



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Tesis de Diploma

“Transferencia Génica Horizontal en bacterias
contaminantes de los cultivos *in vitro* de la
caña de azúcar.”

Leonardo Julio Moreno Bermúdez

Universidad Central “Marta Abreu” De Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Santa Clara, 2011

CON SU ENTRAÑABLE TRANSPARENCIA





Universidad Central "Marta Abreu" De Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Tesis de Diploma

“Transferencia Génica Horizontal en bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar.”

Autor: Leonardo Julio Moreno Bermúdez

Tutor: Dr. José Manuel Machado Rodríguez

Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

mail: info@ibp.co.cu

Santa Clara, 2011

Pensamiento

Pensamiento

*Cuando creemos que todo está perdido
siempre sucede algo que nos devuelve la esperanza.*

Dedicatoria

Dedicatoria

A mis padres y a mi abuela.

Agradecimientos

Agradecimientos

Cuando hacemos un trabajo como este hay tantas personas que nos ayudan y que aportan algo, desde lo más simple como dar un consejo o una sugerencia, hasta lo más complejo como convertirse en la fuerza en la que nos apoyamos para seguir trabajando y en la razón por la que podemos hacer posible algo así.

Mi primer agradecimiento es para las tres personas a las cuales dedico esta tesis, que son parte de las pocas que mueven mi vida, que son mi razón de ser y que constituyen la fuerza, el apoyo y las ganas para seguir adelante, que han hecho todo lo posible y lo que para mí parecía imposible para que yo esté donde estoy y de la forma que estoy. Esas personas que han estado en toda mi vida esperándome, apoyándome, y aconsejándome, con mucha paciencia y dedicación, son mis padres y mi abuela.

El segundo agradecimiento es para otra de esas personas que me mueve, que también me hace estar aquí, que me guía, aconseja, espera y que me ha apoyado mucho en estos tres últimos años de mi vida que ha estado conmigo, que me ayuda a levantarme cuando caigo, que hace que siempre surja algo cuando lo doy todo por perdido y que me hace sentir que también soy su razón de ser, su prioridad y una de las mejores cosas de su vida, esa persona es Amanda.

El tercer agradecimiento es para la otra de las personas que a diario está también a mi lado, muy cerca de mí, no menos importante que las demás por haberla separado, es que he querido dedicar un agradecimiento para ella, porque aunque no sepa cómo, también me ayuda a seguir adelante, a estar donde estoy y es la otra de las que me mueven y constituyen mi razón de ser: mi hermana.

Gracias también a las otras personas de mi familia que me han ayudado de algún modo en estos años de carrera, como mi tía Dunia.

Quiero dar un agradecimiento especial a mi tutor José M. Machado por todos los conocimientos que de él adquirí en el tiempo que trabajamos juntos, conocimientos muy importantes que serán muy útiles en mi vida laboral futura y que serán la base de la misma. Gracias también por su tiempo, dedicación, esmero a la hora de enseñarme, paciencia y ayuda en la elaboración de este documento.

Agradecimientos

A las demás personas de las cuales adquirí valiosos conocimientos para realizar este trabajo y que colaboraron en su la realización, redacción, escritura y perfección, ellos son:

En el laboratorio de Biología Molecular del IBP: Orelvis, de quien aprendí los primeros pasos para trabajar en el laboratorio, Baby, Luis, Neyda y Miladi y en el de Fitopatología a Mileidi, Maira, Belkis y Yelennis, que por simple o pequeño que parezca algo que me enseñaron o aportaron es parte de esto que he podido hacer.

En la facultad a todos los profesores que me formaron, aconsejaron y ayudaron a lograr todo lo que he logrado hoy, en especial a Daymí por su comprensión y permitir sin reparos esta fecha y lugar y a Katia por sus buenas ideas y aportes a la hora de perfeccionar este documento, por sus consejos profesionales y personales en momentos difíciles y sobre todo por su tiempo y dedicación a mi trabajo estando tan ocupada con otros.

A María Teresa por la revisión y todos los detalles que me ayudó a corregir.

A mis 11 compañeros de Aula: Yoana, Dailé, Edgardo, Lizzoe, Rosa Elena, Mónica, Yuleiky, Leyanis, Liliiana, Mayilén y Carmen por su compañerismo, preocupación y momentos alegres y agradables que me sirvieron de mucho en estos últimos tiempos.

A Laura y Yamila, mis amigas, no solo de aula, (que conmigo ya contamos 14) por el apoyo que siempre me dieron, amistad y cariño, por sacarme de ratos malos y meterme en ratos alegres y buenos, también por levantarme en muchas ocasiones y por muchas otras cosas más que sabemos, y que prueban nuestra amistad. Están al final de esta página, pero es un lujo que puedo darme con ellas porque sé que saben que no son las últimas a las que quiero agradecer.

A todos:

Muchas gracias.

Resumen

RESUMEN

La Transferencia Génica Horizontal es la transmisión de material genético entre individuos de la misma especie o de especies diferentes por vía no sexual. Los organismos donadores de genes pueden estar genéticamente modificados o no, lo cual constituye en el primer caso un factor de riesgo que es necesario evaluar, por la posible transmisión de los transgenes incorporados artificialmente a otros organismos con los que estén en estrecho contacto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los riesgos de la Transferencia Génica Horizontal, en bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*), que en algunos casos coinciden con especies endofíticas y/o habitantes de las rizosfera de plantas transgénicas. Se determinó la capacidad de transformación natural de las especies con un plásmido con genes de resistencia a antibióticos, utilizado como vector para la transformación genética de plantas, y a partir del cálculo de las frecuencias de transformación de cada especie se establecieron varios niveles de riesgo. Se obtuvieron bacterias no transformadas y otras que sí lo fueron a frecuencias desde muy bajas, en *Escherichia coli* ($0,09 \times 10^{-7}$) hasta elevadas en *Pseudomonas stutzeri* ($266,6 \times 10^{-7}$) con lo cual los niveles de riesgo abarcaron entre insignificantes y altos. Por los resultados obtenidos, constituye un factor de riesgo la presencia en estos cultivos, de bacterias naturalmente transformables, que pueden tenerse en cuenta cuando se evalúen los riesgos que corren estas especies en contacto con plantas transgénicas.

Palabras clave: Bioseguridad, Evaluación de riesgos, Transferencia Génica Horizontal.

