

 BIOTIKA a.s. Slovenská Lupča		ZPI číslo: 131/F/04.07/2023 Ver. 01
Účinnosť od: 14.2.2024	Nahrádza: Nový dokument	Strana číslo: 1/15
<h2>ZÁVÄZNÁ PRACOVNÁ INŠTRUKCIA</h2>		
Názov : <b>Prevádzkový poriadok výrobného závodu 131 – fermentácia podľa vyhlášky č. 274/2019 Z.z.</b>		
<b>Vypracoval:</b>	<b>Eviduje:</b>	
Bc. Lenka Kluková, mikrobiológ I OVP UZRK Dátum 1.2.2024 Kluková	Odbor zabezpečovania kvality	
<b>Posúdil:</b>	<b>Schválil:</b>	
Mgr. Martin Krnáč, ved. odboru bezpečnosti práce a hygieny Dátum 1.2.2024 Krnáč	Ing. Jana Červenáková, riaditeľka UZRK Dátum: 1.2.2024	

## 1. Predmet prevádzkového poriadku

Účelom prevádzkového poriadku je zaistenie uzavretého nakladania s geneticky modifikovanými organizmami 1. triedy rizika, upraveného tak, aby nedošlo k ich uvoľneniu do životného prostredia a k ohrozeniu zdravia ľudí.

## 2. Rozsah platnosti

Tento dokument je platný pre priestory Výrobného závodu 131 - fermentácia firmy Biotika a.s., ktoré svojim vybavením splňajú požiadavky pre prácu s GMO rizikovej triedy 1.

## 3. Použité skratky

GMO	geneticky modifikovaný organizmus
MO	mikroorganizmus
RT	riziková trieda
ŽP	životné prostredie
ZPI	záväzná pracovná inštrukcia
ÚZRK	Úsek zabezpečovania a riadenia kvality
OZK	Odbor zabezpečovania kvality
OVP	Odbor vývojových projektov
SP	sanitačný poriadok
VZ	výrobný závod
POT	predočkovací tank
OT	očkovací tank
OFT	odťahový fermentačný tank
FT	fermentačný tank
CSL	corn steep liquid
SN	sacharózová nádrž
MŽP	Ministerstvo životného prostredia
TSA	Caso agar

## 4. Súvisiaca dokumentácia

Zákon č. 151/2002 Z.z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov v znení neskorších predpisov

Vyhláška MŽP SR č.274/2019 Z.z.

Zoznam interných predpisov zariadenia

Sanitačný poriadok fermentácie VZ 131: č. 131/F/03.01/2019 Ver. 02

## 5. Identifikačné údaje používateľa

Názov: Biotika a.s.

Adresa: Slovenská Ľupča 566, 97613

IČO: 315 61900

DIČ: 202 045 2419

## 6. Identifikačné údaje vedúceho projektu

Meno: Ing. Ľudmila Kováčová

Trvalé bydlisko: Lučatín 150, 976 61

Telefón: 048 4368 900, 0903 500 875

E-mail: [kovacova@biotika.sk](mailto:kovacova@biotika.sk)

## 7. Kategória rizika GMO

Tento prevádzkový poriadok zariadenia platí pre priestory fermentácie VZ 131 pre uzavreté nakladanie s GMO *Escherichia coli* PILI K84, K85 zaradeným do RT 1.

## 8. Zodpovednosť za zariadenia VZ 131 – fermentácia

Meno: Trangoš Jozef  
Trvalé bydlisko: Trieda SNP 50 , 974 01 Banská Bystrica  
Telefón: 0908553671  
E-mail: [trangos@biotika.sk](mailto:trangos@biotika.sk)

## 9. Charakter, popis a účel zariadenia

Zariadenia VZ 131 fermentácia sa nachádzajú v budove číslo 71. Je to technologická budova so železobetónovou konštrukciou s tehlovými výplňami, postavená pre biotechnologické výroby. V budove sa nachádzajú:

fermentačná hala  
filtrácia

Do okruhu činností v ktorých sa bude používať GMO patria štandardné mikrobiologické techniky pri príprave inokulačného materiálu, fermentácia GMO v prevádzkovom meradle, monitoring prostredia. S GMO sa bude pracovať v uzavretom systéme fermentačných zariadení, filtrácia sa na prácu s GMO nebude používať. pH vyfermentovanej pôdy sa po skončení fermentácie upraví do kyslej oblasti a potrubím prepraví na izoláciu VZ 134.

### 9.1. Opis pracovných priestorov

Výrobný závod VZ 131 (číslo budovy 71)

Fermentačná hala je šesťpodlažná budova s rozmermi 48 x 22 x 30 m so suterénom a filtračná hala je dvojpodlažná s rozmermi 24 x 22 x 15 m.

Výrobné zariadenia tvoria uzavretý systém:

Fermentačné tanky – 5 ks (poz. č. 71403 a, b, c, d, e) sú to tlakové nádoby o objeme 150 m<sup>3</sup> vyrobené z nerez, vybavené miešaním, vzdušnením sterilným vzduchom, meracou technikou, čistiteľné, sterilizovateľné, slúžia na vlastnú produkciu vyrábaného produktu.

Sú osadené na prízemí a presahujú na III. posch.

Fermentačný tank odťahový – 3 ks (poz. č. 71404 a, b, c) sú to tlakové nádoby o objeme 50 m<sup>3</sup> vyrobené z nerez, vybavené miešaním, vzdušnením sterilným vzduchom, meracou technikou, čistiteľné, sterilizovateľné, slúžia na vlastnú produkciu vyrábaného produktu.

Sú osadené na prízemí a presahujú na II. posch.

