



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К.ЗАБОЛОТНОГО

вул. Ак.Заболотного, 154, м. Київ, 03143,
Тел.: +380 44 526-11-79, +380 44 526-23-89, e-mail: secretar@imv.org.ua

СВІДОЦТВО

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

Автори: Гнатюш С.О., Масловська О.Д., Комплікевич С.Я., Мороз О.М.

Депозитор: Львівський національний університет імені Івана Франка

Поштова адреса: 79001, м. Львів, вул. Університетська, 1

Цим підтверджується, що штаму мікроорганізму:

Bacillus sp. RT1

первісно депонований відповідно до «Інструкції про порядок депонування в Україні штамів мікроорганізмів з метою здійснення патентної процедури» в

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Bacillus sp. IMB B-8128

Супровідна документація, яку одержано від депозитора:

паспорт, договір № 126-2024

Дата первісного депонування

21.11.2024



Директор Інституту мікробіології
і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, академік НАН України *Микола СПІВАК*



ІМВ В-8128
Bacillus sp. RT1

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту мікробіології
і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, академік НАН України



Микола СПІВАК

21 листопада 2024 .

В И С Н О В О К

**щодо патогенних властивостей штаму *Bacillus sp.* RT1
за результатами дослідження вірулентності для безпородних білих мишей**

Штам *Bacillus sp.* RT1 надано для випробувань авторами Гнатуш С. О., Масловською О. Д., Комплікевич С. Я., Мороз О. М., депозитор Львівський національний університет імені Івана Франка, відповідно до договору №126-2024. Бактерії *Bacillus sp.* RT1 депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за ідентифікаційним номером ІМВ В-8128. Депонування штаму здійснено згідно змін постанови КМУ №1076 від 23.10.2019 щодо «Порядку проведення державних випробувань, державної реєстрації та перереєстрації, видання переліків пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні» і «Порядку проведення еколого-експертної оцінки матеріалів, поданих для реєстрації пестицидів і агрохімікатів».

Штами цього виду в Україні і ЄС не включено до *списку патогенних мікроорганізмів* [3] чи до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [6]. Є окремі повідомлення про ендокардити та клінічні інфекції, спричинені цими бактеріями. Штами цього виду застосовують як продуценти різноманітних БАР, як агенти біоконтролю у рослинництві, компоненти біопрепаратів для підвищення врожайності сільськогосподарських рослин та покращання структури ґрунтів, а також як пробіотики для людини та тварин [10].

Перевірку патогенних властивостей штаму виконано з використанням безпородних білих мишей вагою 18-20 г, шляхом введення суспензій клітин бактерій перорально через зонд та внутрішньочеревно (в/ч) шляхом ін'єкцій. Миші були повністю адаптовані до умов утримання. Догляд за тваринами після ін'єкцій досліджуваного матеріалу проводили щоденно упродовж 14 діб [12-14].

ВИЗНАЧАЛИ:

1. Вірулентність суспензій активних клітин, отриманих у разі культивування штаму упродовж 48 годин в аеробних умовах на соєво-казеїновому агарі (СКА) за температури $25\pm 2^\circ\text{C}$. Суспензія клітин бактерій штаму *Bacillus sp.* RT1. На стерильному ізотонічному розчині натрій хлориду концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту

каламутності та контролювали шляхом титрування з висівом на живильне агаризоване середовище [7].

2. Інфективність (інвазивність) штаму визначали шляхом встановлення можливості дисемінації бактерій у тканини внутрішніх органів тварин після зараження з урахуванням можливого природного шляху проникнення (per os) до макроорганізму. З цією метою мишам вводили одноразово активну культуру бактерій в максимальних дозах, які не призводять до загибелі тварин. Після 14 діб після зараження проводили вимушений забій лабораторних білих мишей, мікроскопічні дослідження фарбованих мазків-відбитків їх внутрішніх органів та висіви зразків тканин на живильне середовище.

