42-гу доби життя в 1,2 та 1,5 раза відповідно. Вміст відновленого глутатіону за дії Гуміліду та мурашиної кислоти вірогідно підвищувався у 20-добових поросят стосовно контролю в 1,7 раза, а на 30-ту добу життя — в 1,9 раза (Buchko, 2017).

Біологічно активна кормова добавка «Гумілід» не викликає сенсibilізації організму до складових діючих речовин, а навпаки, має десенсibilізувальний ефект, про що свідчить зменшення кількості еозинофілів у крові собак. Основні кількісні зміни популяції клітин крові за дії Гуміліду пов'язані з клітинною ланкою вродженого імунітету організму, що підтверджує збільшення загальної кількості гранулоцитів і моноцитів (Broshkov et al., 2017).

Гумінові кислоти у дозі 2 г щодня кітним козematкам масою тіла 45 кг до та після окоту ефективно використовують як перспективну органічну добавку для впливу на процеси бродіння у жуйних тварин. Це забезпечило зростання у складі рубцевої рідини вмісту ацетату та пропіонату у разі зменшення бутирату та амонійних сполук, а також числа простіших. Покращання молочної продуктивності кіз та темпів росту козенят відбулось без негативних наслідків для їхнього здоров'я. Гумінові кислоти баранам у дозі 5 г та 10 г тимчасово знижують чисельність інфузорій *Epidinium spp.* у рубці. Ці симбіонти жуйних активно гідролізують крохмаль, що вірогідно пояснює зміни хімічного складу рубцевої рідини за впливу гумінових кислот (Galip et al., 2010, El-Zaiat et al., 2018).

Препарат гумінової кислоти Humacid 60 Basic не ефективний як кормовий антипротозойний засіб. Він може підвищити мікробний ріст у дозах до 10 г/кг сухої речовини раціону жуйних. Так, зростала чисельність простіших *Enoploplastron*, *Isotricha* та *Ophryoscolex* на раціоні з високим рівнем клітковини, а *Diploplastron* — у разі збільшення концентратів. Проте без змін залишалась загальна кількість та кількість *Entodinium* (Váradyová et al., 2009).

Таким чином, ефекти від рекомендованої дози Гуміліду забезпечують поліпшення результатів у тваринництві та птахівництві, проте виникають питання щодо можливих негативних реакцій під час застосування кормової добавки у разі помилок у дозуванні або порушення технології випоювання його розчинів.

Метою нашої роботи було проаналізувати наявні дані щодо безпечності кормової добавки «Гумілід» та провести її біотестування на інфузоріях *Paramecium caudatum* відповідно до вимог чинного законодавства у галузі контролю ветеринарних препаратів та кормових добавок.

Матеріал і методи досліджень

Робота виконана в науковій лабораторії кафедри фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету з використанням Гуміліду, який виготовлено згідно з ТУ У 15.7-00493675 004:2009 в умовах Науково-дослідної лабораторії з гумінових речовин ім. проф. Л. А. Христової.

Показники гострої токсичності Гуміліду визначали на культурі інфузорій *Paramecium caudatum*, яка зперевувала у фазі експоненціального зростання за загальноприйнятими методами (Kotsumbas et al., 2006; Zazharskyi et al., 2018; Palchikov et al., 2019).

Для проведення токсикологічного дослідження підготовлено серію розведень Гуміліду в інтервалі 0,1–100 г/л на середовищі для інфузорій. Дані про гостру токсичність досліджуваних концентратів отримано відповідно до рекомендованих методів експрес-біотестування. Значення LC_{50} обчислювали за допомогою пробіт-аналізу кривих летальності (Recommendations of OECD Guidelines for the Testing of Chemicals for evaluation of

toxic effect of toxicants, 2009).

Розрахунок гострої токсичності виконано методом С. Bliss та В. Б. Прозоровського (Prozorovskii, 2007).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного продукту *Statistica 6*.