Abstract

ABSTRACT

Horizontal Gene Transfer is the transmission of genetic material between individuals of the same or different species by asexual way. The gene donor organisms can be genetically modified or not, in the first case it constitutes a risk factor that is necessary to evaluate, for the possible transmission from the artificially incorporated transgenes to other organisms with which they are in strait contact. The objective of this research was to evaluate the risks of the Horizontal Gene Transfer, in polluting bacterias of sugar cane (*Saccharum* spp.) *in vitro* cultures, that in some cases they coincide with endofitics species and/or inhabitants of transgenic plants rhizosphere. The capacity of natural transformation of the species was determined with a plasmid with antibiotics resistance genes, used as vector for plants genetic transformation, and on the basis of calculated transformation frequencies for each species several risk levels were established. Not transformed bacterias were obtained, and others that yes were transformed at frequencies from very low, as in *Escherichia coli* (0.09×10^{-7}) until very high in *Pseudomonas stutzeri* ($266,6 \times 10^{-7}$) with which the risk levels embraced between insignificant and high. In agreement with results, constitutes a risk factor the presence in these cultivations, of naturally transformable bacterias, that must be taken into account when the risks for these species in contact with transgenic plants are evaluated.

Key words: Biosafety, Horizontal Gene Transfer, Risks evaluation

Indice

INDICE

RESUMEN

ABSTACT

Páginas

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Mecanismos de TGH.....	4
2.2 Papel de la TGH en la evolución de los organismos.....	5
2.3 Influencia de la TGH en la nueva biotecnología vegetal.....	7
2.4 La TGH en el laboratorio.....	8
2.4.1 En bacterias contaminantes de los cultivos <i>in vitro</i>	8
2.5 Consecuencias de la TGH en la naturaleza a partir de cultivos transgénicos.....	8
2.6 Análisis de riesgos de la TGH basado en los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en laboratorios y en el campo.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 TGH de plásmidos bacterianos con resistencia a antibióticos o de secuencias génicas de estos, a bacterias contaminantes de los cultivos <i>in vitro</i> de la caña de azúcar.....	12
3.1.1 Obtención del ADN plasmídico a transferir	12
3.1.1.1 Comprobación de la presencia e integridad del plásmido seleccionado.....	13
3.1.2 Obtención de las bacterias contaminantes de los cultivos <i>in vitro</i> de la caña de azúcar	13

3.1.2.1 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias seleccionadas.....	13
3.1.3 Protocolo de TGH de secuencias génicas de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos.....	14
3.1.3.1 Acciones para lograr la TGH.....	14
3.1.3.2 Comprobación de la capacidad de adquirir secuencias génicas de ADN plasmídico, por parte de las bacterias	16
3.1.3.3 Cálculo de la frecuencia de transformación en las bacterias transformadas	16
3.1.4 Comprobación de la capacidad de adquirir, por parte de las bacterias, plásmidos completos por TGH.....	17
3.2 Determinación del nivel de riesgo de la TGH de ADN plasmídico en las especies bacterianas estudiadas y evaluación general de los riesgos.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 TGH de plásmidos bacterianos con resistencia a antibióticos o de secuencias génicas de estos a bacterias contaminantes de los cultivos <i>in vitro</i> de la caña de azúcar.....	18
4.1.1 Obtención del ADN plasmídico a transferir y comprobación de su presencia e integridad.....	18
4.1.2 Obtención de las bacterias contaminantes de los cultivos <i>in vitro</i> de la caña de azúcar y pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las mismas	19
4.1.3 Protocolo de TGH de secuencias génicas de plásmidos, que confieren resistencia a antibióticos.....	21

4.1.3.1 Comprobación de la capacidad de adquirir secuencias génicas de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias.....	21
4.1.3.2 Cálculo de la frecuencia de transformación en las bacterias transformadas	21
4.1.4 Comprobación de la posibilidad de adquirir, por parte de las bacterias, plásmidos completos por TGH.....	24
4.2 Determinación del nivel de riesgo de la TGH de ADN plasmídico en las especies bacterianas estudiadas y evaluación general de los riesgos.....	25
5. DISCUSIÓN.....	26
5.1 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias seleccionadas.....	26
5.2 Adquisición de secuencias génicas de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias.....	27
5.3 Frecuencias de transformación calculadas en las especies transformadas.....	28
5.4 Adquisición de plásmidos completos por TGH en algunas especies.....	30
5.5 Evaluación de riesgos en base a los resultados obtenidos.....	30
6. CONCLUSIONES.....	33
7. RECOMENDACIONES.....	34
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	
9. ANEXOS	

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de plantas genéticamente modificadas en la agricultura ha tenido un gran auge en las últimas décadas, respecto a ello han surgido diversas opiniones; algunas personas ven en estas plantas una posible solución a los problemas que se presentan actualmente en la agricultura y la alimentación a nivel mundial, y otras piensan que pudieran constituir un riesgo para los demás organismos del ambiente en el cual se desarrollan, entre otras cosas, por la posible transferencia horizontal de genes que hacia ellos puede ocurrir; por esto último, dicho fenómeno constituye una de las mayores preocupaciones y temas debatidos alrededor de la evaluación de riesgos con relación a los cultivos transgénicos.

La Transferencia Génica Horizontal (TGH) puede definirse como la transferencia de fragmentos de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) entre células adultas de la misma especie o de especies diferentes por vía no sexual. La célula aceptora puede ser una bacteria, una célula de un hongo o una célula del colon en el sistema intestinal de un organismo multicelular (Brataas *et al.*, 2006).

La preocupación de la TGH viene dada, en parte, porque muchos de los genes con los cuales se transformaban inicialmente las plantas transgénicas iban acompañados de un gen marcador que generalmente confería resistencia a algún antibiótico. Como el proceso puede ocurrir hacia células bacterianas y puede tener lugar en el tracto gastrointestinal de los humanos y de otros animales, si tenemos en cuenta que diversas especies de bacterias viven allí y mantienen relaciones simbióticas, es lógico que pensemos que pudieran transformarse con los genes contenidos en la planta ingerida y concederles resistencia a determinados

antibióticos, con lo cual podrían comportarse como patógenos para el organismo en el cual habitan.

