



## Zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów a działania Unii Europejskiej i Polski dla zachowania bezpieczeństwa biologicznego

Barbara Tudek

Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

**Genetically modified microorganisms, their application and activities of European Union and Poland to ensure biosafety\***

### Summary

Genetically modified microorganisms (GMM) are widely applied in research, medicine, pharmaceutical and food industries, as well as in agriculture and environment protection. The assessment of actual risk to human health and to environment related to GMM application is often difficult, because there is insufficient experience in the application of GMM in areas other than research. That is why European Union, as well as Poland, have undertaken several activities serving to prevent any harm to human health and/or to environment, which might result from utilization of genetic engineering. These activities are performed on the level of legislation and on the level of research programs, aiming at the establishment of effective methods of GMM containment and control.

Polish law on Genetically Modified Organisms from 22 June 2001 builds the safety system in Poland in accordance with EU Directives. Additional legislative documents, supporting such system are European Standards which describe in detail particular issues connected to biosafety in laboratories, industry and environment. European standards are adopted to Polish standardization by Polish Committee for Standardization.

### Key words:

genetically modified microorganisms, biosafety, legislation.

\* Referat wygłoszony na konferencji „Struktury organizacyjne zajmujące się problematyką GMO. Monitorowanie i kontrola przy wprowadzaniu GMO i produktów GMO do środowiska”, 11 września 2001 r., IHAR Radzików. Sfinansowano ze środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej na zamówienie ministra środowiska. Wykład ten jest również publikowany przez IHAR, Radzików.

### Adres do korespondencji

Barbara Tudek,  
Instytut Biochemii  
i Biofizyki,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Pawińskiego 5a,  
02-106 Warszawa;  
e-mail: tudek@ibb.waw.pl

Niniejszy tekst nie jest artykułem naukowym, a raczej zwięzłą informacją dotyczącą zastosowania genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów (GMM), związanych z tym zagrożeń oraz legislacyjnych i innych działań Unii Europejskiej, a także Polski podjętych w celu zapewnienia bezpieczeństwa dla ludzi i środowiska podczas stosowania GMM.

## 1. Wstęp

Mikroorganizmy występują we wszystkich niszach ekologicznych, w ziemi, powietrzu i wodzie, nawet w zimnych wodach podbiegunowych, śniegu i lodzie, a także w chmurach, gdzie mogą namnażać się w bardzo niskich temperaturach. Uważa się, że mikroorganizmy stanowią około 80% biomasy Ziemi. Zdziwiająca jest jednak, że bioróżnorodność genetyczna świata mikroorganizmów jest bardzo słabo poznana, przede wszystkim ze względu na brak dostępu do nich – często bowiem nie poddają się one hodowli za pomocą tradycyjnych technik. Jednak rosnące zapotrzebowanie na leki dla ludzi i zwierząt, nowe biokatalizatory dla przemysłu oraz środki ochrony i odnowy środowiska nadają nowe znaczenie badaniom nad różnorodnością mikroorganizmów.

Według oficjalnych dokumentów Unii Europejskiej mikroorganizm definiuje się jako jednostkę mikrobiologiczną komórkową lub bezkomórkową zdolną do rozmnażania lub do przeniesienia materiału genetycznego. Mikroorganizm zmodyfikowany genetycznie to mikroorganizm, którego materiał genetyczny został zmodyfikowany w sposób jaki nie zdarza się w warunkach naturalnych wskutek krzyżowania i/lub naturalnej rekombinacji. Ustawa o organizmach genetycznie zmodyfikowanych (GMO), zgodnie z Dyrektywą 90/679/UE, pojęcie „mikroorganizm” ujmuje dosyć szeroko; są to bakterie, wirusy, drożdże, kultury komórkowe oraz pasożyty wewnętrzne człowieka, które są zdolne do wywołania jakiegokolwiek infekcji, alergii lub działania toksycznego. Ustawa z 22 czerwca 2001 r., w ślad za przepisami Unii Europejskiej obowiązującymi w czasie przygotowywania i wydania ustawy do GMO zalicza także plazmidy jako nośnik materiału genetycznego. W chwili obecnej UE wykluczyła plazmidy z listy organizmów zmodyfikowanych genetycznie. W Polsce jest obecnie przygotowywana nowelizacja ustawy o GMO, w której plazmidy nie będą podlegały jej rygorom.

## 2. Zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów (GMM)

### 2.1. Badania naukowe i wdrożeniowe

Pałeczka jelitowa *Escherichia coli* oraz drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* stanowią podstawowe narzędzie w poznawaniu funkcji genów. Strategia badań najczęściej polega na skopiowaniu interesującego genu, wstawienie w cząsteczkę wek-



tora wraz z elementami regulatorowymi warunkującymi jego aktywność i przeniesienie wektora do komórek biorcy, w których wytwarzany jest produkt genu. Funkcję genu bada się przez komplementację mutacji biorcy, spontanicznych lub wprowadzonych celowo przez przerwanie ciągłości genu (wstawienie elementów insercyjnych). Wektorami często są plazmidy lub wirusy występujące w komórce w wielu kopiach. Pozwala to na uzyskanie dużej ilości produktu genu (interesujące białko może stanowić 10% wszystkich białek komórkowych, a nawet więcej), jego łatwą izolację i oczyszczenie, a następnie ustalenie właściwości biochemicznych i struktury.

Taka strategia stosowana od lat umożliwiła poznanie funkcji genów wielu gatunków wirusów, bakterii, drożdży, grzybów, roślin, zwierząt i człowieka, a także umożliwiła opracowanie nowych technologii wytwarzania leków, szczepionek, środków spożywczych i przemysłowych.

Ograniczeniem takiego podejścia badawczego jest jednak wielkość fragmentu DNA, którą może pomieścić wektor oraz dostępność mutantów o zdefiniowanym fenotypie. Niektóre geny organizmów wyższych są bardzo duże i metodami konwencjonalnymi udaje się sklonować jedynie ich fragmenty. Przykładem mogą być geny BRCA1 i BRCA2 kodujące bardzo duże wielofunkcyjne białka, których mutacje zwiększają ryzyko nowotworów sutka, zaś ich brak powoduje śmierć organizmu we wczesnym okresie embrionalnym. Takie geny można przenosić za pomocą skonstruowanych *ex vivo* minichromosomów, ale trudno uzyskać oczyszczony produkt genu i jego charakterystykę biochemiczno-strukturalną.

Dzięki zsekwencjonowaniu całego genomu wielu gatunków bakterii, drożdży, rzodkiewnika pospolitego, a także człowieka, odkryto wiele genów, których istnienia nie domyślano się wcześniej ze względu na brak mutantów. Na określenie funkcji tych „genów sierocych” trzeba jeszcze poczekać, ale już teraz warto podkreślić, że dzięki sekwencjonowaniu genomów w naukach przyrodniczych zaczęto wypracowywać nową strategię poznawczą.

## 2.2. Zastosowania medyczne

Inżynieria genetyczna stworzyła możliwość wytwarzania leków, które były niedostępne metodami konwencjonalnymi. Najlepiej znanym przykładem jest insulina ludzka wytwarzana w komórkach *Escherichia coli*. Jest ona znacznie lepiej tolerowana niż insulina zwierzęca, dużo tańsza, a dla niektórych chorych jest jedynym możliwym lekiem. Również w Polsce, powstała fabryka insuliny ludzkiej wytwarzanej w bakteriach. GMM są poza tym wykorzystywane do produkcji wielu innych leków, np. szczepionek przeciw grypie.

Genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy mają również zastosowanie w terapii genowej. Pierwsze próby terapii genowej człowieka miały miejsce w USA w latach 1979-1980. Nie były one jednak zatwierdzone przez władze i na skutek gwałtownego protestu w prasie, terapia genowa została zawieszona. Dopiero w roku 1990



podjęto próbę leczenia zespołu ciężkiego, złożonego niedoboru odporności (SCID – *severe combined immune deficiency*), spowodowanego brakiem enzymu – deaminazy adenozy. Ta gałąź medycyny rozwija się gwałtownie i do czerwca 1999 r. w USA zarejestrowano 277 procedur klinicznych, w tym: 193 – w terapii nowotworów, 40 – w terapii chorób genetycznych, 27 – w terapii przeciwko HIV. Do marca 2000 r. w świecie zanotowano już 400 procedur klinicznych, którym poddało się ponad 3000 pacjentów. W trakcie terapii genowej zmodyfikowany genetycznie mikroorganizm lub inny nośnik dostarcza prawidłowy gen do zmutowanych komórek pacjenta, niezdolnych do wytwarzania produktu tego genu. Takie działanie likwiduje przyczynę choroby i powoduje cofnięcie objawów. Można również wprowadzać fragmenty DNA, które zablokują działanie niepożądanych genów, np. zablokują gen odwrotnej transkryptazy wirusa HIV i zahamują jego cykl rozwojowy.

W terapii genowej często stosowanymi wektorami są wirusy zdolne do wnikania do wielu rodzajów komórek, takie jak: retrowirusy, adenowirusy i lentiwirusy. Terapia przy użyciu wirusów jest jednak dość ryzykowna. Lecznicze stężenie tych mikroorganizmów jest na ogół dość wysokie, a ich DNA może być włączane w przypadkowe miejsca chromosomu. Stwarza to możliwość aktywacji uśpionych retrowirusów, które wchodzi w skład genomu ludzkiego oraz ogólnej ciężkiej infekcji. Do infekcji często dochodziło przy stosowaniu adenowirusów (1).

Podejmowane są także próby użycia genetycznie zmodyfikowanych bakterii do terapii nowotworów. Historycznie, bakterie były wykorzystywane jako czynnik onkolityczny dla złośliwych guzów mózgu. Jednak użycie niezmodyfikowanych bakterii stwarza niebezpieczeństwo ciężkich ogólnych zakażeń, mogących nieraz prowadzić do śmierci. Do niszczenia guzów mogą być wykorzystane same toksyny bakteryjne. Na przykład, egzotoksynę *Pseudomonas* przyłączoną do interleukiny 4 (IL-4), dostarcza się bezpośrednio do złośliwych guzów mózgu. Łączy się ona z receptorami IL-4, występującymi jedynie na powierzchni komórek nowotworowych, dzięki czemu niszczy guz nie uszkadzając normalnej tkanki. Obiecującym podejściem jest zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych bakterii do selektywnego niszczenia guza oraz jako czynników dostarczających prekursorów, które *in vivo* ulegają przekształceniu w aktywne leki. Prowadzone są prace nad około 18. gatunkami bakterii (2). Zmodyfikowane bakterie z gatunku *Salmonella* są obecnie stosowane w I fazie badań klinicznych w Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii. Bakterie te, pozbawione są właściwości wirulentnych i zdolności wywoływania odpowiedzi immunologicznej. Ponieważ są one auktotrofami (np. względem puryn lub aminokwasów aromatycznych) w przestrzeniach nekrotycznych guzów litych lub w komórkach nowotworowych znajdują dobre warunki do wzrostu i gromadzą się w nich selektywnie, około 1000-krotnie wydajniej niż w normalnych komórkach. Bakterie takie mogą dodatkowo zawierać geny samobójcze, np. gen kinazy tymidynowej z wirusa *Herpes simplex*. Enzym kodowany przez ten gen fosforyluje pochodną guanozyny – gancyklowir, który po ufosforylowaniu jest włączany do DNA komórek, kończąc replikację i powodując śmierć komórki. Dożylne podanie samych bakterii lub razem z gancy-



klowirem spowalnia wzrost lub powoduje remisję wielu typów trudnych do leczenia nowotworów złośliwych, takich jak: czerniak, rak płuca, nerki czy wątroby (3).

Modyfikacje genetyczne w organizmie człowieka nie wchodzi w zakres ustawy o GMO. Jednak prace naukowe, poprzedzające wprowadzenie w życie terapii genowej wymagają uzyskania zgody ministra środowiska.

### 2.3. Zastosowania przemysłowe

Genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy mogą mieć zastosowanie do wytwarzania żywności. Dla przykładu, pałeczka mlekowa *Lactobacillus johnsonii* La1 wykorzystywana jest do produkcji jogurtów probiotycznych i innych produktów mlecznych. Wprowadzenie modyfikacji genetycznych czyni tę bakterię bardziej odporną na stres, występujący przy produkcji przemysłowej lub pozwala lepiej kontrolować proces przemysłowy, np. kończyć fermentację w odpowiednim momencie produkcji sera i polepszać jego walory smakowe.

Produkty żywnościowe zawierające genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy nie podlegają rygorom ustawy o GMO z 22 czerwca 2001 r., ale są kontrolowane przez organy podległe ministrowi zdrowia na mocy odrębnej ustawy. Jednak sam proces wytwórczy może wymagać uzgodnień międzyresortowych. Dotyczy to w szczególności postępowania z odpadami oraz postępowania w czasie awarii, gdzie nastąpić może niezamierzone uwolnienie GMM do środowiska. W większości krajów europejskich zastosowanie GMO w żywności jest ujęte w aktach prawnych kompleksowo z innymi zastosowaniami, z wyjątkiem aplikacji medycznych.

Inne rodzaje produktów służących do zastosowania w środowisku, a otrzymanych z wykorzystaniem mikroorganizmów (w tym mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie) to nawozy, stymulatory wzrostu, środki zwalczania szkodników i chwastów, dodatki do kiszzonek, probiotyczne dodatki do pasz, środki do bioremediacji i biodegradacji.

### 2.4. Rolnictwo

Bakterie i niektóre gatunki grzybów są alternatywą dla nawozów chemicznych i pestycydów, wywierając bezpośredni dodatni wpływ na wzrost roślin, dzięki wytwarzaniu substancji pomagających chronić roślinę przed patogenami lub dzięki zwiększaniu pobierania substancji odżywczych przez korzenie. Korzystny wpływ mogą też wywierać pośrednio, poprzez zwiększenie mobilności substancji odżywczych w glebie. Dla przykładu grzyby *Mycorrhizae* zasiedlają system korzeniowy wielu roślin i pomagają w pobieraniu składników odżywczych. Szczepy bakterii *Azospirillum* również kolonizują system korzeniowy roślin i działają jak stymulatory wzrostu. Modyfikacje genetyczne mają na celu wytworzenie bakterii bardziej wydajnych



w kolonizacji i współdziałaniu z rośliną. Wiele uwagi poświęcono tworzeniu bardziej wydajnych bakterii z rodzaju *Rhizobium*. Bakterie te zasiedlają systemy korzeniowe warzyw uprawnych i umożliwiają asymilację azotu atmosferycznego, tak zatem działają jak „biologiczne nawozy azotowe”.

Od dawna znana była zdolność niektórych mikroorganizmów do wytwarzania insektycydów. Bakteria *Bacillus thuringiensis* wytwarza białko (Bt) niszczące larwy motyli żerujących na roślinach hodowlanych (ziemniak, burak i in.). Grzyb *Beauveria bassiana* niszczy szarańczaki, wirus *Heliothis* niszczy szkodnika bawełny *Helicoverpa armigera*. Gen Bt jest obecnie wykorzystywany do tworzenia roślin transgenicznych odpornych na owady, np. ziemniaków odpornych na stonkę.

