

С В І Д О Ц Т В О

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

Кому видано: Чайка О.М., Перетятко Т.Б., Гнатуш С.О.
Львівський національний університет ім. І. Франка
Поштова адреса м. Львів, 79001 вул. Університетська, 1

Цим підтверджується, що штаму мікроорганізму:

Moorella thermoacetica Nadia-3

первісно депонований в :

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Moorella thermoacetica IMB B-7957

Супроводжувальна документація від депозитара одержана:

паспорт, висновок про непатогенність, договір 54-2021

Дата первісного депонування: 23.07.2021

Директор Інституту
мікробіології
і вірусології НАН України



Адреса: 03143, Київ, вул. Заболотного, 154

www.imv.kiev.ua;

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

24.07.2021

AK

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

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

“14” 2021 р.

ПАСПОРТ

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

Номер в депозитарії ЖМВ В-7957
Дата надходження 23.07.2021

1. Видова назва культури: *Moorella thermoacetica*.
2. Номер чи найменування штаму: *Moorella thermoacetica* Nadia-3.
3. Родовід штаму (ізолюваний, отриманий в установі чи колекції, одержаний як мутант, селекціонований). Штам ізолювали зі зразка породи відвалу шахти "Надія" на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.
4. Спосіб одержання штаму (ким, дата, місце, джерело, як і т. п.). Штам одержаний авторами зі зразка породи відвалу шахти "Надія" із глибини 50 см (підніжжя) координати (50.296885, 24.270333) у травні 2016 року. З цією метою водну витяжку породи висівали у середовище ТГ, культивували за анаеробних умов, здійснювали багаторазовий пересів відібраних окремих колоній на рідке та агаризоване середовище ТГ. Депонований штам відібрали за здатністю до гетеротрофного росту за анаеробних умов з використанням широкого спектру карбоновмісних і неорганічних сполук за температури +55 °С.
5. Хто і де (організація, ПП) ідентифікував штам: аспірантка кафедри мікробіології Чайка О. М. і співробітники кафедри мікробіології Перетятко Т. Б., Гнатуш С. О., Львівський національний університет імені Івана Франка.
6. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. З використанням світлової і трансмісійної електронної мікроскопії встановили, що бактерії *M. thermoacetica* Nadia-3 мають паличкоподібну форму, клітини поодинокі розміром 4,0–10x1–2 мкм. Утворюють спори. Грампозитивні. Колонії на агаризованому середовищі світло-коричневого кольору. Каталазонегативні. Оксидазопозитивні. Ростуть за температури +30...+65 °С. Оптимальна температура для росту +50...+55 °С. Оптимальне рН 6,5–7,0. Анаероби. Ростуть у середовищах, в яких джерелом Карбону є

натрій лактат, натрій ацетат, етанол, гліцерин, фумарова кислота, фруктоза, арабіноза, мальтоза, маноза, лактоза, арабіноза. Мають амілолітичну (гідролізують крохмаль) активність. Як акцептор електронів можуть використовувати сполуки Fe(III) , Cr(VI) , NO_3^- , S^0 , SO_4^{2-} та $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Гідролізують аліфатичний тіол, складний ефір жирної кислоти, глюкозу, сорбіт, адотинол.

Виділений штам Nadia-3 відрізняється за морфологічними і фізіологічними характеристиками від усіх валідно описаних штамів *Moorella thermoacetica*.

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

8. Продукт, що синтезується штамом. Амілаза, екзополісахарид.

9. Активність штаму (з вказівкою умов культивування та способу визначення), а також інші промислові показники. Бактерії *M. thermoacetica* Nadia-3 характеризуються амілолітичною активністю за росту у середовищі TF з крохмалем за температури $+55\text{ }^\circ\text{C}$, синтезують екзополісахарид за росту у середовищі TF за температури $+55\text{ }^\circ\text{C}$.

10. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Штам бактерій зберігають за температури $+4\dots+8\text{ }^\circ\text{C}$ у середовищі TF за анаеробних умов.

11. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам *M. thermoacetica* Nadia-3 вирощують анаеробно у середовищі TF (г/л): NH_4Cl – 0,5; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,16; K_2HPO_4 – 1,6; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 1; дріжджовий екстракт – 2; глюкоза – 3; $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; елементна сірка – 1 за температури $+50\dots+55\text{ }^\circ\text{C}$.