Результати

Дослідження концентрації Гуміліду понад 100 г/л через їх високу інтенсивність коричневого забарвлення виявилось неможливим, тому що інфузорії були важко помітними в мікроскоп. Одразу після контакту з розчинами Гуміліду в найбільшій концентрації 100 г/л інфузорії почали швидко рухатися, а потім значна частина їх загинула. Розведення Гуміліду від концентрації 0,1 г/л не впливало на інфузорій, тому для обчислення було обрано саме інтервал від 1,0 г/л до 100 г/л, що було еквівалентно 0,1–10 г/л власне гумінових кислот як активної речовини.

Інформація щодо виживання інфузорій у розчинах Гуміліду різної концентрації наведена на рисунку 1.

У розчинах Гуміліду 1,0 та 10 г/л протягом 1 години спостереження загибель інфузорій складала менше ніж 10 % від загальної чисельності. Концентрація 100 г/л зумовлює зниження кількості парамецій.

Методом С. Bliss та В. Б. Прозоровського перевели відсотки летальності у пробіти з урахуванням вагових коефіцієнтів пробітів за Фінні. Згідно з розрахунком токсичності Гуміліду LC_{50} для *Paramecium caudatum* становить 104 г/л. У перерахунку на вміст гумінових кислот у складі досліджуваного зразка це відповідає 10,4 г/л.

Якщо графічно зобразити залежність між відсотком летальності для інфузорій і різними розчинами Гуміліду, взятими у вигляді показника десятичного логарифму (lg) від концентрації в г/л, то значення "0" відповідає 1,0 г/л, "1" – 10 г/л, "2" – 100 г/л відповідно. Результат визначення рівняння лінійної регресії подано на рисунку 2.

Згідно з рисунком 2, показник десятичного логарифму концентрації Гуміліду при летальності 50 % становить 2,092, що відповідає розчину 124 г/л готового препарату або 12,4 г/л за гуміновими кислотами у його складі.

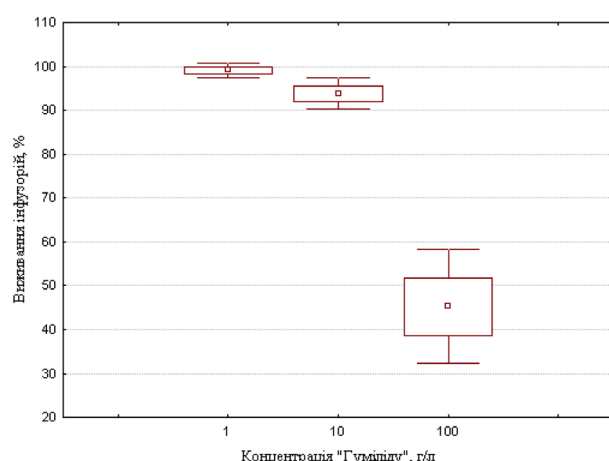


Рис. 1. Значення середніх, стандартних похибок і відхилень виживання парамецій у розчинах Гуміліду концентрацій 1–100 г/л

Обговорення

Класичний токсикологічний аналіз передбачає пошук середньої дози (LD_{50}) хімічних речовин за результатами випробування на лабораторних тваринах у кількох дозах із подальшим обчисленням методами Г. Кербера (1931) та Г. Першина (1950). Проте для визначення параметрів безпечності багатьох речовин застосовуються розрахунки із використанням пробітів, наприклад, за методикою С. Bliss та В. Б. Прозоровського (1978). За цим методом отримані результати виражаються у відсотках летальності, при цьому немає необхідності очікувати загибель усіх піддослідних тварин, що отримували певну дозу досліджуваної речовини. Цей метод дозволяє порівнювати безпечність зразків усіх речовин або їх комбінацій, які малотоксичні та не зумовлюють загибель лабораторних тварин.

В Україні існує гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності (ДСП 8.8.1.2.002-98). Розподіл на групи відбувається згідно з LD_{50} , яка визначається під час введення у шлунок рідких форм препаратів, тому вирізняють I клас (надзвичайно небезпечні) – менше 50 мг/кг, II клас (небезпечні) – 50–200 мг/кг, III клас (помірно небезпечні) – 201–2000 мг/кг та IV клас (малонебезпечні) – понад 2 000 мг/кг. У Європі Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) пропонує використання інших 5 категорій для визначення гострої токсичності під час внутрішнього введення речовин. Так, 1-ша категорія – це препарати, LD_{50} для яких перебуває в інтервалі 0–5 мг/кг, 2-га – 5–50 мг/кг, 3-тя – 50–300 мг/кг, 4-та – 300–2 000 мг/кг, 5-та – 2 000–5 000 мг/кг маси тіла відповідно. Одержані результати під час визначення ступеня гострої токсичності для парамецій пропонується співвідносити із класифікацією LD_{50} , а саме I клас – якщо LC_{50} менше за 10 мг/л, II клас – 10 мг/л–1,0 г/л, III клас – 1,0–10 г/л, IV клас – понад 10 г/л середовища відповідно (Kotsumbas et al., 2006).