Bakulowirusy, są czynnikami chorobotwórczymi niektórych owadów i są stosowane jako biologiczne czynniki kontroli, zastępujące chemiczne insektycydy. Jednak po zakażeniu niezmodyfikowanym bakulowirusem, owad żyje jeszcze przez kilka dni i żeruje na uprawach przynosząc straty. Skonstruowano genetycznie zmodyfikowane bakulowirusy, po zakażeniu którymi owad natychmiast przestaje się odżywiać.

Wytworzono również mikroorganizmy hamujące wzrost innych patogennych drobnoustrojów. Na przykład genetycznie zmodyfikowany szczep *Pseudomonas putida* wytwarza przeciwgrzybiczny związek – kwas 1-karboksylowy fenazyny (PCA). Szczep ten użyty do zaprawiania nasion pszenicy znacząco obniża wzrost patogennych grzybów z gatunku *Fusarium* w systemie korzeniowym roślin. Genetycznie zmodyfikowane bakterie *Pseudomonas* mogą wytwarzać także inne biodegradowalne związki przeciwgrzybiczne, takie jak 1-karboksyamid fenazyny czy 2,4-diacetylofloroglucinol. Związki te skutecznie zwalczają zgniliznę korzeni pomidora powodowaną przez grzyb *Fusarium oxysporum* odmiana *Radicis lycopersici*, butwienie buraka cukrowego oraz chorobę pszenicy powodowaną przez grzyb *Pythium ultimum*. Bakteryjne czynniki kontroli, oprócz tego, że ulegają biodegradacji, indukują u roślin tzw. „odporność systemową” powodującą, że roślina odpowiada szybciej i bardziej agresywnie na atak patogenu. Dodatkowo, kolonizacja korzeni przez mikroorganizmy, zmniejsza odległość pomiędzy miejscem wytwarzania a miejscem pobierania związków przeciwgrzybiczych przez roślinę i ułatwia ten proces. Jednym z celów modyfikacji genetycznych jest poprawienie kolonizacji i zwiększenie wytwarzania metabolitu przeciwgrzybicznego.

## 2.5. Ochrona środowiska

Niektóre niezmodyfikowane bakterie uczestniczą w bioremediacji zanieczyszczeń, gdyż są zdolne do degradowania ksenobiotyków. Na ogół jednak bakterie te źle przeżywają w środowisku naturalnym. Dlatego geny degradacji są przenoszone do bakterii glebowych, najczęściej z gatunku *Pseudomonas*. Obecnie, jednym z najtrudniejszych problemów Unii Europejskiej jest zanieczyszczenie gleby, zbiorników



wodnych i wód gruntowych polichlorowanymi bifenylami (PCB). Związki te – szeroko stosowane przez ponad 50 lat w kondensatorach i innych urządzeniach elektrycznych, jako płyny hydrauliczne, plastyfikatory do tworzyw sztucznych, dodatki do farb i lakierów – zostały uznane za jedno z najbardziej znaczących zagrożeń dla człowieka. Są one trwałe w środowisku, toksyczne dla mikroorganizmów, mogą hamować procesy degradacyjne i wchodzić w łańcuch pokarmowy, stanowiąc poważne zagrożenie zdrowia ludzi (trwałe uszkodzenia systemu nerwowego, wątroby, śledziony i nerek, a także indukcji nowotworów). Pomimo wycofania z produkcji w latach osiemdziesiątych, do dziś istnieje problem unieszkodliwienia odpadów i skażenia środowiska. W ramach programów badawczych UE podjęto działania zmierzające do oczyszczenia środowiska z tych związków za pomocą genetycznie zmodyfikowanych bakterii naturalnie zasiedlających różne nisze ekologiczne. Operon *bhp* kodujący 12 białek rozkładających PCB do metabolitów komórkowych i kwasu benzoowego (4) został przeniesiony do *Pseudomonas* F<sub>113</sub> i 17 innych szczepów wyizolowanych z osadów rzecznych. Wszystkie one rosły na PCB, a wprowadzona cecha była stabilna przez ponad 200 pokoleń. Nie uległa natomiast zmianie przeżywalność, zdolność do kolonizacji i konkurencyjność rekombinantów w stosunku do mikroorganizmów niezmodyfikowanych. Prowadzone są również prace nad konstrukcją mikroorganizmów degradujących inne związki chemiczne, np. toluen stosowany przy produkcji niektórych barwników i leków.

### 3. Ocena zagrożeń

Już pierwsze próby rekombinacji DNA *in vitro* w latach siedemdziesiątych obudziły wątpliwości społeczeństwa czy korzyści wynikające z tej nowej technologii nie są mniejsze niż ujemne skutki dla zdrowia człowieka i środowiska, takie jak nieodwracalna zmiana lub utrata różnorodności biologicznej oraz inne, które mogą być trudne do przewidzenia. W miarę coraz szerszego posługiwania się tą techniką w laboratoriach badawczych i wobec braku lub minimalnej liczby wypadków, techniki inżynierii genetycznej zaczęły być coraz bardziej akceptowane przez opinię społeczną. Ponieważ jednak zachowanie nowego genu wewnątrz organizmu oraz organizmu w ekosystemie jest zagadnieniem bardzo złożonym, Unia Europejska poświęciła wiele uwagi ocenie zagrożeń wynikających z użycia GMO. Były to działania zarówno na poziomie legislacyjnym jak i praktycznym, polegające na prowadzeniu programów badawczych, dotyczących środków kontroli i monitorowania GMO w środowisku. Zgodnie z dyrektywami UE i ustawą o GMO, przede wszystkim należy zidentyfikować potencjalnie szkodliwe skutki, jakie mogą wynikać z użycia GMO, a następnie dokonać oceny możliwości wystąpienia tych skutków i oceny dotkliwości szkody. Zgodnie z dyrektywami UE, szkoda jest rozumiana jako uszczerbek lub utrata zdrowia ludzkiego i/lub niszczenie środowiska.

### **3.1. Czynniki jakie należy wziąć pod uwagę przy ocenie zagrożenia związanego z zastosowaniem GMM**

#### **3.1.1. Patogenność**

Kraje Unii Europejskiej oraz USA przeprowadziły kategoryzację mikroorganizmów pod kątem ich właściwości chorobotwórczych. Rozróżnia się cztery kategorie właściwości chorobotwórczych dla człowieka, zaś trzy dla roślin i zwierząt. Kategoryzacja ta oparta jest na ciężkości choroby wywołanej przez mikroorganizm, jej rozprzestrzenianiu, możliwości profilaktyki i terapii, a wreszcie szkód społecznych lub ekonomicznych. Często te same mikroorganizmy mogą wywoływać choroby zarówno u człowieka, jak i u zwierząt, ale z różnymi skutkami. Wtedy są one umieszczone na listach patogenów zarówno ludzkich jak i zwierzęcych, ale w różnych kategoriach. Poniżej podano zasady klasyfikacji mikroorganizmów wg normy PN-EN 1619\* (\* objaśnienia w p. 4.1.).

##### **3.1.1.1. Patogenność dla ludzi**

#### **Kategoria 1**

Mikroorganizmy, których chorobotwórczość dla człowieka jest mało prawdopodobna. Nie stanowią również zagrożenia dla środowiska.

#### **Kategoria 2**

Mikroorganizmy mogące wywołać schorzenia u ludzi i stanowić zagrożenie dla pracowników; mało prawdopodobne jest ich rozprzestrzenienie się w społeczności; zazwyczaj dostępna jest skuteczna profilaktyka i terapia.

#### **Kategoria 3**

Mikroorganizmy mogące wywołać poważne schorzenia u ludzi i stanowić poważne zagrożenie dla pracowników; może wystąpić ryzyko rozprzestrzenienia się ich w społeczności, lecz zazwyczaj jest dostępna skuteczna profilaktyka i terapia.

