

La seguridad de los marcadores de resistencia a ANTIBIÓTICOS

Emilio Montesinos* y Esther Badosa*

UNA DESCONFIANZA INJUSTIFICADA

El desarrollo y auge de los cultivos de plantas transgénicas, principalmente los de tipo Bt, que tras varios años de comercialización en distintos países del mundo ha superado los 45 millones de hectáreas, se debe sin duda a los beneficios tangibles que presentan para la Agricultura. Recientemente la Agencia para la Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha iniciado una revisión de los riesgos y beneficios de las plantas Bt como bioinsecticidas cuyas conclusiones preliminares ratifican la ausencia de efectos adversos inaceptables para la salud y el medio ambiente, y que tras cinco años de comercialización han aportado beneficios notables para la agricultura y el medio ambiente (EPA 2001).

Sin embargo, las opiniones sensacionalistas, en muchas ocasiones poco fundamentadas, vertidas en la prensa, en internet e incluso en debates públicos, sobre los efectos negativos de las plantas transgénicas han ido creando en sectores de la opinión pública un sentimiento de desconfianza. Esto contrasta con los informes objetivos sobre beneficios y riesgos realizados por paneles de expertos como el del Institute of Food Technologists (IFT 2000) o de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT 2000).

En muchos casos, la percepción del nivel de riesgo ha surgido de la extrapolación de conclusiones fuera de las evidencias científicas experimentales. Con frecuencia se hace referencia a artículos científicos fuera

OBEDECEN A LA NECESIDAD DE RECONOCER LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS

de contexto, pero una lectura detallada de la metodología y de los resultados pueden conducir a situar los resultados en su justa dimensión. No en vano la Ciencia avanza por que las hipótesis y especulaciones se confirman o rechazan en base a hechos experimentales y mediante una interpretación objetiva de los resultados.

Es en este contexto en el que se ha situado una de las más duras polémicas a nivel científico y social, en torno a la posibilidad de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos desde las plantas transgénicas a bacterias.

MARCADORES MICROBIANOS CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La presencia de genes de resistencia a

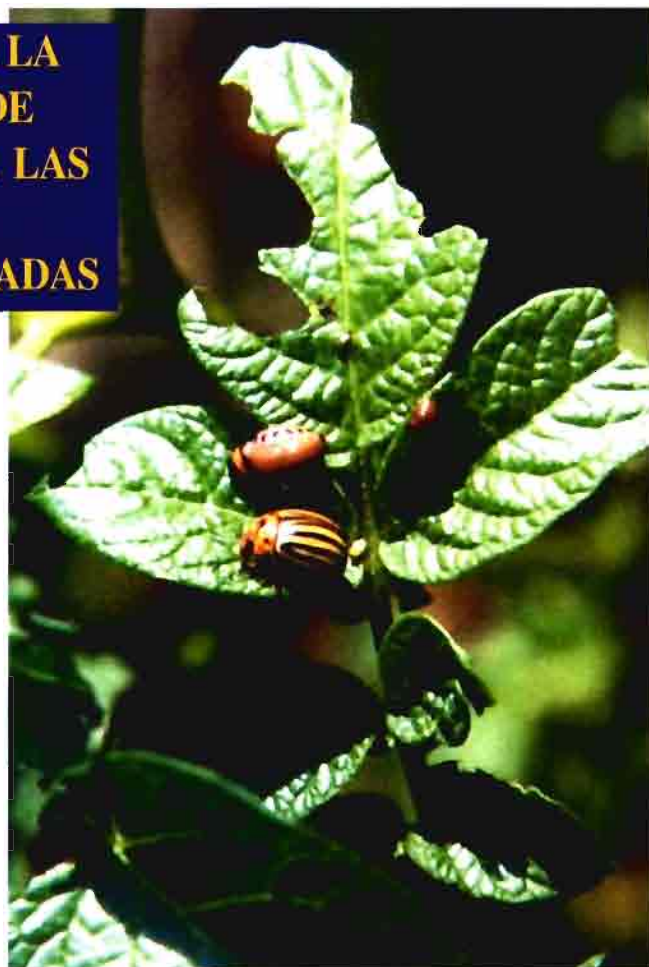


Foto 1. Patata atacada por el escarabajo crisomélido *Leptinotarsa decemlineata*. Las plantas transgénicas Bt expresan la toxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, una proteína letal para muchas larvas de insectos que causan plagas en agricultura.

ciertos antibióticos y herbicidas en plantas transgénicas es consecuencia de la necesidad de reconocer macroscópicamente las células que se han transformado en el pro-

(*) Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Gerona

ceso de obtención de la nueva variedad de planta mejorada genéticamente.

