

7.0007/2020

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

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму: Paenibacillus tundrae 5A-101

первісно депонований в: Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:
Paenibacillus tundrae IMB B-7915

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

Handwritten initials 'AK' in the bottom right corner.

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

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

“12”

2020 р.



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: *Paenibacillus tundrae*.
2. Номер чи найменування штаму: *Paenibacillus tundrae* 5A–101.
3. Родовід штаму (ізолюваний, отриманий в установі чи колекції, одержаний як мутант, селекціонований): для ізоляції штаму зі зразка ґрунту, відібраного з-під моху *Deschampsia antarctica*, о. Барселот, Антарктида (координати 65°19.705, 064°08.060), його водну витяжку висівали на нутрієнт агар, 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 та стійкістю до впливу солей купруму, хрому, кобальту, феруму, мангану, кадмію. Депонований штам здатний рости хемотрофно за аеробних та анаеробних 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 *Deschampsia antarctica* на о. Барселот, координати (65°19.705, 064°08.060), жовтень 2019 року.
5. Хто і де (організація, ПП) ідентифікував штам: співробітники кафедри мікробіології (Гнатуш С. О., Перетятко Т. Б., Мороз О. М., 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. tundrae* 5A–101 паличкоподібної форми, клітини поодинокі або утворюють ланцюжки. Довжина клітин 1,5–3 мкм, ширина – 0,8–1 мкм. Здатні утворювати центрально розташовані овальні спори, діаметр яких перевищує діаметр клітини. Рухомі. Грампозитивні (за Грамом фарбуються негативно, однак відповідно до тесту Куї-Греггера з КОН –

грампозитивні). Простек і чохлів не мають. На середовищі нутрієнт агар утворюють поверхневі матові колонії бежевого кольору з лапатым краєм. Каталазонегативні. Оксидазонегативні. Ростають за температури +2...+37 °С. Оптимальна температура для росту +20...+28 °С. Оптимальне рН 6,8–7,3. Факультативні анаероби. Відновлюють нітрати до нітритів. На м'ясо-пептонному бульйоні характер росту осадовий, який супроводжується утворенням гідроген сульфїду. Амїак під час росту на м'ясо-пептонному бульйоні не продукують. Сечовину не метаболізують. Індолу з триптофану не утворюють. За використання як джерела карбону лактози, мальтози, манози, сахарози і манїту утворюють кислоти. Характеризуються аргїніндекарбоксілазною, орнітиндекарбоксілазною, лізіндекарбоксілазною, β-галактозїдазною, амїлолітичною (гідролїз крохмалю) і ліполїтичною активностями (гідролїз твіну 20). Протеолїтичну активність не виявляють. Фїксують молекулярний азот. Здатні до нїтрифікації та окиснення тіосульфату.

Виділений штам *P. tundrae* 5A–101 відрізняється за морфологічними і фізіологічними характеристиками від усіх валідно описаних видів роду *Raenibacillus* у визначнику Берджі.

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

8. Продукт, що синтезується штамом. Амїлаза, ліпаза, антибіотик.

9. Активність штаму (з вказівкою умов культивування та способу визначення), а також інші промислові показники. *P. tundrae* 5A–101 характеризуються амїлолітичною та ліполїтичною активностями за росту на крохмально-амїачному та середовищі з твіном-20 за температури +20 °С.

10. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Штам бактерій зберігають за температури +16 °С на нутрієнт агарі.

11. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам *P. tundrae* 5A–101 вирощують аеробно на середовищі нутрієнт агар за температури +25 °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. tundrae* 5A–101 на 100 % ідентична до послїдовності гена 16S рРНК штаму *Raenibacillus tundrae* Ab10b (згідно бази даних SILVA rRNA). Бактерії стійкі до 50 мкМ Cd²⁺, 1 мМ Fe²⁺, 2 мМ Cu²⁺, 0,5 мМ Cr(VI), 15 мМ Mn²⁺, 10 мМ Co²⁺.