#### **Kategoria 4**

Mikroorganizmy wywołujące poważne schorzenia u ludzi i stanowiące poważne zagrożenie dla pracowników; może istnieć duże ryzyko rozprzestrzenienia się ich w społeczności; zazwyczaj nie ma skutecznej profilaktyki ani terapii.



### 3.1.1.2. Patogenność dla roślin

#### **Kategoria Ep1**

Mikroorganizmy mogące wywołać schorzenia u roślin, lecz mające jedynie lokalne znaczenie. Mogą być zamieszczone na listach patogenów poszczególnych krajów. Bardzo często są one endemicznymi patogenami roślin i nie wymagają żadnego stopnia hermetyczności. Jednakże doradza się stosowanie odpowiednich technik mikrobiologicznych.

#### **Kategoria Ep2**

Mikroorganizmy, o których wiadomo, że wywołują epidemie wśród roślin uprawnych czy ozdobnych. Te patogeny podlegają przepisom dotyczącym gatunków wymienianych przez władze poszczególnych krajów.

#### **Kategoria Ep3**

Mikroorganizmy zamieszczone na listach kwarantannowych. Import i praca z tymi mikroorganizmami są zazwyczaj zabronione. Potencjalni użytkownicy mają obowiązek skonsultować się z odpowiednimi organami nadzoru.

### 3.1.1.3 Patogenność dla zwierząt

#### **Kategoria Ea1**

Mikroorganizmy mogące wywołać schorzenia u zwierząt i spełniające w różnym stopniu następujące kryteria: ograniczone znaczenie geograficzne, niska zakaźność międzygatunkowa lub jej brak, brak wektorów lub nosicieli. Z gospodarczego i/lub medycznego punktu widzenia ich zagrożenie jest niewielkie. Normalnie nie wymagają żadnych stopni hermetyczności. Powszechnie dostępne są profilaktyka i/lub skuteczna terapia.

#### **Kategoria Ea2**

Mikroorganizmy wywołujące poważne epizootyczne choroby u zwierząt. Zakażenia międzygatunkowe mogą występować na dużą skalę. Powodują one konieczność objęcia przepisami zdrowotnymi określonych gatunków wymienianych przez władze poszczególnych krajów. Można prowadzić profilaktykę za pomocą środków medycznych lub przepisów zdrowotnych.

#### **Kategoria Ea3**

Mikroorganizmy wywołujące poważne panzootyczne lub epizootyczne choroby u zwierząt z wysoką śmiertelnością i możliwością katastrofalnych skutków ekonomicznych dla rolnictwa w obszarze zakażenia. Zasadniczo nie ma znanej profilaktyki medycznej i jedynym dostępnym środkiem przeciwdziałania jest izolacja, w razie konieczności przymusowo wprowadzana w życie.



Unia Europejska stworzyła listy sklasyfikowanych mikroorganizmów, które nie tylko dokonują ich kategoryzacji, ale również dostarczają informacji o obowiązku lub zaleceniu wykonania szczepień ochronnych ludzi narażonych na dane mikroorganizmy. Do ustawy o GMO również zostanie określona klasyfikacja mikroorganizmów pod kątem ich właściwości chorobotwórczych.

Fragment listy mikroorganizmów patogennych dla człowieka, według Francuskiego Stowarzyszenia Normalizacyjnego (AFNOR, *Association Francaise de Normalisation*) przygotowującej projekty norm dla Europejskiego Komitetu Normalizacyjnego (CEN – *Comité Européen de Normalisation*).

<i>Corynebacterium diphtheriae</i> .....	2 sz.o. <sup>1</sup>
<i>Corynebacterium ulcerans</i> .....	2
<i>Corynebacterium haemolyticum</i> .....	2
<i>Corynebacterium minutissimum</i> .....	2
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	2
<i>Coxiella burneti</i> .....	3
<i>Eikenella corrodens</i> .....	2
<i>Erysipelothrix rhusiopathie</i> .....	2
<i>Escherichia coli</i> (szczepy patogene) .....	2
<i>Flavobacterium meningoseptic</i> .....	2
<i>Francisella tularensis</i> .....	3
<i>Gardnerella vaginalis</i> .....	2
<i>Haemophilus ducreyi</i> .....	2
<i>Haemophilus influenzae</i> .....	2
<i>Kingella kingae</i> .....	2

<sup>1</sup> sz.o. – szczepienie obowiązkowe, wykonywane rutynowo i kontrolowane przez odnośne władze, sz.z. – szczepienie zalecane, wykonywane na życzenie lub przy przewidywaniu narażenia

Właściwości chorobotwórcze mikroorganizmów nie są jedynym i wystarczającym czynnikiem oceny zagrożeń.

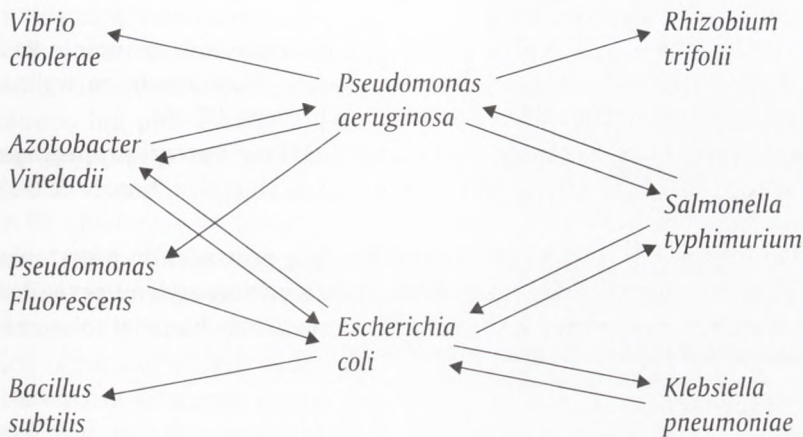
### 3.1.2. Możliwość rozprzestrzeniania w środowisku przez krzyżowanie, rozsiewanie, przenoszenie do innych gatunków

Istotnym czynnikiem jest poznanie ekosystemu, w którym GMM mają być uwolnione (celowo lub przypadkowo, np. na skutek awarii w systemie zamkniętym) i gatunków, z którymi GMM może się krzyżować. Większość bakterii posiada plazmidy, z których duża część ma szeroki zakres gospodarzy i może być przenoszona do różnych gatunków bakterii w drodze koniugacji lub transdukcji. Nowy gen umieszczony na plazmidzie (co jest rutynowym postępowaniem w działaniach w systemie zam-



kniętym, np. w badaniach naukowych) może zostać przeniesiony do innych mikroorganizmów środowiskowych (rys. 1). W przenoszeniu genów uczestniczą również wirusy bakteryjne i ruchome elementy genomu takie jak elementy insercyjne czy transpozony.

Przy działaniach w systemie zamkniętym należy wziąć także pod uwagę mechaniczne sposoby rozsiewania, takie jak: wiatr, ciekłe wodne przemieszczanie zwierząt lub owadów – przenosiciele, a także przenoszenie na urządzeniach mechanicznych (np. na samochodach czy sprzęcie).



Rys. 1. Możliwość przenoszenia plazmidów pomiędzy różnymi gatunkami bakterii na drodze transdukcji.