Para la obtención de plantas transgénicas se utilizan normalmente dos tipos de marcadores seleccionables. Por un lado los marcadores de resistencia bajo control de promotores bacterianos que permiten detectar el paso del gen transformante (por ejemplo el de la toxina de *Bacillus thuringiensis*) a bacterias que actúan meramente como intermediarias durante el proceso de modificación o construcción de los plásmidos vectores de clonación. Este tipo de marcadores suelen ser genes de origen bacteriano que confieren resistencia a antibióticos como ampicilina o kanamicina y pueden pasar a las células vegetales transformadas, pero no se expresan en ellas por llevar promotores bacterianos. Por otro lado, es

generación y en el caso de algunas variedades que se comercializan actualmente se utilizaron genes marcadores de resistencia a ampicilina (gen bla-tem que codifica para una betalactamasa que inactiva el antibiótico) o kanamicina (gen npt que codifica para una neopenténil transferasa).

RIESGO DE TRANSFERENCIA

El posible problema de la transferencia de los genes de resistencia a antibióticos desde la planta transgénica a otros organismos fué inicialmente mal explicado a la opinión pública, especialmente por los medios de comunicación y por algunos sectores ecologistas, transmitiendo la sensación de que comer plantas resistentes a antibióticos nos podía convertir en resistentes a antibióti-

o con otros relacionados a los que confieren resistencia los genes de resistencia introducidos en la planta transgénica (Courvalin 1998).

Este riesgo de transferencia podría a priori tener lugar tanto en el campo como en el sistema digestivo del animal o individuo que consumiera el producto, pero por un lado el tratamiento a que se someten algunos alimentos y por otro los procesos digestivos destruirían en gran parte el material genético, aunque siempre queda la posibilidad de que pequeñas cantidades o fragmentos de DNA conteniendo el gen sobrevivieran al proceso digestivo.

Sin embargo, el número de etapas necesarias para que tenga lugar una transferencia efectiva de un gen marcador de resistencia desde una planta transgénica hasta bacterias de interés clínico, veterinario o agrícola es elevado. Los procesos más relevantes incluyen: supervivencia del gen en un ambiente hostil rico en nucleasas que degradan el DNA como son el tracto gastrointestinal, el suelo o los tejidos de la propia planta; adquisición del estado competente por las bacterias receptoras, un estado poco frecuente que las capacita para incorporar fragmentos de

