

ЕКО-БИОТЕХНОЛОГИИ

АКАДЕМИЧЕН КУРС

ГЕНЕТИЧНО МОДИФИЦИРАНИ МИКРООРГАНИЗМИ (ГММ) – ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ

ЦИРД БИОИНТЕХ ООД

доц. д-р. АННА КУЮМДЖИЕВА
гл. ас. д-р. ВЕНЦИСЛАВА ПЕТРОВА

РО 3: ГММ В ПРОИЗВОДСТВОТО И БЕЗОПАСНОСТТА НА ХРАНИТЕ

1. Въведение

Използването на технологии за генетична модификация в световното селско стопанство и прибавянето в храни и фуражи е ограничено поради активната анти-ГМ политика на “*Green Peace*”, “*Friend of the Earth*” и други заинтересовани групи. В резултат на тази активност, голямо количество продукти, съдържащи ГМО и предназначени за хуманна консумация са изтеглени от ЕС. Това широко разпространено анти-ГМО отношение е насочено и към употребата на генетично модифицирани компоненти в животновъдството. Чрез въвеждането на генетично модифицирани семена на маслодобивни и житни култури в храненето на животните, Европейската комисия предлага през 2001 год. законови промени, с които да започне отново въвеждането на ГМО-базираните технологии. Ако тази политика успее, това ще донесе важни икономически последици за икономиката на ЕО. Следователно изясняването на въпросите, свързани с научните разногласия по сигурността на ГММ са от изключителна важност.

2. Концепция за безопасност на генетично модифицираните храни

Безопасността и оценката на риска при храните, включително тези получени чрез използване на ГМО, се отчитат чрез оценяването на опасността.

За да намерят решение на проблема, *WHO* (Световната здравна организация; World Health Organization) и *FAO* (Организация по храните и земеделието; Food and Agriculture Organization) дефинират за дадени страни-членки на *WHO* някои определения за природата и безопасността на генетично модифицираните храни.

Предложени са следните дефиниции:

- “**Генетично модифицирани микроорганизми (ГММ)**” – микроорганизми (бактерии, дрожди или филаментозни гъби), при които генетичния материал (ДНК) е бил модифициран чрез неестествен метод за размножаване и/или естествена рекомбинация. Тази технология често се нарича “модерна биотехнология”, “генна технология”, “рекомбинантна ДНК технология” или “генетично инженерство”.

- “Модерна биотехнология” означава прилагането на директен пренос в клетките или органелите на нуклеинова киселина, включително рекомбинантна, чрез *in vitro* техники и клетъчно сливане (сливане на протопласти и хибридизация).

По отношение на храните и хранителните компоненти, произведени чрез средствата на ГММ, е предложена следната класификация:

- Продукти, състоящи се или съдържащи живи ГММ.
- Продукти, състоящи се или съдържащи неживи ГММ.
- Продукти, получени чрез ферментационни процеси с ГММ. След пост-ферментационната обработка, ГММ се отстраняват.

3. Процес за оценка на безопасността на храните

3.1. Принцип

Микробиалните ферментационни технологии представляват разумно средство за получаване на храни с висока хранителна стойност и безвредност, което освен това е доказано исторически. Микробиалните ферментации представляват около $\frac{1}{4}$ от общото производство на храни. Те включват хляб, кисели теста, кисело мляко и подквасена сметана, сирене, туршии, ферментирани меса, оцет, вино и бира. Навлизането на подходите на модерната биотехнология изисква създаването на нови критерии за безопасност на храните.

Основните принципи за оценка на безопасността за влагане на ГММ в храните, в съгласие с приетите критерии в тази насока, са свързани с природата и приложението на микроорганизми в производството на тези продукти. Тези принципи са създадени от *FAO/WHO*; *OECD*; *WHO/ILSI*; ЕО посредством споразумения, свързани с оценка на безопасността на нови храни, включително ГММ и препоръки за използването им. Те целят осъществяването на интегриран, етапен подход и изучаване на всеки отделен случай. Това е свързано със създаване на критерии за оценка на безопасността и изработване на схема за решение при определянето на обхват за тестване, необходимо за всеки специфичен случай. Според наредбата на ЕО 1829/2003, навлизането на ГМ храни и фуражи на пазара може да бъде позволено след определена научна оценка на всяка опасност, която те могат да създадат за здравето на човека и животните, както и за околната среда (Директива 2001/18/ЕО).

3.2. Специфични фактори

Разработката на процедура за оценка на безопасността на храните, получени чрез ГММ се основава на следните важни принципи:

- Отчитане на здравните аспекти на човешката популация, включително хората в риск (имуно-компрометираните, старите хора и децата).
- Използването на научни данни като основа за оценка на риска и приложението на методите на добрите практики. Повторен преглед на оценката на риска в светлината на новополучените данни.
- Детайлно охарактеризиране на процедурата за генетично модифициране – т.е описание на феномените делеция/инсерция на ДНК секвенции, реципиентен микроорганизъм, основен донорен организъм, вектори, включени в конструирането на ГММ, конструкта, получените ГММ.

Тези индикатори трябва да се прилагат, като се отчетат няколко важни причини за нуждата от оценка на риска от производството и консумацията на храните, получени чрез ГММ. Индикаторите отчитат както следва:

- Механизъм за излагане на хората на действието на храните или на самия ГММ.
- Информация за възможен вторичен ефект от генната експресия, метаболитните пътища в гостоприемника и разграждането на ДНК .
- Пълна характеристика на използваната хранителна среда (макро- и микро-хранителни елементи) за култивиране на микроорганизмите и образуването на странични продукти; ендогенни токсини, алергени и физиологично активни вещества.
- Охарактеризиране на присъщите разлики между микроорганизмите и растенията, както и за въздействието на хранителната матрица върху ГММ.

3.3. Допълнителни елементи

Следните допълнителни елементи трябва да се вземат предвид при оценка на безопасността:

- Методологични особености – техники, използвани за генетична модификация; охарактеризиране и проверка на очакваната експресия на протеина, продукт на новата ДНК; идентифициране и характеризиране на щамовете (реципиент, донор, самия ГММ)

- Щамът-гостоприемник – естествено местообитание; история на използване от хората; патогенен потенциал; оценка на безопасността и на хранителната стойност (възможна токсичност и хранителни характеристики)
- Събития в околната среда – трансфер на гени и генетична стабилност
- ГММ производни храни – състав на храната, съдържаща ГММ; въздействие на обработката, сваряването и съхранението
- ГММ – връзка между ГММ, гастроинтестиналната флора и бозайника-гостоприемник; въздействие върху имунната ситема.

4. Генетично модифицирани храни и потенциален риск за човека

4.1. Приложение на генетично модифицирани храни и риск за човешкото здраве

Оценката на безопасността на храните, получени с помощта на ГММ се осъществява основно чрез следните изследвания :

- Директно въздействие върху здравето (токсичност).
- Способност да предизвикват алергични реакции (алергенни свойства).
- Определяне на специфични компоненти от микроорганизма, предизвикващи хранителни и токсични въздействия.
- Оценка на стабилността на включения ген.
- Определяне на хранителните последствия, свързани с генетичната модификация.
- Неочаквани последствия, в резултат на генния трансфер .

4.2. Подходи при оценката на риска

Основните последици върху човешкото здраве от използването на генетично модифицираните храни могат да се обобщат в три основни насоки: провокиране на алергични реакции (алергенни свойства), трансфер на гени, външно кръстосване и сравнителни подходи.

- **Алергенни свойства:** Традиционно разработените храни по принцип не са тествани за елергенни свойства. Основна грижа при ГММ храни е да се докаже, че белтъчния продукт на трансферирания ген не е алерген. Протоколи за изследване на ГММ храни са разработени от *FAO* и *WHO*. Алергенен ефект за ГММ храни, които се намират в момента на пазара не е открит.

- **Трансфер на гени.** Възможността за генен трансфер от ГМ храни към клетките на човешкото тяло или към микроорганизмите, намиращи се в гастроинтестиналния тракт, е сериозен проблем, ако пренесения генетичен материал неблагоприятно повлиява здравето на човек. Това е свързано с трансфер на гени за антибиотична резистентност, които често се използват за конструиране на ГММ, споменати по-горе. Поради тази причина, прилагането на технологии, които не използват гени за резистентност към антибиотици се окуражава, независимо че вероятността за такъв пренос е много ниска.
- Илюстрация на такова събитие е следния пример. Антибиотичната резистентност се разпространява широко след масовата употреба на съответните антибиотици в медицината и селското стопанство. Все пак имаединомислие, че при такъв рядък пренос при погълната растителна ДНК към интестиналната микрофлора не оказва значителен ефект върху човешкото здраве. Но генът за резистентност към ампицилина *bla* – TEM срещащ се в някои варианти на трансгенна царевица вече е открит в щамове на *E. coli* в румена на животни и около 10 – 50 % от щамове на човешкия чревен тракт вече са резистентни към ампицилин. Ако това събитие наистина протече и човешки патогени добият антибиотична резистентност, посредством трансфер на гени, е възможно чрез поглъщането на трансгенни материали да се получи разпространение на тази опасност.
- **Външно кръстосване.** Този термин се дефинира, като трансфер на гени от ГМ растения към конвенционални култури или близки видове. Това може да се случи при смесването на култури, получени от конвенционални семена с такива – от ГМ, като непряк ефект върху сигурността и безопасността на храните. Съществуват някои примери показващи реалността на подобен риск: например, следи от царевичен тип, използван само за фуражни нужди се появяват в царевични продукти за консумация от хората в САЩ. Поради тази причина, някои страни (Аржентина, Канада, Южна Африка, САЩ, ЕС) прилагат мерки за намаляване на смесването, включително ясното разделяне на полетата, където двата типа (ГМ и традиционния) се развиват. Тези мерки се съблюдават и при култивирането на царевица, соя, рапица, цикория, тиква, картофи. Към момента, всички ГМ култури, които са достъпни на международния пазар са създадени чрез използване на гени от микроорганизми. Те се характеризират чрез едно от трите основни свойства;

устойчивост към вреди от насекоми; устойчивост към вирусни инфекции и толерантност към някои хербициди.

4.3. Аспекти на безопасност, характерни за ГММ

Рекомбинантните ДНК техники, използвани за модифициране на растенията са подобни на тези, използвани за създаване на генетично модифицирани микроорганизми. Както вече беше споменато, някои генетични характеристики на микроорганизмите са от голямо значение и трябва да се отчетат при оценка на безопасността. Микроорганизмите, които се използват за производство на храни са Грам + и – бактерии, дрожди и филаментозни гъби. Техният геном и рекомбинантни технологии имат различия, въпреки че се използват някои общи техники.

