

2100-1

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., Мороз О. М., Перетятко Т.Б.,
Масловська О. Д., Комплікевич С. Я.
Львівський національний університет ім. І. Франка
ДУ Національний антарктичний науковий центр МОНУ

Поштова адреса 79001, м. Львів, вул. Університетська, 1
01601, м. Київ, бульвар Т. Шевченка, 16

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму: *Pseudomonas yamanorum* 9.9 102
первісно депонований в : Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Pseudomonas yamanorum IMB B-7916

Супроводжувальна документація від депозитара одержана:

паспорт, висновок про непатогенність, договір 141-2020

Дата первісного депонування: 02.12.2020

Директор Інституту мікробіології
і вірусології НАН України



В.С. Підгорський

Адреса: 03143, Київ, вул. Заболотного, 154

www.imv.kiev.ua

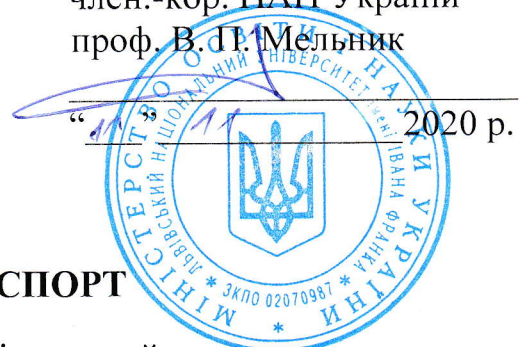
Golovacht@ukr.net, 044-294-69-60

02.12.2020

SP

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Ректор Львівського національного
університету імені Івана Франка
член.-кор. НАН України
проф. В. П. Мельник



ПАСПОРТ

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

Номер в депозитарії _____

Дата надходження _____

1. Видова назва культури: *Pseudomonas yamanorum*.
2. Номер чи найменування штаму: *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102.
3. Родовід штаму (ізолюваний, отриманий в установі чи колекції, одержаний як мутант, селекціонований): для ізоляції штаму зі зразка ґрунту, відібраного з-під моху, мис Расмусен, Антарктичний півострів (координати 65014.848, 064005.080), його водну витяжку висівали на триптон-соєвий агар (ТСА), культивували за аеробних умов, здійснювали багаторазовий пересів відібраних окремих колоній на рідке та агаризоване середовище. Депонований штам відібрали за здатністю до гетеротрофного росту з використанням низки органічних субстратів як джерел карбону. Депонований штам здатний рости хемотрофно за аеробних умов.
4. Спосіб одержання штаму (ким, дата, місце, джерело, як і т. п.). Отриманий авторами зі зразка ґрунту, відібраного учасниками Української антарктичної експедиції з-під моху на мисі Расмусен, координати (65014.848, 064005.080), травень 2020 року.
5. Хто і де (організація, ПП) ідентифікував штам: співробітники кафедри мікробіології (Гнатуш С. О., Мороз О. М., Перетятко Т. Б., Масловська О. Д., Комплікевич С. Я.), Львівський національний університет імені Івана Франка.
6. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. З використанням світлової і трансмісійної електронної мікроскопії встановили, що бактерії *P. yamanorum* 9.9_102 паличкоподібної форми, клітини поодинокі. Розмір клітин 1,5–2,0 x 0,5–0,6 мкм. Спор не утворюють. Рухомі. Грамнегативні. Простек і чохла не мають. Колонії на агаризованому середовищі блискучі, слизисті, бежевого кольору. Каталазопозитивні. Оксидазопозитивні. Ростуть за температури +2...+28 °С. Оптимальна температура для росту +8...+20 °С. Оптимальне рН 6,8–7,3. Аероби. У середовищах з лактозою і мальтозою утворюють кислоту. Як джерело

карбону використовують сахарозу, мальтозу, манозу, лактозу, дульцит, інозит, маніт, сорбіт. Мають ліполітичну (гідроліз твіну 20), протеазну (гідролізують желатин) й амілолітичну (гідролізують крохмаль) активності. За росту у триптон-соевому бульйоні утворюють аміак, гідроген сульфід не продукують. Фіксують молекулярний азот. Засвоюють сечовину.

Виділений штам 9.9_102 відрізняється за морфологічними і фізіологічними характеристиками від усіх валідно описаних видів роду *Pseudomonas* у визначнику Берджі.

7. Галузь використання штаму, препарату. Екобіотехнологія, промислова мікробіологія.

