

Rezumatul informațiilor din Notificarea privind utilizarea în condiții de izolare a două microorganisme modificate genetic: *Trichoderma reesei* - tulpina SCF07199 și *Saccharomyces cerevisiae* - tulpina SCY05234, folosite în producția etanolului celulozic în România.

I. Informații generale

1. Detalii cu privire la notificare

- a. Numărul notificării: **Nr.2 din data de 28.12.2021**
- b. Data primirii notificării: **25.10.2021**
- c. Titlul proiectului: **Notificare pentru obținerea autorizației de utilizare în condiții de izolare a două microorganisme modificate genetic: *Trichoderma reesei* - tulpina SCF07199 și *Saccharomyces cerevisiae* - tulpina SCY05234, pentru a fi folosite în producția etanolului celulozic (bioetanol) în România.**
- d. Scopul utilizării controlate: **utilizare în condiții de izolare a două microorganisme modificate genetic: *Trichoderma reesei* și *Saccharomyces cerevisiae* în procesul de producție a etanolului celulozic (bioetanol) în România.**
- e. Perioada propusă pentru utilizarea în condiții de izolare: **10 ani**

2. Numele și adresa utilizatorului

Notificator: **S.C. CLARIANT PRODUCTS RO S.R.L**

Adresă notificatorului: **Str. Londra, nr. 34, Corp A, camera nr. 6, etaj, sector 1, 011764, București, România**

3. Clasa de utilizare supusă activității de inspecție și control

Cele două microorganisme modificate genetic (*Trichoderma reesei* - tulpina SCF07199 și *Saccharomyces cerevisiae* - tulpina SCY05234) sunt clasificate

ca aparținând clasei 1 de risc (activitatea care implică utilizarea acestora, este raportată la nivelul 1 de biosecuritate). Activitățile propuse ce implică utilizarea celor două microorganisme modificate genetic în cadrul fabricii de producție a etanolului celulozic Clariant Products RO de la Podari, sunt clasificate ca aparținând clasei 1 de risc, ie. activități care nu prezintă sau prezintă riscuri neglijabile, adică activități pentru care este adecvat nivelul 1 de izolare pentru protecția sănătății umane și a mediului, conform OUG 44/2007.

4. Informații referitoare la microorganismul modificat genetic:

1. Denumire științifică:

Microorganismul modificat genetic 1: *Trichoderma reesei* (mucegai)

Microorganismul modificat genetic 2: *Saccharomyces cerevisiae* (drojdie)

2. Încadrare taxonomică:

Microorganismul modificat genetic 1: *Trichoderma reesei*

Domeniu: Eukaryota

Regnul: Fungi

Subregnul: Dikarya

Încrângătura: Ascomycota

Subîncrângătura: Peziziomycotina

Clasa: Sordariomycetes

Subclasa: Hypocreomycetidae

Ordinul: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Genul: Hypocrea

Specia: *Trichoderma reesei* (Anamorf)

Microorganismul modificat genetic 2: *Saccharomyces cerevisiae*

Domeniu: Eucaryota

Regnul: Fungi

Subregnul: Dikarya

Încrângătură: Ascomycota

Subîncrângătură: Saccharomycotina

Clasa: Saccharomycetes
Ordin: Saccharomycetales
Familia: Saccharomycetaceae
Genul: Saccharomyces
Specia: *Saccharomyces cerevisiae* (Teleomorph)

3. Alte denumiri (denumire comună, denumirea tulpinii etc.)

Microorganismul modificat genetic 1: *Trichoderma reesei*
Nu există.

Microorganismul modificat genetic 2: *Saccharomyces cerevisiae*
Drojdia brutarului, drojdia berarului, drojdia budincii

4. Descrierea tehnicilor de identificare și de detecție

Pentru ambele microorganisme modificate genetic utilizate in procesul de hidroliză enzimatică și fermentație, există tehnici stabilite de identificare și detecție.

În cazul tulpinii de *Trichoderma reesei* modificat genetic, identificarea poate fi realizată astfel:

(1) identificarea microbiologică: o probă microbiologică este însămânțată pe mediu de selecție, cu adaos de agar. După o perioadă de incubare predefinită, doar coloniile având o morfologie specifică, pot fi identificate ca fiind *Trichoderma reesei* modificat genetic; (2) identificare genetică: folosind metode bazate pe tehnica PCR, pentru identificarea de ADN specific microroganismului modificat genetic.