Техниката за хомоложна рекомбинация при бактериите е с основно предимство, тъй като интеграционно място може да се проектира при дизайна на експеримента, а нежеланата ДНК може лесно да бъде отстранена. Така че, хомоложна генна система за селекция и поддържане на включената ДНК може да се създаде заедно с развитието на подходящи селекционни методи, съвместими с изискването за безопасност на храните. Тези характеристики улесняват добрия контрол на процедурите за генетично модифициране.

Оценката на безопасността на ГММ се улеснява значително поради наличието на секвенционните данни за генома на някои бактерии и дрожди. Създаването на тази геномни секвенции за дадени микроорганизми е реална научна база за оценката на определена генна технология. Развитието на пост-геномна аналитична методология и технически схеми предоставят надеждна възможност за анализ на генната експресия на ниво – цял геном. Успехът на ДНК микро чиповия анализ позволява изследването на всички гени от генома чрез специфични сонди на нуклеинови киселини. По този начин, може да се установи наличие на индивидуални гени и генна експресия в различни щамове и условия. Напредъкът в протеомиката позволява белтъчните молекули, изолирани от цели клетки да бъдат разделени чрез дву-дименсионална гел електрофореза и да бъдат анализирани. По този начин може да се осъществи сравнение между щамове от различни местообитания. Посредством мас-спектрометрията, индивидуалните протеини могат да бъдат идентифицирани и така да се улесни намирането на връзка на отделните протеини със специфични гени. Микроорганизмите, използвани за получаване на хранителни продукти могат да се открият живи в крайния вариант и така могат да попаднат в консуматора. Това е причината, поради която

възможност за взаимодействие (пряко или непряко) между ГМ организмите и консуматора действително съществува. Следователно, от изключителна важност е да се докаже със сигурност, че микроорганизмите, използвани за получаване на хранителни продукти не са патогенни, токсигенни или алергенни и че генетичната модификация не променя техния статут на безопасност. В този смисъл, съдбата на консумираните ГММ и тяхното влияние върху гастроинтестиналния тракт и чревната микрофлора трябва да се вземе под внимание. Тук е важно да отбележим, че ефектът на ГММ трябва да се отчете и върху здравето на животните, имайки предвид влиянието му върху човека чрез храненето. Една от основните грижи е възможността за трансфер на модифицирани генни секвенции към чревните микроорганизми или клетките на гостоприемника. Дори рядкото откриване на фрагменти ДНК, с произход от храната не може да се пренебрегне и вероятното въздействие на тези гени, които нормално не са представени в диетата трябва внимателно да се оцени.

5. ГММ в производството на храни

Специфичните аспекти за оценка на хранителната безопасност включват основно приложение на ГММ за производство на храни. Необходимо е да се дискутира потенциалният генен пренос между ГММ и други микроорганизми, случващ се в храните и гастроинтестиналния тракт. Също така да се преценяват безопасността на генетичните маркери, използвани при селекцията (напр. антимикробиални резистентни гени), както и възможното взаимодействие на ГММ с интестиналната микрофлора и имунния отговор. В този смисъл въз основа на научни методи използвани при конструирането на ГММ е направена оценка на актуалното състояние на знанията в тази област и предположение за размера на възможните рискове за здравето.

5.1. Техники за генетична модификация на микроорганизми

5.1.1. Класически методи

Класическите методи за геномна модификация на микроорганизмите се разделят на два типа:

- Селекция на мутации, възникнали спонтанно и индуцирани от различни физични и химични фактори на средата. Спонтанните мутации са последица от пренареждането на наследствената ДНК молекула поради заместване на един нуклеотид с друг, добавянето или делецията на един или повече нуклеотиди или други типове реформации. Голям брой от спонтанните мутанти възникват поради

движението на транспозонни елементи към нови места в двойно-верижната ДНК.

Такива елементи са типични за растения, животни и микроби.

- Обмен на ДНК между близкородствени организми. Този тип на генна модификация при микроорганизмите се състои във въвеждането на нова генетична информация чрез хромозомна или плазмидна ДНК. Това събитие настъпва, когато ДНК от хромозомата на донорния микроорганизъм се интегрира в ДНК на реципиентния. Тъй като са само-реплициращи се, плазмидите пренасят ДНК от донора в реципиента без интегриране в хромозомалната ДНК. По този начин, плазмидната ДНК може да бъде пренесена към доста различаващи се организми, в сравнение с донора. Движението на плазмида може лесно да бъде проследено поради маркера, който се съдържа в неговата молекула (напр. антибиотична резистентност). Три различни класически типа на генен трансфер са характерни за бактериите. Счита се, че те протичат в природата:
 - ДНК-свързана трансформация (ДНК се пренася като “гола” ДНК)
 - Трансдукция – преносът на ДНК се осъществява чрез вирус
 - Конюгация – ДНК се пренася по време на клетъчен контакт между донорните и реципиентните клетки.

5.1.2. Молекулярни техники

Съвременният молекулярно-технологичен напредък в методите за мутагенеза и пренос на гени, значително увеличава диапазона от микроорганизми, които са обект на ДНК пренос от неблизко-родствени организми. Бариерата на рода и царството вече не е непреодолимо обстоятелство.

Модерните методи, използвани при бактериите позволяват интегрирането на рекомбинантния конструкт в специфични места на хромозомата или плазмидите. Все пак, процедурите за генна модификация трябва да се оценяват по отношение на тяхната сигурност. По тази причина предмет на дискусия са следните особености: характеристиките на микроорганизма-гостоприемник по отношение на включения(те) ген(и); особености на вектора и конструкта; методите за ДНК пренос.

Когато бактериите се използват като микроорганизми-гостоприемници, процедурата за оценка на риска изисква наличие на данни за безопасна консумация на този микроорганизъм като храна или като хранителен компонент. Ако това изискване не е изпълнено, безопасността на гостоприемника трябва да се изследва и установи. При гостоприемник – еукариотна клетка се прилагат същите съображения. Внесеният(те) ген(и) може да бъде получен от същия микробиолаен вид или от еволюционно по-далечен

организъм. Инсерционният генен продукт трябва да има история на безопасна употреба в храните или неговата сигурност трябва да се докаже. Колкото по-къс е вмъкнатият ДНК фрагмент, толкова по-намалена/улеснена ще бъде процедурата за оценка на хранителната безопасност.

По отношение на характеристиките на вектора и конструкта – ако векторът се използва като част от генома на ГММ, цялата ДНК секвенция трябва да бъде охарактеризирана, включително репликони, промотори, селективни маркери, линкери, както и всяка друга част на ДНК. Векторът трябва да съдържа нуклеотидна последователност от микроорганизми с история на безопасна употреба в храните. Селективните маркери трябва да се изберат много строго и въз основа на безопасната употреба, като маркерите за антибиотикова резистентност трябва да се избягват. Ако все пак те се ползват, трябва да се приложат специфични методи за отделянето им от генома на ГММ (напр. секвенционно специфична рекомбинация). При еукариотите са създадени специфични клониращи вектори, като центромерни плазмиди, дрождеви изкуствени хромозоми, плазмиди, базирани на ‘килър’ фактори и др.

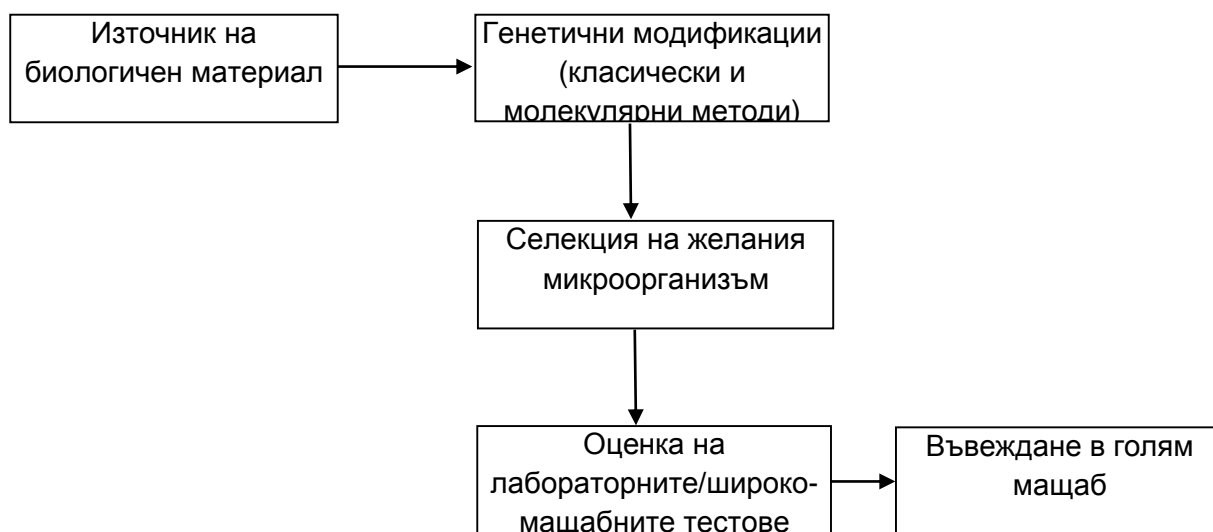
Когато говорим за ДНК пренос има изискване за използването на методи от физична, химична и биологична природа, които да минимизират големи генетични пренареждания в генома на гостоприемника. При използването на интегративни вектори, нуклеотидната последователност на фланкиращите региони на интегративното място в хромозомата трябва да бъде характеризирана. Тази информация е необходима за предвиждането на риска от използваните методи. При еукариотите, има сигурни методи за директно интегриране на *in vitro* модифицирани или създадени генни конструкти в специфични хромозомни места и за делецията на гени, използвани при някои видове. Въз основа на тези методи, са създадени трансгенни конструкти, които са много стабилни по време на вегетативното размножаване на клетките. Съществува и възможност за рекомбинация чрез мейтинг с близки щамове на собствената микрофлора. Когато генетичните особености на използвания щам не са добре познати, недостатъчната информация за възможните рекомбинантни събития прави невъзможно предсказването на механизма и интеграционното място на чуждите гени. По този начин, е възможно методологията, използвана за генетична манипулация на дрожди и филаментозни гъби да позволи интегрирането в променливи места, които да предизвикат появата на различни биотехнологични свойства и генетична нестабилност на ГММ.

