

Aneks B: Obrazac kategorije okoliša

DIO: REZULTATI PROCJENE (ispunjava PB)				
UKF sub-project: Comparative phosphoproteome analysis of <i>S. rimosus</i> oxytetracycline producers strains				
Kategorija procjene prema projektnom okviru	A	B +	✓ B -	C
OBRAZLOŽENJE	Projekti kategorije B- se mogu financirati ako se dostavi niže traženo			
DUBINSKO SNIMANJE				
Kategorija A	Neće se financirati iz projekta			
Kategorija B +	PO ako je projekt uključen u aneks br. 2 ili 3 Uredbe o PO			
Kategorija B -*	Materijali za Planove upravljanja okolišem (PUO) zajedno s potrebnim licencama i sigurnosno-tehničkim listovima materijala (MSDS); ili PUO ili kontrolna lista PUO-a			
Kategorija C	Nema dubinskog snimanja			
Potrebno dodatno obrazloženje	Ako se u projektu koriste radioaktivni, kancerogeni, mutageni i teratogeni materijali te u projektu postoji laboratorijsko testiranje na životinjama - detaljnije trebaju biti objašnjeni: postupci nabave i transporta, postupak rukovanja materijalima/ upravljanja životinjama, sigurnosni postupci, postupak čuvanja i skladištenja te tehnike zbrinjavanja otpada/ toksičnog i opasnog otpada. - za kancerogene, mutagene i teratogene materijale/tvari koje će se koristiti u Vašem projektu molimo da u nekoliko rečenica opišete: Vrstu i količinu, Dozvole za korištenje istih, Postupke za rukovanje tim materijalima (pogotovo postupak zbrinjavanja otpada), Postupak nabave, Transport, Čuvanje/skladištenje, Sigurnosne postupke. Tijekom izvedbe projekta svi eksperimentalni postupci kao i zbrinjavanje otpada te skladištenje ili transport navedenih materijala bit će u skladu sa sigurnosnim postupcima koje propisuje DLP (Dobra laboratorijska praksa) kao i pravilnici IRB-a. Koristit će se: etidij bromid (predviđena ukupna količina je 1mg, radna koncentracija je 0.5µg/ml), akrilamid/bis-akrilamid (predviđena ukupna količina je 8X100mL 40%-tne otopine);			

	Toksični materijali: sodium dodecilsulfate-SDS (predviđena ukupna količina je 200 gr), acetonitril (predviđena ukupna količina je 1L), metanol (predviđena ukupna količina je 5x2,5L) Dozvole za rukovanje/akreditacije laboratorija/institucije – molimo navedite i dostavite Dozvole/Odobrenja za obavljanje djelatnosti od relevantnih institucija (sigurnosni postupci) itd – molimo navedite i dostavite Institut Ruđer Bošković ima akreditaciju/dozvolu za rukovanje, odnosno izvođenje aktivnosti u kojima se koriste kancerogeni/mutageni/toksični spojevi Grupe I (dostavljeno UKF-u)
--	--

*Za projekt kategorije B -: potrebna je javna objava dokumenata, kao što je kontrolna lista materijala, na UKF web stranici; tiskana verzija treba biti dostupna po zahtjevu; po potrebi konzultacije s dionicima elektronskim putem temeljem objavljenih dokumenata

