

С В І Д О Ц Т В О

про первісне депонування штаму мікроорганізму в
Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології
НАН України

Кому видано:	Гнатуш С.О., Масловська О.Д., Мороз О.М., Комплікевич С.Я. Львівський національний університет ім. І. Франка	ДУ Національний антарктичний науковий цент МОНУ
Поштова адреса:	м. Львів, 79001 вул. Університетська, 1	м. Київ, 01601, б. Т.Шевченка, 16

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму:

Lysinibacillus sp. Екм8

первісно депонований в :

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Lysinibacillus sp. IMB B-8081

Супроводжувальна документація від депозитара одержана:

Паспорт штаму, висновок про непатогенність, договір 84-2023

Дата первісного депонування: 28.11.2023

Директор Інституту мікробіології
і вірусології НАН України

Н. Селенко

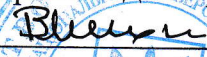
Микола СПІВАК



Handwritten signature

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Ректор Львівського національного
університету імені Івана Франка
член.-кор. НАН України
професор Володимир МЕЛЬНИК


“ 2 ” листопада 2023 р.

ПАСПОРТ

штаму мікроорганізму, який передається
в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України

Номер в депозитарії IME B-8081

Дата надходження 28.11.2023

1. Видова назва культури: *Lysinibacillus* sp.
2. Номер чи найменування штаму: *Lysinibacillus* sp. Екм8.
3. Родовід штаму (ізольований, отриманий в установі чи колекції, одержаний як мутант, селекціонований): Ендофітний мікроорганізм, виділений зі зразка *Deschampsia antarctica* E. Desv. (станція «Арцтовський», острів Кінг-Джордж, -62.163491°, -58.468756°) учасниками 27 Української антарктичної експедиції.
Депонований штам відібрали за здатністю до гетеротрофного росту з використанням низки органічних субстратів як джерел Карбону, здатністю синтезувати індол-3-оцтову кислоту та покращувати схожість насіння пшениці. Депонований штам здатний рости хемотрофно за аеробних умов.
4. Спосіб одержання штаму (ким, дата, місце, джерело, як і т. п.). Отриманий авторами з ендосфери *Deschampsia antarctica* E. Desv., серпень 2023 року.
5. Хто і де (організація, ППІ) ідентифікував штам: співробітники кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка (Гнатуш С. О., Масловська О. Д., Комплікевич С. Я., Мороз О. М.).
6. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. З використанням світлової та трансмісійної електронної мікроскопії встановили, що бактерії *Lysinibacillus* sp. Екм8 Грам-позитивні (за Грамом фарбуються негативно, однак відповідно до тесту Куї-Греггера з КОН – Грам-позитивні) спороутворювальні бактерії паличкоподібної форми. Клітини поодинокі або утворюють ланцюжки. Довжина клітин 3–5 мкм, ширина – 0,8–1 мкм. Нерухомі. Простек і чохла не мають. На середовищі триптон-соевий агар утворюють великі (4–7 мм) бежеві колонії неправильної форми. Колонії сухі, непрозорі, матові. Профіль колоній плоский, край – рівний. Структура колоній дрібнозерниста. Оксидазо- та каталазопозитивні. Ростуть за +15...+37 °С. Оптимальне значення рН для росту становить 7–7,5. Аероби. Здатні використовувати як джерело Карбону глюкозу, лактозу, фруктозу, рамнозу, галактозу, сорбіт, рафінозу, манозу та маніт. Цитрат як джерело Карбону не використовують. Желатин не розріджують. Не здатні до нітраторедукції. Сечовину не метаболізують. Стійкі до 15 % NaCl. Виділений