5.1.3. Сравнение между класическите и молекулярните подходи

Термините “класически” и “молекулярни”, по отношение на методологията за генетична модификация на микроорганизми, както вече беше споменато, означават увеличение на тяхната генетична вариабилност. Този ефект се постига чрез използването на класически методи за спонтанно или мутагенно индуцирани вариации, чрез хибридизация или генен трансфер. Тези методи са неточни, непреки и по-малко мощни, в сравнение с молекулярните. Все пак няма съмнение, че не съществува концептуална разлика между генетичната модификация на микроорганизмите чрез класически или молекулярни техники, използвани за ДНК модифициране и генен трансфер.

Фиг. 1 показва генетичната модификация на микроорганизмите и пътя за въвеждане в околната среда. Тук, двата метода са унифицирани, тъй като няма значение дали класически или молекулярни техники са използвани в етапите на оценка в лабораторията, полето или при широко-машабното въвеждане в околната среда.

Фигура 1:



Съответните биологични принципи, които характеризират тази концепция са включени в докладите на EFSA:

- Основният фокус при вземането на решение за въвеждане в околната среда е продуктът, получен чрез гена модификация и селекция, а не самия процес.
- Характеризирането на продукта изисква информация за използвания процес, но природата на процеса не е достатъчен критерий за решението дали съответния продукт ще бъде повече или по-малко проследен.

- Реакцията на микроорганизмите, модифицирани чрез молекулни или класически методи се основават на едни и същи физични и биологични закони. Натрупаните знания за продуктите на класическите модификации могат да бъдат използвани при оценка на продуктите, получени чрез молекулните техники по отношение на относителната безопасност и оценката на риска.

5.2. Молекулни методи за контрол на генетично модифицираните храни

5.2.1. Методи за идентифициране на щамове микроорганизми

Таксономичният статус на микроорганизма-гостоприемник се счита за изключително важна характеристика по отношение на оценката на риска. Поради тази причина, микроорганизмите, които се използват за генетични манипулации, трябва да бъдат добре изучени таксономично чрез правилна и точна методология. Те трябва да са адекватно охарактеризирани от научна, производствена и безопасна гледна точка. В момента, най-точното средство за правилно определяне на таксономичния статут на микроорганизмите са техниката на ДНК/ДНК хибридизация и дефиниране на 16S рРНК секвенциите. Тези методи дават решаваща информация за таксономичния статут на изследваните микроорганизми. В момента на пазара съществува голямо ранообразие от стандартни физиологични/биохимични методи за фенотипна характеристика на микроорганизмите, които се използват широко. Важна характеристика в описанието на щама е информацията за патогенните му свойства.

След приложението на процедурата за генетична модификация, полученият ГММ щам трябва да отговаря на особеностите определящи безопасността на микроорганизмите-гостоприемници. Новият щам трябва да се охарактеризира чрез същите методи и точност, включително фенотипни и генотипни характеристики. Това прецизно сравнение между гостоприемника и ГММ може да се осъществи чрез използването на съществуващи молекулни техники: рестрикционен анализ, Случайно Амплифицирана Полиморфна ДНК (САПД), Полиморфизъм в Дължината на Амплифицираните Фрагменти (ПДАФ), белтъчен профил и др. Анализът може да се разшири и към геномно секвениране [12].

Други важни фактори, които трябва да се изучат по отношение на оценката на риска на ГММ са:

- ефектът на генетичната модификация върху свойствата на микроорганизма-гостоприемник:

- стабилността на генетичната система и функционални особености на генния конструктор.

Всички тези характеристики са важни по време на процеса на оценка на безопасността на продуктите, получени от ГММ и тяхното влияние върху околната среда.

Методите за идентификация на шамове-продуценти, контаминирани шамове или патогени са техники, прилагани както на генотипно така и на фенотипно ниво. Генотипните методи включват техники като секвенционен анализ на рДНК, базов състав на ДНК и ДНК/ДНК хибридизация.

ДНК секвенирането, особено *секвенционния анализ на рДНК* има за цел сравнителен анализ на рДНК последователности. Това се осъществява чрез директно секвениране на части от или почти целия регион на 16S или 23S рДНК молекулата чрез полимеризационна верижна реакция (ПВР) с помощта на подходящи праймери.

Съотношението на ДНК базите (Г + Ц моларен %) е класически генотипен метод, част от стандартното описание на бактериалните таксони. Наблюдаваното вариране е не повече от 3 % в рамките на вида и не повече от 10% в рамките на даден род. Сред бактериите Г + Ц съдържанието варира между 24 и 76%.

ДНК/ДНК хибридизацията се прилага за идентификация на буквално всички бактерии, както и на широк набор от дрожди и гъби.

По отношение на таксономичната разделителна способност на тези методи, рДНК секвенционният анализ и определянето на базовия състав на ДНК са приложими за идентифициране на родове и видове, докато ДНК/ДНК хибридизационната техника се използва само за охарактеризиране до ниво вид. Генотипните методи намират удачно приложение както при бактерии, така и при дрожди, и в известна по-ограничена степен при гъби (само рДНК секвенционния анализ).

Фенотипните молекулни методи включват снемане на 'отпечатыци' от клетъчните мастни киселини и електрофоретични профили на общ белтък. Тези методи се използват главно при идентификацията на бактерии и докато анализът на мастните киселини е приложим за идентифициране до ниво род и вид, електрофоретичният анализ се използва рутинно за видова идентификация.

5.2.2. Методи за типизиране

Въз основа на молекулярно биологичните ДНК техники, са разработени разнообразни типизиращи методи за разграничаване на отделни видове, както и на изолати от даден вид. Данните, получени от прилагането на тези методи, осигуряват ценна информация за разпространението и присъствието на микроорганизми, развалящи храните или за

патогенни такива, не само в тях, но също така и в околната среда. По този начин ДНК-базираните методи могат да се използват за епидемиологични цели и са полезни при разграничаването между едновременно случващите се, но независими инфекции, и епидемии, причинени от един единствен изолат. Този факт е от особена важност, тъй като може да облекчи прилагането на превантивни и хигиенни мерки.

Генотипните методи обикновено се категоризират в зависимост от техническите аспекти на прилагането им. В съответствие с този критерий могат да се изброят следните по-важни такива:

- ДНК секвениране;
- Анализ на рестрикционни ендонуклеазни профили на плазмидна и/или геномна ДНК (напр. Полиморфизъм в Дължината на Рестрикционните Фрагменти (ПДРФ), Пулсова Гел Електрофореза (ПГЕ));
- Техники на основата на сонди (методи на белязване);
- Техники на основата на ПВР (амплификационни методи като Случайно Амплифицирана Полиморфна ДНК (САПД) и Полиморфизъм в Дължината на Амплифицираните Фрагменти (ПДАФ)).

Полиморфизъм в Дължината на Рестрикционните Фрагменти (ПДРФ). Този метод се основава на природната вариабилност на ДНК молекулите (хромозомна, плазмидна и митохондриална ДНК в еукариотите) по отношение на позицията и броя на 6- до 8-мерни последователности по дължината на тази молекула. Срязването на такава ДНК с рестрикционна ендонуклеаза води до образуване на фрагменти с различна дължина, които могат да се разделят с Агарозна Гел Електрофореза (АГЕ) и да се визуализират директно след оцветяване с етидиев бромид (в случай на ограничен брой фрагменти, например по-малко от 50) или след хибридизация със специфично белязана сонда.

Пулсовата Гел Електрофореза (ПГЕ) е техника, използвана за разделяне на големи ДНК молекули, като хромозоми. Тя може да се прилага също така и за разделяне на големи ДНК фрагменти, получени след срязване с т.н. рядко режещи рестрикционни ендонуклеази, които генерират ограничен брой фрагменти. Поради своята висока степен на полиморфизъм хромозомите/големите фрагменти ДНК са много полезни за видова идентификация.

Техники на основата на сонди (методи на белязване). Тези методи се отнасят до включване в/ или прикрепяне към края на дадена нуклеинова киселина на сонда. Съществуват различни варианти на основния метод в зависимост от разнообразни

фактори. По отношение на типа нуклеинова киселина, нейния размер и количество могат да се изброят 4 метода на белязване: 3' и 5' крайно белязване, случайно белязване чрез никотранслация и белязване със случайни праймери. По отношение на бележещата молекула, т.е. нейната природа, могат да се прилагат както радиоактивни, така и нерадиоактивни методи. При радиоактивното белязване се детектират радиоизотопи чрез автордиография, докато нерадиоактивното белязване използва флуоресценция, хемолуминесценция или ензимни реакции.

Техники на основата на ПВР (амплификационни методи). При тези методи *in vitro* ензимно амплифициране на нуклеотидна последователност се използва за целите на видовата идентификация. Както основният метод на ПВР, така и неговите модификации служат като мощни средства за амплифициране на ДНК последователности от производствени щамове, щамове – замърсители и патогенни щамове, за тяхното детектиране и типизиране. Сред широкото разнообразие на ПВР-базирани методи, целящи директно идентифициране на даден организъм в хранителен продукт, най-често използваните методи са САПД и ПДАФ анализите.

Случайно Амплифицирана Полиморфна ДНК (САПД) е ПВР техника от т.н. случаен тип, основаваща на амплификация на ДНК регион, за който няма предварителна информация за каквато и да е последователност-мишена. Чрез аранжиране на 10-мерни праймери на случаен принцип и прилагане на амплификация при слаб контрол на амплификационните параметри, може да се получи набор от фрагменти (амплифицирани фрагменти), който по принцип е видово специфичен. Този факт допринася за приложението на САПД-ПВР като надежден метод за диференциране сред популации от микроорганизми.

Полиморфизъм в Дължината на Амплифицираните Фрагменти (ПДАФ). Това е високо чувствителен метод за детекция на полиморфизъм сред индивиди, приложим както за вътре- така и за междувидово разграничаване. Това е ПВР опосредстван ПДРФ на подобрани ДНК фрагменти сред широк набор такива. ПДАФ скринира за полиморфизъм в дължината на амплифицираните фрагменти чрез селективно амплифициране на някои от тях. Методът включва смилане на геномна ДНК с две рестрикционни ендонуклеази, последвано от ПВР амплификация на получените фрагменти. Рестрикционните фрагменти се модифицират предварително с адапторни последователности, специфични за използваните ендонуклеази, които по този начин служат като места за свързване с праймерите. Самите праймери са аранжирани по такъв начин, че позволяват силно специфична амплификация, поради факта, че само фрагменти, напълно съответстващи на последователностите на праймерите, се амплифицират.