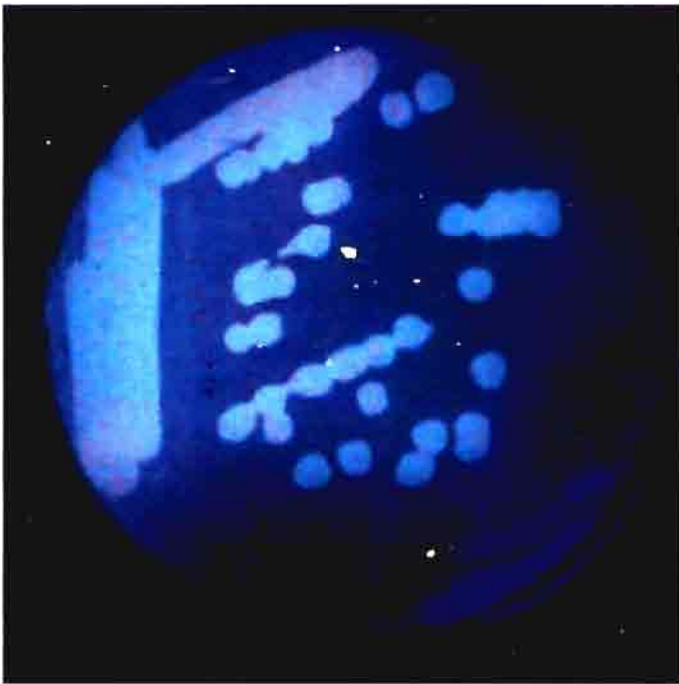


Foto 2. Placa de Petri con colonias de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* cultivada en agar B de King. Esta especie bacteriana no es patógena, forma parte de la microbiota normal de las plantas y se aísla con mucha frecuencia de la parte aérea y del sistema radical.

necesario un segundo tipo de marcadores que permita reconocer las células vegetales que han sido transformadas en el proceso de obtención (bombardeo con DNA, fusión de protoplastos o transformación con *Agrobacterium tumefaciens*). Estos marcadores suelen ser de resistencia a herbicidas como el gen bar (que codifica para el enzima fosfotricina acetiltransferasa) y se expresan en las células transformadas porque poseen promotores de origen vegetal.

En las plantas transgénicas de primera

bacterias asociadas a la planta durante su cultivo en campo (microbiota del suelo o de la propia planta) o al sistema digestivo de los animales (microbiota intestinal) que consumieran el alimento transgénico derivado. Una vez transferidos a dichas bacterias habitantes normales de las plantas o de los animales, podrían transferirse fácilmente a otras bacterias patógenas de los animales o del hombre, lo que ocasionaría que estas últimas se transformaran en insulares a la terapia con los mismos antibióticos

EL CAMINO DE LA TRANSFERENCIA GENÉTICA ES LARGO Y HOSTIL

RIESGO MINIMO FRENTE A MAXIMAS VENTAJAS AGRONOMICAS Y MEDIOAMBIENTALES

cos, cuando el supuesto problema no residía precisamente en esto.

En realidad es mucho más complejo ya que se trataría de que los genes de resistencia mencionados presentes en la variedad vegetal transgénica fueran transferidos a

DNA; competencia entre el gen y otros fragmentos de DNA procedentes de la propia planta o de microorganismos presentes por incorporarse a la bacteria receptora; translocación del gen a través de la membrana de la bacteria receptora; superación de los mecanismos de restricción/modificación del DNA en el citoplasma de la bacteria que evitan la entrada de DNA extraño; integración o recombinación del gen en el genoma de la bacteria receptora, proceso que requiere la presencia de secuencias homólogas entre el DNA del huésped y los dos extremos del gen; y finalmente existencia de una presión selectiva a favor de las bacterias transformadas gracias a la presencia del antibiótico en el medio.

Dado que se ha demostrado experimentalmente que todos estos procesos forman parte de la fisiología y genética de las bacterias, la conclusión es obviamente que la probabilidad no es nula y que por lo tanto el riesgo es finito. Los cálculos teóricos basados en estimaciones de la probabilidad con-

junta a partir de cada una de las etapas descritas, en los casos más optimistas, indican que 1 entre 10.000.000.000.000 de bacterias por generación podría resultar transformada.

ESTUDIOS REALIZADOS

Debido a la polémica existente y a los requerimientos de las autoridades estadounidenses, europeas y en particular de diversos países entre los que se cuenta España, se han realizado estudios sobre la transferencia de los marcadores de resistencia a antibióticos desde plantas transgénicas a bacterias asociadas siguiendo diversas aproximaciones experimentales. Sin embargo, la mayoría de éstos se han realizado en el laboratorio o bajo condiciones de campo simuladas en laboratorio.