Pentru identificarea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* modificat genetic, diferite tehnici pot fi folosite: (1) identificarea microbiologică: o probă este însămânțată pe mediu de selecție, cu adaos de agar. După o perioadă de 24-36 de ore de incubare, doar coloniile având o dimensiune specifică, pot fi identificate ca fiind *Saccharomyces cerevisiae* modificat genetic; (2) identificare genetică: folosind metode bazate pe tehnica PCR pentru identificarea de ADN specific microorganismului modificat genetic.

5. Informații privind modificarea genetică:

Toate modificările realizate asupra tulpinilor au fost efectuate de către specialiști în biologie moleculară într-un laborator specializat, acreditat și certificat conform legislației specifice din Germania.

a) metode utilizate pentru transformarea genetică

Transformarea tulpinii de *Trichoderma reesei*:

Celulele tulpinii receptoare au fost expuse la enzime ce degradează peretele celular pentru a obține protoplaști. Acești protoplaști sunt incubati cu ADN-ul de interes (ie. rezultat din amplificarea PCR). Protoplaștii transformați sunt apoi trecuți pe placi cu mediu de selecție și incubati până ce coloniile devin vizibile.

Transformarea tulpinii de *Saccharomyces cerevisiae*:

Celulele de *Saccharomyces cerevisiae* sunt cultivate și apoi incubate cu polietilen glicol, acetat de Litiu și fragmentul liniar de vector. Celulele sunt apoi expuse la o temperatură ridicată (șoc termic) și apoi sunt lăsate pentru regenerare și exprimarea transformării. Celulele transformate sunt trecute pe placi cu mediu de selecție și incubate până ce coloniile devin vizibile.

b) metode utilizate la formarea și introducerea insertului (inserturilor) în organismul receptor sau la eliminarea unei secvențe

Tulpina gazdă de *Trichoderma reesei* a fost obținută prin mutagenză clasică. Aceasta a fost apoi transformată prin expunerea celulelor la enzime ce degradează peretele celular pentru a obține protoplaști. Celulele obținute numite protoplaști sunt incubate cu ADN-ul de interes (ie. rezultat din amplificarea PCR). Protoplaștii transformați sunt apoi trecuți pe placi cu mediu de selecție și incubati până ce coloniile devin vizibile.

Mai mulți vectori de expresie, purtători ai mai multor gene, au fost integrați în genomul diploid a tulpinii gazdă de *Saccharomyces cerevisiae* prin expunerea celulelor la polietilen glicol, acetat de Litiu și fragmentul liniar de vector. Celulele sunt apoi expuse la o temperatură ridicată (șoc termic) și apoi sunt lăsate pentru regenerare și exprimarea transformării. Celulele transformate sunt trecute pe placi cu mediu de selecție și incubate până ce coloniile devin vizibile.

c) descrierea construcției insertului și/sau a vectorului

Trichoderma reesei modificat genetic:

Insertul și/sau vectorul conține informația genetică pentru producerea de celulaze și hemicelulaze, ie. oxidaze și hidrolaze glicozidice. Aceste enzime permit descompunerea materialul lignocelulozic, în condiții controlate.

Saccharomyces cerevisiae modificat genetic:

Insertul și/sau vectorul conține informație genetică pentru producerea de xilozo-izomerază, o arabinoz-izomerază și o epimerază. Această modificare permite tulpinii să convertească zaharuri monomere C5 și C6 precum glucoză, xiloză și arabinoză în etanol, în condiții controlate.

d) descrierea trăsăturii (trăsăturilor) genetice sau a caracteristicilor fenotipice și mai ales a oricăror trăsături și caracteristici noi, care pot fi exprimate sau nu mai sunt exprimate

Trichoderma reesei modificat genetic:

Tulpina modificată genetic *Trichoderma reesei* dobândește abilitatea de a produce enzime pentru degradarea materialului celulozic pre-tratat.