Muchas especies de bacterias que abundan en la rizosfera de las plantas o en los tejidos de tallos y raíces de las mismas (endofíticas), pueden también adquirir genes por vía horizontal y luego transmitirlos a otros organismos con los que pueden interactuar más tarde, convirtiéndose entonces como un enlace en el paso de transgenes entre las plantas genéticamente modificadas y estos organismos.

A pesar de los diversos estudios realizados sobre TGH en una gran variedad de hábitats donde esta puede tener lugar y con varios organismos, no se han encontrado en la literatura consultada, estudios específicos sobre la ocurrencia del proceso en bacterias contaminantes de los medios de cultivo sintéticos sobre los que se desarrollan las plantas *in vitro*. Investigaciones de este tipo pueden ser importantes si tenemos en cuenta que las plantas transgénicas antes de ser liberadas al campo pasan por esta fase, en la cual dichas bacterias pudieran adquirir genes horizontalmente y luego, sin ser detectadas, mayormente en el caso de las endofíticas, incorporarse en el ambiente y transmitirlos.

En el presente trabajo pretendemos evidenciar la posibilidad de transformación natural que pudieran tener aislados bacterianos identificados hasta el nivel de especie por Alvarado (2003) como contaminantes de los cultivos *in vitro* de plantas de caña de azúcar, como un evento de significación para la evaluación de riesgos en plantas transgénicas, puesto que algunos de estos aislados coinciden con las especies que habitan en la rizosfera de las plantas, incluidas las transgénicas, en el campo y otras son endofíticas de las mismas. De esta manera los resultados que se obtengan pueden ser tomados como base para fundamentar las medidas de

bioseguridad que se adopten con las plantas modificadas genéticamente en los estadios de cultivo en el laboratorio y en el campo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los riesgos de la Transferencia Génica Horizontal, en bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar que poseen competencia natural para aceptar ADN foráneo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar la Transferencia Génica Horizontal en especies bacterianas contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar.
- 2- Establecer el nivel de riesgo biológico que pudiera representar la transformación de estos microorganismos en condiciones de laboratorio.

Revisión Bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mecanismos de TGH

La TGH o transferencia lateral de genes es la transmisión de fragmentos definidos de ADN plasmídico o cromosomal por vía no sexual entre células adultas de la misma generación, las cuales pueden ser de la misma especie o de especies diferentes (Bertolla y Simonet, 1999). La célula que adquiere el ADN (aceptora) puede ser única como es el caso de las bacterias, organismos donde se demostró por primera vez y entre los cuales se usa con mayor frecuencia este término, o una célula de organismos multicelulares como hongos, plantas o animales. Este fenómeno ocurre naturalmente, y se puede evidenciar en los tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukaria* (Nielsen *et al.*, 1998).

Este proceso contrasta con la reproducción sexual normal entre individuos de la misma especie (transferencia vertical de genes), donde se transmiten los genes de una generación a la siguiente durante la creación de la descendencia, asegurándose una contribución casi igual de los genes de cada individuo parental a su progenie.

El ámbito de la TGH es esencialmente toda la biosfera (Ho *et al.*, 1998), se ha comprobado que ocurre en una gran variedad de hábitats agrupados en acuáticos, terrestres y el interior de organismos vivos, algunos de estos son: suelos, tracto gastrointestinal de insectos y mamíferos, y en la rizosfera de plantas entre otros. (De Vries y Wackernagel, 2004).

La TGH puede ocurrir mediante tres mecanismos fundamentales que son: la transformación natural, la conjugación y la transducción (*op. cit.*).

Transformación: Mediante este mecanismo, las bacterias captan el ADN libre del entorno y pueden integrarlo a su genoma. Es un evento que ocurre al azar y solo tiene que estar

presente el material genético libre en el ambiente y la célula aceptora. Permite la transmisión de diversos genes entre especies muy distantes filogenéticamente incluidos los eucariotas donde puede ocurrir también en menor medida.

Conjugación: Requiere el contacto físico entre las dos bacterias que se transfieren ADN, debido a que es necesaria la presencia de un pili sexual originado por plásmidos conjugativos presentes en este tipo de organismos. También puede ocurrir por transposones bajo condiciones particulares, por ejemplo, cuando un plásmido es integrado en el cromosoma y segmentos del ADN cromosómico pueden ser movilizados.

Transducción: Es el mecanismo por el cual el material genético de una bacteria pasa a otra estando contenido dentro de un virus bacteriano durante la infección, por lo que junto con el mecanismo anterior depende de elementos genéticos parásitos.

2.2 Papel de la TGH en la evolución de los organismos

Los genes ganados por transferencia horizontal pueden ser transmitidos por los organismos a sucesivas generaciones por lo cual este proceso ha desempeñado un importante papel en la evolución de los mismos a lo largo del proceso evolutivo, produciendo genomas muy heterogéneos y dinámicos, en los que cantidades importantes de ADN son incorporadas y eliminadas del cromosoma.

La importancia de la TGH en la evolución del genoma procarionte se ha inferido a partir de análisis filogenéticos (Jain *et al.*, 1999), Por ejemplo, una comparación realizada por Welch *et al.*, (2002) de tres cepas de *Escherichia coli* revela que solo el 39% del genoma es conservado y el resto difiere principalmente como una consecuencia del mencionado proceso, lo cual

refleja que gran parte de la composición de los genomas de las bacterias, no son más que el producto de genes adquiridos por vía horizontal (Keese, 2008).

Las transferencias laterales de genes entre los procariontes, o de otros tipos de organismos a ellos, han cambiado la ecología y patogenicidad de muchas especies bacterianas promoviendo su diversificación y especiación, pues estas transferencias las han hecho adquirir cualidades como resistencia a antibióticos, capacidades virulentas, y propiedades metabólicas que pueden transmitir a otras especies y que les permiten explorar nuevos hábitats, influenciando la evolución de las mismas (Friesen *et al.*, 2006).

Cuando el proceso ocurre entre bacterias y organismos genéticamente modificados con un gen de resistencia a antibiótico incorporado como marcador junto al transgén de interés, es cuando mayormente se manifiesta lo anterior. Este proceso se considera como una de las causas más importante de la resistencia a fármacos en los microorganismos. (Kay *et al.*, 2002).

