

**Aleksander Chmiel\***

**Akademia Medyczna w Łodzi oraz**

**Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN**

**Łódź**

## **Bezpieczeństwo pracy z patogenami roślin**

Jednym z podstawowych zagadnień współczesnej biotechnologii jest bezpieczeństwo pracy z drobnoustrojami, niezależnie od tego czy są to szczepy naturalne, czy też konstruowane technikami inżynierii genetycznej. Problemom tym poświęcono szereg publikacji (1-5); są one również przedmiotem wydawanych w różnych krajach instrukcji, zaleceń i przepisów o charakterze prawnym (6-9), a także przedmiotem działalności organizacji międzynarodowych, takich jak: European Economic Community (EEC) i European Federation of Biotechnology (EFB), w ramach której powołano specjalną sekcję Working Party on Safety in Biotechnology (WPSB). Program działania tej ostatniej autor prezentował w oddzielnym opracowaniu (10), a pełny tekst materiałów z organizowanego przez nią międzynarodowego sympozjum został opublikowany w *Swiss Biotech* (11).

Ogólnie drobnoustroje podzielono na: 1) nieszkodliwe dla ludzi, zwierząt i roślin, 2) o niskim stopniu ryzyka dla ludzi, 3) o dużym stopniu ryzyka dla ludzi, 4) o najwyższym stopniu ryzyka dla ludzi (niektóre wirusy) i 5) tzw. patogeny środowiskowe, czyli drobnoustroje wywołujące choroby zwierząt i roślin, nie stanowiące jednak zagrożenia dla ludzi. Dużo uwagi poświęca się pracy z tą ostatnią grupą drobnoustrojów; są one przedmiotem badań nie tylko w specjalistycznych laboratoriach mikrobiologicznych, ale również biotechnologicznych. Europejska Federacja Biotechnologiczna wyróżniła trzy grupy patogenów roślinnych (Ep1, Ep2 i Ep3; wg 12) oraz ustaliła dla nich 3 kategorie zabezpieczeń w pracach laboratoryjnych (z j. ang. *Safety Level 1, 2, and 3*; wg 13).

### **Grupa EFB Ep1 – poziom zabezpieczenia 1**

Drobnoustroje o niewielkim zagrożeniu – mogą wywoływać lokalne choroby roślin jako patogeny endemiczne. Praca z nimi nie wymaga specjalnych zabezpieczeń. Ponieważ możliwe jest jednak zakażenie nimi roślin – gospodarzy znajdujących się w sąsiedztwie, należy stosować zasady prawidłowych technik mikrobiologicznych w pracy z patogenami roślin (z j. ang. *Good Microbiological Techniques for Work with Plant Pathogens* – GMTTP, por. zestawienie).

\* Autor jest członkiem Zespołu ds. Problemów Bezpieczeństwa w Mikrobiologii i Biotechnologii Komitetu Mikrobiologii PAN oraz przedstawicielem Polski w "Working Party on Safety in Biotechnology" European Federation of Biotechnology.



### Zasady prawidłowej pracy mikrobiologicznej z patogenami roślin (GMTPP, wg 13)

1. Wymagane jest opanowanie przez pracownika podstawowej wiedzy z mikrobiologii i o patogenach roślin oraz świadomość zagrożenia dla roślin (gospodarzy) w sąsiedztwie, jeżeli namnażane patogeny byłyby przypadkowo wprowadzone do otoczenia.
2. Dostęp do laboratorium powinien być ograniczony jedynie dla osób, które mają świadomość zagrożenia, jakie dla środowiska mogą stanowić doświadczenia i procesy z patogenami roślin.
3. Skażone odpady i ubrania powinny być umieszczone w szczelnych pojemnikach i wyjąławiane przed wyjęciem.
4. Należy stosować procesy sterylizacji cieplnej i chemicznej.
5. Należy używać wyłącznie niezawodnych sprzętów.
6. Po normalnej pracy oraz po rozlaniu materiału zakaźnego, powierzchnie robocze i podłogi należy zdezynfekować.
7. Nie wolno dopuścić do rozwoju owadów i gryzoni.

W odniesieniu do doświadczeń w dużej skali z drobnoustrojami wyizolowanymi z gleby lub materiału roślinnego, niezbędne jest używanie szczepów zidentyfikowanych przez specjalistów i prowadzenie doświadczeń w porozumieniu z ekspertami ochrony roślin. Jeżeli drobnoustrój okaże się patogenem roślinnym, należy kontynuować doświadczenie z zapewnieniem warunków bezpieczeństwa na poziomie 2, dopóki w porozumieniu z ekspertami ochrony roślin nie zostanie określony właściwy dla niego poziom zabezpieczeń. W czasie doświadczenia należy określać skażenie gazów odłotowych i innych odpadów. Wszelkie odpady (gazy i ciecze) z doświadczeń w dużej skali powinny być wyjąławiane.

#### Grupa EFB Ep2 – poziom zabezpieczenia 2

Drobnoustroje stwarzające zagrożenie – wywołujące choroby u roślin uprawnych (także ozdobnych). W pracy z nimi obowiązują konsultacje z ekspertami ochrony roślin; wstęp do laboratorium jest dozwolony wyłącznie dla osób upoważnionych; przy wejściu wymagane są śluzы, w których należy zmienić ubranie; ściany, sufity i podłogi muszą być gładkie i łatwe do mycia i odkażania; niezbędne jest zainstalowanie wyciągów wyposażonych w wysokosprawne filtry powietrza (z j. ang. *High Efficiency Particulate Air Filter* – HEPA). Wszelkie odpady powinny być odkażone; obowiązują zasady GMTPP jak dla grupy Ep1; doświadczenia połowe muszą być prowadzone pod nadzorem eksperta ochrony roślin.