El grupo de Frank Gebhard y Kornelia Smalla del IBP de Braunschweig (Alemania) consiguió transformar la bacteria *Acinetobacter* sobre filtros de membrana impregnados con extractos de DNA de plantas transgénicas que contenían una construcción basada en un plásmido portador del gen *npt II* que confiere resistencia a la kanamicina, pero la transformación sólo se produjo cuando existían regiones homólogas (Gebhard y Smalla 1998) y no se observó cuando no existían regiones homólogas entre la planta y la bacteria (Nielsen et al. 1997). En otro experimento realizado por el grupo de Ingo Potrykus del ETH de Zürich (Suiza) no se detectó la transferencia de los genes de resistencia a ampicilina desde la planta a bacterias receptoras utilizando un sistema modelo basado en discos de patata transgénica que contenía los genes *bla* mientras eran infectados con la bacteria fitopatógena *Erwinia chrysanthemi* B374 y el sistema era sometido a electroporación para aumentar la probabilidad de transformación (Schlüter et al. 1995). La transferencia de genes desde la planta a bacterias tampoco se detectó en un estudio realizado por el grupo de Pascal Simonet en el CNRS (Francia) utilizando un sistema consistente en plantas de tomate y tabaco que habían sido obtenidas utilizando una construcción basada en un plásmido portador de un gen *npt II* que confiere resistencia a kanamicina y que habían sido infectadas por una cepa modificada genéticamente de la bacteria *Ralstonia solanacearum* que contenía genes con regiones homólogas de la construcción (Bertolla et al. 2000).

Los estudios de transferencia en condi-

ciones naturales están sometidos a dificultades metodológicas para extraer y purificar selectivamente la fracción de DNA bacteriano y evitar la contaminación con DNA de la planta transgénica que se produce fa-

Braunschweig (Alemania) utilizando DNA directamente extraído de muestras de campo de parcelas de remolacha transgénica resistente a rizomanía que poseían secuencias específicas del gen *npt II*, y de la fracción bacteriana cultivable, y mediante una técnica de hibridación específica, no se pudo concluir en la existencia de transferencia debido a dificultades en la interpretación de las señales obtenidas (Gebhard y Smalla 1999).

Los resultados obtenidos en un estudio realizado por nosotros en el marco del Plan de Seguimiento del maíz establecido por el Ministerio de Agricultura, en diferentes campos comerciales de maíz transgénico de España durante 2000-2001, no han detectado la transferencia de los genes marcadores de resistencia a ampicilina desde la planta a bacterias asociadas del suelo, de las raíces o de la parte aérea. Este resultado permite concluir que si a pesar del uso de técnicas muy sensibles como las disponibles actualmente no se detecta la transformación, es por que el proceso es poco probable.

RIESGO MÍNIMO, VENTAJAS MÁXIMAS

Además, en el caso de que ocurriera, la posibilidad de que causara un impacto significativo sería en la mayoría de los casos remota porque la resistencia a ampicilina y kanamicina está muy extendida en numerosas especies de bacterias que forman parte de la microbiota humana, de los animales, de las plantas y del suelo (Götz et al. 1996). La existencia de bacterias resistentes puede ser previa al uso de los antibióticos o como consecuencia de la presión selectiva ejercida por su uso extensivo en ganadería, medicina y agricultura (Houndt y Ochman 2000).

En consecuencia, teniendo en cuenta que los niveles poblacionales bacterianos en el sistema suelo-planta o intestino de los animales son con frecuencia del orden de 10⁹ bacterias por gramo, y que los datos más recientes confirman que entre un 1-10% de la microbiota bacteriana residente es resistente de forma natural, cada transformación de una bacteria resistente por adquisición del gen marcador de la planta transgénica se añadiría a un ruido de fondo preexistente de millones de bacterias resistentes al antibiótico, lo que tendría un impacto poco significativo, al menos cuantitativamente.



Foto 3. Detección específica del marcador de resistencia a ampicilina en plantas transgénicas que poseen la construcción Bt176. La foto muestra las señales obtenidas mediante electroforesis de DNA a partir de amplificaciones por PCR con cebadores diseñados para detectar el gen *bla* de resistencia a ampicilina. M, patrones de diferente peso molecular; C-, maíz no transgénico; Bt176, maíz transgénico; E. coli pUC18, cultivo bacteriano transformado en el laboratorio mediante el vector de clonación utilizado para la construcción Bt176.

ilmente a partir de células senescentes del sistema radical y del suelo. En un experimento realizado por el grupo del IPB de

Sin embargo la biotecnología vegetal ha desarrollado soluciones al problema mediante nuevos métodos de transformación que han aportado una nueva generación de plantas transgénicas basada en la eliminación de los marcadores de resistencia seleccionables (tecnología BOGUS) o selección positiva por la capacidad de crecer de las células transformadas en nutriente raros. Varias multinacionales productoras de semillas modificadas genéticamente han iniciado la sustitución de las variedades antiguas por otras que no presentan marcadores de resistencia a antibióticos obtenidas mediante esta tecnología.