Očkovacie tanky – 4 ks (poz.č. 71402 a, b, c, d) sú to tlakové nádoby o objeme 15 m<sup>3</sup> vyrobené z nerez, vybavené miešaním, vzdušnením sterilným vzduchom, meracou technikou, čistiteľné, sterilizovateľné, slúžia na prípravu inokulačného materiálu.

Sú umiestnené na III. posch. a presahujú na V. posch.

Preočkovacie tanky – 8 ks (poz.č. 71401 a, b, c, d, e, f, g, h) sú to tlakové nádoby o objeme 1,5 m<sup>3</sup> vyrobené z nerez, vybavené miešaním, vzdušením sterilným vzduchom, meracou technikou, čistiteľné, sterilizovateľné, slúžia na prípravu inokulačného materiálu.

Sú umiestnené na V. posch. a zasahujú na IV. posch.

Rozmiešavací kotol – 1 ks ( poz.č. 71201) -3 m<sup>3</sup> nerezová nádrž s miešaním na prípravu inokulačných pôd pre POT, je umiestnená na I. a II. posch.

Rozmiešavací kotol– 1 ks ( poz.č. 71203) – 14 m<sup>3</sup>, nerezová nádrž s miešaním na prípravu inokulačných pôd pre OT, je umiestnená na I. a II. posch.

Rozmiešavací kotol – 1 ks ( poz.č. 71205) – 30 m<sup>3</sup> tlaková nádoba pre prípravu suspenznej fermentačnej pôdy (SSP) pre FT, vyrobená z nerez, vybavená miešaním, čistiteľná, sterilizovateľná, je umiestnená na prízemí – II.posch.

Rozmiešavací kotol – 1 ks ( poz.č. 71206) – 35 m<sup>3</sup> netlaková nádoba pre prípravu nesuspensnej fermentačnej pôdy (NSP) pre OT, vyrobená z nerez, vybavená miešaním, je umiestnená na prízemí – II.posch.

Tank živín – 8 ks (poz.č. 71503 a, b, 71505 a, b, 71506 a, b, 71507 a, b, 71508 a, b) – 10 m<sup>3</sup> tlaková nerezová nádrž s miešaním na prípravu sterilných živných príkrmov (CSL, FOOK, SAM, ŽP) , sú umiestnené na III.- V. posch.

Zásobník živín nádrž pre hydroxid sodný – 1ks ( poz.č. 71501 b) - 10 m<sup>3</sup> tlaková nádrž z ocele triedy 11 kyselinovzdorne smaltovaná, určená pre skladovanie roztoku hydroxidu sodného, bez miešania, je umiestnená na III.-V. posch.

Tank živín – 2 ks ( poz.č. 71504 a, b) - 40 m<sup>3</sup> tlaková nerezová nádrž s miešaním na prípravu sterilného roztoku sacharózy , sú umiestnené na prízemí - II. posch.

Kotol odpeňovadla – 2 ks ( poz.č. 71510 a, b) -1,26m<sup>3</sup> tlaková nerezová nádrž s miešaním na prípravu sterilného odpeňovadla (CHPP), sú umiestnené na IV - V. posch.

Zásobník – 1 ks (poz. č. 71112) -16 m<sup>3</sup> tlaková nádoba bez miešania, vyrobená z ocele tr. 11 opatrenej smaltom, je určený na skladovanie tekutého corn-steepu (CSL2), je umiestnený na III. posch.

Zásobník – 1 ks (poz. č. 71119) -10 m<sup>3</sup> tlaková nádoba s miešaním, vyrobená z ocele tr. 11 opatrenej smaltom, je určený na skladovanie tekutého corn-steepu (CSL1), je umiestnený na III. posch.

Zásobník– 1 ks (poz.č. 71115) - 16 m<sup>3</sup> tlaková nádoba z ocele tr.11, smaltovaná, určená na skladovanie čpavkovej vody, umiestnená na 3 posch.

Ležatý zásobník – 1 ks (poz. č. 71214) – 20 m<sup>3</sup>, tlaková nádoba vyrobená z ocele tr. 11 smaltovaná, určená na skladovanie a dohrievanie oteplenej vody, umiestnená na IV. posch.

Nádrž – 1 ks ( poz.č. 71613 a) - 30 m<sup>3</sup> tlaková nerezová nádrž s miešaním na skladovanie dextrózového sirupu, umiestnená na prízemí - I. posch.

Chemister 3 FAD/43000 – 1 ks (poz.č.71301 a) stojatá tlaková nádoba, objem 5,8 m<sup>3</sup> slúži na odlúčenie pevných častíc a vody z technologického vzduchu, umiestnená je na prízemí

Chemister 3 FAD/43000 – 1 ks (poz.č.71301 b, c) stojatá tlaková nádoba, objem 3 m<sup>3</sup> slúži na odlúčenie pevných častíc a vody z technologického vzduchu, umiestnené sú na prízemí

Zberník čistého kondenzátu – 1 ks (poz. č. 71801), 6,3 m<sup>3</sup>, tlaková nádoba bez miešania určená na zber čistého kondenzátu, umiestnená v suteréne

Zberník čistého kondenzátu – 1 ks (poz. č. 71802), 10 m<sup>3</sup>, tlaková nádoba bez miešania určená na zber čistého kondenzátu, umiestnená v suteréne

Vyvíjač sýtej pary – 1 ks (výr.č. 1711-T) –stojatá tlaková nádoba o objeme 0,685 m<sup>3</sup>, vyrobená z AKV, slúži na prípravu čistej sýtej pary k sterilizácii vzduchových filtrov, umiestnený je na IV. posch.

