

**Rezumatul informațiilor din Notificarea privind utilizarea în condiții de izolare a două tulpini de *Trichoderma reesei* modificate genetic, folosite în producția etanolului celulozic în România.**

## **I. Informații generale**

### **1. Detalii cu privire la notificare**

a. Numărul notificării: /xx.04.2022

b. Data primirii notificării:

c. Titlul proiectului: **Notificare pentru obținerea autorizației de utilizare în condiții de izolare a două tulpini de *Tichoderma reesei* modificate genetic, pentru a fi folosite în producția etanolului celulozic (bioetanol) în România.**

d. Scopul utilizării controlate: **utilizare în condiții de izolare a două tulpini *Trichoderma reesei* modificate genetic 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**

Microorganismul modificat genetic *Trichoderma reesei* este clasificat ca aparținând clasei 1 de risc (activitatea care implică utilizarea acestora, este raportată la nivelul 1 de biosecuritate). Activitățile propuse ce implică utilizarea microorganismelor 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* (mușegai)-tulpina SCF010833

Microorganismul modificat genetic 2: *Trichoderma reesei* (mușegai)-tulpina SCF010840

##### **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 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)

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

Microorganismul modificat genetic 1 și 2: *Trichoderma reesei* (tulpina SCF010833 și SCF010840)

Nu există.

### **4. Descrierea tehnicilor de identificare și de detecție**

Pentru tulpinile de *Trichoderma reesei* modificate genetic, utilizate în procesul de producție industrială de bioetanol, în fazele de multiplicare, producție de enzime și hidroliză enzimatică, există tehnici stabilite de identificare și detecție.

Identificarea poate fi realizată astfel: (1) identificarea microbiologică: o probă microbiologică este inoculată 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 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 transferați pe mediu de selecție solid și incubati 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 protoplaste sunt incubate cu ADN-ul de interes (ie. rezultat din amplificarea PCR). Protoplaștii transformați sunt apoi transferați pe mediu de selecție solid și incubati 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. hidrolaze glicozidice și oxidoreductaze. Aceste enzime permit descompunerea materialului lignocelulozic, 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.

### **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. hidrolaze glicozidice și oxidoreductaze. 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.

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

Pentru tulpinile de *Trichoderma reesei* modificate genetic care vor fi utilizate în procesul de producție industrială de bioetanol, în fazele de multiplicare, producție de enzime și hidroliză enzimatică, 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 inoculată 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.

### **g) istoricul introducerilor sau utilizărilor anterioare ale microorganismului modificat genetic**

Producția industrială de preparate enzimatică 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, industria hârtiei și a textilelor.

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) în zaharuri (glucoză, xiloză și arabinoză).

Microorganismele parentale corespunzătoare celor modificate genetic, folosite în procesul de producție a bioetanolului celulozic, au o istorie îndelungată de utilizare sigură, iar cele modificate genetic vor fi folosite doar în condiții izolate și controlate, în instalații închise. Mai mult, microorganismele modificate genetic au fost folosite și testate în cadrul fabricii demonstrative de producere a bioetanolului Clariant din Germania.

Două notificări similare, 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. Autoritatea Competentă a emis Autorizația cu numărul 1/30.06.2021 și Autorizația nr. 1/10.02.2022, 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, este în prezent autorizată folosirea în condiții de izolare a patru tulpini modificate genetic - *Trichoderma reesei* SCF07603/SCF07199 și *Saccharomyces cerevisiae* SCY01127/SCY05234.

#### **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 au 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.

Microorganismele modificate genetic (*Trichoderma reesei*) 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.

### **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 și procesate resturile provenite din agricultură (paie). În cadrul procesului, are loc extracția zaharurilor simple din materialul celulozic

și/sau hemicelulozic 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) în zaharuri simple (glucoză, xiloză și arabinoză).

Producția industrială de preparate enzimatică 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, industria hârtiei și a textilelor.

## **2. Locația utilizării în condiții de izolare**

Fabrica de producție a bioetanolului (etanol celulozic) se află 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.**

Microorganismele parentale corespunzătoare celor modificate genetic, folosite în procesul de producție a bioetanolului celulozic, au o istorie îndelungată de utilizare sigură, iar cele modificate genetic vor fi folosite doar în condiții izolate și controlate, în instalații închise.

Microorganismele modificate genetic, 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 microorganismelor 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**

Pe baza evaluării naturii activităților ce implică utilizarea microorganismelor modificate genetic ce fac obiectul acestui dosar tehnic, și anume: 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, precum și a datelor furnizate în istoria îndelungată de utilizare sigură a microorganismelor parentale, rezultă că probabilitatea ca aceste microorganisme modificate genetic, să producă efecte negative este foarte redusă.