Saccharomyces cerevisiae modificat genetic

Tulpina modificată genetic *Saccharomyces cerevisiae* produce enzime ce facilitează fermentarea zaharurilor și convertirea acestora în etanol.

e) structura și cantitatea oricărui vector și/sau acid nucleic donor, rămas în construcția genetică finală a organismului modificat

Trichoderma reesei modificat genetic:

Vectorii conțin informația genetică pentru producția de celulaze și hemicelulaze, ie. oxidaze și hidrolaze glicozidice. Expresia secvenței inserate în *Trichoderma reesei* nu modifică patogenitatea tulpinii obținute, în comparație cu tulpina parentală și nu rezultă în producția de toxine. Astfel, microorganismul modificat genetic rezultat nu prezintă niciun pericol pentru oameni, animale, plante sau mediu.

Saccharomyces cerevisiae modificat genetic:

Vectorii conțin informația genetică, care codifica producerea de xilozo-izomerază, o arabinoz-izomerază și o epimerază. Tulpina modificată genetic, nu își modifică gradul de patogenitate și toxicitate față de tulpinaparentală. Producerea acestor izomeraze sau a altor proteine în *Saccharomyces cerevisiae* nu determină modificarea patogenității tulpinii și nu rezultă în producția de toxine. Microorganismul modificat genetic rezultat nu prezintă niciun pericol pentru oameni, animale, plante sau mediu.

f) descrierea tehnicilor de identificare și de detecție, inclusiv tehnici pentru identificarea și detecția secvenței și a vectorului inserate

Pentru ambele microorganisme modificate genetic utilizate în procesul de hidroliză enzimatică și fermentație, există tehnici stabilite de identificare și detecție.

În cazul tulpinii de *Trichoderma reesei* modificat genetic, identificarea poate fi realizată astfel:

(1) identificarea microbiologică: o probă microbiologică este însămânțată pe mediu de selecție, cu adaos de agar. După o perioadă de incubare predefinită, doar coloniile având o morfologie specifică, pot fi identificate ca fiind *Trichoderma reesei* modificat genetic; (2) identificare genetică: folosind metode bazate pe tehnica PCR, pentru identificarea de ADN specific microroganismului modificat genetic.

Pentru identificarea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* modificat genetic, diferite tehnici pot fi folosite: (1) identificarea microbiologică: o probă este însămânțată pe mediu de selecție, cu adaos de agar. După o perioadă de 24-36 de ore de incubare, doar coloniile având o dimensiune specifică, pot fi identificate ca fiind *Saccharomyces cerevisiae* modificat genetic; (2) identificare genetică: folosind metode bazate pe tehnica PCR pentru identificarea de ADN specific microorganismului modificat genetic.

g) istoricul introducerilor sau utilizărilor anterioare ale microorganismului modificat genetic

Producția industrială de preparate enzimatiche obținute cu ajutorul *Trichoderma reesei* au o istorie lungă de utilizare sigură în multe industrii precum, producția amidonului, procesarea furajelor, fermentația alcoolică din cereale, obținerea malțului și fabricarea berii, obținerea de sucuri din fructe și legume, în industria hârtiei și a textilelor.

Drojdia modificată genetic necesară procesului de fermentație (*Saccharomyces cerevisiae*) produce enzime ce facilitează fermentația zaharurilor și transformarea acestora în etanol. *Saccharomyces cerevisiae* are o istorie îndelungată de utilizare în industria procesării alimentelor. Cunoscută și sub denumirea de “drojdia brutarului sau drojdia berarului”, acest microorganism este folosit de secole pentru dospitul pâinii și ca agent de fermentație în obținerea băuturilor alcoolice.

În procesul de producție a bioetanolului, pentru degradarea celulozei și hemicelulozei în zaharuri fermentescibile, sunt folosite enzimele produse de *Trichoderma reesei*. *Trichoderma reesei* modificată genetic facilitează

transformarea celulozei (și/sau a hemicelulozei) din biomasă în zaharuri (glucoză, xiloză și arabinoză).

Ambele microorganisme modificate genetic folosite în procesul de producție a bioetanolului celulozic au o istorie îndelungată de utilizare sigură și vor fi folosite doar în condiții izolate și controlate, în instalații închise. Mai mult, ambele microorganisme modificate genetic au fost folosite și testate în cadrul fabricii demonstrative de producere a bioetanolului Clariant din Germania.