5.2.3. Методи за откриване и проследяване на щамове

Тук са приложими само генотипни методи, а именно всички техники на типизиране, изброени по-горе, с особен акцент върху ДНК белязането, чиято мощна разделителна способност дава възможност за детекция на ниво род, вид и щам при бактерии, дрожди и гъби.

5.3. Молекулярни методи за откриване и количествено определяне на ГММ

5.3.1. Откриване на ГММ

Първите Генетично Модифицирани Организми (ГМО) с приложение за целите на здравеопазването и промишлеността са модифицирани щамове *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*, произвеждащи инсулин. В последствие се прилагат множество рекомбинантни микроорганизми. Всички те се използват в индустриални биореактори при строго дефинирани условия и такива процеси обикновено не изискват провеждане на тестове за откриване на ГМО.

Необходимостта от такива специфични тестове се появява с внедряването през средата на деветдесетте години на миналия век на генетично модифицирани (ГМ) животни и растения в околната среда.

Главно ГМ зърнени храни провокираха започването на важни дебати, особено в Западна Европа, за оценка на безопасността на храните и за потенциално модифициране на околната среда. За успокоение на потребителите се появиха храни, обозначени като свободни от ГМО. Обаче, не само суровините могат да се използват за изготвяне на храни, но също така и множество съставки от растителен произход, които могат да присъстват в много ниски количества в крайния продукт. Такъв е например случая с лецитин, екстрахиран от соя. Лецитинът се използва като добавка в много индустриални производства на шоколад или ароматизирани с шоколад продукти. Това, което трябва да се анализира всъщност не е пречистеният лецитин (който е идентичен с лецитина от немодифицираните соеви растения), а само някои модифицирани ДНК последователности или кодираните от тях рекомбинантни белтъци. Последните могат да присъстват само като следи, което налага необходимост от много чувствителни методи за тяхното откриване.

5.3.2. Методи за откриване

Откриването на ГМО или техни производни може да се осъществи чрез детекция на молекулата – първична мишена (самата ДНК последователност и евентуално - РНК), специфично свързана с генетичната модификация на своя продукт (рекомбинантният

белтък, който може да се продуцира в съответствие с генетичната промяна). По-голяма част от наличните методи се отнасят до откриване на ДНК и само няколко техники се прилагат в детекцията на РНК и белтък. Причините за този факт са следните:

- ДНК може да се амплифицира и пречисти бързо и ефективно с помощта на ПВР. Мултиплицирането на РНК и белтъци е по-сложно и изисква повече време.
- ДНК е стабилна молекула, докато РНК е нестабилна. Белтъкът лесно може да стане обект на температурна денатурация по време на преработването на храните, т.е. неговата стабилност зависи от множество външни фактори.
- Ако модифицираният елемент е ядрена ДНК, съществува линейна зависимост между нейното количество и това на ГМО. Такава корелация обаче, не е открита между количеството ГМО и РНК/белтък.
- Тъй като генетичната модификация е извършена на ниво ДНК, логично е откриването на тази модификация да се осъществява на същото ниво.

Понастоящем всички търговски ГМО притежават чуждеродна ядрена ДНК.

5.3.3. Методи, основани на белтък

Основата на тези методи е имунологична и се свежда до специфично свързване от типа “антиген-антитяло” и класически анализ ELISA. Реакцията антиген – антитяло разпознава чуждеродната молекула, свързва се с нея и така полученият комплекс се открива обикновено с хромогенна реакция. Тъй като антитялото, необходимо за откриване на антигена, не би могло да се разработи без достъп до самото пречистено такова, то то трябва да се синтезира изкуствено по известна аминокиселинна последователност или да се пречисти от изследваните ГМО.

Обикновено трансгенният продукт е малък полипептид или белтък, който може да се експресира под контрола на силен конституитивен промотор във всяка тъкан и на практика по всяка време от жизнения цикъл на растението. Следователно, белтъкът е в достатъчно количество и представлява аналитична мишена. Трябва да се има предвид обаче, че напоследък в модифицираните растения желаният белтък се синтезира само под контрол на индуцируем промотор (т.е. при стресови условия, по време на определен етап от жизнения цикъл и т.н.). В тази ситуация откриването и анализът за наличие на рекомбинантен белтък често са неадекватни.

5.3.4. Методи, основани на РНК

При тези методи се провежда специфично свързване между РНК молекулата и праймер (синтетичен РНК или ДНК олигонуклеотид). Праймерът, комплементарен на началото

на РНК молекулата, се свързва с нея и в резултат се получава двойноверижен хетеродуплекс, подобен на ДНК. Използвайки обратна транскриптаза се провежда *de novo* биосинтеза на ДНК, която след това може да се амплифицира с ПВР и да се открие. Недостатък на този метод е фактът, че специфичните праймери не могат да се конструират без познания за състава на РНК, която трябва да се открие.

5.3.5. Методи, основани на ДНК – амплифициране с ПВР

Методите, основани на ДНК, разчитат на мултипликация на специфична част от молекулата на ДНК чрез техниката на ПВР. За визуализиране на амплификационните продукти рутинно се използва гел електрофореза. Тя може да се проведе самостоятелно или да се свърже с ендонуклеазно смилане (ПДРФ-ПВР). Един по-сложен вариант на основния ПВР протокол включва определяне на T_m профила чрез средствата на внедряване на багрила в двойната верига на ДНК и излъчване на флуоресцентна светлина. С увеличаване на температурата двете вериги на ДНК започват да се разделят и съответно излъчената светлина, която може да се измери, намалява. T_m е много по-специфична характеристика на ДНК последователностите в сравнение с дължината на ДНК. Друг вариант е използването на сонди и провеждане на хибридизация с ДНК или РНК. Ако се конструира подходяща сонда, то тя може да отдиференцира природните от чуждеродните последователности. Бележейки сондата с радиоактивни или нерадиоактивни съединения може да се улесни детекцията на молекулите. Понастоящем, най-често използваните техники за анализ на ГМО са гел електрофорезата и хибридизацията.

Скринингът на хранителни проби за наличие на ГМО с използване на основния протокол на ПВР включва следните процедури:

- Екстракция на ДНК от пробата и стандарти с неизвестно количество ГМО;
- Провеждане на няколко ПВР със специфични праймери (обикновено за добре известни регулаторни последователности, каквито са например промоторите 35SCaMV или Tnos);
- Визуализиране на ДНК фрагментите в агарозна гел електрофореза;
- Анализ и полу-количествена оценка с помощта на софтуер за изображения.

С помощта на методите на основата на множествена ПВР могат да се скринират и откриват няколко ДНК последователности в рамките на една-единствена реакция. Обаче, разработването на множествен анализ изисква внимателно тестване и потвърждаване. Наличните амплификационни фрагменти трябва да бъдат допълнително

анализирани за разграничаване на отделните ампликони. Това може да се осъществи с помощта на специфични хибридационни сонди в гел електрофореза, като се сравнят фрагментите по размер, или с използване на белязани праймери.

Голямо преимущество на тази техника е фактът, че са необходими по-малък брой реакции за изследване на пробата за наличие на ДНК, произхождаща от ГМО. Ако е необходимо провеждането на допълнителни количествени анализи би било добре да се знае количеството на кои ГМО ще се следи, тъй като процедурата е относително скъпа. Идентификацията на определен ГМО е важна също така и в контекста на нашите познания за одобрените и не-одобрените ГМО.

Друг подход е **количественото определяне, на базата на ПВР**, което може да бъде осъществено както по време на амплификационния процес (т.нар. ПВР в реално време), така и след приключване на реакцията (ПВР в крайна точка).

Анализите на крайния продукт често се основават на сравнение на количеството на амплифицираната ДНК от две ДНК мишени: едната е тази, чието количество трябва да се определи, а другата е т.нар 'конкурент' (в малко, но известно количество), която се добавя в амплификационната смес преди провеждането на реакцията и коамплифицира с мишената, чието количество ще се определя. Този процес се нарича още конкурентна количествена ПВР. Той се основава на презумпцията, че ако и двете ДНК – мишената и конкурента – дадат едно и също количество амплификационен продукт, то и началното количество на тези ДНК молекули се приема за едно и също.

При ПВР анализа в реално време количеството на синтезирания продукт по време на ПВР се определя директно чрез измерване на флуоресценцията. Има търговско достъпни хибридационни сонди, излъчващи флуоресценция, съответстваща на количеството на синтезираната ДНК. Количеството на синтезирания продукт може да се определи и чрез излъчването на внедрено флуоресцентно багрило, но при този случай не е възможно да се направи разлика между специфичните и неспецифични продукти. Предимство на този метод е, че може да се следи количеството на образуваните продукти в динамика, а също така и да се определи броя на циклите, необходими за получаване на определено количество ПВР продукти.

ПВР в реално време изисква по-сложно и скъпо оборудване, но е по-бърз и по-специфичен метод от конкурентната ПВР.

5.3.6. Процесът на детекция

Процесът на детекция представлява процедура, състояща се от следните индивидуални стъпки [9]:

1. *Вземане на проба.* Стратегията за вземане на проба включва комплексна статистика за получаване на надеждна оценка на количеството ГМО или техни производни.
2. *Хомогенизиране.* Тази стъпка включва хомогенизиране на пробата.
3. *Изолиране/пречистване.* Тази стъпка касае изолиране и пречистване на ДНК, РНК или белтък. Най-критичните фактори за тази стъпка са количеството (концентрацията), чистотата и качеството на изследваната макромолекула. Тук отново се използва статистически анализ.
4. *Анализ за присъствие/отсъствие.* На този етап се провежда анализ за присъствие или не на ГМО или техни производни. Както беше споменато по-горе разполага се с широк набор от методи, всеки един от които предлага различна разделителна способност за отличаване на производните на различните ГМО и различна надеждност по отношение на фалшиви (+) и (-) резултати. Други параметри, които трябва да се имат предвид при избора на метод за детекция са: възможността молекулата, която трябва да бъде открита, да бъде напълно деградирала, т.е. да не може да бъде определена; възможността по време на преработката на храните, молекулата, която бе трябвало да е обект на избрания метод за детекция, да бъде отстранена; възможността анализът да се провежда със смес от ГМО и това да доведе до сложен и време консумиращ идентификационен процес.
5. *Идентификация.* За идентификация на целевата молекула обикновено трябва да се потвърдят всички (+) резултати с цел да се елиминират фалшивите (+) реакции и да се потвърди идентичността на намерената молекула.
6. *Количествено определяне.* На този етап се провежда количествено определяне на модифицирания материал в дадена проба. Тук отново статистическият подход е важен, тъй като количествените определяния винаги изискват стандарти.
7. *Интерпретация на резултатите от анализа.*

5.3.7. Предимства и недостатъци на методите за детекция

Границите на детекция и количествено определяне могат да се категоризират в три групи:

1. Абсолютни граници – най-малкия брой копия, които трябва да присъстват в началото на първия цикъл за получаване на коректно определяне с вероятност 95 %;
2. Относителни граници – най-ниският относителен процент от генетично модифициран материал, който може да се определи;
3. Практически граници – границите, приложими за определена проба.