8. Продукт, що синтезується штамом. Амілаза, ліпаза, протеаза, екзополісахариди.

9. Активність штаму (з вказівкою умов культивування та способу визначення), а також інші промислові показники. *P. yamanorum* 9.9_102 характеризуються амілолітичною активністю за росту на крохмально-аміачному середовищі, ліполітичною активністю за росту на середовищі з твіном-20, протеолітичною активністю за росту на середовищі з желатином за температури +8 °С.

10. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Штам бактерій зберігають за температури +8 °С на ТСА.

11. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам *P. yamanorum* 9.9_102 вирощують аеробно на середовищі ТСА за температури +8...+20 °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 *P. yamanorum* 9.9_102 на 99,86 % ідентична до послідовності гена 16S рРНК штаму *P. yamanorum* 27E2. Бактерії стійкі до 0,1 мМ Cd^{2+} , 1 мМ Fe^{2+} , 1 мМ Cr(VI) , 2 мМ Cu^{2+} , 25 мМ Mn^{2+} .

14. Причина депонування: бактерії *P. yamanorum* 9.9_102 перспективні для використання у біотехнологіях очищення забруднених середовищ від органічних субстратів (джерела карбону), важких металів (Cd^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cr(VI) , Cu^{2+} , Mn^{2+}); мають амілолітичну, ліполітичну і протеолітичну активності.

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., Мороз О. М., Перетятко Т.Б., Масловська О. Д., Комплікевич С. Я.

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.

11 листопада 2020 року



Гнатуш С. О.

Мороз О. М.

Перетятко Т. Б.

Масловська О. Д.

Комплікевич С. Я.

Підпис

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту мікробіології і
вірусології НАН України

В.С.Підгорський
3 грудня 2020 р.

ВИСНОВОК щодо дослідження вірулентності штаму *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102 на моделі білих мишей

Штам *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102 надано для випробувань Львівським національним університетом ім. І. Франка згідно договору № 141-2020 від 12.10.2020.

Окремі види вказаного роду включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [1,2,3].

Рівень небезпеки конкретного промислового штаму мікроорганізму можна встановити за рівнем його патогенності, який визначають у гострих, субхронічних, хронічних дослідках на лабораторних тваринах, визначаючи ряд токсико-гігієнічних показників: вірулентність (оральна, інгаляційна, дермальна токсичність, подразнення очей, інвазивність, інфективність), токсичність біомаси, токсигенність, імунотоксичність (алергенність), дисбіотична дія тощо [5, 6, 7, 8]. Для депонування даного штаму визначали рівень його безпеки у гострих дослідках на моделі теплокровних лабораторних тварини – безпородних білих мишах за допомогою дослідження окремих показників патогенності - вірулентності та інфективності (інвазивності) бактерій.

Для досліджень брали завись клітин у фізіологічному розчині концентрацією $4 \cdot 10^9$ і $10 \cdot 10^9$ у 1 мл. Дослідження проводили на безпородних білих мишах вагою 18 ± 2 г. Тварини були адаптовані протягом 15 діб до умов утримання [4]. 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 48 годин. Для культивування використовували соєво-казеїновий агар (СКА) та температуру $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Суспензію готували на стерильному фізіологічному розчині, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності [9]. Контролювали поведінкові реакції та фізіологічний стан мишей. Критерієм авірулентності слугувала відсутність інфекційної патології та загибелі мишей протягом 14 діб при вводиті рекомендованих граничних концентрацій клітин бактерій. Згідно [5] вірулентними вважаються штами мікроорганізмів, LD_{50} яких при надходженні через шлунок менше ніж 10^8 клітин/мишу і відповідно менше $3 \cdot 10^7$ при внутрішньочеревних ін'єкціях. Мікроорганізми, які мають LD_{50} більше вказаних граничних величин належать до 3 чи 4 класу небезпеки. Для мікроорганізмів IV класу небезпеки керувалися рекомендованими граничними мінімальними концентраціями клітин $\text{LD}_{50\text{в/ч}}$ не менше 10^9 та $\text{LD}_{50\text{per os}}$ не менше 10^{11} клітин/мишу, а для бактерій III класу небезпеки $\text{LD}_{50\text{в/ч}}$ в межах 10^7 – 10^9 та $\text{LD}_{50\text{per os}}$ в межах 10^9 – 10^{11} клітин/мишу [6, 7, 8].