Для розширення інформації щодо безпечності нових речовин під час досліджень із виявленням шкідливості речовин, крім традиційних об'єктів серед ссавців (білих шурів і мишей), усе частіше проводять визначення на інших видах тварин, зокрема, птахів. Наприклад, середня летальна доза клатро-

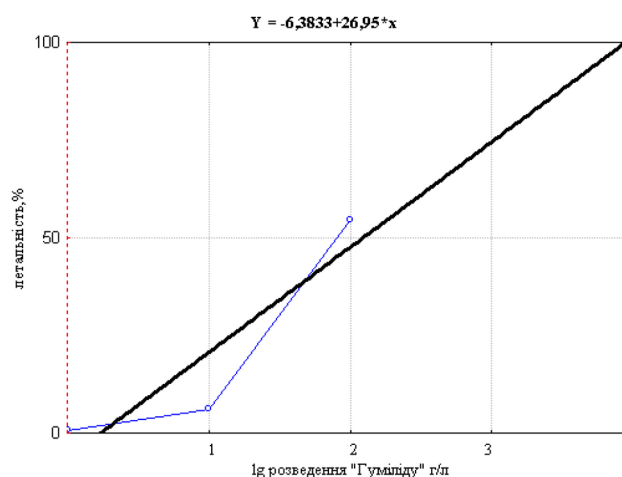


Рис. 2. Графічне зображення рівняння лінійної регресії

хелату заліза (IV) для внутрішнього застосування перепелам становить 764 ± 33 мг / кг маси тіла, а для білих мишей після внутрішньошлункового введення $1\,258 \pm 145$ мг / кг. Така відмінність у чутливості дозволяє відносити цю сполуку заліза до різних класів токсичності у ссавців і птахів (Dukhnitsky et al., 2019).

При цьому необхідно проводити розширений пошук змін в організмі, зумовлених препаратами, які вивчаються. Наприклад, під час дослідження гострої токсичності препарату «Фероцель-Т» встановлювали токсичні дози або побічні ефекти за одноразових перорального та парентерального введення на детоксикаційну функцію печінки методом «гексенальної проби» на білих щурах, подразнювальну дію на слизову оболонку ока кроля, гіперчутливість у морських свинок (Todoruk et al., 2018).

Усе ширше запроваджуються методи, які дозволяють вивчати безпечність на водних організмах, якщо препарати випоюють тваринам через систему водопостачання. Адже з метою контролю за рівнем забруднення питної води в системах водопостачання, а також попередження посилення росту умовно-патогенних мікроорганізмів у травному каналі, на поверхні устаткування та в самих тваринницьких приміщеннях запропоновано чимало препаратів. Безпечність таких препаратів можливо прогнозувати за результатами на тест-об'єктах, зокрема *Tetrahymena pyriformis* та *Paramecium caudatum*, що зменшує потребу у використанні лабораторних тварин відповідно до вимог біоетики (Крува et al., 2012; Zazharskyi et al., 2018).

Класичне вивчення безпечності препаратів із гуміновими речовинами започатковане у працях Т. Д. Лотош (1975). Вибір як тест-системи виживаності інфузорій *Paramecium caudatum* для оцінювання біологічної активності гумату калію, отриманого з бурого вугілля, показує можливість поширити її на інші препарати, у складі яких є гумінові речовини. Так, гумат калію в концентраціях 0,001 і 0,1 % виявився нетоксичним для найпростіших, NOEC (No Observed Effect Concentration) становить 1 г/л, а EC₅₀ (Half maximal effective concentration) – 10 г/л середовища (Terekhova et al., 2012).