Специфичността на наличните понастоящем методи, основани на ДНК, може да се категоризира в четири групи:

1. Скрининг методи, които откриват широк обхват от ГМО без да ги идентифицират;
2. Скрининг методи за определен тип генетична модификация;
3. Методи, специфични за даден конструкт, използвани понякога за идентификация на ГМО;
4. Методи, основани на специфична трансформация, използвани за идентификация на ГМО (все още на етап лабораторна разработка, не се предлагат за търговски цели).

5.4. Оценка на генния трансфер

5.4.1. Прокариотни микроорганизми

Разнообразието от механизми е типично за трансфера на ДНК при прокариотите, като то може да доведе до пренос на наследствени характеристики.

Тези механизми за трансфер на ДНК дават на бактериите предимство в адаптивния отговор на промените в околната среда посредством приемането на нова генетична информация, която може да даде ефикасно оръжие за устояването на неблагоприятен селективен натиск. Подобен тип събитие е широкото разпространение на гените за антимикробна резистентност сред микроорганизмите, след въвеждането на антибиотични агенти в земеделието, ветеринарната и хуманната медицина. Силно разпространен механизъм за трансфер на гени при прокариотните системи е конюгацията, която се основава на наличието на плазмид в донорните клетки или на конюгационни транспозони в хромозомата. Прекият клетка-клетка контакт подпомага трансфера на копие(я) от плазмида или транспозона(ите) в реципиентните клетки. При бактериите са идентифицирани голям брой плазмиди, някои от които нямат способност за собствен пренос. В този случай той се улеснява от други плазмиди.

Броят на плазмидите, представени в бактериалните клетки може да бъде различен и тази черта е обща за бактериалните популации, обитаващи различни ниши. Тези подвижни генетични елементи – плазмидите и транспозоните често могат да определят нови свойства на клетките. Уникален феномен в природата (както и в експериментални условия) е конюгативния генен трансфер от бактерии към еукариотни клетки (дрожди, филаментозни гъби, животински и растителни клетки).

Друг процес на генен трансфер, който се основава на активно приемане на ДНК от бактериите в тяхната цитоплазма е естествената трансформация. Този феномен е характерен за ограничен брой бактерии от основните трофични и таксономични групи. Процесът (трансферът) може да протече ефективно по време на специфична фаза от растежа на популацията, наречена “компетентност”. Трансформацията се реализира с

хромозомални ДНК фрагменти или плазмиди, като процесът се осъществява при специфични физични или химични условия, характеризиращи фазата на компетентност, през която чуждата ДНК може да навлезе в бактериалните клетки. Такъв тип на трансформация често се ползва при релизирането на генните технологии.

Третият тип на генен трансфер – трансдукцията също се наблюдава в микробниалните популации и съобщества. Тя се осъществява чрез бактериални вируси, които пакетират случайна част от ДНК на последната клетка-гостоприемник, правейки я донорна и след това я пренасят в реципиентна клетка.

Специфичността на горе-описаните три механизма зависи от генетичното родство на донорната и реципиентната клетка. Трансферът на гени може да се осъществи посредством тези механизми между членовете на един вид, но и между представители на различни видове и родове. Така нареченият “хоризонтален генен трансфер”, осъществяван чрез горните механизми е обширно изучен и се счита като много важен за геномната структура на бактериалния вид. Изследването на този феномен включва също така и анализ на пълната геномна секвенция.

Експериментите в областта на е

стествения генен трансфер показват, че разнообразни събития на пренос се осъществяват в естествените местообитания на бактериите, включително в почвата, ризосферата, филоплана, седиментите, речните епитопи, хранителните продукти, интестиналния тракт, устната кухина на бозайниците и др.

След сполучливия трансфер на чуждата ДНК в реципиентната клетка, тя може да се внедри в генома посредством геномна интеграция (напр. хоможна рекомбинация) или чрез формиране на плазмид (в случай, че присъства репликационно начало). Този процес може да се прекрати поради различни причини (като липса на хомоложност в нуклеотидната последователност или наличие на рестрикционни ендонуклеази). Ясно е, че ако новата генетична информация дава предимство на реципиента и позволява оцеляването при промени в естествената екосистема, то тя ще бъде запазена на популационно равнище, ако селекционният натиск е продължителен. Така че, трансферът на гени може да се счита като феномен, типичен за природата на прокариотните микроорганизми. Той е естествен отговор към промени в селективния натиск на средата, където циркулирането на гени или генни комбинации, както и появата на някои генни групи дава по-добри възможности за оцеляване на микробната популация.

Имайки предвид, естествения характер на трансфера на гени в бактериалното съобщество, който може да осигури широкото разпространение на рекомбинантните конструктори, за предпочитане е по време на процеса на генно-инженерните манипулации, да се използва хромозомалния интеграционен подход. Включването на гени в конструкторите, които могат да дадат селективно предимство при дадени условия, трябва да се избягва (напр. антимикробиални детерминанти). Процедура на премахване на всяка генна секвенция, която може да стимулира случайното интегриране в други геноми трябва да бъде предвидена при подготовката на желан конструктор.

5.4.2. Еукариотни микроорганизми

Еукариотните клетки се различават от прокариотните по своята комплексна структура: те притежават добре развито ядро.

Процесите на генен трансфер при тези микроорганизми (дрожди и филаментозни гъби) също се различават от тези, описани при бактериите.

Естествената клетъчна хибридизация и генетична рекомбинация се срещат главно при видове, притежаващи полов или парасексуален клетъчен цикъл. Тези събития се осъществяват в еукариотни клетки с полово размножаване посредством мейтинг, мейоза и спорулиране. Генният трансфер при микроорганизмите с парасексуален жизнен цикъл протича чрез анастомоза, ядрено сливане и хаплоидизация чрез постепенна загуба на хромозоми. При някои родове може да се наблюдава и междувидова хибридизация между близкородствени видове.

Транферът на синтетични гени от дрожди към клетки на бозайници е осъществен чрез дрождеви изкуствени хромозоми (YAC). Те са с изключителен потенциал, като вектори при генната терапия.

5.5. Генетична стабилност на микроорганизмите

Микроорганизмите са генетично много по-нестабилни отколкото плътно организирани хромозоми при висшите еукариоти. Те притежават по-висока скорост на растеж и тъй като са едноклетъчни могат да се адаптират бързо към променящата се среда, така че те са способни да се променят генетично много по-лесно от висшите еукариоти. Някои механизми за генен трансфер при микроорганизмите вече са идентифицирани и дискутирани. Подвижните ДНК частици са отговорни за промяната на бактериалния генетичен материал, което често довежда до появата на нови фенотипни характеристики, инактивиране на гени, загуба на гени и цялостна дестабилизиране на генома. Тези подвижни частици ДНК включват инсерционните

последователности (ИП), плазмидите, профагите и транспозоните. Множество бактериални щамове имат голям брой различни ИП и част от тях често активно причиняват транспозиция.

Геномът на еукариотните микроорганизми също се подлага на ДНК промени. Те могат да претърпят серии от пренареждания по време на растежа, които зависят от физични, химични условия и култивационната система. В някои случаи, непрекъснатите култури са ефикасни селективни средства за стабилизиране на приетите нови ДНК секвенции. По принцип, тези промени възникват от спонтанната транспозиция на подвижни елементи (напр. *Tu* ретротранспозони) и хромозомални сегменти. Последното събитие е добре представено при полиморфизма в дължината на хромозомите.

Феноменът на генетична променливост на микроорганизмите също така може да повлияе върху стабилността на рекомбинантната ДНК в ГММ. Това свойство трябва да се отчете при оценката на генетичната стабилност на ГММ.

Локализацията на клонираните гени (хромозомална или плазмидна) силно повлиява генетичната стабилност на рекомбинантната ДНК молекула. Тя прави селекцията на подходяща векторна система изключително важна за съдбата на рекомбинантната ДНК. Когато се ползват вектори с голям брой копия или интегрирана в хромозомата ДНК, стабилността на новата генетична информация ще зависи от основни биологични механизми. Генетичната стабилност на трансферирувания генетичен материал ще бъде същата като тази на приемащия микроорганизъм. Високата стабилност на трансферирувания генетичен материал изисква обширни познания за локализацията на транспозоните и ИП, както и на местата за прикрепяне на умерените фаги.

5.6. Микробна патогенност

По принцип микроорганизмите, които се използват в биотехнологиите за производство на ферментационни храни (напр. млечно-, пропионово- и оцетно-кисели бактерии, дрожди (*Saccharomyces*, *Kluuyveromyces*), някои филаментозни гъби като *Penicillium*, *Aspergillus*) се считат за безопасни за употреба от човек. Те имат дълга история на съвместно съществуване с човечеството и се смятат като цяло за безопасни и непатогенни. Има някои данни за много редки случаи на бактеремия и ендокардити причинени от някои чревни млечно-кисели бактерии при пациенти с тежки сърдечни заболявания. Тези случаи определят все пак тези микроорганизми като хранителни патогени.

Хранителните патогени имат инвазивни и/или токсигенни въздействия, когато са в храните или в човешкия гастроинтестинален тракт. Друга група от микроорганизми – опортюнистичните патогени, по принцип не са опасни за здрави хора, но при имунокомпрометирани хора могат да представляват риск. Наскоро, чрез използване на възможностите на молекулярните техники, геномите на повечето хранителни и опортюнистични патогени са изцяло секвенирани и гените, отговорни за тяхната патогенност са определени. Тези постижения дават възможност за идентифициране на подобната генетична информация в геномите на различните микроорганизми, използвани в хранителната индустрия. Изучаването на данните от няколко секвенирани геноми на микроорганизми, използвани в хранителните ферментации показват наличието на два примера (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*) които не притежават познати патогенни свойства.

В заключение, дългият срок на безопасна употреба и наскоро получените генетични доказателства показват, че генетичната основа на повечето от микроорганизмите, използвани в хранителната индустрия не показва наличие на детерминанти за патогенност.

Освен тези главни съображения за патогенността съществуват и някои допълнителни вредни нежелани последици, които трябва да се отчетат.

