

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von prokaryotischen Umweltisolaten bei gentechnischen Arbeiten

I. Einführung:

In der vorliegenden Stellungnahme werden Kriterien und Untersuchungsmethoden für die Einstufung von Wildtypisolaten von Bakterien und Archaea aus Umweltproben in eine Risikogruppe benannt. Sie werden angewandt, wenn Bakterien und Archaea als Spender- oder Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten verwendet werden sollen, ohne dass sie eindeutig bis zur Spezies-Ebene identifiziert werden konnten (Isolate mit unklarer taxonomischer Stellung). Diese Stellungnahme schließt nicht die Bewertung von gentechnischen Arbeiten mit Mikrokosmen ein.

Grundsätzlich sollten Umweltisolate zunächst durch Einsatz moderner biochemischer und molekularbiologischer bzw. taxonomischer Methoden zuverlässig charakterisiert werden. Ergeben diese taxonomischen Untersuchungen einschließlich der MALDI-TOF-Analyse oder der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens oder des Gesamtgenoms jedoch keine eindeutige Zuordnung zu einer bereits bekannten Spezies, so werden die im Folgenden beschriebenen Grundsätze und Verfahren angewandt.

Eine detaillierte Feststellung bestimmter physiologischer Eigenschaften und Kenntnis der Herkunft bzw. des natürlichen Standorts eines Isolates kann unter Umständen eine Zuordnung zu einer Risikogruppe ermöglichen (s. II.1. bis II.3.). Wenn diese Kenntnisse für eine Risikobewertung nicht ausreichen, so ist zu prüfen, welche der unter II.4. bis II.6. genannten weitergehenden Untersuchungen zur Abschätzung eines pathogenen Potentials durchzuführen sind.

Die detaillierte Untersuchung eines Umweltisolates kann dann entbehrlich sein, wenn die taxonomischen und physiologischen Untersuchungen seine Zuordnung zu bestimmten größeren taxonomischen Einheiten, Stoffwechseltypen oder der Mikroflora von Extremstandorten erlauben, die aufgrund bestimmter Charakteristika **nur Organismen der Risikogruppe 1** enthalten. Dies trifft z. B. auf **acidophile, alkaliphile, psychrophile und thermophile sowie autotrophe Prokaryoten** zu.

Dabei ist zu beachten, dass die Bildung von Toxinen bei der Einstufung von Spender- und Empfängerorganismen in eine Risikogruppe nach § 5 GenTSV nicht ausschlaggebend für eine Einstufung der entsprechenden Organismen in die Risikogruppe 2 ist, wenn sie nicht mit einer Infektion von Tieren oder Menschen einhergeht. So ist bekannt, dass eine Reihe von Cyanobakterien Substanzen bilden können, die Neuro-, Zyto- oder Hepatotoxine sind bzw. hautreizend oder entzündlich wirken können. Cyanobakterien werden der **Risikogruppe 1** zugeordnet, obwohl sie Toxine bilden können. Eine mögliche Toxinexpression ist jedoch bei der Gefährdungsbeurteilung gentechnischer Arbeiten zu berücksichtigen, um geeignete Maßnahmen zum Schutz der Beschäftigten ergreifen zu können (s. hierzu auch Merkblatt B006 der Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie, Juli 2015).

Archaea wurden bis vor Kurzem generell als apathogen betrachtet. Inzwischen gibt es jedoch Hinweise darauf, dass das methanogene Archaeon *Methanobrevibacter oralis* an opportunistischen Infektionen beteiligt sein könnte. *M. oralis* ist das einzige Archaeon, das von der ZKBS vorsorglich der **Risikogruppe 2** zugeordnet wurde ([Az. 45241.0223, September 2021](#)), da nicht auszuschließen ist, dass es beim Menschen an der Auslösung der Parodontitis beteiligt ist. Auch in der TRBA 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea)“ ist *M. oralis* als einziges Archaeon der Risikogruppe 2 zugeordnet.

II. Kriterien der Risikobewertung:

Im Folgenden werden Untersuchungen und Bewertungskriterien benannt, die für die Einstufung von prokaryotischen Isolaten mit unklarer taxonomischer Stellung in eine Risikogruppe herangezogen werden:

1. Herkunft des Isolates

Für die Risikobewertung ist es wichtig, ob das Isolat aus Umweltproben stammt, in denen vorwiegend saprophytische Organismen vorkommen, oder ob Organismen mit geringen Nährstoffansprüchen am Standort vorherrschend sind.

