

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:	м. Львів, 79001 вул. Університетська, 1	м. Київ, 01601, б. Т.Шевченка, 16

Цим підтверджується, що штаму мікроорганізму:

Pedobacter sp. 2U-K-37

первісно депонований в :

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Ресстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Pedobacter sp. IMB B-7982

Супроводжувальна документація від депозитара одержана:

паспорт, висновок про непатогенність, договір 107-2021

Дата первісного депонування: 06.12.2021

Директор Інституту мікробіології
і вірусології НАН України



06.12.2021

Адреса: 03143, Київ, вул. Заболотного, 154

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН

.<https://imv.org.ua>

Депозитарій <https://imv.org.ua/>

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



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

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

“ ___ ” _____ 2021 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: *Pedobacter* sp.
2. Номер чи найменування штаму: *Pedobacter* sp. 2U-K-37.
3. Родовід штаму (ізолюваний, отриманий в установі чи колекції, одержаний як мутант, селекціонований): для ізоляції штаму зі зразка ґрунту, відібраного з місця гніздування *Larus dominicanus* (Мартина домініканського), о. Галіндез, Морська Антарктика (координати S 65.247453, W 064.249915), його водну витяжку висівали на крохмально-аміачний 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 хрому, феруму, мангану, кадмію.
4. Спосіб одержання штаму (ким, дата, місце, джерело, як і т. п.). Отриманий авторами зі зразка ґрунту, відібраного учасниками Української антарктичної експедиції з місця гніздування *Larus dominicanus* (Мартина домініканського), о. Галіндез, Морська Антарктика (координати S 65.247453, W 064.249915), березень 2021 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 *Pedobacter* sp. 2U-K-37 паличкоподібної форми, клітини поодинокі або утворюють ланцюжки. Довжина клітин 1,5–2 мкм, ширина – 0,8–1 мкм. Спор не утворюють. Нерухомі. Грамнегативні. На крохмально-аміачному агарі утворюють поверхневі круглі, блискучі колонії рожевого кольору з рівним краєм, які темніють у міру старіння колоній.

Колонії дрібні, 1-3 мм у діаметрі. Каталазопозитивні. Оксидазонегативні. Ростуть за температури +4...+25 °С. Оптимальна температура для росту +20 °С. Оптимальне рН 6,8–7,3. Мікроаерофіли. На триптон-соєвому бульйоні рівномірний характер росту, який супроводжується утворенням аміаку. Гідроген сульфід у під час росту на триптон-соєвому бульйоні не продукують. Індолу з триптофану не утворюють. Помірні галофіли, витримують до 15 % NaCl. За використання як джерела карбону лактози, мальтози і глюкози утворюють кислоту. За росту у середовищі Гісса із лактозою, ксилозою, манітом та глюкозою зумовлюють розрідження середовища. Характеризуються амілолітичною (гідроліз крохмалю), ліполітичною (гідроліз твіну-20) та протеолітичною (розрідження желатину) активностями. Ростуть на середовищі Менкіної з лецитином. Фіксують молекулярний азот. Здатні до нітрифікації. Ростуть на голодному агарі (триптон-соєвий агар, розведення 1:10).

Виділений штам *Pedobacter* sp. 2U-K-37 відрізняється за морфологічними і фізіологічними характеристиками від усіх валідно описаних штамів роду *Pedobacter*.

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. *Pedobacter* sp. 2U-K-37 характеризуються протеолітичною, амілолітичною та ліполітичною активностями за росту на триптон-соєвому бульйоні з 12,5% желатину, крохмально-аміачному середовищі та середовищі з твіном-20, відповідно, за температури +20 °С.

10. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Штам бактерій зберігають за температури +4 ... +6 °С на крохмально-аміачному середовищі.

11. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам *Pedobacter* sp. 2U-K-37 вирощують аеробно на крохмально-аміачному середовищі за температури +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 *Pedobacter* sp. 2U-K-37 на 98,37 % ідентична до послідовності гена 16S рРНК штаму *Pedobacter humicola* R135 (згідно з базою даних GenBank – NCBI rRNA). Бактерії стійкі до 2 мкМ Cd²⁺, 20 мМ Fe²⁺, 0,5 мМ Cr(VI), 5 мМ Mn²⁺.

14. Причина депонування: бактерії *Pedobacter* sp. 2U-K-37 перспективні для використання у біотехнологіях очищення забруднених середовищ від органічних субстратів (джерела карбону), важких металів (Cd²⁺, Fe²⁺, Cr(VI), Mn²⁺), а також для отримання протеаз, амілаз та ліпаз. Штам здатний продукувати екзополісахариди.

15. Відомості про депозитора /назва організації, що депонує штамп, 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.

2 листопада 2021 року

Гнатуш С. О.

Перетятко Т. Б.

Мороз О. М.

Масловська О. Д.

Комплікевич С. Я.



ВИСНОВОК

щодо дослідження вірулентності штаму *Pedobacter sp. 2U-K-37* на моделі білих мишей

Штам *Pedobacter sp. 2U-K-37* надано для випробувань Львівським національним університетом імені Івана Франка згідно договору № 107-2021 від 04.08.2021.

Штами цього роду 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]. Це бактерії, що існують у ґрунті, активному мулі, рибах. Для них характерна гіперинолітична активність та здатність синтезувати різноманітні інші ферменти – хітіназу, метал-протеази, К-карагінази [11].

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 безпеки 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 безпеки 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 *Pedobacter sp. 2U-K-37* на теплокровні лабораторні тварини брали для досліджень завесь клітин у фізіологічному розчині у концентраціях 4,2 та 16,6 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 діб до умов утримання [9]. Нагляд за тваринами після ін'єкцій проводили протягом 14 днів. Визначали:

3. Вірулентність суспензії активних клітин, отриманих при культивуванні штамів в аеробних умовах при температурі 20 ± 1 °C. Штам *Pedobacter sp. 2U-K-37* вирощували протягом 20 діб на соєво-казеїновому агарі (СКА). Суспензію клітин готували на стерильному фізіологічному розчині, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності з урахуванням розміру клітин бактерій ($k=1.5$) [10].
4. 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 днів 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. 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 днів 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 8,3x10⁹ клітин/мишу, внутрішньочеревинно у дозах 2,1x10⁹) 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 днів після початку дослідження 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 на СКА не виявлені.

Таблиця. Результати дослідження вірулентності штаму *Pedobacter sp. 2U-K-37* *

Матеріал для введення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей		
						Захворіло	Загибло	Вижило
	штук	мл	млрд. клітин		днів	штук	штук	штук
Дослід:								
Суспензія 20-добових клітин	10	0,5	2,1	в/ч	1	0	0	10
- // -	10	0,5	8,3	per os	1	0	0	10
Контроль:								
Фізіологічний розчин	7	0,5	0	в/ч	1	0	0	7
- // -	7	0,5	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 *Pedobacter sp. 2U-K-37* для досліджених теплокровних тварин (ЛД_{50 в/ч} > 2 млрд. кл., ЛД_{50 per os} > 8 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 *Pedobacter sp. 2U-K-37* 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]. Мікроорганізми III - IV класу небезпеки дозволені МОЗ України до використання у виробництві.

Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму, який буде об'єктом винаходу і планується в Україні до інтродукції у зовнішнє середовище як можливий 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. Постанова досліджень для обґрунтування предельно-допустимих концентрацій виробничих штамів мікроорганізмів і на їх основі готових форм препаратів в повітрі робочої зони. 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.
11. Steyn P. L. et al. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family Sphingobacteriaceae fam. nov. International Journal of Systematic Bacteriology (1998), 48, 165-177

Старший науковий співробітник, к.б.н.

Інженер

Т.М. Головач

Л.І.Грома

06.12.2021