Miešačka (nádrž na preplachovú vodu) – 1 ks (inv.č. 11386) –7,5 m<sup>3</sup>, zariadenie na zber filtrátu vyfermentovanej pôdy, je vyrobená z nerez, nie je tlaková, s miešaním, umiestnená na prízemí – 1. posch.

### **Filtrácia**

Filtračné zariadenie Larox – 1 ks (poz.č. 71604 a), nerez, zariadenie určené na filtráciu vyfermentovanej pôdy, umiestnené na I. a II. posch.

Filtračné zariadenie Larox – 1 ks (poz.č. 71604 b), nerez, zariadenie určené na filtráciu vyfermentovanej pôdy, umiestnené na I. a II. posch.

Rozmiešavacia nádrž – 2 ks (poz. č. 71601 a, b) – 75 m<sup>3</sup>, netlaková nerezová nádoba s miešaním, určená pre vypustenie fermentačnú pôdu a filtrát, umiestnené sú na prízemí – II. posch.

Rozmiešavacia nádrž – 2 ks (poz. č. 71601 c, d) – 75 m<sup>3</sup>, netlaková nerezová nádoba s miešaním, určená na zber filtrátu vyfermentovanej pôdy, umiestnené sú na prízemí – II. posch.

Odstredivka Alfa-laval – (poz.č. 71622 b) - samostatne stojace zariadenie z nehrdzavejúcej ocele, určené na odseparovanie biomasy, umiestnené na II. poschodí

Vzdušník – 2 ks (inv.č. 14859, 14860) – 10 m<sup>3</sup>, tlaková nádoba, používaná ako zásobník tlakového vzduchu pre filtračné zariadenia Larox, umiestnené sú na 1 posch.

Výmenník tepla- chladič – 3ks – protiprúdny výmenník tepla, chladiace médium soľanka, umiestnené sú na 2 posch.

Výmenník tepla- chladič – 2ks – protiprúdny výmenník tepla, chladiace médium chladiaca voda, umiestnené sú na 1 posch.

Riadiaci systém - 1 ks - Centrum CS 3000 - počítačový riadiaci systém pre riadenie technologického procesu fermentácie v OFT, je umiestnený vo veľíne na V. posch.

### **10. Pravidlá pre prácu s GMO pre jednotlivé zariadenia**

GMO *Escherichia coli* Pili K84, K85 sú zaradené do RT 1. Nakladanie s GMO je realizované v súlade s požiadavkami uvedenými pre túto rizikovú skupinu vo vyhláske MŽP SR č.399/2005 Z.z. a v súlade s kontrolnými opatreniami uvedenými v tabuľke v kapitole 12 tohto dokumentu.

#### **10.1. Pravidlá pre prácu s GMO pre jednotlivé zariadenia sú uvedené ďalej nasledovne:**

1. Počas manipulácie s GMO musia byť dvere a okná zatvorené.
2. Pracovné miesto musí byť udržiavané v poriadku a čistote.
3. Pracovný povrch musí byť dekontaminovaný po každom experimente a na konci pracovného týždňa.
4. Ak sa pracovné miesto kontaminovalo, okamžite musí byť dekontaminované.
5. Počas manipulácie s GMO (odber vzoriek) sa pracuje v rukaviciach. Je nutné nosiť pracovný plášť alebo iné ochranné oblečenie. Tento pracovný plášť nesmie byť používaný v kanceláriách alebo na verejných miestach.
6. Počas manipulácie s GMO sa neodporúča nosiť na rukách hodinky alebo šperky.
7. Pracovný odev, ktorý bol kontaminovaný s GMO alebo v dôsledku nehody s GMO, musí byť pred práním dekontaminovaný sterilizáciou v autokláve 30 minút pri 121°C.
8. Pracovné oblečenie a osobné veci musia byť uskladnené oddelene.
9. V tomto priestore sa nesmie fajčiť, jesť a požívať alkoholické alebo nealkoholické nápoje.
10. Pred odchodom z tohto pracovného priestoru je potrebné umyť si ruky.
11. Počas manipulácie s GMO treba predchádzať tvorbe a šíreniu aerosolov.
12. Rastliny, ktoré nie sú predmetom experimentu sa nesmú nachádzať v tomto priestore.
13. Materiál, ktorý bol v kontakte s GMO musí byť dekontaminovaný 30 minút pri 121°C pred ďalším použitím.
14. Biologický odpad, ktorý bol v kontakte s GMO musí byť sterilizovaný 30 minút pri 121°C.
15. V pracovnom priestore počas manipulácie s GMO nesmie byť žiaden hmyz.
16. V tomto priestore sa môžu použiť len kmene mikroorganizmov, ktoré sa dajú identifikovať.
17. Geneticky modifikované organizmy musia byť čitateľne označené.
18. Chemický toxický odpad, ktorý vznikol počas práce musí byť separovaný.

19. Materiál a biologický odpad, ktorý bol v kontakte s GMO pred odnesením na sterilizáciu musí byť inaktivovaný vhodným dezinfekčným roztokom (tekutý biologický odpad je dekontaminovaný vyliatím do uzatváracej zbernej nádoby s roztokom Persterilu 0,5%, chlórnanu sodného 5%, Sava 5-10%).
20. Tieto pravidlá sa musia dodržiavať aj pri experimentoch, ktoré nezahŕňajú prácu s GMO.