#### Grupa EFB Ep3 – poziom zabezpieczenia 3

Patogeny roślin o dużym zagrożeniu, wymieniane na listach kwarantannowych. Należy unikać jakichkolwiek manipulacji z nimi. Wyjątkowo, w niektórych krajach



dopuszcza się jednak pracę z tymi drobnoustrojami zgodnie z wymaganiami jak dla grupy Ep2 oraz dodatkowo: obowiązuje zezwolenie i nadzór eksperta ochrony roślin; zakaz wstępu do laboratorium dla osób spoza personelu; wejście przez służbę z natryskiem i zmianę ubrania; niewielkie podciśnienie w pomieszczeniu; nietłukące się szyby w oknach.

W pracach laboratoryjnych obowiązuje znajomość drobnoustrojów chorobotwórczych dla roślin, a także dróg ich rozprzestrzeniania się oraz zabezpieczenia przed wydostaniem się ich z przestrzeni (np. laboratorium), w której prowadzone są badania. Analiza zagrożenia, jakie dla roślin drobnoustroje te stwarzają obejmuje:

- 1) liczbę komórek niezbędną do wywołania choroby;
- 2) oporność drobnoustroju na wysuszenie, ciepło i czynniki chemiczne;
- 3) drogę skażenia, np. przez wiatr, powietrze, czynniki pływające lub fruujące;
- 4) występowanie odpowiednich roślin – gospodarzy.

Przepisy dotyczące zabezpieczeń przed wprowadzeniem drobnoustrojów i organizmów wyższych niebezpiecznych dla roślin i produktów roślinnych do krajów członkowskich EWG (EEC) zostały wydane w roku 1976 (14). Zawierają one pełne listy tych organizmów, z uwzględnieniem różnic obowiązujących w krajach członkowskich. Listy kwarantannowe drobnoustrojów, owadów i nicieni dla krajów europejskich i śródziemnomorskich zostały opracowane w roku 1975 i uaktualnione w 1982 (15). Materiały te (14,15) znajdują się w posiadaniu autora.

Odrębnym zagadnieniem jest celowe wprowadzanie do środowiska naturalnego drobnoustrojów spełniających różne funkcje ekologiczne. Znane i dopuszczone do stosowania są bakteryjne szczepionki użytniające glebę oraz bakteryjne, grzybowe i wirusowe insektycydy. Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej i opartych na niej nowych biotechnologii powstał problem wprowadzania do środowiska szczepów zawierających zrekombinowany *in vitro* materiał genetyczny (rDNA). Mogą one dostać się do środowiska w sposób niezamierzony i niekontrolowany lub też zamierzony, co może być kontrolowane w różnym stopniu. W krajach o różnym stopniu rozwoju biotechnologii opracowywane są przepisy regulujące warunki pracy z takimi drobnoustrojami (16) i wprowadzanie ich do środowiska (17). W roku 1987 odbyła się w Cervii (Włochy) konferencja nt. "EC regulatory harmonization of the deliberate release of genetically engineered organisms", na której dyskutowano nad opracowaniem odpowiednich przepisów dla krajów członkowskich EWG (EEC). Istnieje potrzeba zorganizowania również w Polsce zinstytucjonalizowanego działania w tym zakresie oraz generalnie, w odniesieniu do jak najszerzej pojętej biotechnologii. Potrzebna jest informacja, nauczanie, wytyczne (normy) do projektowania laboratoriów oraz przepisy bezpieczniejszej pracy z drobnoustrojami w laboratoriach i zakładach przemysłowych.

#### Literatura

1. Hartree R., Bpoth V., (1977), Safety in biological laboratories. Biochemical Society Special Publication No 5, London.
2. Jackson D. A., Stick S. P., (1979), The recombinant DNA debate. Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall.



3. Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatenwesen (DECHEMA), Arbeitsmethoden für die Biotechnologie – Sichere Biotechnologie, Frankfurt-am-Main 1982.
4. Küenzi M., et al., (1983), *Appl. Biotechnol. Microbiol.*, 21, 1.
5. Collins C. H., (1988), *Laboratory-acquired infections*, Butterworths, London.
6. U. S. Federal Register, (1978), 43, 60 108.
7. Guidelines for handling recombinant DNA molecules, animal, viruses and cells. Medical Research Council of Canada, Ottawa 1979.
8. U. S. Federal Register, (1980), 45/73, 25 366.
9. Categorisation of containment, Department of Health and Social Services and the Health and Safety Executive. Advisory Committee on Dangerous Pathogens, HMSO, London 1984.
10. Chmiel A., (1988), *Postępy Mikrobiol.*, 27, 127.
11. International Symposium on Safety in Biotechnology, Zürich (Switzerland), October 16-17, 1986, *Swiss Biotech* 5, 2a/1987.
12. Küenzi M., et. all., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 105.
13. Frommer W., et. all., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (w przygotowaniu do druku)
14. The Council of the European Communities (1987), *Official J. Europ. Comm.*, L26, 20.
15. EPPO Recommendations on New Quarantine Measures. European and Mediterranean Plant Protection Organization (2nd edition). Mathys G., and Smith J. M., (eds.), Paris 1982.
16. U. S. Federal Register (1987), 52, No 154, 29800.
17. Procedures for Assessment of the Planned Release of Recombinant DNA Organisms. Dept. Industry, Technology and Commerce, Canberra ACT 2600 (1987).

## Summary

### Safety in Work with Plant Patogens

Classification of microorganisms causing diseases in plants as well as recommendations for the safe work with plant patogens, proposed by Working Party on Safety in Biotechnology of the European Federation of Biotechnology are presented.

---

**Aleksander Chmiel,**  
**Instytut Technologii i Chemii Leków, Akademia Medyczna,**  
**ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź.**