За період спостереження після введення суспензій живих бактерій (перорально у дозах від $0,5 \times 10^9$ до 5×10^9 КУО на мишу та внутрішньочеревно у дозах від 1×10^9 до 5×10^9 КУО на мишу [7]) усі тварини добре поїдали корм, мали жвавий вигляд, не було відмічено змін хутряного покриву. Достовірної різниці в масі та температурі тіла дослідних контрольних тварин, а також в загальному стані організму та поведінці не було.

Таблиця. Результати дослідження вірулентності штаму
Bacillus sp. RT1

Матеріал для введення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей		
						Захворіло	Загибло	Вижило
	Гол.	мл	млрд. клітин	в/ч per os	діб	штук	штук	штук
<u>Дослід:</u>								
Суспензія активних 48 годинних клітин бактерій	6	0,5	1,0	в/ч	1	0	0	6
	6	0,5	5,0	в/ч	1	0	0	6
	6	0,5	0,5	per os	1	0	0	6
	6	0,5	1,0	per os	1	0	0	6
	6	0,5	5,0	per os	1	0	0	6
<u>Контроль:</u>								
Фізіологічний розчин	6	0,5	0	в/ч	1	0	0	6
	6	0,5	0	per os	1	0	0	6

Усі миші дослідних і контрольних груп після закінчення терміну спостереження були вбиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів.

Результати розтину показали: серце – в межах анатомічної норми; легені в об'ємі не збільшені, долі легко відокремлюються одна від одної, поверхні гладенькі, спайок не відмічено; шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника зовні без змін, на розрізі малянок слизової незмінений; печінка темно-червоного кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена,

поверхня гладенька, нирки не збільшені, бобоподібної форми, поверхні гладенькі, на розрізі чіткий малюнок кіркової і мозкової зон, межа між зонами не зглажена; селезінка не збільшена, пружної консистенції, на розрізі пульпа помірно повнокровна і темного кольору.

Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин після 14 діб після початку досліджень показали, що даний штам мікроорганізмів не інфективний, не дисемінує і не розмножується в організмі теплокровних.

Пероральне та внутрішньочеревне введення суспензій живих клітин культур клітин не спричинило інвазій бактерій у внутрішні органи тварин. Ретрокультури не виявлені.

Отримані результати свідчать про авірулентність штаму для дослідження теплокровних тварин (LD_{50} в/ч > 5 млрд. клітин/мишу, LD_{50} PER OS > 5 млрд. клітин/мишу)

Таким чином, згідно отриманих результатів та відповідних нормативних документів [4,5,6, 8-11], штам *Bacillus sp. RT1* належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин. Згідно даних щодо вірулентності, без урахування рівнів токсичності, токсигенності, алергенності, дисбіотичної дії штам *Bacillus sp. RT1* може вважатися непатогенним.

Висновок видано для депонування вищезгаданої культури бактерій.

Література

1. Директива 90/679 Ради Європейської економічної співдружності.
2. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, видання 4-те, 1995 р.
3. Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності. ДСП МОЗ України, ДСП 9.9.5.035.99. 1999 р.
4. 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/>.
5. Кожемякин Ю. М і ін. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. МОЗУ, Фармкомітет. Київ-2002. 156 С.
6. 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.
7. 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.
8. Смирнов В. В, Резник С. Р., Василевская И. А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова думка, 1982.
9. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use/ Iryna B Sorokulova et al.// Dig Dis Sci. 2008 Apr; 53(4). P. 954-63.
10. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, видання 9-те, 2020.

11. Anne de Boer Sietske, A., Diderichsen, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. Amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 1–4 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00164689>.
12. Ammar Algburi et al. Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895// *Advances in Microbiology* January 2016, 06:432-452.
13. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects// Carlos M.H. Ferreira et al.// Випуск 682, 10 вересня 2019 р., сторінки 779—799, www.sciencedirect.com/journal.
14. Перелік пріоритетних біологічних патогенних агентів. Розпорядження Кабінету Міністрів України від 15.09.2023 р. № 800-р.

Науковий співробітник, к.м.н.

Валентина БОЙКО

Інженер

Тетяна ЖИЛІХОВСЬКА

21 листопада 2024