### Priestory fermentačnej prevádzky VZ 131

V priestoroch fermentačnej prevádzky VZ 131 prebieha príprava inokula a fermentácia s GMO v prevádzkových fermentačných tankoch s mechanickou upchávkou, ktorá v maximálnej miere umožňuje uzavretie systému. Systém tesnenia zaisťuje obojstrannú sterilitu (filtre na vstupe a výstupe, tesnenie) znižuje riziko úniku GMO na minimum. Sterilizácia vzorkovacích ventilov parou a použitie dezinfekčných roztokov, znižujú schopnosť prežitia GMO na minimum. Úniku mikroorganizmov odchádzajúcimi plynmi zabraňuje filtračné zariadenie do ktorého je vyvedený výdych z každého fermentora. pH pôdy sa po ukončení fermentácie upraví do kyslej oblasti na hodnotu 3,5. Uzavretým potrubím sa obsah fermentora pretlačí do uzavretých nádob a odtiaľ na separáciu biomasy na ultrafiltráciu Alfa-laval. Odseparovaná biomasa sa zbiera v ďalšej uzavretej nádrži, kde sa inaktivuje zahriatím na 80°C po dobu 30 minút.

Pri odbere vzoriek v priebehu kultivácie, úprave vzorky pre analytické stanovenie a počas neho, pri čistení fermentorov sú pracovníci povinní okrem pracovného odevu pracovať v rukaviciach.

V prípade kontaminácie pracovných plôch, odevu alebo pokožky je pracovník povinný riadiť sa pokynmi podľa scenára reprezentatívnych druhov havárií (kapitola 11 tohto dokumentu)

### 10.2. Spôsob uchovávania GMO

GMO sú uchovávané v kryoskúmavkách pri  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  v uzamykateľných mrazničkách. Prístup ku kľúčom má len úzky okruh zamestnancov.

- a) Nádoba, v ktorej sú uskladnené GMO musí byť čitateľne označená
- b) GMO musia byť označené tak, aby bolo možné ich bližšie identifikovať v registračnom systéme.
- c) Ak sú v rovnakom priestore uskladnené aj geneticky nemodifikované organizmy, tieto musia byť uložené oddelene
- d) Nevyužívané GMO musia byť zlikvidované sterilizáciou pri 121°C počas 30 minút podľa pravidiel, uvedených v kapitole 10.4..

GMO mikroorganizmi	Podmienky uskladnenia	Spôsob uskladnenia
<i>Escherichia coli</i> PILI K84, K85	$\leq -70^{\circ}\text{C}$	V uzavretých kryoskúmavkách uložených v krabičkách

### 10.3. Spôsob označovania GMO

Táto povinnosť sa týka geneticky modifikovaného materiálu, ktorý je používaný v experimentoch alebo je uchovávaný (bakteriálne kmene, pletivové kultúry a reprodukateľné časti rastlín).

Geneticky modifikovaný materiál musí byť označený nasledovne:

- a) Názov:

- b) Číslo šarže dodávky
- c) Dátum prípravy

Označenie musí byť umiestnené na všetkých kontajneroch, ktoré obsahujú geneticky modifikovaný materiál.

Označenie musí byť viditeľné a čitateľné.

#### 10.4. Spôsob likvidácie GMO

- GMO určené na likvidáciu je možné sústreďovať len v priestoroch na to vopred určených
- Plastové materiály (napr. falkonky), ktoré prišli do styku s GMO uskladňovať v autoklávovateľných sáčkoch a označiť indikačnou páskou
- Sklený materiál, ktorý prišiel do styku s GMO uskladňovať v autoklávovateľných sáčkoch a označiť indikačnou páskou
- Sklené nádoby, ktoré prišli do styku s GMO označiť indikačnou páskou
- Sterilizácia biologického odpadu sa uskutočňuje autoklávovaním pri teplote 121°C počas 30 minút
- Inaktivovaný biologický odpad (indikačná páska je čierna) môže opustiť budovu ako bežný odpad

Mikroorganizmy v kontaminovanom materiáli, odpade a kontaminovaných prístrojoch musia byť vhodným spôsobom inaktivované.

Spôsoby inaktivácie:

- Chemicky (dezinfekčnými roztokmi)
- Tepelne (sterilizáciou v autokláve)

#### Zoznam dezinfekčných roztokov

- roztok hydroxidu sodného: 1%
- roztok suprachlór: 0,5%
- roztok SAVO: 5-10%
- roztok chlórnanu sodného: 5%
- roztok etanolu: 96%

Pri uvedenej koncentrácii dezinfekčných prostriedkov je doba pôsobenia na kontaminovaný materiál 10 minút.

Odpustené množstvo vzorky zo vzorkovača fermentačného tanku musí byť okamžite dekontaminované preliatím dezinfekčným roztokom a prepustením pary 300 kPa cez sústavu odvodu do zberníka kondenzátu.

Tekutý odpad (vzorky obsahujúci živý GMO) je chemicky dekontaminovaný vyliatím do zbernej nádoby na biologický odpad s dezinfekčným roztokom a potom likvidovaný tepelne autoklávovaním.

Pevné odpady (kontaminovaná buničitá vata, handry použité k dezinfekcii pracovných plôch) budú zhromažďované v polyetylénových vreciach pre biologický odpad, a následne likvidované spoločne spálením.

Odpadná fermentačná pôda je tepelne inaktivovaná sterilizáciou v autokláve, alebo vo fermentačnom tanku. Následne je vypustená do splaškovej kanalizácie.

Fermentačné zariadenie (fermentačné tanky) sú vybavené filtračným zariadením odchádzajúceho vzduchu čím je minimalizovaný únik GMO do ovzdušia.