Някои нежелани ефекти на ГММ се получават в резултат от генетичната манипулация. Такива са метаболитното несъответствие, експресията на “мълчаливи” гени и промяната на взаимодействието между микроба и интестиналната имунна система. Тези ефекти водят до прекомерно увеличаване стойностите на някои общи метаболити, които по принцип са без токсичен ефект, напр. при млечно-киселите бактерии, дрождите (ацеталдехид, формиат, биогенни амини) и гъбата *Penicillium camamberti (roqueforti)* (циклопиазонова киселина или рокфортин); експресия на някои гени, кодиращи токсини; появата на нежелани имунни реакции; нежелани реакции с други клетки (напр. ентоцитите) от гастроинтестиналния тракт.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

A decade of EU-funded GMO research (2001-2010) (PDF). Directorate-General for Research and Innovation. Biotechnologies, Agriculture, Food. European Union. 2010.

FAO (2008) GM Food safety Assessment: tools for trainers.

WHO (2001) *Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms.*

Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from
Biotechnology

OECD - 1993a. *Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants.* Paris,
OECD Report. 40 pp.

OECD - 1993b. *Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a
baseline for assessing the role of modern biotechnology.* Paris, OECD. 235 pp.

ILSI, *Safety assessment of viable genetically modified micro-organisms used in food,* 1999

EFSA Scientific Colloquium on QPS (2004) available at:

<http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/109e>

EFSA (2015) *Guidance for renewal applications of genetically modified food and feed
authorised under Regulation (EC) No 1829/2003.*

EFSA (2011) *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and
their products intended for food and feed use.*

Tepfer, M., Andow, D. A. and Ammann, K. (2002) *Environmental biosafety research.*

Environ. Biosafety Res. 1:3-4

Bawa A.S., Anilakumar K.R. (2013) *Genetically modified foods: safety, risks and public
concerns-a review.* J Food Sci Technol., 50(6):1035-46

Parekh S.R. (2004) *The GMO Handbook: Genetically modified animals, microbes and plants
in biotechnology,* Human Press Inc.

Devos Y., Aguilera J., Diveki Z., Gomes A., Liu Y., Paoletti C., du Jardin P., Herman L.,
Perry J.N., Waigmann E. (2014) *EFSA's scientific activities and achievements on the
risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of
existence: looking back and ahead.* Transgenic Res., 23(1):1-25

Aymerich T., Martin B., Garriga M and Hugas M. *Microbial Quality and direct PCR
identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal
low-acid sausages.* 2003, Appl. Environm. Microbiol. 69, (8), 4583 – 4594.

Alberts B et al. (2013) *Standing Up for GMOs.* Science 341(6152):1320.

Gaskell G, Allansdottir A, Allum N, Castro P, Esmer Y, Fischler C, Jackson J, Kronberger N,
Hampel J, Mejlgaard N, Quintanilha A, Rammer A, Revuelta G, Stares S, Torgersen
H, Wager W; Allansdottir; Allum; Castro; Esmer; Fischler; Jackson; Kronberger;
Hampel; Mejlgaard; Quintanilha; Rammer; Revuelta; Stares; Torgersen; Wager
(February 2011). "The 2010 Eurobarometer on the life sciences". Nat. Biotechnol. 29
(2): 113–4.

<http://www.genetic-id.com>

<http://www.genescan.com>

<http://www.identigen.com>

<http://www.identitypreserved.com>

<http://www.gmocert.com>

<http://www.investigen.com>

<http://www.alteca.com/index.htm>

<http://www.biprofilelabs.com>

<http://www.agbiotechnet.com/topics/GMsafety.asp>

<http://www.safetyalerts.com>

РО 4: ОЦЕНКА НА РИСКА ОТ ГММ И ПРОИЗВОДНИТЕ ИМ ПРОДУКТИ

1. Оценка на риска от ГММ и производните им продукти върху здравето на човека и животните

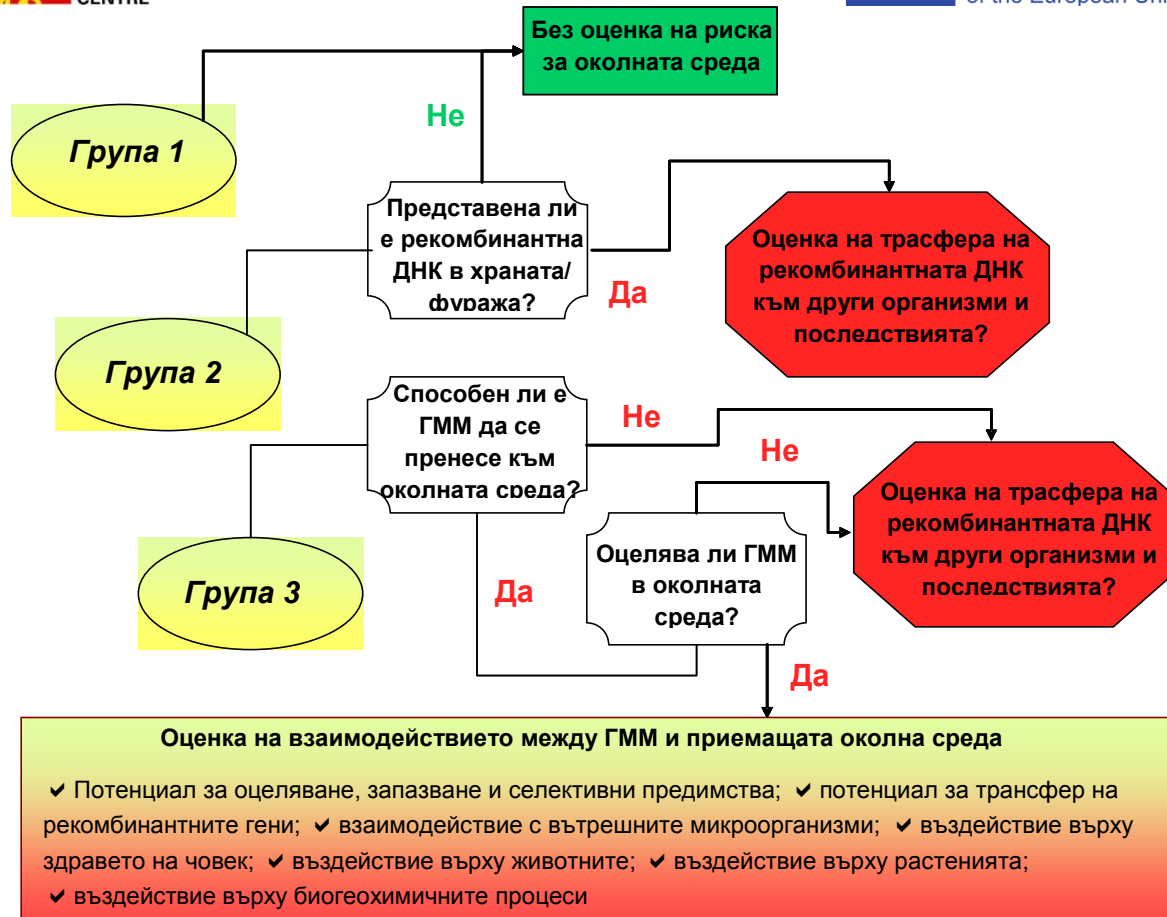
1.1. Концепция за фактическата еквивалентност на ГММ

ГММ и производните им продукти, използвани за консумация от човека и животните варират от групи отделни съединенияр получени чрез тях, до чисти култури от живи ГММ. Пречистените продукти като аминокиселини и витамини са типичен пример за първата група, докато пробиотичните култури или млечно-киселите закваски – за втората. Междинно място заемат продуктите от генетично модифицираните микроорганизми, като млечно-киселите продукти, където живи ГММ присъстват, но има и продукти без тях. Последните могат да съдържат следи от трансгенното събитие, напр. сурови ензимни препарати, образувани чрез лизис на микробиалните клетки. Въз основа на тези съображения, три групи от ГММ или производна храна и фуражи могат да бъдат разграничени (виж Таблица 1 по-долу).

Таблица 1:

<i>Група</i>	<i>Описание</i>
Група 1	Дефинирана смес от съединения или единични съединения получени от ГММ (напр. аминокиселини, витамини, чисти ензими).
Група 2	Комплексни продукти без живи ГММ, които не съдържат единици от каквито и да е клонирани (чужди) отворени рамки на четене (напр. лизирани клетъчни екстракти, някои фуражни ензими, вино, някои бири и др.)
Група 3	Култури и продукти, съдържащи живи ГММ или генетично интактна клонирана (чужда) ДНК (напр. живи или топлинно убити стратерни и пробиотични култури, някои бири, сирене, кисело мляко и др.)

Различни процедури за оценка на риска се прилагат, когато храните и фуражите съдържат продукти от споменатите по-горе групи (Фиг. 1). Най-внимателно проучване се прави при продуктите съдържащи живи ГММ. Ограничена информация по отношение на системата за производство е необходима за оценка на риска при единичните съединения. В случая, когато ГММ не се отделят от продукта и пречистването е ограничено, необходимата информация за оценка на риска е много по-обширна от тази за единичния продукт. Съществува необходимост за разбиране на процеса, чрез който ГММ са инактивирани в продукта и за степента, в която следи от трансгенното събитие могат да се открият в него. Ако живи ГММ остават в продукта, необходимата информация трябва да бъде разбираема, така че да се позволи научна оценка на риска. Нивото на критичност за оценка на риска е свързано с историята на употреба на реципиентния и донорния щам (в зависимост от секвенциите за клониране), както и със самата модификация. Процедурите за оценка на риска на ГММ са по-малко критични, когато се отчита качествена презумция за безопасност (КПБ) на микроорганизмите в храната и хранителните вериги. В такъв случай, оценката на риска трябва да цели съответна информация, която не е спомената в КПБ окачествяването, вече присъдено на родителския/реципиентния/донорния щам или на таксономична група с КПБ статут за същата крайна употреба.



Фиг. 1: Подход за оценка на риска за околната среда на ГММ и техните продукти

Обобщение на информацията, необходима за въвеждането на ГММ и техните производни продукти на пазара според EFSA документацията е представено в Приложение 1.