Wenn ein für den Mikroorganismus typischer Standort durch extreme Lebensbedingungen gekennzeichnet ist, z. B. durch Belastung mit toxischen Stoffen (z. B. Schwermetallen), hohen Salzgehalt, hohe Temperaturen (z. B. heiße Quellen), sehr niedrige oder sehr hohe pH-Werte oder hohe Strahlenbelastung, so ist nicht damit zu rechnen, dass es sich bei dem Isolat um einen Krankheitserreger für Mensch oder Tier handelt.

2. Wachstumsbedingungen

Die Wachstumsbedingungen, vor allem Vermehrungs-Temperatur und -pH, liefern weitere wichtige Hinweise zur Abschätzung des Gefährdungspotentials. Dabei sollten sowohl das Wachstums-Optimum als auch die Toleranzgrenzen bestimmt werden.

Isolate, die sich nur unter 25 °C oder nur über 42 °C vermehren, sind in der Regel als apathogen für den Menschen zu betrachten; das Gleiche gilt, wenn der pH-Wert im Nährmedium für die Vermehrung unter 5,5 bzw. über 8,5 liegen muss. Aus den Temperatur- bzw. pH-Toleranzen lässt sich auch abschätzen, ob eine Vermehrung im Menschen oder im tierischen Organismus denkbar oder wahrscheinlich ist.

3. Nährstoffansprüche

Ein weiteres Kriterium für die Risikobewertung sind die Nährstoffansprüche. Es sollte geprüft werden, ob ein Isolat nur auf Mineralsalz-Medien wächst und das Wachstum dort durch Zugabe von komplexen, organischen Nährmedienzusätzen, wie Hefe-Extrakt, Pepton etc. gehemmt wird.

Organismen, die auf komplexen Medien nur sehr schwach oder überhaupt nicht wachsen, sind meist als Krankheitserreger auszuschließen.

4. Tierversuche

Zur Abschätzung eines pathogenen Potentials können Tierexperimente durchgeführt werden, mit denen z. B. die Letale Dosis 50 im Mausmodell ermittelt wird. Hierzu werden die Organismen in der Regel intravenös oder intraperitoneal appliziert, bei Verwandtschaft eines neuen Isolates zu enteropathogenen Organismen könnten auch orale Tests durchgeführt werden.

5. Zytotoxizitäts-Untersuchungen

Es könnte geprüft werden, ob eine Zytotoxizität des Kulturüberstandes für eukaryote Zelllinien feststellbar ist.

Es sollte ein Kulturfiltrat des Isolats hergestellt werden, das ein oder besser mehreren gängigen, etablierten eukaryoten Zelllinien zugesetzt wird, um auf zytopathische Effekte zu prüfen.

6. Adhäsions-Versuche

Zur Feststellung, ob ein Isolat eukaryote Zellen kolonisieren kann, sollte getestet werden, ob es Adhäsine bildet. Zu diesem Zweck kann eine etablierte Zellkultur mit dem Isolat inkubiert werden.

Die unter II.1. bis II.2.3 genannten Kriterien umreißen die Lebensbedingungen für extremophile, halophile oder autotrophe Organismengruppen. Diese haben kein Gefährdungspotential. Isolate, die keiner bekannten Spezies zugeordnet werden können und zu diesen Organismengruppen gehören, können bei gentechnischen Arbeiten als Spender- oder Empfängerorganismen der Risikogruppe 1 verwendet werden, ohne dass sie zuvor von der ZKBS in eine Risikogruppe eingestuft wurden.

Die Einstufung eines Isolats, das weder einer bekannten Spezies zugeordnet werden kann, noch zu den unter II.1. und II.2. genannten extremophilen, halophilen oder autotrophen Organismengruppen gehört, in eine Risikogruppe ist eine Einzelfallentscheidung. Diese ist vor Verwendung der Organismen als Spender- oder Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten durch die ZKBS vorzunehmen.

Hinweis:

Bei der Einstufung von Prokaryoten mit phytopathogenem Potential ist zudem die [Stellungnahme der ZKBS zu Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten \(April 2007, Az. 6790-10-53\)](#) zu beachten.