### **10.5. Podmienky prenosu GMO v uzavretých priestoroch a na verejných priestoroch.**

- Prenášanie GMO v priestoroch používateľa
  - a) GMO musia byť prenášané v pevne uzavretých, povrchovo nekontaminovaných nádobách, tak aby nedošlo k ich úniku do okolia
- Prenášanie GMO na verejných priestoroch
  - a) GMO, ktoré patria do triedy 1, musia byť prenášané v pevne uzavretých nádobách. Medzi jednotlivými prenášanými nádobami musí byť umiestnený vhodný absorbujúci materiál, ktorý vyplní priestor medzi nimi. V prípade použitia suchého ľadu, vonkajšia nádoba musí byť vybavená ventilom, ktorý umožní ventiláciu uvoľňovaného CO<sub>2</sub>.
  - b) Identifikačné údaje o prenášanom materiáli musia byť uvedené v sprievodnom papieri a na každej prenášanej nádobe.
  - c) Každý verejný transport GMO musí byť oznámený vedúcemu projektu.

### **10.6. Metódy na odstránenie GMO v prípade ich nekontrolovaného úniku, udalosť, nehoda a porušenie pravidiel**

Spôsoby odstránenia nekontrolovaného úniku sú popísané v kapitole 13 tohto dokumentu.

Osoby zodpovedné za likvidáciu nekontrolovaného úniku:

Vedúci VZ 131: Trangoš Jozef

Vedúci fermentácie VZ 131 : Ing. Bukovčan Pavol

## **11. Udalosť, nehoda a porušenie pravidiel**

### **11.1. Udalosť**

Každá udalosť, pri ktorej sa mohli GMO uvoľniť do prostredia mimo pracovného priestoru musí byť zaznamenaná.

Príklady:

- Strata GMO alebo ich poškodenie počas prenosu
- Pád nádoby, ktorá obsahuje GMO, pričom došlo k rozliatiu suspenzie na podlahu/stôl v pracovnom priestore
- Pád nádoby, ktorá obsahuje geneticky modifikované rastliny, pritom došlo k rozbitiu nádoby
- GMO sú uložené v poškodenej nádobe alebo sú infikované patogénom
- Poštou prišli neznáme GMO
- Prítomnosť GMO v odpade ako dôsledok nesprávneho postupu pri sterilizácii v parnom autokláve

Postup v prípade udalosti:

- Prerušiť prácu, kontaktovať vedúceho projektu a zreteľne opísať danú udalosť
- Pokúsiť sa zabrániť ďalšiemu šíreniu GMO
- Zaznamenať všetky technické zlyhania počas práce s GMO

Postup v prípade kontaminácie priestoru bakteriálnou suspenziou:

- Ak je to možné, odstrániť všetky prekážky z kontaminovanej oblasti
- Ak je to možné, čakať 15 min, aby došlo k usadeniu aerosólov
- Pracovať v rukaviciach

- Nedotýkať sa rozbitého skla alebo ostrých predmetov
- Presvedčiť sa, či sa kontaminant nešíri cez uzavretú oblasť (kruh), ktorá sa vytvorila dezinfekčnou látkou. Dezinfikovať celú oblasť
- Zakryť kontaminovaný materiál alebo povrch s papierovou hygienickou vreckovkou alebo filtračným papierom, ktorý bol namočený v 70% alkohole
- Po 10 minútach vreckovku alebo filtračný papier odstrániť a umiestniť medzi biologický odpad
- Opäť zakryť kontaminovaný materiál alebo povrch s papierovou hygienickou vreckovkou alebo filtračným papierom, aby nasali tekutinu
- Opakovať tento postup pokiaľ nie je tekutina dokonale absorbovaná
- Vyčistiť postihnutú oblasť opäť so 70% alkoholom
- Vyčistiť všetok materiál, nástroje a povrch najprv s vodou a mydlom a potom s dezinfekčným roztokom (70% alkohol). Nástroje môžu byť aj sterilizované v parnom autokláve
- Všetko kontaminované oblečenie dezinfikovať alebo sterilizovať v parnom autokláve
- Kontaminovanú pokožku umyť dezinfekčným mydlom

### 11.2. Nehoda

Nehoda zahrňuje všetky udalosti, pri ktorých počas manipulácie s GMO došlo k zraneniu alebo pravdepodobnej kontaminácii zamestnancov. Všetky nehody musia byť zaznamenané.

#### Postup pri nehode

- Okamžite oznámiť nehodu vedúcemu projektu alebo členovi výboru pre bezpečnosť
- V prípade poranenia (porezanie, pichnutie) nechať ranu krváčať tak dlho ako je to možné, potom opláchnuť pod tečúcou vodou a následne opláchnuť so 70% alkoholom alebo jódom tinktúrou
- V prípade, že boli zasiahnuté oči, ústa a iné, opláchnuť veľkým množstvom vody
- Vyhľadať lekársku pomoc

Nehodu písomne zaznamenať

### 11.3. Porušenie pracovných pravidiel

Každé porušenie pracovných pravidiel musí byť zaznamenané.

Príklady porušenia pravidiel:

- GMO sú uskladnené bez označenia.
- Použitie geneticky modifikovaných rastlín alebo konštruktu, ktoré neboli zaevidované.