Finalmente, llegados a este punto debemos ser realistas, aceptar que el riesgo nulo no existe por muy avanzada que sea la tecnología que se utilice, y confrontar el riesgo asumible con las ventajas agronómicas, nu-

tricionales y medioambientales que suponen las nuevas variedades de cultivos transgénicos.

REFERENCIAS

- Bertolla, F., Pepin, R., Passelegue-Robe, E., Paget, E., Simkin, A., Nesme, X., and P. Simonet. 2000. Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4161-4167.
- Courvalin, P. Plantes transgéniques et antibiotiques. Les OGM risquent-ils d'aggraver le problème crucial de la résistance bactérienne?. *La Recherche*. Mayo, 1998.
- Gebhard, F., and Smalla, K. 1998. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1550-1554.
- Gebhard, F., Smalla, K. 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:261-272.
- Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., Van Elsas, J.D., Smalla, K. 1996. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62:26121-2628.

Houndt, T., Ochman, H. 2000. Long term shifts in patterns of antibiotic resistance in enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5406-5409.

IFT Expert Report on Biotechnology of Foods. 2000. Benefits and concerns associated with recombinant DNA biotechnology-derived foods. *FoodTechnology* 54:61-80.

Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K., and Van Elsas, J.D. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria- a rare event?. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:79-103.

Nielsen, K.M., Gebhard, F., Bones, A.M., and Van Elsas, J.D. 1997. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theor. Appl. Genet.* 95:815-821.

Schlüter, K., Fütterer, J., and Potrykus, I. 1995. Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs- if at all- at an extremely low frequency. *Biotechnology* 13:94-98.

SEBIOT. 2000. Plantas transgénicas. Preguntas y respuestas. Sociedad Española de Biotecnología.

U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Office of Pesticide Programs. Biopesticides and Pollution Prevention Division. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/other-docs/bt_reassess/1-Overview.pdf

PONENCIAS

1ª Ponencia: "El regadío y el Medio Ambiente. La Directiva Marco sobre Políticas de Aguas"

Ponentes:

Dña. Carmen Martorell Pallás
Secretaría General de Medio Ambiente del MIMAM
D. Julio Berbel Vecino
Profesor titular de la ETSIAM de Córdoba

2ª Ponencia: "La Financiación de la Modernización de los Regadíos con las Sociedades Estatales y las Comunidades Autónomas"

Ponentes:

D. José María Martín-Montalvo Vera
Consejero-Delegado de HIDROGUADIANA
D. Álvaro Molina Fernández-Miranda
Presidente de SEIASA del SUR y del ESTE
D. Joan I. Puigdollers Noblom
Consejero Delegado de RIEGOS de CATALUÑA

3ª Ponencia: "Las Comunidades de Usuarios de Aguas Subterráneas"

Ponentes:

Dña. Silvia del Saz Cordero
Catedrática de Derecho Administrativo
Profesora Titular de la UNED

SOLICITUD DE INSCRIPCIONES

FERAGUA (Persona de contacto: Clara García de Puelles)
C/ Trajano 2, 41002 - Sevilla.
Tels. 954 56 25 20 - Fax: 954 22 95 99
E-mail: congreso@feragua.com - Web: www.feragua.com

STAND COMERCIAL

Feragua dispone de espacio comercial en el recinto del Congreso para ofrecerlo a entidades públicas o privadas y firmas comerciales.



X CONGRESO NACIONAL
COMUNIDADES
de REGANTES

Sevilla, del 8 al 13 de abril de 2002

PALACIO DE CONGRESOS Y EXPOSICIONES DE SEVILLA. FIBES



Patrocinadores:



FERAGUA

Federación de Comunidades de Regantes
de la Cuenca del Guadalquivir.