Переважає більшість робіт на лабораторних тваринах демонструє безпечність у використанні Гуміліду та доводить його вплив на компоненти антиоксидантної системи захисту клітин крові, серця, печінки та головного мозку.

Застосування Гуміліду запобігає розвитку виражених токсичних наслідків від доксорубіцину та суттєвих змін дослідних астрогліальних білків у фракції розчинних білків серцевого м'яза та головного мозку щурів (Babets et al., 2016).

Гумілід зумовлює зниження рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів і активності ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах. У результаті зростає активність у гемолізаті еритроцитів глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, а також каталази у плазмі крові та у фракції розчинних білків серцевого м'яза (Paronik et al., 2015).

Додавання аскорбінової кислоти до розчину Гуміліду позитивно впливає на мітохондрії печінки піщанок за рахунок підвищення антиоксидантного захисту клітин, що супроводжується збільшенням активності каталази, аспартатамінотрансферази, кількості цитохрому С (Dyomshina et al., 2017).

Використання Гуміліду в дозі 5 мг/кг маси тіла за діючою речовиною в дострепсовий період протягом 18 діб запобігає негативним змінам умісту гемоглобіну, кількості еритроцитів, гематокритного числа та еритроцитарних індексів (середній об'єм еритроцитів, середній корпускулярний об'єм, середній уміст гемоглобіну в еритроциті) у щурів за впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу. Одержаний ефект схожий із впливом антиоксиданта – вітаміну Е у дозі 50 мг/кг маси тіла (Diachenko & Stepchenko, 2018).

Висновки

Таким чином, Гумілід має вплив на клітини організму тварин шляхом активації антиоксидантної системи захисту клітин. У разі застосування як добавки до питної води у концентрації меншій за 1 % він нетоксичний для найпростіших, NOEC (No Observed Effect Concentration) становить 2 г/л, а EC₅₀ (Half maximal effective concentration) – 104–124 г/л середовища. Отже, результати щодо активності Гуміліду відносно інфузорій, а саме – LC₅₀ – понад 5 000 мг/кг, що дозволяє класифікувати його як нетоксичну речовину, як згідно з вітчизняним — IV клас згідно з СП 8.8.1.2.002-98, так і міжнародним критерієм — 5-та категорія токсичності.

References

- Babets, Y. V., Ushakova, G. A., & Stepchenko, L. M. (2016). The role of astroglial proteins in the brains of rats under the influence of doxorubicin and Humilid. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 24(2), 392–397.
- Broshkov, M. M., Galuzina, L. I., Stepchenko, L. M., Trokoz, V. O., & Semyonova, A. A. (2017). Pidvyshhennja pryrodnoi rezystentnosti ta imunologichnoi' reaktyvnosti cucenjat shljahom dodavannja do osnovnogo racionu kormovoi' dobavky guminovoi' pryrody [Increasing the natural resistance and immunological reactivity of puppies by adding a humic feed supplement to the main diet]. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian University*, 3, 115–120 (in Ukrainian).
- Buchko, O. M. (2017). Vil'noradykal'ni procesy v organizmi porosjat za dii' kompleksu biologichno aktyvnyh dobavok [Free radical processes in the piglet's organism under a complex of biologically active supplements]. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian University*, 1, 127–130 (in Ukrainian).
- El-Zaiat, H., Morsy, A., El-Wakeel, E., Anwer, M., & Sallam, S. (2018). Impact of humic acid as an organic additive on ruminal fermentation constituents, blood parameters and milk production in goats and their kids growth rate. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 27(2), 105–113.
- Galip, N., Polat, U., & Biricik, H. (2010). Effects of supplemental humic acid on ruminal fermentation and blood variables in rams. *Italian Journal of Animal Science*, 9(4), e74.
- Garashuk, M., & Stepchenko, L. (2010). Vykorystannja gumilidu dlja profilaktyky pisljavidluchnogo stresu u porosjat [Application of Humilid for prophylaxis of post-weaning stress of piglets]. *Naukovyj Visnyk Veterynarnoi' Medycyny*, 6(79), 51–54 (in Ukrainian).
- Gunchak, A. V., Stepchenko, L. M., Ratych, I. B., & Stefanyshyn, O. M. (2017). Efektyvnist' vykorystannja spoluk guminovoi' pryrody v racionah perepilok [Efficiency of humin-based compounds in quail diet]. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian University*, 2, 53–57 (in Ukrainian).
- Diachenko, L. M., & Stepchenko, L. M. (2018). Erythrocyte system of rat blood during the application of fodder additives of humic nature for combined stress. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 6(3), 34–38.
- Dukhnitsky, V., Derkach, I., Plutenko, M., Fritsky, I., & Derkach, S. (2019). Acute toxicity of the iron clathrochelate complexes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(3), 276–279.
- Dyomshina, O. O., Ushakova, G. O., & Stepchenko, L. M. (2017). The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), 185–190.
- Geyssun, A. A., & Stepchenko, L. M. (2018). The protein metabolism in pheasants when using vermiculture in combined feed biomass. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 6(3), 7–11.