**12. Kontrolné opatrenia a iné ochranné opatrenia pre iné uzavreté priestory ( Podľa prílohy č. 4 k vyhláške 274/2019 Z.z.)**

	Popis	Úroveň ochrany - 1	Realita Biotika a.s.
1	Životaschopné mikroorganizmy by sa mali kontrolované používať v systéme, ktorý oddeľuje samotný proces od okolia (uzavretý systém)	voliteľné	áno – systém sterilných kultivačných tankov opatrených sterilizovanými upchávkami a filterami
2	Kontrola plynov vychádzajúcich z uzatvoreného systému	nevyžaduje sa	áno - ventily filtrov pri uzavretých nádobách
3	Kontrola aerosólov počas zberu vzoriek, pridávaní materiálu do uzatvoreného systému alebo prenose materiálu do ďalšieho uzatvoreného systému	voliteľné	áno - vzorkovacie ventily preparované
4	Inaktivácia biomasy kultivačných tekutých médií pred ich odstránením z uzatvoreného systému	voliteľné	nie je
5	Utesnenie by malo byť navrhnuté tak, aby minimalizovalo alebo zabránilo úniku	bez špecifických požiadaviek	áno - sterilná výroba
6	Kontrolované miesto by malo byť navrhnuté tak, aby prípadný únik z uzavretého systému zostal v kontrolovanom priestore	voliteľné	nie je
7	Kontrolované miesto by malo byť hermeticky uzatvoriteľné na dezinfekciu plynom	nevyžaduje sa	nie je

**Vybavenie**

8	Vstup cez dekontaminačnú miestnosť	nevyžaduje sa	nie je - výroba je v uzavretom priestore
9	Lahko umývateľné povrchy odolné vode, kyselinám, zásadám, rozpúšťadlám, dezinfekčným látkam a dekontaminačným činidlám	vyžaduje sa (pracovné stoly, ak sú)	áno - podlahy, steny, stoly -GMO v uzavretom systéme oddelenom od pracovného priestoru
10	Zvláštne opatrenia na primeranú ventiláciu kontrolovaného miesta na účel minimalizácie kontaminácie vzduchu	voliteľné	nie je
11	Na kontrolovanom mieste by mal byť udržiavaný nižší tlak ako je v okolitom prostredí	nevyžaduje sa	nie je
12	Odsávaný a vháňaný vzduch z kontrolovaného priestoru by mal byť HEPA filtrovaný	nevyžaduje sa	nie je

**Systém práce**

13	Uzatvorené systémy by mali byť umiestnené v kontrolovanom priestore	nevyžaduje sa	áno
14	Prístup by mal mať dovolený len určený personál	nevyžaduje sa	áno
15	Označenia biobezpečnosti by mali byť rozmiestnené	nevyžaduje sa	nie je
16	Pracovníci by sa mali osprchovať pred opustením kontrolovaného priestoru	nevyžaduje sa	nie je
17	Pracovníci by mali nosiť ochranný odev	vyžaduje sa (pracovný odev)	áno + predpísané ochranné pomôcky

**Odpady**

18	Inaktivácia geneticky modifikovaných mikroorganizmov v odpadových vodách z umývadiel, na umývanie rúk, zo sprch a v podobných odpadových vodách	nevyžaduje sa	nie je
19	Inaktivácia geneticky modifikovaných mikroorganizmov v kontaminovanom materiáli a v odpade vrátane odpadových vôd pred konečným zneškodnením	voliteľné	áno - použitý materiál (vzorkovacie nádoby) sú po použití umyté a sterilizované výrobné zariadenie je sterilizované tepelne alebo chemicky - odpady tekuté obsahujúce GMO sú sterilizované tepelne alebo chemicky odpady pevné nie sú

**13. Popis možného nekontrolovaného úniku a opatrení k obmedzeniu úniku GMO**

<b>Nekontrolovaný únik</b>	<b>Nebezpečie-dôsledok</b>	<b>Opatrenia</b>
1. Rozbitie Schott fľaše s inokulom pri očkovaní inokulačného tanku (100 – 200 ml)	Kontaminácia vonkajšieho povrchu tanku, podlahy, stien, prípadne pracovného odevu	- sanitácia kontaminovaných plôch dezinfekčným roztokom pomocou buničitej vaty alebo iného materiálu - výmena odevu a ich dekontaminácia v autokláve (uložený do vreca pre kontaminovaný materiál) - dekontaminácia materiálu použitého k sanitácii v autokláve - kontrola účinnosti sanitácie plôch - kontrola prostredia (vzduchu)
2. Rozbitie Schott fľaše s inokulom pri transporte na miesto očkovania	Kontaminácia vnútorného priestoru transportnej nádoby	- celková dekontaminácia transportnej nádoby v autokláve
3. Rozbitie vzorkovnice pri odbere vzorky z tanku	Kontaminácia okolia, vzorkovacieho ventilu, podlahy, prac. odevu	Rovnaká ako v bode 1 - preliatie systému pod vzorkovacím ventilom do zberníka kondenzátu s dezinfekčným roztokom
4. Únik kultúry zo sterilného tanku v priestoroch fermentácie	Kontaminácia okolia, vzorkovacieho ventilu, podlahy, prac. odevu, kanalizačného systému, ochranných pomôcok pri likvidácii havárie	Rovnaká ako v bode 1 - dekontaminácia kanalizačného systému koncentrovaným roztokom lúhu, glutaraldehydu či persterilu - tepelná deaktivácia v zberníku špinavého kondenzátu

### Možné následky nekontrolovaného úniku:

- na zdravie ľudí: možnosť prechodnej alergickej reakcie u citlivých osôb pri vyššej expozícii aerosólu s mŕtvimi bunkami. Účinok na zdravie vo forme tekutej kultúry nebol zaznamenaný
- na zvieratá: nebol zistený, predmetný GMO ako aj jeho rodičovský organizmus, mimo špeciálnej živnej pôdy neprežíva kvôli plazmidovému systému GMO, ktorý je nestabilný (stabilizácia chloramfenikolom)
- na prostredie a biologickú rozmanitosť: nebol identifikovaný, obmedzená životaschopnosť mimo živného média

### Metódy pre izoláciu kontaminovaného zariadenia a priestorov pri nekontrolovanom úniku

- uzavretie armatúr, vypnutie daného zariadenia (s ohľadom na bezpečnosť práce a následky zásahu)
- uzavretie pracoviska (s povolením vstupu iba osobám určeným na likvidáciu havárie, a osobám, ktoré testujú prostredie)
- fyzická kontrola (dozor pracovníkom)

## **14. Postupy detekcie**

### **14.1. Detekcia GMO**

#### A – stanovenie prítomnosti GMO a jeho titru

Rôzne riedenia tekutej vzorky sa vysievajú na platne s LB agarom s prídavkom chloramfenikolu (12,5 µg/ml). Platne sa kultivujú 48 hod pri 37°C.