- штам *Lysinibacillus* sp. Екм8 відрізняється за морфологічними та фізіологічними характеристиками від усіх валідно описаних видів роду *Lysinibacillus* у визначнику Берджі.
7. Галузь використання штаму, препарату. Екобіотехнологія, промислова мікробіологія.
8. Продукт, що синтезується штамом. Індол-3-оцтова кислота.
9. Активність штаму (з вказівкою умов культивування та способу визначення), а також інші промислові показники. *Lysinibacillus* sp. Екм8 синтезує індол-3-оцтову кислоту за росту у середовищі поживний бульйон з триптофаном за +20 °С, покращує схожість насіння пшениці.
10. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Штам бактерій зберігають за температури +20±2 °С на триптон-соевому агарі (або триптон-соевому агарі, розведеному у 10 разів).
11. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам *Lysinibacillus* sp. Екм8 вирощують за аеробних умов на триптон-соевому агарі (або триптон-соевому агарі, розведеному у 10 разів) за температури +25±2 °С.
12. Відомості про патогенність /для людини, тварин чи рослин/ (оформляється як окрема довідка).
13. Генетичні особливості штаму (ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, фагів та т.п.). Послідовність нуклеотидів гена 16S рРНК штаму *Lysinibacillus* sp. Екм8 на 99,41 % ідентична до послідовності гена 16S рРНК штаму *Lysinibacillus macroides* JB_2 (згідно з базою даних SILVA rRNA).
14. Причина депонування: бактерії *Lysinibacillus* sp. Екм8 перспективні для використання у процесах розроблення мікробних препаратів для покращення проростання насіння та стимулювання росту рослин.
15. Відомості про депозитора /назва організації, що депонує штам, автор чи авторський колектив, адреса, факс, телетайп, телефон/: Львівський національний університет імені Івана Франка, Державна установа Національний антарктичний науковий центр МОН України. Авторський колектив: Гнатуш С. О., Масловська О. Д., Комплікевич С. Я., Мороз О. М.
16. Відомості про патентовласника /найменування, адреса, факс, телетайп, телефон, заявка N.....від....., патент N.....від...../ (заповнюється при наявності даних). Львівський національний університет імені Івана Франка, 79001, м. Львів, вул. Університетська, 1, тел.: (032) 255-41-00, факс: (032) 255-41-00.

Державна установа Національний антарктичний науковий центр МОН України, 01601, м. Київ, бульвар Т. Шевченка, 16, тел.: (044) 246-38-80, (044) 246-38-10.

2 листопада 2023 року

Світлана ГНАТУШ
Ольга МАСЛОВСЬКА
Соломія КОМПЛІКЕВИЧ
Оксана МОРОЗ



ВИСНОВОК

щодо дослідження вірулентності штаму *Lyzinibacillus sp. Екм8* на моделі білих мишей

Штам *Lyzinibacillus sp. Екм8* надано для випробувань Львівським національним університетом ім. І. Франка згідно договору №84-2023.

Бактерії роду *Lyzinibacillus* є грампозитивними, спороутворюючими, рухливими бактеріями. Цей рід виділили із роду *Bacillus*. Види *Lyzinibacillus* відомі своєю інсектицидною дією, мають потенціал для рекультивації земель від важких металів, можуть стимулювати ріст рослин і виступати як агент біоконтролю [10]. Відомо також про синтез ними бактеріоцинів та антибіотичних речовин. *Lyzinibacillus* не часто, але ізолюють у клінічній мікробіологічній практиці і він може викликати захворювання людини. Повідомлялося про випадки сепсису спричиненого *L. fusiformis* і *L. sphaericus*, особливо у дітей, хворих на рак [12].

Слід враховувати потенційні біологічні небезпеки, пов'язані з використанням мікроорганізмів у сільському господарстві і поширенням їх у навколишньому середовищі. Для цього бажано використання мікроорганізмів, що відносяться до 1-ої групи ризику ЄС – тобто до мікроорганізмів щодо яких немає відомосте про спричинення хвороби у людини чи тварин (або класу небезпеки 4, Україна). Така вимога є абсолютно необхідна при безпосередньому використанні біологічних агентів, що вносяться в ґрунти [14]. Бактерії роду *Lyzinibacillus* в Україні і ЄС не включено до *списку патогенних мікроорганізмів* [1] чи до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [2, 10, 13].

Для виробничих мікроорганізмів необхідно дослідно підтвердити їх безпечність. Рівень патогенності конкретного промислового мікроорганізму базується на встановленні у гострих, субхронічних та хронічних дослідів на різних видах тварин ряду токсико-гігієнічних показників: вірулентності (оральна, інгаляційна, дермальна), інвазивності, токсичності, токсигенності, імунотоксичності (алергенності), дисбіотичної та подразнюючої дії тощо [5,6,7,8].

Штами мікроорганізмів, що дозволяються МОЗ України до використання у виробництві та до інтродукції у зовнішнє середовище, відносяться до непатогенних і/або в окремих випадках умовно-патогенних [4, 6]. Це мікроорганізми III чи IV класу небезпеки по ГОСТ 12.1.007-76 що відповідає 1-ій або 2-ій групі ризику біологічних агентів по класифікації ВООЗ і ЄС [1, 2, 4, 6]. Згідно рекомендацій МОЗУ необхідно встановити непатогенність штаму мікроорганізму, який планується до використання у біопрепараті. «Якщо в експериментальних дослідженнях не виявлено будь-яких клінічних симптомів і відхилень в загальному стані лабораторних тварин, мікроорганізми не інвазивні (тобто не здатні проникати в клітини організму) і не інфекційні (невірулентні), слід вважати такі мікроорганізми непатогенними» [4]. Умовною мірою патогенності мікроорганізмів є їх вірулентність, яка виражається дозою життєздатних мікробних клітин, що спричиняє загибель 50% заражених тварин. Критерії визначення ступені вірулентності штамів мікроорганізмів у гострих дослідів наведені у [4, 5, 6, 7].