- Kotsumbas, I. Y., Malyk, O. G., & Paterega, I. P. (2006). Doklinichni doslidzhennya veterinarnih likarskih zasobiv [Preclinical studies of veterinary medicinal products]. Triada Plus, Lviv (in Ukrainian).
- Kryva, O. A., Chumak, V. O. & Suhin, V. M. (2012). Biotestuvannya na infuzorijah zasobiv znezarazhennja vody, jaki mistjat' metaly [Biotesting of disinfectants contents metals for water at ciliates]. Naukovi Praci PDAA, 5, 42–45 (in Ukrainian).
- Kushch, L. L., Miroshnikova, O. S., Matcenko, O. V., & Stepchenko, L. M. (2015). Vplyv gumilidu na rist i pokaznyky krovi gusenjat [The influence of Gumilid on body weight and hematology indicators of goslings]. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary sciences», 17(3), 224–230 (in Ukrainian).
- Mikhaylenko, E. A., Dyomshina, O. O., Ushakova, G. O., Griban, V. G., & Stepchenko, L. M. (2016). Influence of feed additive “Humilid” on protein and amino acid metabolism indicators in broiler chickens of Cobb 500 cross. The Animal Biology, 18(4), 66–71.
- Palchykov, V. A., Zazharskyi, V. V., Brygadyrenko, V. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., Borovik, I. V., Chumak, V., Kryvaya, A., & Boyko, O. O. (2019). Bactericidal, protistocidal, nematodicidal properties and chemical composition of ethanol extract of Punica granatum peel. Biosystems Diversity, 27(3), 300–306.
- Paronik, V., Stepchenko, L., Diachenko, L., Lievykh, A., & Shevtsova, A. (2015). Vplyv korvitynu ta gumilidu na stan oksydantno-antyoksydantnoi' systemy shhuriv na foni vvedennja adrenalinu [Influence of corvutin and humilid on the oxidantantioxidant system in rats after injectoin of adrenalin]. Biologija Tvaryn, 17(4), 109–114 (in Ukrainian).
- Prozorovskij, V. B. (2007). Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov farmakologicheskikh issledovanij [Statistical processing of pharmacological studies]. Psihofarmakologija i Biologicheskaja Narkologija, 7, 3–4, 2090–2120 (in Russian).
- Terekhova, V. A., Kydralieva, K. A., Rakhleeva, A. A., Pukalchik, M. A., Timofeev, M. A. & Yurishcheva, A. A. (2012). Ocenka biobezopasnosti guminovyh kislot kak komponentov nanogibridnogo detoksikanta v standartnyh test-sistemah [Biosafety assessment of humic acids as components of a nanohybrid detoxicant in standard test systems]. Toksikologicheskij Vestnik, 2, 35–40 (in Russian).
- Todoriuk, V. B., Hunchak, V. M., Gutyj, B. V., Gufriy, D. F., Hariv, I. I., Khomyk, R. I., & Vasiv, R. O. (2018). Preclinical research of the experimental preparation “Ferosel T.” Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences, 1(1), 3–9.
- Váradyová, Z., Kišidayová, S., & Jalč, D. (2009). Effect of humic acid on fermentation and ciliate protozoan population in rumen fluid of sheepin vitro. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89(11), 1936–1941.