1.2 Приложение на сравнителния подход

Стратегията за оценка на ГММ се основава не само на преценяването на очакваните модификации, но и на неочакваните резултати от процеса на генетична манипулация. Тя сравнява ГММ или ГМ храна/фураж със съответните им конвенционални дубликати. Този сравнителен подход се свързва с концепцията, че конвенционалните дубликати с история на безопасна употреба могат да се използват като референтна точка за оценка на риска на даден ГММ за околната среда, храната и фуража. С цел да охарактеризира това, *OECD* развива концепцията за “осведоменост” и “фактическа еквивалентност”, която по-късно е разработена от *ILSI* и *WHO/FAO*. Оценката на риска цели да идентифицира новите или променените опасности, свързани с конвенционалните дубликати. Тези сравнителни изследвания могат да се ползват като първа стъпка при

оценката на риска. После, на втори етап, трябва да се определят едновременно очакваните и неочаквани различия и тяхното влияние върху безопасността на околната среда и на храната/фуражите.

Информация за концепциите за “осведоменост”, ”маса от знания”, “история на безопасна употреба” и “фактическа еквивалентност” е представена по-долу:

Таблица 2

<i>Концепция</i>	<i>Описание</i>
“осведоменост” и ”маса от знания”	Повечето от ГММ щамове, използвани за хранителни/фуражни цели принадлежат към добре характеризирани видове. Подобна “осведоменост” позволява на оценителя на риска да взаимодейства от предишните знания и опит, получени при въвеждането на подобни микроорганизми в храни или в околната среда, както и от анализа на риска/сигурността, осъществен преди мащабирането на технологиите. Терминът е заместен с по-нов – “маса от знания”.
“фактическа еквивалентност”	Тази концепция се базира на основния принцип, че съществуващ микроорганизъм с ‘история за безопасна употреба’, като храна или фураж може да служи за сравнение при оценката на безопасността на ГМ храна или фураж. Подробно описание е дадено в <i>ILSI</i> и <i>EFSA</i> Научни беседи за КПБ.

Нито концепцията за “маса от знания”, нито за “история на безопасна употреба” гарантират липсата на вреди. В случай, когато на родителския организъм е даден КПБ статут, цялата достъпна информация за историята на безопасна употреба вече е била оценена.

Естественото разнообразие на микробиалния геном става ясно в храните и по време на тяхната обработка, тъй като изключително сложни микробиални асоциации могат да съществуват. Нещо повече, химични и физични фактори/характеристики на храната могат да повлияят върху генната експресия и да причинят вариации. Тази особеност

трябва да се вземе предвид по време на оценката на безопасността, тъй като различни данни могат да бъдат получени в лабораторните експерименти с храни или в гастроинтестиналния тракт по време на поглъщането. Така че, концепцията за фактическа еквивалентност трябва да се прилага към самите ГММ, както и към храните, които са получени чрез тях. Тук трябва да се отбележи, че приложението на концепцията за фактическа еквивалентност трябва да се извърши много внимателно, тъй като много малки разлики могат да разграничат патогенните от непатогенните щамове на микроорганизмите.

Основните характеристики на концепцията за фактическа еквивалентност са включване на специфичен анализ на състава и фенотипа на ГММ и сравнение с конвенционалния щам. В този смисъл, *FAO* и *WHO* отбелязват в доклада си, че е необходимо да се поддържа контакт с прогреса в новите молекулярни методологии. Тяхното приложение предлага мощно оръдие за получаването на подробна аналитична информация и може да улесни успешното сравнение между конвенционалните и генетично модифицираните микроорганизми. В този смисъл, използването на ДНК микрочипове и протеомни техники е изключително подходящо. Метаболитната характеристика на микроорганизмите чрез диапазон от аналитични техники е съвременен подход със специфична стойност в оценката на ГММ, където метаболитното пренареждане е очакван резултат.

Приложението на такъв тип техники е ограничено от нуждата за оценка на основата на нормалните вариации и значението на детектираните разлики. Важни стъпки трябва да бъдат осъществени преди тези техники да се считат за рутинни в оценката на сигурността:

- Валидиране на методологията за осигуряване на тяхната репродуктивност и мощност
- Постигане на съгласие за оценка на тяхното изпълнение (т.е дефиниране на диапазона на разликите в един чип/профил, което да се счита за ‘нормална вариация’)
- Оценка на всяка разлика в профила, която не се счита за ‘нормална вариация’.

1.3. Очаквани и неочаквани въздействия

Очаквани въздействия: Те се очакват да протекат, като последица от включването или инактивацията на гени или ДНК последователности и са тясно свързани с целта на генетичната модификация. Тези очаквани модификации в състава на ГММ, които са

различни в сравнение с родителския щам могат да се измерят като единични съединения (ново-получен протеин) или промяна в клетъчния метаболитен поток.

Неочаквани въздействия: Промените във фенотипните разлики между ГММ и неговия изогенен дубликат, които не се очакват след извършената генна манипулация. Тези неочаквани въздействия могат да се дължат на:

- Интеграция на метаболитните пътища;
- Генетично пренареждане;
- Метаболитни смущения и плейотропен ефект;
- Синтеза на нов фузионен протеин.

1.4. Излагане на ГММ

На първо място, с цел да се предотврати нежелано въздействие от приложението на ГММ в хранителната индустрия, трябва да се извърши пред-пазарна оценка на сигурността. Всяко въздействие върху хранителната верига трябва да се проследи. По време на оценката, следните важни фактори трябва да се вземат под внимание: възможността за консумация на ГММ; тип на ГММ/продукт/ген; оценка на потенциалната опасност на популационно ниво.

Методите за измерване на потенциалната опасност от излагането на популацията на ГММ трябва да се определят. В този смисъл е важно да се отбележат заключенията от предишни консултации:

“Промяната в хранителните нива на определена растителна култура може да окаже влияние върху общия хранителен прием. При такива случаи, е важно да се определят различията в хранителното съдържание и био-достъпността, и тяхната стабилност във времето, обработката и съхранението, както и да се проследят промените в структурата на диетата, в резултат на въвеждането на хранително модифицираните храни и да се оцени тяхният потенциален ефект върху хранителния и здравен статут на консуматорите. Все пак, оценяването на влиянието върху хранителния статут на консуматорите е важно при всички значителни промени в диетата и не само при въвеждането на генетично модифицирани храни”.

Както вече е отбелязано от *FAO/WHO*, много е трудно да се предвиди потенциален дългосрочен ефект на която и да е храна върху здравето, включително и тези получени с помощта на ГММ. Това се дължи на голямата генетична изменчивост в човешката

популация и на сложността на проследяването на въздействието. Счита се, че е много трудно да се идентифицира всеки ефект в отношение с конвенционалните храни, освен ако специфични изследвания не са планирани за да отговорят на специфични въпроси. Така че развитието на специфични методи за проследяване на излагането на действието на ГММ е наложително.

1.5. Въздействие върху интестиналната микрофлора

Голям брой живи микроорганизми (до 10^{14}) обитават човешкия гастроинтестиналния тракт по време на неговия живот. Съставът на микрофлората наброява около 400 вида. Те не са добре познати, тъй като голяма част от тях не може да се анализира поради липсата на подходящи техники. Счита се, че достъпните класически и молекулярни подходи не са достатъчно мощни за да опишат цялото това разнообразие от микроорганизми. Типът на микробиалната популация се сменя последователно по отношение на състава и броя от устната кухина (където доминират микробиални видове са млечно-киселите бактерии, стрептококите и някои анаеробни видове), стомаха (преминаващи киселинно-толерантни видове), тънкото черво (обитавано от колон-подобна микрофлора) до колона, където микробиалната маса достига до 10^{12} грама/сухо тегло.

Популациите, колонизиращи колона се доминират от анаероби като *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides* и *Clostridium*. Микроаерофилите и факултативните анаероби, като лактобацилите, ентерококите и колиформите обикновено са по-малко – 3-4 пъти. Тази ендогенна микрофлора, живееща в гастроинтестиналния тракт представлява основна бариера срещу външната микрофлора, която се опитва да инвазира чревния тракт и осигурява т.нар. колонизационна резистентност.

Съставът на гастроинтестиналната (ГИ) микрофлора в количествен и качествен аспект зависи от голям брой фактори включително:

- Фактори на средата – тип на диетата, приложена антимикубиална терапия, дезинфектанти, хранителни добавки, занимание, климат.
- Фактори, асоциирани с гостоприемника – възраст, пол, чревна подвижност, време за пренос, рН, защита от жлъчните киселини и др.
- Отношения на видовете в ГИ микрофлора – скорост на прием на хранителни вещества, кислород, H^+ , H_2S , образуване на антимикубиални агенти, органични киселини, NH_3

Всички тези фактори имат съвместно действие върху общия статут на ГИ микрофлора. Съществуват някои взаимодействия между ГИ микрофлора и различните гостоприемник-асоциирани структури и функции. Тези взаимодействия могат да се открият на различни равнища: органно, клетъчно и молекулярно и могат да се обобщят като: прокариотно-еукариотни връзки на клетъчно ниво; продуциране на органични киселини, нуклеотиди и др.; взаимодействие с ентерохепатитната циркулация; развитие на чревна-асоциираната имунна система; влияние върху чревната подвижност и ентероцитната митоза. Те зависят от възрастта и здравния статут на индивида. Така че, оцеляването на екзогенната микрофлора (включително ГММ) се подчинява на тяхната способност да надделеят влиянието на вътрешната ГИ микрофлора и горе-споменатите гостоприемник-асоциирани фактори. Също така, колонизационната резистентност взима участие в оцеляването, но тези механизми още не са добре разбрани. Някои микроорганизми могат да напуснат чревния лумен и да се появят другаде. Терминът, който описва това поведение е транслокация. Определянето на интестиналното *in vitro* оцеляване на微生物ите е трудна задача. Поради тази причина се изисква селекция на подходящи животински модели, симулиращи човешката ГИ система и експерименти с пациенти. Тези експерименти трябва да бъдат потвърдени с надеждна методология за щамова идентификация.

В случай, че въведените ГММ в ГИ тракт, преживеят смилането, те могат да бъдат само преминаващи или да се установят за различно време в червата. Този феномен се описва с термина колонизация и се измерва с константното равнище на микроорганизмите, установени за определен период от време.

Дълго-срочната (постоянна) колонизация на ГИ тракт от екзогенни микроорганизми е много рядка при възрастните хора. Но ако това се случи, приложението на някои пробиотични щамове показва, че нормалната микрофлора трябва да се открива във фекалиите и колоналната мукоза седмици след оралното приемане. За да се опише оцеляването на микроорганизмите в ГИ тракт за период, два пъти по-дълъг от транзитното време се използва термина 'персистентност'.

В случай на въвеждане на ГММ в ГИ тракт, независимо от тяхното установяване (детектирано или не), съществува възможност за взаимодействие с микрофлората на бозайника-гостоприемник. Очакваното въздействие върху чревната флора може частично да зависи от функциите, експресирани от ГММ (фенотипна експресия) и по този начин от хорозонаталния трансфер на гени.