### 3.1.3. Możliwość uzyskania przewagi selekcyjnej, zmiany cech lub równowagi ekosystemu

W warunkach idealnych zmodyfikowany genetycznie mikroorganizm powinien być gorzej przystosowany do środowiska i po spełnieniu swojej funkcji wymierać. Jednak niektóre GMM nie wykazują zmienionej przeżywalności, zdolności do kolonizacji i konkurencyjności w stosunku do mikroorganizmów niezmodyfikowanych. Tak zatem raz wprowadzone do środowiska, zrekombinowane bakterie mogą stać się trwałym jego elementem. Genetycznie zmodyfikowane szczepy *Rhizobium* można wyizolować z gleby nawet po 8 latach od ich uwolnienia do środowiska. Poza tym wiele mikroorganizmów może tworzyć formy przetrwalnikowe i przeżywać w otwartym środowisku przez wiele pokoleń. Znaczenie ma również interakcja z nieożywionymi elementami środowiska, np. osadzanie wirusów na grudkach gleby powoduje ich większą trwałość niż przewidywana. Podobnie białko Bt, które może się osadzać na grudkach gleby jest bardziej trwałe i wywiera silniejsze działanie toksyczne niż w roślinie (prawdopodobnie na skutek ograniczonej proteolizy).



Należy wziąć pod uwagę możliwość uzyskania przewagi selekcyjnej, np. *Bradyrhizobium*, serotyp 123 uniemożliwia zasiedlenie ekosystemu bardziej wydajnymi szczepami *Rhizobium*.

Trzeba rozważyć możliwość wyrządzenia szkody organizmom niedocelowym, np. czy wytwarzanie przez GMM środków ochrony roślin nie wpłynie na mikroflorę, dżdżownice, pożyteczne owady, albo zwierzęta (myszy, krety). Doświadczalne uwolnienie zmodyfikowanego szczepu *Pseudomonas putida* o podwyższonej aktywności przeciwgrzybiczej, przejściowo zmieniło skład mikroflory grzybów w systemie korzeniowym pszenicy, chociaż nie miało wpływu na aktywność metaboliczną populacji drobnoustrojów glebowych (5).

Ważny może być również przepływ genów z drobnoustrojów naturalnie zasiedlających dany ekosystem do bakterii genetycznie zmodyfikowanych, co wykazano dla szczepów *Rhizobium* w badaniach finansowanych przez UE (6).

Istotne jest również czy na skutek manipulacji GMM nie nastąpi propagacja genów niosących oporność na antybiotyki, stosowane w leczeniu chorób człowieka i zwierząt.

Czy rozkład trujących związków jest kompletny i nie prowadzi do powstania silniejszych trucizn (np. niecałkowity rozkład trój- i czterochloroetyleny przez bakterie stosowane w ochronie środowiska prowadził do powstania bardziej toksycznego chlorku winylu).

#### 3.1.3.1. Możliwość zapobiegania lub przeciwdziałania szkodliwym skutkom wynikającym z użycia GMM

Należy wziąć pod uwagę możliwość prowadzenia profilaktyki, np. dostępność szczepień ochronnych dla ludzi i zwierząt, a także możliwość leczenia.

#### 3.1.3.2. Skala i miejsce działania oraz charakter czynności

Skala i miejsce działania ma istotne znaczenie w ocenie zagrożenia. Znacznie mniejsze zagrożenie niesie manipulacja na niewielką skalę (np. badania naukowe) z patogennymi mikroorganizmami dla roślin (wirusy ziemniaka czy pomidora) w dużym mieście, gdzie możliwość przeniesienia do środowiska jest znikoma niż taka sama operacja wykonywana w ośrodku hodowlanym, otoczonym polami, na których uprawia się rośliny – gospodarzy dla tych patogenów. Należy również brać pod uwagę wszelkie niestandardowe czynności mogące sprzyjać rozprzestrzenieniu mikroorganizmów, takie jak tworzenie aerozoli.



#### 4. Zachowanie bezpieczeństwa biologicznego GMM

Genetycznie zmodyfikowane organizmy mogą być stosowane w warunkach izolacji fizycznej od środowiska, a czynności takie klasyfikuje się jako „zamknięte użycie”, albo w otwartym środowisku i zastosowanie takie klasyfikuje się jako „zamierzone uwolnienie”. Podczas zamkniętego użycia i zamierzonego uwolnienia genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów stosowane są odmienne środki kontroli ich rozprzestrzeniania. Zamknięte użycie nie stawia specjalnych wymogów odnośnie do budowy genetycznej organizmu, gdyż ograniczenie rozprzestrzeniania osiąga się dzięki stworzeniu odpowiednich barier fizycznych, organizacji pracy i przepisów. Podczas zamierzonego uwolnienia najważniejszym czynnikiem kontroli jest budowa genetyczna, która ogranicza przeżywalność organizmu genetycznie zmodyfikowanego lub przenoszenie transgenów.

Unia Europejska opracowała szereg dokumentów dostarczających wytycznych odnośnie do zasad postępowania i kontroli GMO. Zawarte są one zarówno w dyrektywach UE (dyrektywa 90/219 z 23 kwietnia 1990 r. znowelizowana 98/81/WE z 26 października 1998 r. w sprawie zamkniętego użycia oraz 90/220 z 23 kwietnia 1990 r. w sprawie zamierzonego uwolnienia GMO, obecnie zastąpiona przez znowelizowany dokument, tj. dyrektywę 2001/18/EC z 12 marca 2001 r.) jak i w normach europejskich opracowywanych przez Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN). Do tej pory UE wydała 43 **normy** dotyczące biotechnologii. Dostarczają one ogólnych wytycznych odnośnie do zasad zamkniętego użycia GMO: budowy i organizacji laboratorium biotechnologicznego, biotechnologicznego zakładu przemysłowego, zasad funkcjonowania tych jednostek, łącznie z wyborem wyposażenia, kryteriów funkcjonowania wyposażenia w zakładzie biotechnologicznym, zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, zasad tworzenia banków komórek i konserwacji szczepów, zasad postępowania z odpadami i ich unieszkodliwiania. Istnieje również druga grupa norm, która dotyczy procesów biotechnologicznych w środowisku. Normy te koncentrują się głównie wokół zasad identyfikacji i monitorowania modyfikacji genomowych łącznie z zasadami pobierania próbek oraz postępowania z produktami wytworzonymi na bazie GMO lub zestawami diagnostycznymi do ich badania.

Opracowywaniem polskiej wersji językowej Norm Europejskich zajmuje się



**Polski Komitet Normalizacyjny**

Warszawa, ul. Świętokrzyska 14B tel. (22) 55-67-555; faks (22) 55-67-407.

Normy te są do nabycia w PKN:

Wydział Marketingu i Sprzedaży

00-950 Warszawa, ul. Świętokrzyska 14b

tel. (0-22) 556-77-77, fax (0-22) 556-77-87



Wszelkie informacje dotyczące normalizacji udzielane są przez:  
 Ośrodek Informacji i Dokumentacji  
 00-139 Warszawa, ul. Elektoralna 2  
 centrala: tel. (0-22) 620-02-41  
 sekretariat: tel./fax (0-22) 624-71-22

#### INNE PUNKTY DYSTRYBUCJI POLSKIEGO KOMITETU NORMALIZACYJNEGO

##### **Polski Komitet Normalizacyjny**

Filia Ośrodka Informacji  
i Dokumentacji  
ul. Dąbrowskiego 22  
40-032 Katowice  
tel./fax (0-32) 251 89 04  
e-mail: oid@pkn.katowice.pl

##### **Polski Komitet Normalizacyjny**

Filia Ośrodka Informacji  
i Dokumentacji  
ul. Narutowicza 75  
90-132 Łódź  
tel./fax (0-42) 678 54 60  
e-mail: oidlodz@pkn.com.pl

##### **Punkt Informacji Normalizacyjnej**

Biblioteka Główna OINT  
Politechniki Wrocławskiej  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław  
tel./fax (0-71) 320 35 27