El genoma de los eucariotas también ha evolucionado por TGH mediante la adquisición de genes que fluyen de generación en generación. Entre estos organismos se encuentran los protozoos ciliados y algunos insectos. En el caso de los primeros se han encontrado en su interior enzimas propias de bacterias con las cuales cohabitan en el rumen del ganado, que intervienen en la degradación de compuestos ingeridos por estos últimos (Richard *et al.*, 2006). En el caso de los insectos, algunos áfidos contienen en su interior bacterias simbiotas que les proporcionan aminoácidos esenciales escasos en su dieta, por ejemplo *Acyrtosiphon pisum* tiene como simbiota a la bacteria *Buchnera aphidicola*, de la cual se plantea que el insecto adquirió genes por TGH que le permitieron establecer simbiosis con esta y otras especies bacterianas en su interior (Nikoh y Nakabachi, 2009).

Otros eucariotas que podemos incluir en este tema son los humanos y las plantas. *Amborella trichopoda* es una especie vegetal de la cual se plantea -luego de haber realizado análisis filogenéticos comparativos con otras especies de plantas- que presenta en su genoma 26 genes foráneos ganados de estas últimas mediante TGH (Bergthorsson *et al.*, 2004). En el caso del hombre se dice que alrededor del 50% del genoma humano está compuesto de elementos genéticos móviles, y se ha originado ampliamente a través del proceso que hemos estado abordando en los diferentes momentos de nuestro pasado evolutivo (Keese, 2008).

2.3 Influencia de la TGH en la nueva biotecnología vegetal

La influencia que tiene la TGH en la nueva biotecnología vegetal caracterizada en parte por la modificación genética de plantas, se puede ver desde los puntos de vista positivo y negativo. En el primero de los casos si tenemos en cuenta que algunos genes de interés para el hombre como los que confieren resistencia a plagas, enfermedades y productos químicos y que no se encuentran en plásmidos bacterianos, pueden introducirse dentro de especies bacterianas que luego los transmitirán a las plantas y ambas introducciones son una transformación aunque no siempre sea natural. El ejemplo más conocido es *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria utilizada como un importante vector para producir plantas transgénicas (*Vox populi*), que provoca la transferencia e integración estable dentro del genoma de la planta, de genes deseados por el hombre. Aunque no es muy conocido, también se pueden transferir genes desde las plantas transgénicas hacia *A. tumefaciens* (retrotransferencia) y en el sistema radicular de la planta, una vez que la bacteria entre en contacto con otras de la rizosfera, les puede incorporar los transgenes, e incluso a la siguiente cosecha que se realice en el mismo suelo (Sessitsch, 2001). Esta es una de las formas de valorar el punto de vista negativo de la TGH en la biotecnología vegetal.

2.4 La TGH en el laboratorio

Los estudios realizados en las últimas décadas han proporcionado valiosos conocimientos sobre los procesos por los que ocurre la TGH, estos, aunque han incluido en menor medida organismos eucariotas han hecho un gran énfasis en las bacterias.

2.4.1 En bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro*

En la literatura consultada no se han encontrado estudios específicos sobre TGH en bacterias que contaminan los cultivos *in vitro* de plantas ya que estas han sido poco estudiadas (Herman, 1996), sin embargo especies reportadas por algunos autores (e.g., Alvarado, 2003) como contaminantes de los medios de cultivo mencionados si se han analizado en relación a su capacidad para aceptar ADN foráneo por TGH (e.g., Siciliano y Germida, 1999) por ser habitantes de la rizosfera de plantas transgénicas en el campo o por ser endofíticas de estas.

Sería importante estudiar el fenómeno de la TGH en bacterias que habitan los cultivos *in vitro* de plantas, porque en el caso de que estas no sean transgénicas los resultados se pudieran aplicar a la hora de evaluar los riesgos que corren estas especies bacterianas con plantas genéticamente modificadas (PGM) tanto en el laboratorio como en el campo. También porque las PGM antes de pasar al campo son cultivadas *in vitro* y ya desde esta fase se pudieran realizar los análisis de riesgos que ocasionarían al ambiente si llevaran a él una microbiota endofítica acompañante, difícil de detectar que tenga posibilidades de transformación natural y que al establecer contacto con los organismos ambientales pueda afectarlos.

2.5 Consecuencias de la TGH en la naturaleza a partir de cultivos transgénicos

Se asume que el empleo de PGM en la agricultura a nivel mundial produce grandes cantidades de ADN recombinante en los suelos (*vox populi*), ya sea cuando están estas

Revisión Bibliográfica

plantas en el campo o cuando una vez cosechadas permanecen restos de ellas en él , esto ha propiciado la preocupación de que el ADN recombinante pueda transformar la microbiota natural de la rizosfera, pues comenzando por dichos microorganismos los transgenes pueden entrar a la cadena de los procariontes y constituir un riesgo potencial asociado a la presencia de plantas transgénicas en el ambiente .(Bertolla y Simonet, 1999). También insectos y mamíferos que ingieren estas plantas pueden verse afectados si la microbiota de su interior se transformara con determinados genes, cuestión ya analizada cuando nos referimos a la influencia del fenómeno en la evolución. Por ejemplo, se han descubierto genes marcadores de resistencia a antibióticos en el polen transgénico transferido a las levaduras y bacterias habitantes de los intestinos de larvas de abejas (Jain y Lake, 1999).

Del análisis anterior nos pudiéramos preguntar si puede estar disponible el material genético de las PGM en los suelos por un tiempo tan largo, como para transformar su microbiota y constituir esto un riesgo para ella. Esta pregunta puede haber constituido la base de investigaciones enfocadas en determinar la presencia y persistencia del ADN en dicho lugar, y en su disponibilidad para bacterias competentes presentes en él.

Considerando que en los suelos existe un alto nivel de actividad DNAsa endonucleolítica de origen mayormente procariótico (Blum *et al.*, 1997), Gebhard y Smalla, (1999) esperaban como resultado de sus investigaciones que la persistencia del ADN fuese muy limitada; sin embargo, cuando el ADN aislado de restos de plantas transgénicas fue introducido en suelos no estériles, se observó la persistencia de algunas cantidades de este luego de algunos meses y pudo ser recuperado incluso dos años más tarde, Tales resultados se pueden explicar por la adsorción del ADN en la superficie de componentes minerales de los suelos

que lo hacen menos susceptible a la degradación por las DNAsas (Lorenz y Wackernagel, 1987).

