

Posudok o riziku

Spôsob použitia: Fermentačná výroba Intermediátu CHIC

Vektor: plazmid pBAC,

Príjemca: *E. coli* K12 MG1655, ATCC 47076

Výsledný GMO: *E. coli* Pili K85, K84

Možný nepriaznivý účinok: nemá

Odhad pravdepodobnosti: -

Hodnotenie rozpoznateľného rizika: žiadne

Manažment rizika: práca v zariadení

Hodnotenie celkového dopadu: riziková trieda 1

Celkový záver: Organizmus príjemcu, organizmus darcu, vektor a vložený genetický materiál sú zdravotne nezávadné organizmy (trieda 1) a aj výsledný geneticky modifikovaný organizmus je zdravotne nezávadný organizmus. Tento geneticky modifikovaný organizmus a manipulácia s ním nepredstavujú riziko pre človeka a životné prostredie.

1. Posudok z posudzovania rizika používania genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov v uzavretých priestoroch.

- a) Geneticky modifikovaný organizmus kmeň *E. coli* Pili K85 nie je patogénny a nie je toxický, nie je známy jeho škodlivý vplyv na zdravie ľudí, zvieratá a životné prostredie
- b) Do okruhu činností, v ktorých sa bude používať geneticky modifikovaný organizmus patria štandardné mikrobiologické techniky pri príprave základného inokulačného materiálu, testovanie rastových a produkčných vlastností GMO v laboratórnom a štvrťprevádzkovom meradle, výroba Intermediátu CHIC s uvedeným GMO vo výrobnom meradle, kontrola sterility monitoring prostredia, a nakladanie s odpadmi. Do okruhu činností nepatria akékoľvek techniky vyžadujúce manipuláciu s DNA horeuvedeného GMO.
- c) Nakoľko škodlivé vplyvy súvisiace s okruhom činností s GMO neboli doposiaľ preukázané, údaje o možnej intenzite účinkov sú bezpredmetné.
- d) S ohľadom na skutočnosť, že škodlivé vplyvy z použitia GMO plánované v našom zariadení neboli doposiaľ preukázané, vyhodnotenie pravdepodobnosti výskytu škodlivých vplyvov je bezpredmetné

2. Identifikácia všetkých možných škodlivých vplyvov podľa odseku 1 písm.a) spojených

a) s organizmom prijímateľa

1. Použitý mikroorganizmus *E. coli* K12 MG1655, nemá patogénne, virulentné, infekčné, alergénne a toxické vlastnosti. *E. coli* K12 MG1655 sa využíva v molekulárnej biológii a je zaradený do bezpečnostnej triedy BSL 1.
2. Autochtónne vektory – bezpredmetné v našom prípade
3. Blokujúce mutácie - bezpredmetné v našom prípade
4. Predchádzajúce genetické modifikácie prijímateľa – nie sú nám známe
5. Rozsah hostiteľov - bezpredmetné v našom prípade
6. Nie sú nám známe podstatné zmeny vo fyziológii vplyvom genotypu, ktoré by mohli mať vzťah k škodlivosti pre zdravie človeka alebo životné prostredie
7. Prirodzené biotopy a geografické rozloženie: Tento kmeň bol udržiavaný ako laboratórny kmeň s minimálnou genetickou manipuláciou. Pôvodný kmeň K-12 divokého typu zo Stanfordskej zbierky obsahoval F plazmid aj fág lambda. MG1655 bol vyliečený pomocou akridínovej oranžovej a UV. Posun rámca na konci rph má za následok zníženú expresiu pyrE a mierne pyrimidínové hladovanie, takže kmeň

rastie o 10 až 15 % pomalšie v médiu bez pyrimidínu ako v médiu obsahujúcom uracil. Zároveň aj vzhľadom na nestabilitu plazmidu v prostredí bez chloramfenikolu *E.coli* K12 MG1655 má zníženú schopnosť prežívania mimo laboratórnych a definovaných podmienok. Preto v prirodzených biotopoch nemajú šancu úspešne prežívať a tak ovplyvniť geografické rozšírenie.