##### **Punkt Informacji Normalizacyjnej**

Centrum Techniki Okrętowej  
Al. Rzeczypospolitej 8  
80-369 Gdańsk  
tel. (0-58) 511 62 20, 511 62 63  
fax (0-58) 511 62 13  
e-mail: standard@cto.gda.pl

##### **Punkt Informacji Normalizacyjnej**

Institut Technologii Nafty  
ul. Łukasiewicza 1  
31-429 Kraków  
tel. (0-12) 617 75 64, 617 75 65  
fax (0-12) 617 75 95  
e-mail: pin@itn.com.pl

##### **Punkt Informacji Normalizacyjnej**

H. CEGIELSKI-POZNAŃ S.A.  
ul. 28 Czerwca 1956 r. 223/229  
61-485 Poznań  
tel./fax (0-61) 831 11 84  
e-mail: td@hcp.com.pl

##### **Punkt Sprzedaży Norm**

Institut Spawalnictwa  
ul. Bł. Czesława 16/18  
44-100 Gliwice  
tel. (0-32) 231 00 11 w. 223  
fax (0-32) 231 46 52  
e-mail: normy@alpha.is.gliwice.pl

##### **Punkt Sprzedaży Norm**

Stocznia Szczecińska S.A.  
Szefostwo Projektowe  
ul. Firlika 19  
71-637 Szczecin  
tel. (0-91) 459 12 60  
fax (0-91) 459 29 29, 434 54 63  
e-mail: urman.malgorzata@sssa.com.pl

##### **Punkt Sprzedaży Norm**

Stowarzyszenie Elektryków Polskich  
Biuro Badawcze ds. Jakości  
**Oddział w Lublinie**  
ul. Rapackiego 13/15  
20-150 Lublin  
tel.: (0-81) 748 33 34, 748 33 35  
fax: (0-81) 740 82 42  
e-mail: lublin@bbj-sep.com.pl

Do tej pory 12 norm zostało ustanowionych, a prace nad wieloma innymi są zaawansowane, tak że do końca 2002 r. spodziewane jest włączenie 80% norm europejskich do normalizacji polskiej. Został również opracowany słowniczek terminów biotechnologicznych mających zastosowanie w normach.

Tabela 1

Wykaz norm ustanowionych opracowanych przez Normalizacyjną Komisję Problemową nr 287 ds. Biotechnologii

Nr PN	Tytuł
1	2
PN-EN 1620:2001	Biotechnologia – Procesy na dużą skalę i produkcja – Budowa zakładu przemysłowego w zależności od stopnia zagrożenia
PN-EN 12128:2000	Biotechnologia – Laboratoria badawcze, rozwoju i analizy – Stopnie hermetyczności laboratoriów mikrobiologicznych, strefy ryzyka i wymagania względem lokalizacji i bezpieczeństwa fizycznego



1	2
PN-EN 12305:2000	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do strategii pobierania próbek przy zamierzonych uwolnieniach roślin zmodyfikowanych genetycznie
PN-EN 12306:2000	Biotechnologia – Wytyczne do kontroli jakości zestawów diagnostycznych wykorzystywanych w rolnictwie do zwalczania szkodników roślin i zwierząt, chorób roślin i zwierząt oraz zanieczyszczeń środowiska
PN-EN 12461:2001	Biotechnologia – Procesy na dużą skalę i produkcja – Wytyczne do postępowania z odpadami, ich inaktywacji i kontroli
PN-EN 12468:2001	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do strategii monitorowania zamierzonego uwalniania roślin zmodyfikowanych genetycznie
PN-EN 12682:2001	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do określania organizmów zmodyfikowanych genetycznie poprzez analizę funkcjonalnej ekspresji modyfikacji genomowej
PN-EN 12683:2001	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do charakterystyki organizmów zmodyfikowanych genetycznie przez analizę stabilności molekularnej modyfikacji genomowej
PN-EN 12685:2001	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do strategii monitorowania zamierzonego uwalniania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie, łącznie z wirusami
PN-EN 12686:2001	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do strategii pobierania próbek podczas zamierzonego uwalniania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie, łącznie z wirusami
PN-EN 12687:2001	Biotechnologia – Organizmy zmodyfikowane do zastosowania w środowisku – Wytyczne do charakterystyki organizmów zmodyfikowanych genetycznie poprzez analizę modyfikacji genomowej
PN-EN 12689:2001	Biotechnologia – Wytyczne do oceny czystości, aktywności biologicznej i stabilności produktów otrzymanych z wykorzystaniem mikroorganizmów

#### 4.1. Zamknięte użycie

Izolację fizyczną niezbędną przy zamkniętym użyciu GMO osiąga się przez trzy zintegrowane elementy:

- a) konstrukcję pomieszczenia
- b) wyposażenie techniczne pomieszczeń
- c) dobrą praktykę laboratoryjną.

Wyróżnia się cztery stopnie hermetyczności w zależności od stopnia zagrożenia:

- hermetyczność 1. stopnia – dla działań nie powodujących zagrożeń,
- hermetyczność 2. stopnia – dla działań stwarzających niewielkie zagrożenia,
- hermetyczność 3. stopnia – dla działań stwarzających umiarkowane zagrożenia,
- hermetyczność 4. stopnia – dla działań stwarzających duże zagrożenia.

Przykładowo podano minimalne wymagania dotyczące budowy, wyposażenia i funkcjonowania laboratorium w zależności od stopnia hermetyczności.



Tabela 2

**Wymagania dla laboratorium o hermetyczności od 1. do 4. stopnia według normy PN-EN 12128 Laboratoria badawcze, rozwoju i analizy – Stopień hermetyczności laboratoriów mikrobiologicznych, strefy ryzyka i wymagania względem lokalizacji i bezpieczeństwa fizycznego\***

Wymagania <sup>1</sup>	Stopnie hermetyczności			
	1	2	3	4
1	2	3	4	5
Oznakowanie stopni hermetyczności	Tak <sup>2</sup>	Tak	Tak	Tak
Oznakowanie stref zagrożenia ze znakiem biologicznego zagrożenia	–	Tak	Tak	Tak
Odpowiednia przestrzeń dla każdego pracownika	Tak	Tak	Tak	Tak
Pomieszczenia laboratoryjne oddzielone drzwiami	Nie <sup>3</sup>	Tak	Tak (automatycznie zamykane)	Tak (fizycznie oddzielone)
Wejście do laboratorium przez służę powietrzną	Nie	Nie	Dowolnie <sup>4</sup>	Tak
Zaopatrzenie w okno obserwacyjne lub alternatywne rozwiązanie	Nie	Tak	Tak	Tak
Powierzchnie wodoszczelne, łatwe do mycia i odporne na środki czyszczące itp.	Tak (stół)	Tak (stół)	Tak (stół, podłoga)	Tak (stół, podłoga, ściany, sufit)
Umywalki	Tak	Tak	Tak	Tak
Umywalki uruchamiane bez użycia rąk	Dowolnie	Tak	Tak	Tak
Natryski	Dowolnie	Dowolnie	Dowolnie	Tak (w służbie powietrznej)
Dezynfekcja rąk	Dowolnie	Tak	Tak	Tak
Przechowywanie odzieży laboratoryjnej wewnątrz laboratorium lub szatni	Dowolnie	Tak	Tak	Tak
Wentylacja				
– urządzenia utrzymujące podciśnienie	Nie	Nie	Dowolnie	Tak
– odprowadzanie powietrza poprzez zastosowanie filtrów HEPA	Nie	Nie	Tak	Tak (przez 2 filtry HEPA)
Wprowadzanie powietrza poprzez zastosowanie filtrów HEPA	Nie	Nie	Nie	Tak
Zainstalowanie systemu alarmowego dla sygnalizowania niedopuszczalnych zmian ciśnienia	Nie	Nie	Tak	Tak
Uszczelnienie laboratorium pozwalające na dezynfekcję gazową	Nie	Dowolnie	Tak	Tak
Konstrukcja laboratorium pozwalająca na walkę z potencjalnymi przenosicielami np. owadami i gryzoniami, kontrola	Nie	Dowolnie	Tak	Tak
Wyposażenie laboratorium we własny sprzęt	Nie	Nie	Tak	Tak
Zaopatrzenie w komorę bezpiecznej pracy	Dowolnie	Dowolnie	Tak	Tak (III klasy)
Zaopatrzenie w awaryjne źródło prądu	Nie	Nie	Dowolnie	Tak
Środki komunikowania z otoczeniem zewnętrznym np. telefon umożliwiający porozumienie się bez użycia rąk lub jakiś odpowiednik	Nie	Nie	Dowolnie	Tak
Zaopatrzenie w autoklaw				
– zainstalowany wewnątrz laboratorium	Nie	Nie	Tak	–
– zainstalowany w laboratorium autoklaw przelotowy z dwoma wejściami	–	–	Dowolnie	Tak
System usuwania odpadów				
– udokumentowany	Nie	Tak	–	–
– walidowany	Nie	Dowolnie	Tak	Tak