2.6 Análisis de riesgos de la TGH basado en los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en laboratorios y en el campo

Para analizar los riesgos de la TGH en bacterias, tanto en aquellas que solo se cultivan en condiciones de laboratorio, como en las aisladas del ambiente y que están en contacto directo con las PGM, se estudia su capacidad de ser transformadas y se realizan cálculos de sus frecuencias de transformación. Para ello se emplean técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), así como la adquisición por parte de estos microorganismos de genes de resistencia a antibióticos (Brataas *et al.*, 2003). Esta última ha sido una de las formas clásicas de estudiar el proceso que hemos estado abordando desde que comenzaron las investigaciones en este tema (Heinemann y Traavik, 2004).

La transformación es rara en la naturaleza (Nielsen *et al.*, 1998; Gebhard y Smalla, 1999), y en condiciones de laboratorio ocurre a muy bajas frecuencias (Nielsen *et al.*, 2000; Kay *et al.*, 2002), esto nos brinda la idea de que los riesgos que tienen los microorganismos de sufrir TGH en el ambiente son bajos. La cuestión anterior está avalada por un estudio *in vivo*, realizado con bacterias tomadas directamente del suelo en el que se desarrollaban plantas transgénicas de remolacha azucarera, con el gen marcador *nptII* que codifica para la resistencia al antibiótico kanamicina; los resultados mostraron que las frecuencias de transformación de estas bacterias con dicho gen fueron muy bajas. (Nielsen y Townsend, 2004).

A pesar de que en la mayoría de la literatura actual se reflejan las bajas posibilidades de transformación natural de los microorganismos que hemos estado abordando, tanto en

Revisión Bibliográfica

condiciones de laboratorio como en condiciones de campo, y que esto a su vez sustenta que los riesgos de la TGH para ellos son bajos, el tema continua siendo cada año un objeto de estudio y el propósito de nuevas investigaciones que se desarrollan con el fin de realizar nuevos aportes a la hora de evaluar el impacto que pueden tener los cultivos transgénicos en el ambiente.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TGH de plásmidos bacterianos con resistencia a antibióticos o de secuencias génicas de estos, a bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar

3.1.1 Obtención del ADN plasmídico a transferir

Para verificar la capacidad de transformación natural de las bacterias seleccionadas para este estudio, se utilizó el plásmido pHCG 59 (Anexo 1) proveniente de una cepa bacteriana de *E. coli*, XL-1 Blue, con genes de resistencia a tres antibióticos: Ampicilina, Estreptomicina y Espectinomicina. La cepa se sembró en una placa de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo LB (Luria-Bertani, en: Sambrook y Rusel, (2001)) al que fueron incorporados los antibióticos en las siguientes cantidades: Ampicilina (50 µg/ml,) 30 µl, Estreptomicina y Espectinomicina (100 µg/ml) 15 µl respectivamente.

De la placa se seleccionaron colonias aisladas, una vez crecidas, con las cuales se realizaron precultivos para multiplicar los plásmidos siguiendo el protocolo de aislamiento de ADN plasmídico descrito en el Anexo 2 con las siguientes modificaciones: luego de adicionar 150 µl de Tris EDTA (TE) al sedimento de bacterias y agitar con el vórtex, paso número cinco, se centrifugó a 8 000 g por 2 min, se extrajo todo el TE y el sedimento se congeló durante 12 h a -20 °C. Luego se adicionó nuevamente TE en la cantidad mencionada, se agitó de igual forma y se agregaron 350 µl y 250 µl de NaOH/SDS y KacO respectivamente. Antes de mantener a 4 °C, la solución de ADN plasmídico se trató con 3 µl de RNAsa (10mg/ml) por cada 20 µl de solución durante 30 min a 37 °C.

3.1.1.1 Comprobación de la presencia e integridad del plásmido seleccionado

La presencia e integridad de los plásmidos se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y la concentración fue determinada por espectrofotometría en un espectrofotómetro *BioPhotometer*, (Eppendorf, Alemania), de luz UV a 260 nm (precisión fotométrica: 1,5%, error sistemático fotométrico $\pm 1\%$).

3.1.2 Obtención de las bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar

Las bacterias fueron suministradas por el laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) provenientes de la colección de cultivos microbianos de esta institución. Las especies, conservadas en Agar Nutriente, fueron sembradas en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo LB e incubadas a 37 °C. El listado y ubicación taxonómica de las especies se presentan en los Anexos 3 y 4 respectivamente.

3.1.2.1 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias seleccionadas

Se analizó la susceptibilidad de las bacterias frente a los antibióticos para los cuales contiene genes de resistencia el plásmido seleccionado; para ello se utilizó el método de Bauer *et al.*, (1966):

Se tomaron fragmentos de colonias de las especies y se realizaron suspensiones en tubos de eppendorf con 200 μ l de agua destilada, se agitaron posteriormente los homogenizados con el vórtex y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo LB utilizando la espátula de Drjigalsky. Una vez seco el medio de cultivo se incorporaron sobre él tres discos de antibiograma (Whatman 3MM, E.E.U.U.), cada uno con un antibiótico diferente en la siguiente

concentración total: Ampicilina (10 µg), Estreptomina (7,83 µg) y Espectinomicina (10 µg), según lo recomendado por Gavan (1974). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 a 48 h para la posterior evaluación del crecimiento.

3.1.3 Protocolo de TGH de secuencias génicas de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos

Se utilizó el método de Brataas *et al.*, (2006) descrito a continuación:

3.1.3.1 Acciones para lograr la TGH

Concentración de células bacterianas

La cantidad de células bacterianas necesarias para el experimento, 75-100 millones en 75 µl de solución salina fisiológica (SSF) al 0,85%, valorados por la escala de Mc Farland 0,5 (Jorgensen *et al.*, 1993), fue determinada por espectrofotometría a una densidad óptica de 600 nm, luz visible.

La concentración mencionada de células se obtuvo al realizar precultivos de las bacterias en tubos con 3 ml de medio LB tomando fragmentos de colonias. Los precultivos se hicieron crecer en agitación a 37 °C durante 18 h y se colectó luego el sedimento de bacterias al centrifugar a 1 500 g, este sedimento se diluyó con 500 µl de SSF y se tomaron alícuotas para cuantificar en el espectrofotómetro.