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 *M. thermoacetica* Nadia-3 (GenBank MW940839) на 99,2 % ідентична до послідовності гена 16S рРНК штаму *M. thermoacetica* JCA-5801. Бактерії стійкі до 20 мМ NO_3^- , 1 мМ Fe^{2+} , 1 мМ Cr (VI).

14. Причина депонування. Бактерії *M. thermoacetica* Nadia-3 перспективні для використання у біотехнологіях очищення забруднених середовищ від органічних субстратів (джерела карбону), важких металів (Fe^{2+} , Cr (VI)), неорганічних сполук (NO_3^- , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ та S^0); мають амілолітичну активність, синтезують екзополісахарид.

15. Відомості про депозитора /назва організації, що депонує штам, автор чи авторський колектив, адреса, факс, телетайп, телефон/: Львівський національний університет імені Івана Франка. Авторський колектив: Чайка О. М., Перетятко Т. Б., Гнатуш С. О.

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.

12 травня 2021 року



Чайка О. М.

Перетятко Т. Б.

Гнатуш С. О.



ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Інституту мікробіології і вірусології НАН України

В.С.Підгорський

19.07.2021р.

ВИСНОВОК

щодо дослідження вірулентності штаму *Moorella thermoacetica Nadia-3* на моделі білих мишей

Штам *Moorella thermoacetica Nadia-3* надано для випробувань Львівським національним університетом імені Івана Франка згідно договору № 54-2021 від 19.04.2021.

Штами цього виду в Україні не включено до списку патогенних мікроорганізмів [1, 5] чи в ЄС до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [2].

Для виробничих мікроорганізмів необхідно дослідно підтвердити їх безпечність. Рівень патогенності конкретного промислового мікроорганізму базується на встановленні у гострих, субхронічних та хронічних дослідах на різних видах тварин ряду токсико-гігієнічних показників: вірулентності (оральна, інгаляційна, дермальна), інвазивності, токсичності, токсигенності, імунотоксичності (алергенності), дисбіотичної та подразнюючої дії тощо [3, 4, 6, 7].

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, 7]. 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 [2, 4, 6, 7]. 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» [7]. Умовною мірою патогенності мікроорганізмів є їх вірулентність, яка виражається дозою життєздатних мікробних клітин, що спричиняє загибель 50% заражених тварин. Критерії визначення у гострих дослідах вірулентності та класу небезпеки штамів мікроорганізмів наведені нижче.

З метою депонування даного штаму проводили його первинну санітарно-гігієнічну оцінку, а саме досліджували у гострих дослідах на моделі білих мишей окремі показники патогенності – вірулентність та інвазивність (дисемінацію) суспензії культури [4, 5]. Щоб підтвердити відсутність патогенної дії *Moorella thermoacetica Nadia-3* на теплокровні лабораторні тварини брали для досліджень завись клітин у фізіологічному розчині у концентраціях 1 та 6,3 млрд/мл.

Перевірку вірулентних властивостей штаму виконано з використанням статевозрілих беспородних білих мишей вагою 18-20 г шляхом введення суспензій клітин перорально через зонд та внутрішньочеревинно в ін'єкціях [3,7]. Тварини були адаптовані протягом 14 днів до умов утримання [9]. Нагляд за тваринами після ін'єкцій проводили протягом 14 днів. Визначали:

1. Вірулентність суспензії активних клітин, отриманих при культивуванні штамів в анаеробних умовах при температурі 37 ± 1 °C. Штам *Moorella thermoacetica Nadia-3* вирощували протягом 16 днів на TF бульйоні (г/л): NH_4Cl – 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,16, K_2HPO_4 – 1,6, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1, дріжджовий екстракт – 0,5, глюкоза – 3, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, елементна сірка – 1. Осаджували клітини протягом 15 хв. при 3000 об/хв. Суспензію готували на стерильному фізіологічному розчині, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності з урахуванням розміру клітин бактерій ($k=1$) [10].
2. Інвазивність штаму визначали за можливих природних шляхів поступлення останніх в організм, а саме по спроможності культури проникати в тканинах органів тварин і зберігатися

там до 14 доби після пероральної затравки. 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 [8] та проводили розтин і макроскопічні дослідження внутрішніх органів та висіви їх зразків на живильний агар (СКА) для виявлення ретрокультур в анаеробних умовах. Для контролю паралельно висівали на чашки Петрі з живильним середовищем СКА чисту культуру штаму.