#### B - identita GMO

- farba a tvar kolónií: béžová farba, okrúhle, konvexné, hladké
- tvar buniek: klasické krátke tyčinky, pohyblivé
- farbenie podľa Grama: gramnegatívne tyčinky

### **14.2. Identifikácia GMO v prostredí**

Vzorky odobrané z tekutých odpadov sa riedia a stanovujú na platniach s LB agarom s prídavkom chloramfenikolu. Vzduch sa vzorkuje air-samplerom (aeroskop). Pevné povrchy sa monitorujú odtlačkovou metódou.

## **15. Ochrana zdravia človeka a životného prostredia**

- pri manipulácii s kultúrou s prítomnosťou GMO je nutné používať ochranné gumené rukavice
  - pri predpokladanej dlhodobej expozícii je potrebné použiť masku s filtrom proti organickým kyselinám a parám (fy 3M, typ ABE 1)
  - pri likvidácii havárie v priestore s rozptýleným aerosólom je nutné používať aj ochrannú masku na celú tvár, chrániacu zrak (maska sa používa s príslušným filtrom)
  - po ukončení zásahu, opustení kontaminovaného priestoru sa musia kontaminované osoby hneď umyť, v prípade zasiahnutia väčšej časti tela osprchovať
- životné prostredie je chránené preventívne:
- likvidáciou živých GMO v tekutých médiách tepelnou sterilizáciou
  - asanáciou kanalizačného systému niektorým z dezinfekčných prostriedkov, asanuje sa príslušný kanalizačný rozvod v kontaminovanom priestore

-niekoľkostupňovou úpravou odchádzajúceho vzduchu zo sterilných nádob, barometrická slučka, tepelná blokáda spätných kondenzátov, antibakteriálny filter (Pall), cyklon, skladovacie nádoby opatrené ventilačnými filtrami a filtračnými elementami.

- okná opatrené sieťkami proti hmyzu, alebo lampy k likvidácii hmyzu
- pravidelná deratizácia v podniku (resp. priestorov s možným výskytom hlodavcov)

## **16. Zoznam pracovníkov preškolených pre prácu na pracovisku**

### **VZ 131**

Vedúci VZ 131 - Trangoš Jozef

Vedúci fermentácie VZ 131-Ing. Bukovčan Pavol

Technológ strojnej údržby: Ing. Demian Viliam

Technológ strojnej údržby: P. Jašík

Majstri fermentácie: J. Matuška, I. Papcúnová, Š. Valach, J. Bidlo

Chemik farm. výroby: P. Vigaš, I. Pohl, V. Krajčí, M. Hoghová, M. Kováč, J. Sanitra ,

J. Matula, Z. Tomanová

Práca s GMO na úseku VZ 131 sa týka prevádzky fermentácie.

### **17. Približné množstvo GMO alebo produktu, s ktorým sa bude na pracovisku nakladať**

GMO: produkčný kmeň *Escherichia coli* pre výrobu Intermediátu CHIC

- a. mikrobiologické laboratóriá OVP v budove ORK

2 kryoskúmavka s objemom 1 – 5 ml (cca 1 x za týždeň)

1x50 ml fermentačnej pôdy v sterilných sklenených vzorkovniciach

- b. Analytické laboratóriá medzioperačnej kontroly ORK

1 x 100 ml fermentačnej pôdy v sklenených uzatvárateľných vzorkovniciach

### **18. Organizačné a technologické zabezpečenie pracoviska**

Odber vzoriek uskutočňujú pracovníci fermentácie VZ 131.

### **19. Upratovanie a kontrola výrobných priestorov**

Upratovanie priestorov prevádzky sa riadi Sanitačným poriadkom zariadenia SP 131/F/03.01/2019 Ver. 02

### **20. Údržba zariadení**

Záznamy o údržbe a pravidelných kontrolách zariadení sú uvedené v denníkoch zariadení a v protokoloch o príprave šarží.

### **21. Zásady hygieny a bezpečnosti práce**

Pracovníci prevádzky musia byť preškolení o zásadách bezpečnej manipulácie s mikrobiologickým materiálom a o GMO používaných v prevádzke. Neskúsení pracovníci a návštevy musia byť informovaní o nebezpečí a doprevádzaní školeným pracovníkom. Pracovný priestor pre prácu s GMO musí byť označený. V laboratóriách a prevádzke sa nosí predpísaný pracovný odev.

Všetky priestory sú udržiavané čisté a v suchom stave. Všetky pracovné plochy sú pravidelne dezinfikované.

Veľkoplošné kontaminované plochy (havárie), sú okamžite označené, dezinfikované vhodným dezinfekčným prostriedkom.

Všetky dezinfekčné práce sú vykonávané včas a takým spôsobom, aby sa zamedzilo vzniku aerosólu.