Інфективність (інвазивність) штаму визначали за можливих природних шляхів поступлення останніх в організм, а саме по спроможності клітин проникати і зберігатися в тканинах органів тварин на 14 добу після перорального зараження. Мишам вводили одноразово *per os* активну культуру бактерій в дозах, які не призводили до загибелі тварин.

Через 14 діб після зараження і закінчення терміну спостережень тварин убивали дислокацією шийних хребців [10] та проводили розтин і макроскопічне дослідження внутрішніх органів та висіви їх зразків на живильний агар (СКА) для виявлення ретрокультур. Для контролю паралельно висівали на чашки Петрі з СКА чисту культуру штаму.

Після внутрішньочеревного вводу 2 млрд. клітин бактерій протягом спостереження до 14 діб не встановлено зміни поведінкових реакцій тварин, 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 (Таблиця 1). Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин при висіві зразків на СКА через 14 діб після в/ч ін'єкцій не виявили носійства культури у нирках та печінці.

Середньолетальні дози культури *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102 при в/ч введенні не були досягнуті, оскільки останні перевищували застосовану концентрацію. Так, $LD_{50 \text{ в/ч}} > 2 \cdot 10^9$ клітин/мишу (таблиця). Отримані при в/ч введенні результати свідчать про можливість приналежності штаму по ступені небезпеки мікроорганізмів до 4-го класу, а саме "мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії" [6, 8]. На 14 добу після в/ч ін'єкцій $2 \cdot 10^9$ клітин/мишу не спостерігається носійства культури у печінці та нирках тварин.

Після пероральної затравки дози 5 млрд. 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 тварин не відмічено. Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин при висіві зразків на СКА через 14 діб після пероральної затравки не виявили носійства культури у нирках та печінці; ретрокультури при висіві зразків печінки чи нирок на СКА не виявлені.

Таблиця 1. Результати дослідження вірулентності штаму *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102*

Матеріал для введення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей		
	штук	мл	млрд. клітин			Захворіло	Загило	Вижило
<u>Дослід:</u>								
Суспензія 2-добової культури	10	0,5	2	в/ч	1	0	0	10
	10	0,5	5	per os	1	0	0	10
<u>Контроль:</u>								
Фізіологічний розчин	10	0,5	0	в/ч	1	0	0	10
	10	0,5	0	per os	1	0	0	10

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

Середньолетальна доза культури *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102 при пероральному введенні не встановлена оскільки вона перевищує застосовану дозу - $LD_{50 \text{ per os}} > 5 \cdot 10^9$ клітин/мишу. Культура не інвазивна - не зберігається і не розмножується в тканинах органів тварин через 14 днів після перорального зараження.

Всі миші і контрольні в тому числі, які залишились 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, спаян не відмічено;
- шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника зовні є звичайними, на розрізі малюнок слизової незмінений;
- печінка темно-червоного кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена, поверхня гладенька;

- нирки звичайних розмірів і форми, поверхні гладенькі, на розрізі чіткий малюнок коркової і мозкової речовини;
- селезінка не збільшена, консистенція туга, на розрізі пульпа помірно повнокровна і темного кольору.

Таким чином, штам *Pseudomonas yamanorum* 9.9_102 згідно отриманих у «гострих» дослідях результатів та відповідних нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом, що належить до непатогенних мікроорганізмів ІУ класу небезпеки: «*мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії*» [5, 6, 7, 8]. Мікроорганізми цього класу небезпеки дозволені МОЗ України до використання у виробництві [5].

Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму.

Література

1. Безпека роботи з мікроорганізмами І-ІІ груп патогенності. Державні санітарні правила МОЗ України, ДСП 9.9.5.035.99. 1999р.
2. Директива 90/679 Ради Європейської економічної співдружності.
3. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, видання 4-те, 1995.
4. Кожемякин Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. МОЗУ, Фармкомітет. Київ-2002. 156 С.
5. 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.
6. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев, 1982.
7. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды М., 1991.
8. Постановка исследований для обоснования предельно-допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. Методические указания. М., 1983.
9. Шаповалова О.В. і ін. Стандартизація методу виготовлення суспензій мікроорганізмів // Збірка «Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях» Київ, «Знання України», 2004, стор.70-75.
10. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 - Международный вестник ветеринарии, № 2, 2015г. С. 96-107.

Старший науковий співробітник, к.б.н.

Інженер

02.12.2020



Т.М. Головач

Л.І.Грома