O notificare similară, împreună cu un dosar tehnic, au fost transmise guvernului din Bavaria Superioară (Germania) de către compania Clariant pentru autorizarea utilizării în condiții de izolare a acelorași două microorganisme modificate genetic, clasificate nivel de siguranță 1, pentru a fi utilizate la fabrica demonstrativă de producere a etanolului celulozic Sunliquid®. În fabrica din Straubing, Germania, sunt utilizate aceleași procese și microorganisme precum cele care vor fi folosite în fabrica Clariant din Podari.

O notificare similară, împreună cu un dosar tehnic, au fost depuse la Agenția Națională pentru Protecția Mediului (ANPM) de către compania Clariant, pentru autorizarea utilizării în condiții de izolare a două microorganisme modificate genetic, clasificate nivel de biosecuritate 1, pentru a fi utilizate în fabrica de producție a etanolului celulozic (bioetanol) Clariant Products RO din Podari. A fost emisă Autorizația cu numărul 1/30.06.2021 pentru utilizarea în condiții de izolare a microorganismelor modificate genetic *Trichoderma reesei* și *Saccharomyces cerevisiae* în producția industrială de etanol celulozic (bioetanol). În cadrul fabricii de producție a bioetanolului celulozic de la Podari, a fost autorizată folosirea în condiții de izolare a două tulpini modificate genetic - *Trichoderma reesei* SCF07603 și *Saccharomyces cerevisiae* SCY01127.

h) considerații privind sănătatea umană și animală, precum și sănătatea plantelor

Trichoderma reesei modificat genetic:

În baza caracterizării microorganismului modificat genetic, clasificarea acesteia în grupa 1 de risc și având în vedere informațiile științifice și experiența acumulată în utilizarea *Trichoderma reesei* în diferite tipuri de procese industriale, microorganismul modificat genetic rezultat nu are capacitatea de a produce boli sau efecte adverse asupra sănătății oamenilor, animalelor sau a plantelor. Microorganismul modificat genetic și microorganismul parental nu are și nu determină efecte potențial nocive prin provocarea unor maladii la om, animale sau

plante. Nu există proprietăți nocive asociate microorganismului receptor sau materialului genetic inserat.

Saccharomyces cerevisiae modificat genetic:

În baza caracterizării microorganismului modificat genetic (drojdia), clasificarea acestuia în grupa 1 de risc și având în vedere informațiile științifice și experiență acumulată în utilizarea *Saccharomyces cerevisiae* în diferite tipuri de procese industriale, microorganismul modificat genetic rezultat nu are capacitatea de a determina boli sau efecte adverse asupra sănătății oamenilor, animalelor sau plantelor. Microorganismul modificat genetic și microorganismul parental (deja autorizat pentru a fi utilizat în România) nu au și nu determină efecte potențial nocive prin provocarea unor maladii la om, animale sau plante. Nu există caracteristici nocive asociate microorganismului receptor, vectorului utilizat sau materialului genetic inserat.

Ambele microorganisme modificate genetic (*Trichoderma reesei* și *Saccharomyces cerevisiae*) vor fi inactivate prin tratament termic (expunere la temperaturi înalte).

i) compararea microorganismului modificat cu organismul donor, cu organismul receptor sau (când este cazul) cu organismul parental, în ceea ce privește patogenitatea

Trichoderma reesei modificat genetic:

Modificarea genetică nu determină producția de compuși toxici, nu rezultă în dobândirea de factori de patogenitate sau nu determină creșterea capacității de supraviețuire în natură a tulpinii obținute. Se poate concluziona că, tulpina de *Trichoderma reesei* folosită este identică cu tulpina parentală în privința patogenității.

Saccharomyces cerevisiae modificat genetic:

Niciunul dintre elementele genetice transferate nu este implicat în mecanisme de patogenitate sau producere de toxine în organismele de origine. Se poate concluziona că, tulpina de *Saccharomyces cerevisiae* folosită este identică cu tulpina parentală în privința patogenității.