З метою депонування даного штаму проводили його первинну санітарно-гігієнічну оцінку, а саме досліджували у гострих дослідів на моделі білих мишей окремі показники патогенності – вірулентність та інвазивність (інфективність) суспензії культури [4, 5]. Щоб підтвердити відсутність патогенної дії *Lyzinibacillus sp. Екм8* на теплокровні лабораторні тварини брали для досліджень завись культури у фізіологічному розчині у концентраціях 2 та 12 млрд/мл. Дослідження проводили на безпородних білих мишах вагою 18±2 г. Тварини були адаптовані протягом 15 діб до умов утримання [3]. Досліджуваний матеріал вводили

перорально через зонд та внутрішньочеревинно за допомогою ін'єкцій. Нагляд за тваринами після затравки та ін'єкцій проводили протягом 14 днів.

Визначали вірулентність суспензії клітин, отриманих при культивуванні штаму в аеробних умовах протягом 5 діб. Для культивування використовували триптон-соевий агар розведений у 10 разів (ТСА 1:10) та температуру $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Суспензію готували на стерильному фізіологічному розчині, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності з урахуванням розмірів клітин штаму [8]. Контролювали поведінкові реакції та фізіологічний стан мишей. Критерієм авірулентності слугувала відсутність інфекційної патології та загибелі мишей протягом 14 діб при вводиті граничних рекомендованих концентрацій клітин бактерій. Керувалися граничними концентраціями клітин, рекомендованими для непатогенних мікроорганізмів. Згідно [4] вірулентними вважаються штами мікроорганізмів, ЛД₅₀ яких при надходженні через шлунок менше ніж 10^8 клітин/мишу і відповідно менше 10^6 при внутрішньочеревних чи інтраназальних ін'єкціях. Мікроорганізми, які мають ЛД₅₀ більше вказаних граничних величин належать до III або IV класу небезпеки. Для мікроорганізмів IV класу небезпеки граничними мінімальними концентраціями клітин є ЛД_{50в/ч} $\geq 10^8$ /мишу та ЛД_{50per os} $\geq 10^{10}$ /мишу. Для III класу небезпеки ЛД_{50в/ч} в межах $10^6 \div 10^8$ /мишу та ЛД_{50per os} в межах $10^8 \div 10^{10}$ /мишу ($10^9 \div 10^{11}$ /щура) [4, 5, 7].

Інвазивність (інфективність) штаму визначали за можливих природних шляхів постутплення останніх в організм, а саме по спроможності культури проникати і зберігатися в тканинах органів тварин на 14 добу після пероральної затравки. Мишам вводили одноразово *per os* активну культуру бактерій в максимальних дозах, які не призводили до загибелі тварин. Через 14 діб після зараження і закінчення терміну спостережень тварин убивали дислокацією шийних хребців [9] та проводили розтин і макроскопічні дослідження внутрішніх органів та висіви їх зразків на живильний агар (ТСА 1:10) для виявлення ретрокультур. Для контролю паралельно висівали на чашки Петрі з живильним середовищем чисту культуру штаму.

При внутрішньочеревних ін'єкціях дози 1×10^9 протягом спостереження до 14 діб мишки не відзначалися зміною поведінкових реакцій, всі тварини добре поїдали корм, змін з боку хутряного покрову не помічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла дослідних і контрольних тварин. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них не порушувались, поведінкові реакції були звичайними. Клінічних ознак інфекційного ураження тварин не відмічено. Через 14 діб після в/ч введення дози 1×10^9 КУО/мишу при висіві зразків внутрішніх органів (печінки і нирок) дослідних мишей на ТСА 1:10 виявлені ретрокультури у зразках печінки та у меншій мірі у зразках нирок.

Таблиця 1. Результати дослідження вірулентності штаму *Lyzinibacillus sp. Екм8**

Матеріал для введення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей		
						Захворіло	Загинуло	Вижило
	штук	мл	млрд. клітин		діб	штук	штук	штук
<u>Дослід:</u>								
Суспензія культури	10	0,5	1	в/ч	1	0	0	10
	10	1,0	12	per os	1	0	0	10
<u>Контроль:</u>								
Фізіологічний розчин	10	0,5	0	в/ч	1	0	0	10
	10	1,0	0	per os	1	0	0	10

*Примітка: в/ч - внутрішньочеревинні ін'єкції, per os - введення в шлунок з допомогою зонда.