Concentración de plásmidos

El valor de la concentración del plásmido pHCG 59 se obtuvo por lectura directa en el espectrofotómetro UV a 260 nm. Se realizó la dilución también con SSF al 0,85% hasta alcanzar 10 a 20 µg de ADN en un volumen de 75 µl.

Procedimiento de la TGH

Se mezclaron ambos volúmenes de 75 µl, solución con el plásmido y solución bacteriana respectivamente, y se adicionó el volumen total en el centro de una membrana de papel de filtro de 2,25 cm de radio y con diámetro de poros 0,22 µm (Millipore, E.E.U.U.), incorporado en una placa de Petri sobre el medio de cultivo LB, para lograr el crecimiento de las bacterias en contacto con los plásmidos. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C sin ser volteadas.

Como controles positivo y negativo se utilizó una cepa de *E.coli*, XL-1-Blue, (sin el plásmido pHCG 59) con conocida capacidad para adquirir ADN foráneo por transformación química y física. Para cada control se utilizó la misma cantidad de células mencionadas en el volumen de 75 µl de SSF, en el caso del control negativo los 75 µl restantes de solución no contenían los plásmidos a diferencia del positivo que sí lo contenían en la cantidad requerida.

Posterior a la incubación los filtros fueron trasladados al interior de tubos de 50 ml de capacidad (Corning, E.E.U.U.) con 4 ml de SSF al 0.85 %.Las bacterias se resuspendieron agitando con el vórtex por 30 segundos y a partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas base 10 (10^{-1} hasta 10^{-7}) con 180 µl de SSF y 20 µl de la suspensión para poder obtener placas con un número de colonias que fuera factible contar (desde 30 hasta 300).

3.1.3.2 Comprobación de la capacidad de adquirir secuencias génicas de ADN plasmídico con resistencia a antibióticos, por parte de las bacterias

Para determinar el número de bacterias transformadas naturalmente se transfirieron a tres placas de Petri, cada una con uno de los antibióticos incorporado al medio de cultivo LB, 100 µl de los 4 ml de la suspensión (10^0 : sin diluir) obtenida de las bacterias crecidas junto al plásmido. Se usó la espátula de Drjigalsky para esparcir la solución.

El total de células presentes en los 4 ml de suspensión, número de recipientes, se determinó adicionando 100 µl de la dilución 10^{-7} en una placa con el mismo medio sin antibiótico. Fue utilizado el método anterior para esparcir la solución.

Las placas se incubaron durante tres días a 37 °C para luego contar las colonias crecidas con un contador de colonias.

3.1.3.3 Cálculo de la frecuencia de transformación en las bacterias transformadas

Se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Frecuencia de transformación} = \frac{\text{Número de transformantes}}{\text{Número de recipientes}}$$

Los resultados se dieron como frecuencia de transformación de cada bacteria usada en el experimento.

3.1.4 Comprobación de la capacidad de adquirir, por parte de las bacterias, plásmidos completos por TGH

De cada placa de Petri utilizada para contar el número de colonias transformantes naturales de las especies y con un antibiótico incorporado al medio de cultivo, se seleccionaron tres colonias y fragmentos de ellas se sembraron en placas con los otros dos antibióticos por separado. Aquellas colonias que crecieron se inocularon en una placa con los tres antibióticos juntos adicionados en el medio de cultivo, tomando fragmentos de la colonia original; de ahí se seleccionaron colonias y se realizaron precultivos para aislar el presunto ADN plasmídico por el método descrito en el Anexo 2 y se comprobó la presencia de los plásmidos mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. Se tomó como marcador el plásmido pHCG 59 aislado de la cepa de *E. coli* XL-1 Blue.

3.2 Determinación del nivel de riesgo de la TGH de ADN plasmídico en las especies bacterianas estudiadas y evaluación general de los riesgos.

Los niveles de riesgos de la TGH se determinaron sobre la base de los resultados obtenidos a partir de la transformación o no de las bacterias, y en el caso de las transformadas se tuvieron en cuenta las frecuencias calculadas para cada especie. Se realizó una evaluación cualitativa estableciendo los siguientes niveles: insignificantes, bajos, moderados y altos, propuestos por La Rosa *et al.*, (2006).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 TGH de plásmidos bacterianos con resistencia a antibióticos o de secuencias génicas de estos a bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar

4.1.1 Obtención del ADN plasmídico a transferir y comprobación de su presencia e integridad

Los plásmidos en cada purificación efectuada se obtuvieron a una concentración que fue desde 22,3 a 38,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, su integridad pudo ser verificada al observarse la presencia de isoformas en el gel de agarosa al 0,8% cuando se realizó la electroforesis (Fig. 1).

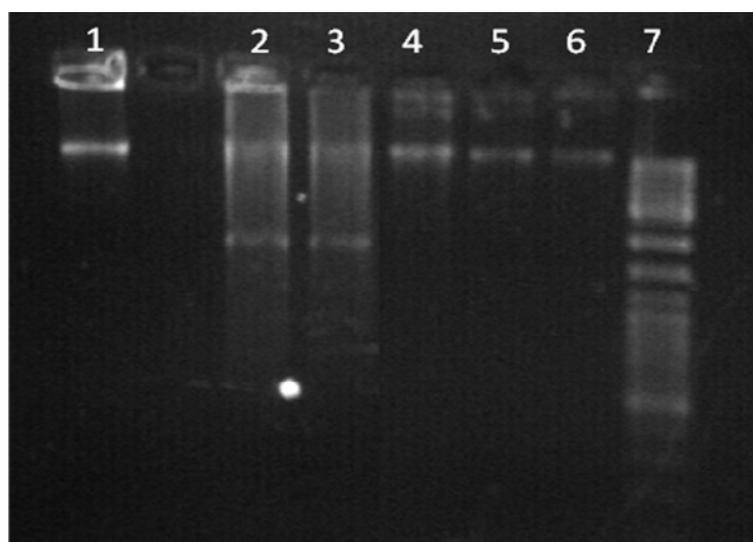


Figura 1. Gel de agarosa al 0,8% donde se observa la presencia de isoformas del plásmido pHCG 59 de la cepa de *Escherichia coli* XL-1-Blue (1-6), 7: marcador de peso molecular.