III. Informații cu privire la utilizarea în condiții de izolare

1. Scopul utilizării controlate, inclusiv rezultatele anticipate

Procesul tehnologic pentru producerea etanolului celulozic (bioetanol) este unul biochimic, în care sunt utilizate resturile provenite din agricultură (paie), după procesarea acestora. În cadrul procesului, are loc extracția zaharurilor din materialul celulozic și/sau hemicelulozic degradat și transformarea acestora în etanol, prin procesul de fermentație.

În cadrul procesului de producție, microorganismul folosit pentru producția de enzime ce facilitează extracția zaharurilor fermentescibile din materialul celulozic și/sau hemicelulozic degradat, este o tulpina de mucegai (fungi) modificată genetic (*Trichoderma reesei*). *Trichoderma reesei* modificată genetic facilitează transformarea celulozei (și/sau a hemicelulozei) din biomasă în zaharuri (glucoză, xiloză și arabinoză).

Producția industrială de preparate enzimatiche obținute cu ajutorul *Trichoderma reesei* au o istorie lungă de utilizare sigură în multe industrii precum producția amidonului, procesarea furajelor, fermentația alcoolică din cereale, obținerea malțului și fabricarea berii, obținerea de sucuri din fructe și legume, în industria hârtiei și a textilelor.

Drojdia modificată genetic necesară în procesul de fermentație (*Saccharomyces cerevisiae*) produce enzime ce facilitează fermentația zaharurilor și transformarea acestora în etanol. *Saccharomyces cerevisiae* are o istorie îndelungată de utilizare în industria procesării alimentelor și este cunoscută sub denumirea de “drojdia brutarului sau drojdia berarului”.

2. Locația utilizării în condiții de izolare

Fabrica comercială de producție a bioetanolului (etanol celulozic) va fi amplasată în Comuna Podari, satul Podari, județul Dolj.

Utilizarea în condiții de izolare a microorganismelor, va fi limitată următoarelor zone din cadrul fabricii de producție a etanolului celulozic:

Laboratorul de microbiologie

Unitatea de producție a enzimelor / drojdilor

Platforma de hidroliză enzimatică

Platforma de fermentație etanolică

3. Măsurile de limitare a riscurilor potențiale, măsurile de control și de monitorizare a introducerii prevăzute.

Ambele microorganisme modificate genetic folosite în procesul de producție a bioetanolului celulozic au o istorie îndelungată de utilizare sigură și vor fi folosite doar în condiții izolate și controlate, în instalații închise.

Ambele microorganisme modificate folosite în procesul de producție a bioetanolului celulozic au fost dovedite a fi potrivite pentru utilizare sigură și vor fi utilizate în condiții de izolare. Niciuna dintre caracteristicile fenotipice exprimate nu sunt implicate în mecanisme de patogenitate, producția de toxine sau transfer de gene.

În vederea asigurării că activitățile ce implică utilizarea celor două microorganisme modificate genetic au loc în condiții controlate și reduc orice risc, vor fi implementate și respectate măsuri și planuri clare de biosecuritate pentru a reduce la minimum riscul oricărei expuneri a zonei de lucru și/sau a mediului înconjurător.

Metodele ce vor fi implementate pentru reducerea oricărui risc sunt legate de: configurarea și organizarea procesului de producție, echipamentul de lucru folosit, elaborarea unor proceduri de lucru, instruirea personalului, echiparea personalului cu echipament individual de protecție (EIP), implementarea unui plan de control riguros a parametrilor procesului de producție și instruirea întregului personal din fabrică. Procesul de producție este automatizat, supervizat și controlat prin prezența permanentă a unui angajat specializat.

4. Probabilitatea producerii efectelor potențial nocive

Din cauza naturii activităților ce implică utilizarea celor două microorganisme modificate genetic, utilizarea acestora în condiții izolate, configurarea și organizarea automatizată a procesului de producție (folosirea unor echipamente de ultimă generație, sisteme automatizate de control al proceselor), implementarea unor proceduri de lucru și măsuri de biosecuritate și istoria îndelungată de utilizare sigură a microorganismelor parentale, probabilitatea ca cele două microorganisme modificate genetic să producă efecte negative este foarte redusă.