1	2	3	4	5
Inaktywacja ścieków	Nie	Dowolnie	Tak	Tak

1) Posługując się tabelą uwzględnić przepisy krajowe dotyczące biotechnologii.

2) Tak: wymaganie.

3) Nie: Brak wymagania.

4) Dowolność: Zastosowanie rozwiązania należy rozpatrzyć w każdym przypadku w oparciu o oszacowanie ryzyka w zależności od sytuacji.

*\* Przedruk za zgodą Prezesa Polskiego Komitetu Normalizacyjnego – zezwolenie Nr 4/P/2002. Oryginały norm dostępne są w Wydziale Marketingu i Sprzedaży Biura PKN, 00-950 Warszawa 1, skr. Pocz. 411. Za zgodność przedruku norm z oryginałem odpowiada autor niniejszej publikacji.*

Podobne zalecenia są również opracowane dla zakładów przemysłowych, szklarń i zwierzętarni. Informacje te są również zawarte w Rozporządzeniu Ministra Środowiska do ustawy o GMO z 22 czerwca 2001 r.

#### 4.1.1. Zasady dobrej praktyki laboratoryjnej wg normy PN-EN 12741\*

Unia Europejska spisała zasady dobrej praktyki laboratoryjnej, których przestrzeganie ogranicza zagrożenie dla pracowników ze strony drobnoustrojów stosowanych w pracy. Niektóre z punktów zostały opisane bardzo szczegółowo w osobnych normach, które podane są w nawiasach:

- Utrzymywać miejsce pracy na najniższym poziomie narażenia;
- Stosować odzież i sprzęt ochronny;
- Dokonywać regularnej kontroli sprawności urządzeń i instalacji (PN-EN 12298);
- Regularnie sprawdzać obecność GMO poza strefą zamkniętego użycia (PN-EN 12685, 12686);
- Dbać o wyszkolenie pracowników;
- Dla kategorii III i IV – powołać komórki do spraw bezpieczeństwa biologicznego;
- Wprowadzić wewnętrzne regulaminy bezpieczeństwa;
- Oznakować strefy zagrożenia biologicznego;
- Wydać zakaz stosowania pipet doustnych;
- Wprowadzić skuteczne środki i procedury dezynfekcyjne;
- Bezpiecznie postępować z odpadami (PN-EN 12461, 12740).

#### 4.1.2. Ustalenie zasad postępowania z odpadami

Usuwanie i unieszkodliwianie odpadów jest bardzo ważnym elementem procesów biotechnologicznych. Metodyka postępowania i unieszkodliwiania odpadów opiera się na następujących ogólnych zasadach:

\* Objaśnienia w p. 4.1.



1. Uzyskania informacji na temat ryzyka mikroorganizmu dla człowieka i środowiska.
2. Identyfikacji odpadów (gazowe, płynne, stałe) i etapu, na którym powstają.
3. Wyborze parametru hermetyczności.
4. Wyborze metody unieszkodliwiania.
5. Walidacji i weryfikacji metody unieszkodliwiania.

Tabela 2

Przykład metod unieszkodliwiania odpadów zależnie od ich typu\*

Typ odpadów	Gazowe	Płynne	Stałe
	Unieszkodliwianie		
Ciepłe	X <sup>1</sup>	XXX <sup>3</sup>	XXX
Chemiczne	XX <sup>2</sup>	XX	XX
Napromienianie	X	X	X
Spalanie	XX	X	XXX
Filtracja	XXX	X	N/A <sup>4</sup>
Metodami biologicznymi	X	XX	X

<sup>1</sup> X możliwe<sup>2</sup> XX odpowiednie<sup>3</sup> XXX zalecane<sup>4</sup> N/A nie stosuje się

\* Objaśnienia w p.4.1.

Najbardziej bezpieczne są termiczne metody unieszkodliwiania odpadów biotechnologicznych. Inne metody zaleca się stosować jako alternatywę metody termicznej, lub tam, gdzie ze względu na duże objętości lub skład chemiczny odpadów, metody termiczne są nieodpowiednie.

#### 4.2. Zamierzone uwolnienie

Wytwarzanie dodatkowego białka w mikroorganizmach genetycznie zmodyfikowanych często powoduje zaburzenie równowagi metabolizmu, co skutkuje wolniejszym wzrostem niż mikroorganizmy niezmodyfikowane, a w rezultacie wyparciem ze środowiska. Przykładem jest szczep *Pseudomonas putida* WCS358r produkujący czynnik przeciwgrzybiczy, który po dwóch latach od zamierzonego uwolnienia jest niewykrywalny w środowisku dostępnymi metodami (5). Niektóre mikroorganizmy są jednak trwale i dlatego w pracach nad stworzeniem GMM, które można byłoby uwolnić do środowiska największą wagę poświęca się opracowaniu bezpiecznych „biologicznych systemów zamknięcia”, które zapewniłyby 1) ograniczenie przeniesienia materiału genetycznego; 2) kontroli przeżywalności GMM w środowisku.



ad 1) Przede wszystkim zrezygnowano ze stosowania plazmidów niosących oporność na antybiotyki jako wektorów dla wprowadzanych genów (transgenów), gdyż stosunkowo łatwo przenoszą się pomiędzy bakteriami (rys. 1), a propagacja genów oporności na antybiotyki, szczególnie tych, które są stosowane w leczeniu ludzi i zwierząt jest niepożądana. Transgeny są umieszczane w **chromosomie** mikroorganizmu biorcy, co znacznie ogranicza ich przypadkowe przeniesienie do innego mikroorganizmu. Opracowano metodykę, w której wektorami są transpozony, pozbawione enzymu transpozazy (7). Oporność na antybiotyki została zastąpiona naturalnymi genami, np. receptorem sideroforu z *Pseudomonas putida* WCS<sub>358</sub>. Bakterię niosącą tak zrekombinowany DNA można wyselekcjonować spośród nie niosących tej cechy, hodując na pożywce zawierającej pseudobaktynę w miejscu antybiotyku.