14. Причина депонування: бактерії *P. tundrae* 5A–101 перспективні для використання у біотехнологіях очищення забруднених середовищ від органічних субстратів (джерела карбону), важких металів (Cd²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Cr(VI), Mn²⁺, Co²⁺), а також для отримання амїлолітичних та ліполїтичних ферментів.

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

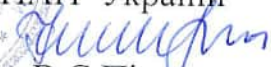
16. Відомості про патентовласника /найменування, адреса, факс, телетайп, телефон, заявка N.....від....., патент N.....від...../ (заповнюється при наявності даних). Львівський національний університет імені Івана Франка, 79001, м. Львів, вул. Університетська, 1, тел.: (032) 255-41-00, факс: (032) 255-41-00.


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

Затверджую
Директор Інституту мікробіології і
вірусології НАН України

В.С.Підгорський
3 грудня 2020 р.



В И С Н О В О К щодо дослідження вірулентності штаму *Paenibacillus tundrae* 5A-101 на моделі білих мишей

Штам *Paenibacillus tundrae* 5A-101 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, 12, 13].

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 $2,1 \cdot 10^9$ і $10,6 \cdot 10^9$ 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 з урахуванням розмірів клітин штаму [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, ЛД₅₀ 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 ЛД₅₀ більше вказаних граничних величин належать до 3 чи 4 класу небезпеки. Для мікроорганізмів IV класу небезпеки керувалися рекомендованими граничними мінімальними концентраціями клітин ЛД_{50в/ч} не менше 10^9 та ЛД_{50per os} не менше 10^{11} клітин/мишу, а для бактерій III класу небезпеки ЛД_{50в/ч} в межах 10^7 – 10^9 та ЛД_{50per 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 максимальних 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 1,05 млрд. клітин бактерій 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 встановило носійство культури у нирках та печінці.

Середньолетальні дози культури *Paenibacillus tundrae* 5A-101 при в/ч введенні не були досягнуті, оскільки останні перевищували застосовану концентрацію. Так, $LD_{50\text{в/ч}} > 1,05 \cdot 10^9$ 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 $1,05 \cdot 10^9$ клітин/мишу ще спостерігається носійство культури у печінці та нирках тварин.

Після пероральної затравки дози 5,3 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 *Paenibacillus tundrae* 5A-101*

Матеріал для введення	Кількість мишей штук	Доза		Шлях введення	Курс введення діб	Кількість мишей		
		мл	млрд. клітин			Захворіло штук	Загинуло штук	Вижило штук
<u>Дослід:</u>								
Суспензія	10	0,5	1,05	в/ч	1	0	0	10
2-добової культури	10	0,5	5,3	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 - внутрішньочеревинні ін'єкції, per os - введення в шлунок за допомогою зонда.

Середньолетальна доза культури *Paenibacillus tundrae* 5A-101 при пероральному введенні не встановлена оскільки вона перевищує застосовану дозу - $LD_{50\text{per os}} > 5,3 \cdot 10^9$ 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, спаяк не відмічено;
- шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника зовні є звичайними, на розрізі малюнок слизової незмінений;

- печінка контролю і пероральної дослідної групи темно-червоного кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена, поверхня гладенька; печінка в/ч дослідної групи світло-червона, що очевидно спричинено наявністю у ній життєздатної культури штаму;
- 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 *Paenibacillus tundrae* 5A-101 згідно отриманих у «гострих» дослідях результатів та відповідних нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом, що належить до непатогенних мікроорганізмів **IY 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 I-II 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.
11. Проект закону України №4015 від 24.01.2014 «Про заборону розміщення іноземними державами, наддержавними утвореннями, організаціями або фізичними особами вірусно-біологічних лабораторій 3 та 4 (найвищих) рівнів біологічної безпеки на території України».
12. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis-typhimuricus* из организма человека и животных. Киев: Наукова думка, 1980.
13. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова думка. 1982.

Старший науковий співробітник, к.б.н.

Інженер

02.12.2020

 Т.М. Головач
 Л.І.Грома