Въздействието на ГММ върху бозайника-гостоприемник може да се определи като пряко и непряко. Прякото се характеризира чрез общото влияние върху всички структури и функции, представени по-горе, а непрякото се определя от взаимодействието със собствената микрофлора и по-точно с нейните активни елементи. И двата типа на взаимодействие (пряко/непряко) могат да се провокират и от неживи микроорганизми, тъй като те запазват функционални свойства (напр. имунна модулация, химично свързване, клетъчна адхезия). Определена секреция на биологично активни съединения, като токсини и ензими може също да бъде предвидена.

Възможността за трансфер на гени вече беше дискутирана, така че е оправдано да отчетем и конюгативния трансфер между микроорганизмите в червата, който зависи едновременно от родството на ГММ с интестиналната микрофлора и от тяхното време на престой в GI тракт. Този ефект може да се очаква при персистентните или колонизиращите щамове, докато преминаващите са с малко влияние. Към момента няма съмнение, че в интестиналния тракт съществува измерваема персистентност на ДНК. Доказано е, че растителна и рекомбинантна ДНК може да навлезе в кръвоносната система, клетките на тъканите и дори в ядрата на бозайника-гостоприемник.

1.6. Въздействие върху имунната система

Заклучението на консултациите на *FAO/WHO*, по отношение на оценката на имунно-модулаторния потенциал на ГММ е, че е необходимо разглеждане на всеки отделен случай. Например, относно алергенните свойства, двете организации вече са направили някои препоръки.

Съществуват данни, които потвърждават взаимодействието между чревната микрофлора и статута на имунната система. Трябва да се отбележи, че за разлика от ГМ растения, ГММ се установяват добре в GI тракт и по този начин предизвикват потенциално имунно-модулаторно въздействие.

2. Бъдещи перспективи

Достъпните в момента, методи за детекция на ГМО и техни производни не могат да разграничат два различни компонента в хранителните продукти. Методите могат да бъдат използвани само за детектиране и количествено определяне на съдържанието на ГМО на видово ниво.

В момента, компаниите, които търсят одобрение на ГМО в Европа имат право да пазят в тайна секвенционната информация, която описва съответните им ГМО. Поради тази

причина учените нямат основната информация, необходима за дизайн на методи за детекция [15, 16].

По-добри методи за изолиране и детектиране на интересуващите ни молекули и техния количествен и качествен анализ са необходими и в момента се разработват. Основната част от тях са насочени към ДНК методите, които могат да позволят повишаване на специфичността чрез:

- ПВР методи, прицелни за мястото на съединяване между инсърта и интеграционната част;
- Методи, основани на ‘отпечатьци’ и специфични за ГМО, като тези използвани в криминалистиката;
- Диагностични микро-чипове, подобни на тези, използвани за определяне на предразположението към наследствени заболявания.

Накрая, тестове за вешина на акредитирани лаборатории, според международни стандарти трябва да бъдат организирани за индустриалните контролиращи институции и такива, които осъществяват анализ на ГМО.

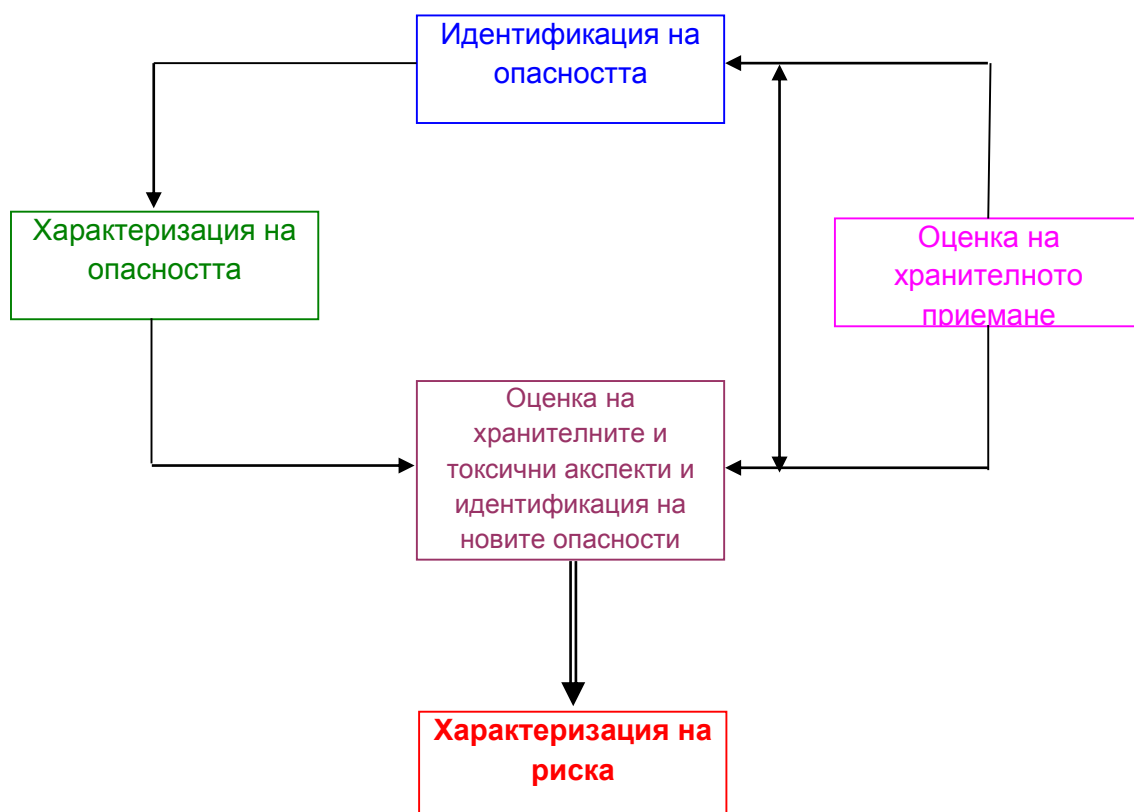
3. Заключение бележки

Процесът за оценка на риска трябва да се основава на:

- Изучаване случай по случай чрез прилагането на серия от добре дефинирани въпроси
- Сравнителен подход за идентифициране на приликите и разликите между храните, получени по класически път и от ГММ, чрез прилагане на концепцията за фактическа еквивалентност, която предоставя практически средства
- Въвеждане на специфични съображения по отношение на вродените свойства на микроорганизмите посредством оценяване на влиянието на ГММ върху хранителната матрица
- Приложение на концепцията за фактическа еквивалентност едновременно за ГММ и за получената храна, чрез изследване на допълнителни параметри като патогенност и персистентност в ГИ тракт на бозайниците
- Отчитане на специфичните нужди и излагане на ГММ – ГММ трябва да бъдат интегрална част от храните в жива или нежива форма
- Оценката на ГММ трябва да се осъществи по отношение на хранителната стойност и безопасността – микроорганизмите, използвани за производство на храни са от основно значение за хранителното качество и безопасността на продукта

- Оценката на ефекта на ГММ или техните части върху имунната система на бозайника-гостоприемник изисква допълнително обсъждане – микроорганизмите в ГИ тракт повлияват имунната система и внедряването на ГММ в производството на храни изисква специфична оценка на риска, в зависимост от системата на обработка
- Внимателно оценяване на възможния генен трансфер от ГММ към чревната микрофлора – генетичният материал от храната има потенциал за трансфер към чревната микрофлора и клетките на бозайниците *in vivo*
- Силна нужда от история за безопасна употреба на микроорганизма-гостоприемник в храните – използвания микроорганизъм-гостоприемник трябва да има статут на безопасност; селективните маркери трябва да се избират много внимателно по отношение на безопасната употреба, като маркерните гени за антимикробна резистентност трябва да се избягват и изключат от крайните ГММ

Обобщение на предложеното бъдещо развитие на процеса за оценка на риска е представено на Фиг. 2.



Фигура 2. Обобщение на предложеното бъдещо развитие на процеса за оценка на риска

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- A decade of EU-funded GMO research (2001-2010) (PDF). Directorate-General for Research and Innovation. Biotechnologies, Agriculture, Food. European Union. 2010.
- FAO (2008) GM Food safety Assessment: tools for trainers.
- WHO (2001) *Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology
- OECD - 1993a. Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants. Paris, OECD Report. 40 pp.
- OECD - 1993b. Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology. Paris, OECD. 235 pp.
- ILSI, Safety assessment of viable genetically modified micro-organisms used in food, 1999
- EFSA Scientific Colloquium on QPS (2004) available at:
<http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/109e>
- EFSA (2015) Guidance for renewal applications of genetically modified food and feed authorised under Regulation (EC) No 1829/2003.
- EFSA (2011) Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use.
- Tepfer, M., Andow, D. A. and Ammann, K. (2002) Environmental biosafety research. *Environ. Biosafety Res.* 1:3-4
- Bawa A.S., Anilakumar K.R. (2013) Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technol.*, 50(6):1035-46
- Parekh S.R. (2004) The GMO Handbook: Genetically modified animals, microbes and plants in biotechnology, Human Press Inc.
- Devos Y., Aguilera J., Diveki Z., Gomes A., Liu Y., Paoletti C., du Jardin P., Herman L., Perry J.N., Waigmann E. (2014) EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead. *Transgenic Res.*, 23(1):1-25
- Aymerich T., Martin B., Garriga M and Hugas M. Microbial Quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. 2003, *Appl. Environm. Microbiol.* 69, (8), 4583 – 4594.
- Alberts B et al. (2013) Standing Up for GMOs. *Science* 341(6152):1320.

Gaskell G, Allansdottir A, Allum N, Castro P, Esmer Y, Fischler C, Jackson J, Kronberger N,

Hampel J, Mejlgaard N, Quintanilha A, Rammer A, Revuelta G, Stares S, Torgersen

H, Wager W; Allansdottir; Allum; Castro; Esmer; Fischler; Jackson; Kronberger;

Hampel; Mejlgaard; Quintanilha; Rammer; Revuelta; Stares; Torgersen; Wager

(February 2011). "The 2010 Eurobarometer on the life sciences". Nat. Biotechnol. 29

(2): 113–4.

Web sources:

<http://www.genetic-id.com>

<http://www.genescan.com>

<http://www.identigen.com>

<http://www.identitypreserved.com>

<http://www.gmocert.com>

<http://www.investigen.com>

<http://www.alteca.com/index.htm>

<http://www.biprofilelabs.com>

<http://www.agbiotechnet.com/topics/GMsafety.asp>

<http://www.safetyalerts.com>