8. Zapojenie do enviromentálnych procesov – bezpredmetné v našom prípade
9. Vzájomné pôsobenie s inými organizmami v ŽP – interakcie tohto typu nie sú známe, v našom prípade bezpredmetné
10. Schopnosť vytvárať štruktúry schopné prežitia - bezpredmetné v našom prípade

b) organizmus darcu:

1. Darcovským organizmom je WT (Wild Type) *E.coli*.
2. Informácie o autochtónnych vektoroch nám nie sú známe
3. Rozsah prirodzených hostiteľov a syntetických vektorov nám nie je známy
4. Iné fyziologické charakteristiky – nám nie sú známe
5. Vo WT *E.coli* nie sú prítomné gény, ktoré spôsobujú odolnosť proti antimikrobiálnym látkam vrátane antibiotík

c) s vektorom

1. Použitá génová technika: transformácia
2. Typ vektora: plazmid
3. Identita vektora: pBAC, plazmid *E.coli* s nízkym počtom kópií kompatibilný s génom rezistencie na chloramfenikol
4. Genetická mapa vektora: nie je k dispozícii
5. Prítomnosť sekvencie *cam* (rezistencia voči chloramfenikolu)
6. plazmid je vo výslednom GMO stabilizovaný markerom *cam*
7. Zloženie vektora: Počiatok replikácie (origin) nízkokópiového plazmidu, chloramfenikolová antibiotická rezistencia a inzert

d) S vloženým inzertom


1. Jedná sa o gén *trpD*, antranilát syntáza, vedúci k auxotrofnému kmeňu a tento gén sa exprimoval na plazmide, čo viedlo k prototrofnému kmeňu ("obnoviť rast")
genetická mapa inzertu nie je k dispozícii
2. Funkcia inzertu: akumulácia prirodzeného intermediátu metabolizmu *E coli* a zvýšenie toku dráhy smerom k nadprodukcii antranilátu
3. Umiestnenie inzertu vo výslednom GMO: expresia na plazmide
4. Vložený gén je endogénny *E. coli*, ktorý umožňuje akumuláciu antranilátu v supernatante kultúry. Z tohto génu nevyplýva žiadne riziko. Sekvencie inzertu sa nepodieľajú na patogénnych, toxických alebo škodlivých vlastnostiach darcovského organizmu alebo vektora, neboli popísané ani uvedené

e) S výsledným GMO

1. Očakávané toxické alebo alergické účinky GMO: teoreticky je možný výskyt dočasných slabých alergických reakcií na aerosól mŕtvych buniek u citlivých ľudí, preto je treba vhodným spôsobom zabrániť vzniku aerosólu. Na identifikáciu a detekciu GMO sa používajú metódy PCR inzertu a následné sekvenovanie.
2. Porovnanie GMO s organizmom príjemcu alebo rodiča: Rýchlosť reprodukcie GMO je porovnateľný s rodičovským organizmom. GMO je kmeň, ktorý je charakterizovaný nadprodukciou antranilátu oproti rodičovskému mikroorganizmu.

3. Porovnanie kmeňov *E.coli* Pili K84 a K85: Gén *trpD* je pod dvoma rôznymi syntetickými promotormi s rôznou silou, pomenovanými p6 (pre kmeň K84) a p9 (pre kmeň K85)
4. Očakávaná kolonizačná schopnosť: bezpredmetné v našom prípade
5. Infekčná dávka, choroba: U živých buniek v tekutej suspenzii neboli zistené škodlivé vplyvy na človeka, zvieratá alebo rastliny
6. Vzhľadom na zaužívaný režim práce a likvidácie odpadového biologického materiálu na našom uzavretom pracovisku spĺňajúce požiadavky pre rizikovú triedu 1 je takmer nulová šanca úniku GMO do životného prostredia.
7. Genetická stabilita GMO: genetické modifikácie sú stabilné a plazmidy sú udržiavané s chloramfenikolom v bohatom médiu.
8. Predpokladaný výsledok vzájomného pôsobenia: bezpredmetné v našom prípade
9. Známe, predpokladané účinky na rastliny a zvieratá: doteraz nie sú známe
10. Známe, predpokladané účinky zapojenia sa do biogeochemických procesov - doteraz nie sú známe

V Slovenskej Ľupči, 7.9.2023



Ing. Ľudmila Kováčová
vedúca projektu