Zaproponowano również system całkowicie uniemożliwiający przypadkowe przeniesieniu genu do innych mikroorganizmów. System ten składa się z genu zabójczego (*colE<sub>3</sub>* kodującego RNazę tnącą wszystkie prokariotyczne 16S rRNA) i genu kontrolnego (*immE<sub>3</sub>* kodującego represor dla „zabójczego białka” hamujący jego syntezę). W genetycznie zmodyfikowanym mikroorganizmie gen zabójczy jest umieszczony w pobliżu rekombinowanego DNA kodującego nową cechę, podczas gdy gen regulatorowy jest oddalony. Przeniesieniu rekombinowanego DNA do innego mikroorganizmu będzie towarzyszyło również przeniesienie genu zabójczego i śmierć komórki biorcy.

ad 2) Ważne jest także aby móc kontrolować obecność genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów w środowisku i usuwać je kiedy nie są już potrzebne. Szczególnie istotne może to być podczas zastosowania GMM do bioremediacji zanieczyszczeń. Na podstawie projektów badawczych realizowanych w UE podjęto ten problem i opracowano system **zabójczych elementów genetycznych**, które zabiłyby bakterię po spełnieniu swojej funkcji. Przykładem jest szczep bakterii glebowej z gatunku *Pseudomonas* unieszkodliwiający polichlorowane bifenyle (PCB). Gen zabójczy *gef*, kodujący białko toksyczne dla bakterii został połączony, poprzez białko represorowe *LacI*, z systemem genów warunkujących unieszkodliwianie PCB. W obecności metabolitów PCB w komórce, bakterie wytwarzają represor *LacI*, który hamuje syntezę zabójczego białka. Po unieszkodliwieniu PCB, represor *LacI* nie jest wytwarzany, bakteria zaczyna produkować białko zabójcze i umiera (8).

## 5. Monitorowanie obecności GMM w środowisku

Monitorowanie obecności GMM w środowisku jest przedmiotem uregulowań legislacyjnych w postaci dyrektywy 90/220 z 23 kwietnia 1990 r. w sprawie zamierzonego uwolnienia GMO, dyrektywy 2001/18/EC z 12 marca 2001 r. oraz norm europejskich: PN-EN 12682, 12683, 12685-12687. Normy te podają szereg ogólnych zaleceń odnośnie do strategii monitorowania, strategii pobierania próbek, analizy modyfikacji genomowej, jej stabilności molekularnej oraz funkcjonalnej ekspresji. W do-





Obecność GMM w środowisku tradycyjnie badano izolując je i hodując na standardowych pożywkach. Jednak jest to procedura dość długa, może dawać niepewne wyniki przy bardzo niskiej koncentracji GMM, a również należy brać pod uwagę, że mikroorganizm uwolniony do środowiska może nabywać nowych cech, które uniemożliwią jego ponowny wzrost w warunkach laboratoryjnych. Ostatnio szeroko stosowanymi metodami umożliwiającymi stosunkowo łatwą obserwację GMM w środowisku jest dołączenie do rekombinowanego DNA lub do chromosomu biorcy genów reporterowych ułatwiających rozróżnienie GMM od organizmów niezmodyfikowanych. Często są to „kolorowe” białka takie jak fluoryzujące zielono białko Gfp (*green, fluorescent protein*) z chelbii morskiej lub czerwone białko Lux z *Vibrio harvei*. Mikroorganizmy niosące te białka są łatwe do rozróżnienia w obserwacji pod mikroskopem zaopatrzonym w czułą kamerę.

Analiza DNA i RNA ma na celu wykrywanie charakterystycznych sekwencji rekombinowanego DNA. Zwykle prowadzi się ją metodami standardowymi takimi jak analiza wzoru restrykcyjnego, hybrydyzacja z sondą genową, amplifikacja fragmentu DNA lub RNA, sekwencjonowanie DNA lub RNA. Analiza RNA dostarcza również informacji na temat ekspresji rekombinowanego genu w komórkach biorcy. Można także badać produkty białkowe transgeny poprzez immunodetekcję lub obserwację aktywności biologicznej białka, np. jego aktywności enzymatycznej. Można też badać produkty niebiałkowe genu metodami chromatograficznymi.

Wybór metody monitorowania zależy od wielu czynników takich jak: cel monitorowania, wielkość pobieranych próbek, częstość pobierania próbek, metody przechowywania próbek, budowa genetyczna GMM, ekspresja rekombinowanego DNA, wyposażenie laboratorium i doświadczenie zawodowe pracowników, a wreszcie od posiadanych środków finansowych.

## **6. Uzyskanie zgody na użycie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów**

Aby uzyskać zgodę na zamknięte użycie lub zamierzone uwolnienie GMM należy złożyć wnioski do ministra środowiska. Wniosek powinien zawierać:

1. Informację o użytkowniku – instytucji oraz osobie odpowiedzialnej.
2. Informację o planowanym działaniu, w tym charakterystykę GMO:
  - biorcy, dawcy, wektora,
  - źródło i funkcję materiału genetycznego,
  - cechy identyfikujące GMO.
3. Planowane poziomy i rodzaje zabezpieczeń.
4. Środki bezpieczeństwa pracy z GMO.
5. Sposoby postępowania z odpadami.
6. Monitorowanie obecności GMM poza obszarem kontrolowanym (o ile to konieczne) oraz:



- dokumentację oceny zagrożeń,
- plan postępowania na wypadek awarii,
- informację na temat poprzedniego użycia GMO.

Wydanie zgody następuje maksymalnie na 5 lat. Dla I oraz II kategorii zagrożenia, po upływie tego terminu należy jedynie powiadomić ministra o ponownym użyciu GMO. Dla III i IV kategorii zagrożenia, po upływie terminu należy ponownie złożyć wnioski. Ustawa o GMO przewiduje również możliwość odmowy wydania zgody na zamknięte użycie GMO, ale tylko dla niebezpiecznych operacji, tzn. dla kategorii III i IV.

## 7. Wnioski

Genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy mają zastosowanie w wielu gałęziach życia takich jak badania naukowe, medycyna, przemysł farmaceutyczny, spożywczy i in., rolnictwo, ochrona środowiska. Unia Europejska podchodzi z dużą ostrożnością do zastosowania inżynierii genetycznej ze względu na wciąż niedostateczną liczbę danych, które umożliwiłyby ocenę zagrożenia wynikającą z jej zastosowania. Dlatego też wszelkie działania z zastosowaniem GMO są kontrolowane przez odnośne władze, a także ewidencjonowane. Polskie przepisy w formie ustawy o GMO z 22 czerwca 2001 r. określają wymagania dla użytkowników GMO według wzorów europejskich. Bardzo szczegółowym rozwinięciem przepisów europejskich są normy europejskie, systematycznie wdrażane do normalizacji polskiej przez Polski Komitet Normalizacyjny. Wprawdzie stosowanie norm jest dobrowolne i wydane są one w formie zaleceń, jednak ze względu na szczegółowość mogą stać się dużą pomocą zarówno dla naukowców jak i osób zatrudnionych w przemyśle lub firmach biotechnologicznych aby bezpiecznie korzystać z inżynierii genetycznej.

## Literatura

1. Grosshans H., (2000), *Funct. Integr. Genomics*, 1, 142-145.
2. Jain K. K., (2001), *Exp. Opin. Biol. Ther.*, 1, 291-300.
3. Zheng L. M., Luo X., Feng M., Li Z., Le T., Ittensohn M., Trailsmith M., Bermudes D., Lin S. L., King I. C., (2000), *Oncol. Res.*, 12, 127-135.
4. Ohtsubo Y., Delawary M., Kimbara K., Takagi M., Ohta K., Nagata Y., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 36146-36154.
5. Glandorf D. C., Verheggen P., Jansen T., Jorritsma J. W., Smit E., Leeftang P., Wernas K., Thomashow L. S., Laureijs E., Thomas-Oates J. E., Bakker P. A., van Loon L. C., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3371-3378.
6. Hirsch P. R., (1996), *New Phytol.*, 133, 159.
7. Kaniga K., Davidson J., (1991), *Gene*, 100, 201-205.
8. Ronchel M. C., Ramos C., Jensen L. B., Molin S., Ramos J. L., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2990-2994.