Annex F: Kontrolna lista materijala za Plan upravljanja okolišem

MATERIAL EMP

Podkorisnik	IRB
NAZIV PROJEKTA	Comparative phosphoproteome analysis of <i>S. rimosus</i> oxytetracycline producers strains
Opseg projekta i aktivnost–opis projekta	Cilj ovog projekta je odrediti ulogu fosforilacije proteina u biosintezi antibiotika modelne industrijski važne bakterije. Na taj način proširit će se spoznaje o signalnom putu koji koristi fosforilaciju proteina kao kontrolni mehanizam u biosintezi antibiotika. U posljednjih desetak godina proučavanja fosfoproteoma evolucijski udaljenih bakterijskih vrsta ukazala su na učestalu fosforilaciju serinskih, treoninskih i tirozinskih (Ser/Thr/Tyr) aminokiselinskih ostataka različitih proteina koji sudjeluju u nizu staničnih procesa, od bazičnog metabolizma do razvojnih procesa i prijenosa signala. Napredak masene spektrometrije, njezina primjena u proteomici kao i primjena novijih metoda za globalnu detekciju fosforiliranih proteina, imale su značajan utjecaj na brzi razvoj ove znanstvene discipline. Iako je navedena poslijetranslacijska modifikacija (PTM) proteina učestala kod bakterija, u većini slučajeva njezina biološka uloga nije razjašnjena. Zbog toga u ovom trenutku razotkrivanje funkcija fosforilacijskih događaja u bakterijskim stanicama predstavlja novi znanstveni izazov. Ovim se projektom predlažu usporedna istraživanja fosfoproteoma dvaju sojeva bakterije <i>Streptomyces rimosus</i>, koji proizvode bitno različite količine antibiotika oksitetraciklina (OTC) kako bi se otkrio utjecaj fosforilacije aminokiselinskih ostataka Ser/Thr/Tyr na biosintezu antibiotika. Upravo bakterije roda <i>Streptomyces</i> proizvode brojne i izuzetno važne prirodne produkte od kojih su za medicinu najvažniji antibiotici (tetraciklini, streptomycin i β -laktami), imunosupresori i antikancerogene supstance (doksorubicin). Među navedenim antibioticima tetraciklini svakako predstavljaju jednu od najuspješnijih skupina antibiotika. Toj skupini pripada i okstetraciklin (OTC) koji proizvodi bakterija <i>S. rimosus</i>. Temeljitim pregledom znanstvene i stručne literature utvrdili smo da istraživanja fosfoproteoma nisu provedena kod industrijski važnih proizvođača antibiotika. Stoga predlažemo primjenu masene spektrometrije (MS) visoke rezolucije u kombinaciji s biokemijskim metodama za obogaćivanje fosfopeptida kako bismo analizirali stanične lizate bakterija koje proizvode različite koncentracije OTC-a. Krajnji cilj ovog projekta je uspoređivanjem fosfoproteomskih profila identificirati regulatorne proteine čija razina fosforilacije kontrolira biosintezu antibiotika te povećava proizvodnju OTC-a kod bakterije <i>S. rimosus</i>. Identifikacija novih regulatornih proteina mogla bi također

	omogućiti povećanje prinosa medicinski važnih antibiotika koje sintetiziraju i neke druge vrste streptomiceta. Znanstvenici na ovom projektu imaju dugogodišnju ekspertizu i znanja na temelju kojih je bakterija <i>S. rimosus</i> svrstana kao jedna od najbolje istraženih i opisanih industrijskih bakterija. Ova kombinacija znanja i predložene tehnologije temelj je uspješnosti izvođenja projekta. Očekivani rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju signalnih putova ovih kompleksnih prokariota tijekom njihove stanične diferencijacije koja se odvija usporedno s biosintezom antibiotika.
Institucija koja provodi/nadzire projekt	Institut “Ruđer Bošković”
Koji su potencijalni utjecaji projekta na okoliš?	Projekt nema utjecaja na okoliš
ISPITIVANJE	
Molimo opišite faze ispitivanja	Faza 1. Istraživanje optimalnog uvjeta rasta modelnog mikroorganizma, bakterije <i>S. rimosus</i> te praćenje stanične diferencijacije kao i kvantifikacija proizvodnje antibiotika oksitetraciklina (OTC) u svim fazama rasta. Faza 2. Određivanje fosforilacije staničnih proteina na serinskim, treoninskim i tirozinskim aminokiselinskim ostacima pomoću western analize. Analizirat će se uzorci staničnih ekstrakata iz različitih faza rasta. Faza 3. Nakon odabira optimalnih uvjeta za rast i prinos OTC-a, pripremit će se veće količine ekstrakata stanica za preparativnu analizu fosfoproteoma. Faza 4. Nakon pripreme preparativne količine staničnih ekstrakata iz odabranih faza rasta uzorci protein razgradit će se tripsinom na peptide. Pomoću afinitetne kromatografije (TiO₂ ili imunoprecipitacijom specifičnim antitijelom - IP) uzorci će se obogatiti peptidima koji su fosforilirani na aminokiselinskim ostacima serina/treonina/tirozina za analize spektrometrijom masa (MS-analize). Faza 5. Priprema uzoraka za proteomske analize provest će se kako bi se načinila korelacija ukupnih proteina (ekspresija proteina) iz odabranih faza rasta te njihove fosforilacije. Stanični ekstrakti će se precipitirati, razdvojiti PAGE i potom frakcionirati prema masi proteina. Razgradnja tripsinom načint će se u gelu (in-gel digestion). Faza 6. LC-MS mjerenja. Peptidi će se eluirati iz gela, razdvojiti pomoću tekućinske kromatografije i potom analizirati spektrometrijom masa.