Середньолетальні дози культури *Lyzinibacillus sp. Екм8* при в/ч введенні не були досягнуті і перевищували застосовану концентрацію, ЛД_{50в/ч} $> 1 \times 10^9$ клітин/мишу. На 14 добу після в/ч ін'єкцій не спостерігається носійство культури у печінці та у нирках тварин. Отримані результати свідчать про належність штаму до IV класу небезпеки [7].

Після пероральної затравки 12×10^9 клітин/мишу тварини добре поїдали корм, змін з боку хутряного покрову не помічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла дослідних і

контрольних тварин. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них не порушувались, поведінкові реакції були звичайними. Клінічних ознак інфекційного ураження не відмічено.

Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин через 14 діб після пероральної затравки не виявили носійства культури у нирках та печінці: відсутні ретрокультури при висіві зразків печінки та нирок на ТСА 1:10.

Летальна доза культури *Lyzinibacillus sp. Екм8* при пероральному введенні не встановлена, $LD_{50\text{per os}} > 12 \cdot 10^9$ клітин/мишу, штам не інфекційний (невірулентний), немає ознак інвазивності: не дисемінує у внутрішні органи дослідних тварин і не висівається на 14 добу після пероральної затравки.

Всі миші і контрольні в тому числі, які залишилися живими після закінчення терміну спостережень, були вбиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. Відсутність інфекційної патології і ознак ураження дослідних тварин було підтверджено при макроскопічному вивченні внутрішніх органів. Результати розтину показали:

- серце звичайної форми і розміру;
- легені в об'ємі не збільшені, долі легко відокремлюються одна від одної, поверхні гладенькі, спаск нема;
- шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника зовні є звичайними, на розрізі малюнок слизової незмінений;
- печінка вишневого кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена, поверхня гладенька;
- нирки звичайних розмірів і форми, поверхні гладенькі, на розрізі чіткий малюнок коркової і мозкової речовин;
- селезінка не збільшена, консистенція туга, на розрізі пульпа помірно повнокровна і темного кольору.

Таким чином, штам *Lyzinibacillus sp. Екм8* згідно отриманих у «гострих» дослідах результатів та відповідних нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом, $LD_{\text{per os}} > 12 \cdot 10^9$ та $LD_{\text{в/ч}} > 1 \cdot 10^9$ /мишу. Штам належить **ІУ класу небезпеки**: «малонебезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії» [4, 5, 6, 7]. Мікроорганізми цього класу небезпеки дозволені МОЗУ до використання у виробництві [4].

Дослідження проведені для депонування штаму у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України з метою патентування винаходу. Висновки зроблені на основі гострої пероральної та внутрішньочеревної дії без дослідження токсичності, токсигенності, дисбіотичної та хронічної дії.

Література

1. Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності. ДСП МОЗ України, ДСП 9.9.5.035.99. 1999р.
2. DIRECTIVE 2000/54/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work // <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/>.
3. Кожемякин Ю.М і ін. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. МОЗУ. Київ-2002. 156 С.
4. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ, 2004.
5. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев, 1982.
6. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды М., 1991.
7. Постановка исследований для обоснования предельно-допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. Метод. указания. М., 1983.
8. Шаповалова О.В. і ін. Стандартизація методу виготовлення суспензій мікроорганізмів // «Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях». Київ, «Знання України», 2004, стор.70-75.
9. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эктаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 - Международный вестник ветеринарии, № 2, 2015г. С. 96-107.
10. *Lyzinibacillus* Species: Their Potential as Effective Bioremediation, Biostimulant, and Biocontrol Agents January 2021 Reviews in Agricultural Science 9:103-116. DOI:10.7831/ras.9.0_103.
11. *Lyzinibacilli*: A Biological Factories Intended for Bio-Insecticidal, Bio-Control, and Bioremediation Activities// Qazi Mohammad Sajid Jamal1, Varish Ahmad// J Fungi (Basel). 2022 Dec; 8(12): 1288. doi: 10.3390/jof8121288.
12. The Genus *Lyzinibacillus*: Versatile Phenotype and Promising Future / Kayath Aimé Christian/ International Journal of Science and Research Volume 8 Issue 1, January 2019 www.ijsr.net.
13. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, видання 9-те, 2020.
14. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects// Carlos M.H. Ferreira, Helena M.V.M. Soares, Eduardo V. Soares// Випуск 682, 10 вересня 2019 р., сторінки 779—799, www.sciencedirect.com/journal.

Старший науковий співробітник, к.б.н.
Інженер

28.11.2023

 Т.М. Головач
 Л.І. Грома