Po práci a pred odchodom z pracovných priestorov je pracovník povinný si umyť ruky (pri bezprostrednom kontakte so vzorkami obsahujúcimi GMO sa pracuje v rukaviciach).

## **22. Zoznam povinných osobných ochranných pracovných prostriedkov**

- Pracovná blúza
- Pracovné nohavice
- Biely plášť ( v laboratóriách)
- Pracovná obuv
- Pracovné rukavice
- Ochranné okuliare alebo štít
- Ostatné ochranné pomôcky (ochr. zástera, ochranná maska) – podľa potreby

## **23. Zakázané činnosti na pracovisku**

V uzavretých priestoroch laboratórií a prevádzky je zakázané jesť, piť, a fajčiť.

## **24. Zásady vedenia evidencie o prevádzke zariadenia**

Činnosť zariadenia je zaznamenaná v denníku zariadenia. V denníku zariadenia sú vedené záznamy o údržbe a čistení.

## **25. Spôsob oznámenia nekontrolovaného úniku**

Nekontrolovaný únik v súvislosti s GMO sa vždy oznamuje v poradí ako je uvedené:

- Vedúcemu príslušného pracoviska – telefonicky
- Odbornému poradcovi – telefonicky
- Manažérovi pre bezpečnosť a hygienu – telefonicky

Po posúdení rozsahu nekontrolovaného úniku sa informuje:

- Výrobný riaditeľ resp. riaditeľ závodu
- Inšpekcia životného prostredia
- Mestský úrad Slovenská Ľupča

Tento prevádzkový poriadok bol predložený (viď rozdeľovník).

## **26. Záverečné ustanovenia**

### **26.1. Uchovávanie dokumentácie**

Originál tohto dokumentu sa uchováva na Úseku zabezpečovania a riadenia kvality. Príslušná záznamová dokumentácia je uchovávaná u vedúcich oddelení.

### **26.2. Kontrola platnosti dokumentu**

Kontrolou tohto dokumentu je poverený vedúci projektu v spolupráci s vedúcim VZ 131. Dokument je platný odo dňa vydania a platí na VZ 131 –fermentácia Biotika a.s.

Prílohy:

1. Plán miestností a zariadení

- Koniec dokumentu -

## Príloha č.1 Plán zariadení

### Legenda k schémam výrobných priestorov

Príloha č. 1: VZ 131– 5.poschodie schéma č. 1

OT1 očkovací tank  
OT2 očkovací tank  
OT3 očkovací tank  
OT4 očkovací tank  
POT1-8 predočkovací tank  
Zásobníky sterilných roztokov 1-12  
Zásobník ster. protipenidla CHPP 1-2  
Velín fermentácie

Príloha č. 1: VZ 131– 4.poschodie schéma č. 2

Vyvíjač sýtej pary  
OT1 očkovací tank- prechod  
OT2 očkovací tank- prechod  
OT3 očkovací tank- prechod  
OT4 očkovací tank- prechod  
POT1-8 predočkovací tank  
Zásobníky sterilných roztokov 1-12- prechod  
Zásobník ster. protipenidla CHPP 1-2  
Oteplená voda

Príloha č. 1: VZ 131– 3.poschodie schéma č. 3

OT1 očkovací tank  
OT2 očkovací tank  
OT3 očkovací tank  
OT4 očkovací tank  
FT 1-5 fermentačný tank  
Zásobníky sterilných roztokov 1-12  
Zásobník čpavkovej vody  
Zásobné nádrže na CSL 1-3

Príloha č. 1: VZ 131– 2.poschodie schéma č. 4

FT 1-5 fermentačný tank – prechod  
Rozmiešavacia nádrž POT a OT  
OFT 1-3  
Zásobníky ster. roztokov SAS 1,2  
Nádrž SSP a NSP  
Sklad surovín



Príloha č. 1: VZ 131– 1.poschodie schéma č. 5

FT 1-5 fermentačný tank – prechod  
OFT 1-3 – prechod  
Zásobníky ster. roztokov SAS 1,2 – prechod  
Nádrž SSP a NSP – prechod  
Chemistre 1-3

Príloha č. 1: VZ 131– Prízemie schéma č. 6

FT 1-5 fermentačný tank  
OFT 1-3  
Zásobníky ster. roztokov SAS 1,2  
Nádrž SSP a NSP  
Chemistre 1-3  
Kondenzátové hospodárstvo

## **FILTRÁCIA**

Príloha č. 1: VZ 131– 2.poschodie schéma č. 4

Velín filtrácie  
Larox 1,2  
Zásobné nádrže na pôdu 1,2  
Zásobné nádrže na filtrát 3,4  
Zásobná nádrž na flokulant  
Zásobná nádrž síran hlinitý  
Chladič na pôdu  
Chladič na filtrát  
Odstredivka Alfa-Laval

Príloha č. 1: VZ 131– 1.poschodie schéma č. 5

Larox 1,2  
Zásobné nádrže na pôdu 1,2 - prechod  
Zásobné nádrže na filtrát 3,4 – prechod  
Zásobná nádrž na dextrózu  
Zásobná nádrž na filtrát  
Zásobná nádrž na predfiltráty  
Nádrž na premývaciu vodu  
Nádrže na tlakovú vodu  
Výmenníky tepla  
Vzdušníky  
Nádrž na soľanku  
Nádržka na premývaciu vodu

Príloha č. 1: VZ 131– Prízemie schéma č. 6

Zásobné nádrže na pôdu 1,2

Zásobné nádrže na filtrát 3,4

Zásobná nádrž na dextrózu

Zásobná nádrž na filtrát

Zásobná nádrž na predfiltráty

Odpadná nádrž