Контролювали поведінкові реакції та фізіологічний стан мишей. Критерієм авірулентності слугувала відсутність інфекційної патології та загибелі мишей протягом 14 діб при дослідженні граничних рекомендованих концентрацій клітин бактерій для непатогенних мікроорганізмів. Згідно [7] вірулентними вважаються штами мікроорганізмів, ЛД₅₀ яких при надходженні через шлунок менше ніж 10⁸ клітин/мишу і відповідно менше 10⁶ 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}>10⁸/мишу (10⁹/щура) та ЛД_{50per os}>10¹⁰/мишу(10¹¹/щура). Для **III класу небезпеки** ЛД_{50в/ч} в межах 10⁶–10⁸/мишу (10⁷–10⁹/щура) та ЛД_{50per os} в межах 10⁸–10¹⁰/мишу (10⁹–10¹¹/щура) [3, 6, 7, 8].

В період спостереження після вводу суспензії живих клітин бактерій (перорально у дозах 2,1*10⁹ клітин/мишу чи внутрішньочеревинно у дозах 0,5*10⁹) всі тварини були активними, добре поїдали корм, фізіологічні відправлення у них не порушувались, поведінкові реакції були звичайними, змін з боку хутряного покриву не помічено. Клінічних ознак токсикозу не відмічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла дослідних і контрольних тварин, а також в загальному стані та поведінці.

Мікробіологічні дослідження зразків тканин внутрішніх органів дослідних тварин через 14 діб після початку досліду показали, що даний штам не інфективний, не дисемінує і не розмножується в організмі теплокровних. Пероральне і внутрішньочеревне введення суспензії живих клітин культури не спричиняло інвазії бактерій у внутрішні органи тварин – печінку, легені, нирки. Ретрокультури в анаеробних умовах на СКА не виявлені.

Таблиця. Результати дослідження вірулентності штаму *Moorella thermoacetica Nadia-3* *

Матеріал для введення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей		
						Захворіло	Загибло	Вижило
	штук	мл	млрд. клітин		діб	штук	штук	Штук
<u>Дослід:</u>								
Суспензія 16-добових клітин	10	0,5	0,5	в/ч	1	0	0	10
- // -	10	0,35	2,1	per os	1	0	0	10
<u>Контроль:</u>								
Фізіологічний розчин	7	0,5	0	в/ч	1	0	0	7
- // -	7	0,35	0	per os	1	0	0	7

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

Отримані результати свідчать про авірулентність *Moorella thermoacetica Nadia-3* для досліджених теплокровних тварин (ЛД_{50 в/ч}>0,5 млрд. кл., ЛД_{50 per os}>2,1 млрд. клітин/мишу) (таблиця). Застосовані внутрішньочеревні дози перевищують рекомендовані граничні значення для мікроорганізмів IV класу небезпеки.

Всі миші у тому числі і контрольні, які залишились живими після закінчення терміну спостережень, були вбиті дислокацією шийних хребців, проведено їх розтин і дослідження

внутрішніх органів [8]. 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 одне від одного, поверхні гладенькі, спаяк 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, культура *Moorella thermoacetica Nadia-3* згідно отриманих у «гострих» дослідах результатів та відповідних нормативних матеріалів належить до групи авірулентних мікроорганізмів [3, 4, 6, 7] не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин - білих мишей. **Штам належить до IV класу небезпеки мікроорганізмів: "малонебезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії"** [6].



Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму, який є об'єктом винаходу і планується в Україні до інтродукції у зовнішнє середовище як компонент біопрепарату.

Література

1. Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності. Державні санітарні правила 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.
3. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев, 1982.
4. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды М., 1991.
5. Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения. МЗ СССР, 1980.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

Старший науковий співробітник, к.б.н.

Інженер
19.07.2021

 Т.М. Головач
 Л.І. Грома