	Faza 7. Obrada podataka i kvantifikacija proteina. Svi dobiveni podatci analizirat će se MaxQuant i Andromedom, programskim paketima.
DOZVOLE	
Koje dozvole su potrebne za pripremu projekta i/ili ispitivanje? ¹	Dozvola za korištenje otrova skupine I i interni Pravilnici IRB-a (Pravilnik o zaštiti na radu iz listopada 2011, te Pravilnik o zbrinjavanju svih vrsta otpada iz tehnološkog procesa i iz procesa obrade otpadnih voda iz studenog 2009.) (priloženo).

Ova lista uključuje identifikaciju materijala i postupaka koji se koriste (mehanički, kemijski, itd.) te dobre laboratorijske i inženjerske prakse.

Treba popisati sve materijale koji će se koristiti u procesu, opasan materijal treba se identificirati u skladu s propisima o kemikalijama (aneks G Okvira za upravljanje okolišem). Obrazac s podacima o sigurnosti materijala i sve dozvole treba priložiti završnom dokumentu.

Opći cilj upravljanja opasnim materijalima je izbjeći ili, kada izbjegavanje nije moguće, smanjiti nekontrolirano oslobađanje opasnih tvari ili nezgode (uključujući eksplozije i požar) za vrijeme proizvodnje, rukovanja, pohrane i uporabe. Ovaj cilj se može postići:

- Gdje je to moguće, izbjegavanjem ili smanjenjem uporabe opasnih materijala.
- Sprečavanjem nekontroliranog ispuštanja opasnih tvari u okoliš ili nekontroliranim reakcijama koje mogu dovesti do požara ili eksplozije;
- Korištenjem inženjerskih kontrolnih mehanizama sukladno naravi opasnosti;
- Provedbom kontrole upravljanja (procedure, inspekcije, komunikacije, obuke i vježbe) za rješavanje zaostalih rizika koji nisu spriječeni ili pod kontrolom pomoću inženjerskih mjera.

Popis materijala /kemikalija koje će se koristiti	Ako je moguće dodijelite CAS broj materijalu/kemikaliji (identifikacijski broj kemijske supstance) ²	Sukladno Zakonu o kemikalijama, ovaj je materijal opasan	Molimo dodijelite kategoriju prema Zakonu o kemikalijama; članak 2 (Aneks G)
		Y/N	
Acetonitril	75-05-8	Y	H225 zapaljiva tekućina, H302 akutna toksičnost- oralna i H312 dermalna; H332 akutna toksičnost -inhal. ;H319

¹ Sve dozvole potrebno je priložiti finalnom dokumentu

			ozljeđuje i nadražuje oko
Akrilamind (Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution)	79-06-1	Y	H302 + H332 štetno ako se proguta ili udahne; H315 Nadražuje kožu; H317 Može izazvati alergijsku reakciju na koži; H319 Uzrokuje jako nadraživanje oka; H340 Može izazvati genetska oštećenja; H350 Može uzrokovati rak; H361f Sumnja na moguće štetno djelovanje na plodnost; H372 Uzrokuje oštećenje organa tijekom produljene ili ponavljane izloženosti
EtBr	1239-45-8	Y	H302 akutna toksičnost- oralna; H330 akutna toksičnost –inhal; H341 mutagen za germinativne stanice
Metanol	67-56-1	Y	H225 zapaljiva tekućina; H301 akutna toksičnost- oralna i H311 dermalna; H331 akutna toksičnost –inhal; H370 specifična toksičnost za ciljane organe - jednokratno izlaganje
SDS	151-21-3	Y	H228 zapaljiva krutina; H302 i H332 štetan ako se proguta ili udiše; H318 uzrokuje teške ozljede oka; H335 može nadražiti dišni sustav; H412 štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima

²Sigurnosno-tehničke listove materijala potrebno je priložiti finalnom dokumentu

AKTIVNOST	PARAMETAR	KONTROLNA LISTA ZA MJERE UBLAŽAVANJA
	Zbrinjavanje otpada	(a) Putevi za skupljanje i odvoz otpada kao i mjesta će se odrediti za sve glavne vrste otpada previđene za rušenje i nastale građevinskim radovima. (b) Građevinski otpad skupljaju i odlažu licencirani izvođači/ tvrtke (c) Evidencija o odlaganju otpada će se držati kao dokaz ispravnog zbrinjavanja prema zahtjevima. (d) Kad god je moguće, izvođač /tvrtka će ponovno upotrijebiti i reciklirati odgovarajuće i prihvatljive materijale (osim azbesta).
	Zbrinjavanje toksičkog/opasnog otpada	(e) Privremeno skladištenje svih opasnih i toksičkih tvari u sigurnosnim kontejnerima na licu mjesta i s označenim detaljima sastava, svojstava i informacija o rukovanju. (f) Kontejneri opasnih tvari trebaju se pohraniti u hermetičkim kontejnerima radi sprječavanja prolijevanja i curenja. (g) Otpad se prevozi posebnim licenciranim vozilima i odlaže su na licenciranom deponiju. (h) Lakovi koji sadržavaju toksičke sastojke ili otapala ili lakovi izrađeni na temelju olova neće se upotrijebiti. (i) Svi korišteni materijali trebaju biti označeni, a sigurnosno-tehnički listovi tiskani.

Faza montaže i ispitivanja				
Što koji parametar se prati?	Gdje se prati parametar?	Kako se prati parametar (što se treba mjeriti i kako)?	Kada se prati parametar (vrijeme i učestalost)?	Tko prati parameter (tko je odgovoran)?
1. Rast bakterije <i>S. rimosus</i> , kvantifikacija proizvodnje OTC-a, te praćenje morfološke diferencijacije micelija tijekom rasta bakterije.	U Laboratoriju za molekularnu genetiku te u zajedničkim eksperimentalnim prostorima Zavoda za molekularnu biologiju i Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, IRB-a)	Prirast bakterije <i>S. rimosus</i> pratit će se mjerenjem porasta biomase. Oksitetraciklin će se pratiti prvo analizom fermentacijskih podloga metodom u bunariću te nakon toga preciznim mjerenjima koncentracija OTC-a pomoću HPLC analiza. Morfološka diferencijacija te odumiranje micelijskog peleta pratit će se fluorescencijskom mikroskopijom i specifičnim fluorescentnim indikatorima.	Parametri će se monitorirati tijekom prve godine (višeputno).	Eksperimente će izvoditi ekspertno osoblje osposobljeno za rad u molekularno-mikrobiološkom laboratoriju i laboratoriju za analizu i sintezu organskih molekula (D.Vujaklija, A.Mikoč, T. Šimunov, TBD-poslijedoktorand, i M.Roje)

2. Određivanje ukupne stanične fosforilacije na Ser/Thr/Tyr a.k.-ostacima proteina staničnih ekstrakata.	U Laboratoriju za molekularnu genetiku te u zajedničkim eksperimentalnim prostorima Zavoda za molekularnu biologiju	Analiza po Westernu pomoću specifičnih protutijela.	Parametri će se monitorirati tijekom prve godine (višeputno).	Eksperimente će izvoditi ekspertno osoblje osposobljeno za rad u molekularno-mikrobiološkom laboratoriju (D.Vujaklija, A.Mikoč, T. Šimunov, TBD-poslijedoktorand, i PhD student)
3. Priprema proteinskih uzoraka, peptida te obogaćivanje fosforiliranih peptida.	U Laboratoriju za molekularnu genetiku te u zajedničkim eksperimentalnim prostorima Zavoda za molekularnu biologiju i u Laboratoriju za spektrometriju masa u Zavodu za fizičku kemiju.	Analiza po Westernu pomoću specifičnih protutijela. Učinkovitost razgradnje protein na peptide te obogaćivanje uzoraka s fosforiliranim peptidima prati se spektrometrijom masa.	Parametri će se monitorirati tijekom druge polovice prve godine i prve polovice druge godine (višeputno).	Eksperimente će izvoditi ekspertno osoblje osposobljeno za rad u molekularno-mikrobiološkom laboratoriju (D.Vujaklija, TBD -poslijedoktorand, i PhD student, S. Kazazić)
4. Mjerenje LC/MS i obrada podataka	U Interfaculty Institute for Cell Biology Quantitative Proteomics, Proteome Center Tuebingen, i u Laboratoriju za spektrometriju masa u Zavodu za fizičku kemiju.	Broj LC/MS eksperimenata. Identifikacijom i kvantifikacijom mjerenih peptide i fosfopeptida.	Parametri će se monitorirati tijekom druge godine (višeputno).	Eksperimente će izvoditi ekspertno osoblje osposobljeno za masenu spektrometriju. (B. Maček, TBD- Proteome Center Tuebingen; poslijedoktorand, i PhD student, S. Kazazić i D.Vujaklija)