4.1.2 Obtención de las bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar y pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las mismas

Al analizar la respuesta del crecimiento de los aislados bacterianos frente a cada antibiótico se observó resistencia de forma natural frente a Ampicilina y Espectinomicina en *Bacillus pumilus* (Fig. 2a), frente a Estreptomicina en *E. coli* ATCC (Fig. 2b), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (Fig. 2c) y *Ochrobactrum antropii* que también presentó resistencia de forma natural a Espectinomicina. Los demás aislados presentaron susceptibilidad intermedia y/o sensibilidad frente a los tres antibióticos con diámetros de inhibición desde 10 mm hasta 55 mm (Fig. 2d). Todos los resultados de las pruebas de susceptibilidad se muestran en la tabla I.

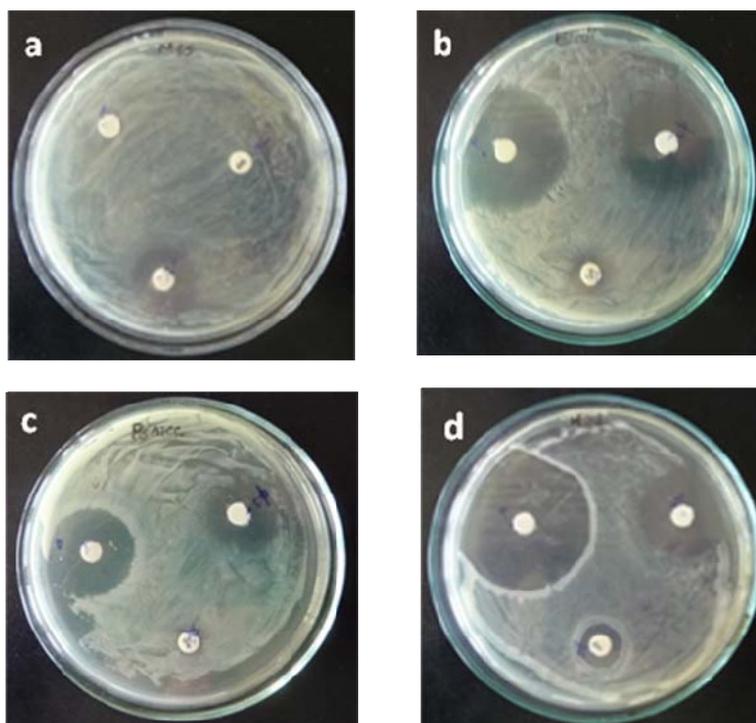


Figura 2. Placas de Petri donde se observa la presencia o no del halo de inhibición de las bacterias alrededor de los discos de antibiograma. a: *Bacillus pumilus*, b: *Escherichia coli* ATCC, c: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, d: *Stenotrophomonas maltophilia*.

Tabla I.: Diámetro de inhibición del crecimiento (mm) de las bacterias frente a los antibióticos, alrededor de los discos de antibiograma.

Especie	Ampicilina	Espectinomicina	Estreptomicina
<i>Bacillus licheniformis</i>	S (33)	S (22)	S (15)
<i>Bacillus pumilus</i>	R (0)	R (0)	S (19)
<i>Bacillus subtilis</i>	S (39)	S (24)	I (12)
<i>Burkholderia cepacia</i>	S (30)	S (22)	S (19)
<i>Corynebacterium spp.</i>	S (40)	S (22)	S (19)
<i>Escherichia coli ATCC</i>	S (33)	S (24)	R (10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S (42)	S (23)	I (12)
<i>Ochrobactrum antropii</i>	I (12)	R (13)	R (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S (55)	S (20)	S (16)
<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC</i>	S (25)	I (15)	R (0)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S (32)	S (22)	I (13)
<i>Serratia ficaria</i>	S (31)	S (22)	I (14)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S (55)	S (21)	S (15)
<i>Escherichia coli (XL-1-Blue)(Control)</i>	S (33)	S (22)	S (19)

R=Resistente, I=Intermedio, S=Sensible.

4.1.3 Protocolo de TGH de secuencias génicas de plásmidos, que confieren resistencia a antibióticos

4.1.3.1 Comprobación de la capacidad de adquirir secuencias génicas de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias

Transcurridas las 24 h de incubación de las bacterias frente a los plásmidos se observó crecimiento de las mismas sobre la membrana de filtro en todos los casos. Pasados los tres días de incubación de las placas de Petri sembradas con las diluciones realizadas a partir de las bacterias crecidas sobre los filtros, hubo crecimiento de colonias transformantes en algunas placas y en otras no. La mayoría de las especies se transformaron indistintamente para algunos antibióticos y para otros no, solamente *S. maltophilia* no resultó ser transformante natural para ninguno de los tres antibióticos, no sucedió así con *B. subtilis* y *P. aeruginosa* que adquirieron secuencias génicas que les confirieron resistencia a los tres. Los resultados de la cantidad de colonias transformantes de cada especie pueden observarse en la tabla II.

4.1.3.2 Cálculo de la frecuencia de transformación en las bacterias transformadas

En la Tabla III se presentan las frecuencias de transformación frente a cada uno de los antibióticos, para las especies que fueron transformantes naturales, la mayor frecuencia se obtuvo para *Pseudomonas stutzeri* y la menor para el control positivo de *E. coli*.

Tabla II. Colonias bacterianas crecidas en las Placas de Petri con y sin antibióticos, para determinar el número de transformantes y de recipientes respectivamente.

Especie	Número de transformantes (dilución 10 ⁰) (Placas con antibióticos)			Número de recipientes (dilución 10 ⁻⁷) Placas sin antibióticos)
	Amp.	Esp.	Est.	
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	55	4
<i>Bacillus pumilus</i>	RN	RN	0	8
<i>Bacillus subtilis</i>	45	9	476	27
<i>Burkholderia cepacia</i>	99	108	0	8
<i>Corynebacterium spp.</i>	0	554	0	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC	0	85	RN	116
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	303	259
<i>Ochrobactrum antropii</i>	0	RN	RN	46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	270	0	116	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	0	0	RN	53
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	455	800	34	3
<i>Serratia ficaria</i>	0	0	7	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	1
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue)(Control Positivo)	0	1	0	11
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue)(Control Negativo)	0	0	0	51

RN: Resistencia natural, Amp.: Ampicilina, Esp.: Espectinomicina, Est.: Estreptomycinina.

Tabla III. Frecuencias de transformación calculadas para cada especie bacteriana transformante natural, frente a cada antibiótico (por 10^7 bacterias).

Especie	Frecuencias de transformación		
	Amp.	Esp.	Est.
<i>Bacillus licheniformis</i>	NT	NT	13,75
<i>Bacillus pumilus</i>	RN	RN	NT
<i>Bacillus subtilis</i>	1,66	0,33	17,62
<i>Burkholderia cepacia</i>	12,4	13,5	NT
<i>Corynebacterium spp.</i>	NT	138,5	NT
<i>Escherichia coli ATCC</i>	NT	0,73	RN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NT	NT	1,17
<i>Ochrobactrum antropii</i>	NT	RN	RN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,5	NT	5,8
<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC</i>	NT	NT	RN
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	148,3	266,6	11,3
<i>Serratia ficaria</i>	NT	NT	7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NT	NT	NT
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue)(Control Positivo)	NT	0,09	NT
<i>Escherichia coli</i> (XL-1-Blue)(Control Negativo)	NT	NT	NT

Amp.: Ampicilina; Esp.: Espectinomicina; Est.: Estreptomicina; NT: No Transformante; RN: Resistente Natural.

4.1.4 Comprobación de la posibilidad de adquirir, por parte de las bacterias, plásmidos completos por TGH

De todas las colonias transformantes seleccionadas para evaluar su crecimiento frente a los dos antibióticos diferentes al adicionado en el medio sobre el cual crecían, solo seis colonias crecieron frente a los tres antibióticos incorporados de forma independiente en el medio de cultivo. Estas colonias fueron: uno y tres de *B. subtilis* crecidas en las placas con Espectinomicina y Ampicilina respectivamente, uno y dos de *Klebsiella pneumoniae* crecidas en la placa con Estreptomomicina y de la placa donde crecía *E. coli* ATCC con Espectinomicina, las colonias uno y dos.

Al sembrar las colonias anteriores en una placa con los tres antibióticos incorporados de forma simultánea en el medio de cultivo, solo hubo crecimiento en dos casos: las colonias uno y dos de *K. pneumoniae* crecidas frente a Estreptomomicina.

Cuando se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con las muestras de ADN plasmídico aislado de estas seis colonias, se observaron diferentes patrones de bandas en el gel (Fig. 3), algunos coinciden con los del patrón utilizado y otros no, por ejemplo: fig. 3D.

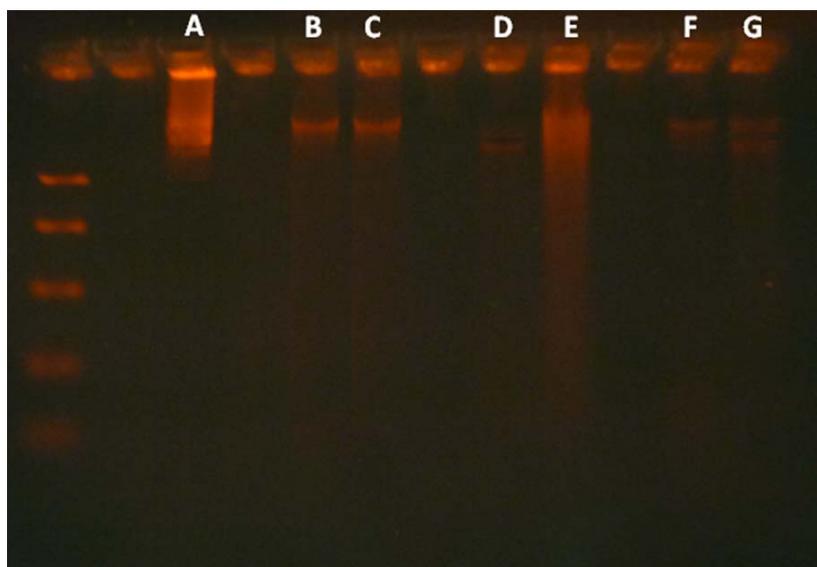


Figura 3. Gel de agarosa al 0,8 % donde se observan bandas de ADN plasmídico ubicadas en diferentes posiciones. A: bandas del plásmido pHCG 59 de *Escherichia. coli* XL 1 Blue utilizado como patrón, B y C: bandas de plásmidos de las colonias 2 y 1 respectivamente de *Klebsiella. pneumoniae* crecidas en Estreptomina, D y E: bandas de plásmidos de las colonias 1 y 2 respectivamente de *Escherichia. coli* ATCC crecidas en Espectinomicina, F y G: bandas de plásmidos de las colonias 1 y 3 de *Bacillus. subtilis* crecidas en Espectinomicina y Ampicilina respectivamente.

4.2 Determinación del nivel de riesgo de la TGH de ADN plasmídico en las especies bacterianas estudiadas y evaluación general de los mismos

Por la presencia de bacterias no transformantes y transformantes a frecuencias muy bajas como es el caso de *E. coli* (control positivo) y elevadas en *P. stutzeri*, los niveles de riesgos establecidos fueron desde insignificantes hasta altos.

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias seleccionadas.

La resistencia mostrada por determinadas especies de bacterias frente a algunos antibióticos puede ser explicada por la presencia en ellas de resistencia natural intrínseca, que no es más que la presencia de genes que al ser codificados les permiten a estos organismos crecer frente a determinado antibiótico, y que se puede expresar tanto desde plásmidos como desde el cromosoma. Teniendo en cuenta que en el presente estudio se utilizaron antibióticos pertenecientes a la familia de los aminoglucósidos (Streptomycina y Espectinomycina) y de los betalactámidos (Ampicilina), pueden sugerirse además otras explicaciones como la producción por parte de las bacterias, de enzimas como las aminoglucosidasas y betalactamasas, que inactivan a estos tipos de antibióticos respectivamente cuando la bacteria está en contacto con ellos. Pudieron haber ocurrido también, modificaciones que impidieran la llegada del antibiótico al interior de la célula, en el caso de los betalactámidos estas modificaciones constituyen mutaciones en las porinas de la pared celular y para los aminoglucósidos alteraciones en los sistemas de transporte. (Pérez, 1998).

Los argumentos anteriores para presentar resistencia frente a los aminoglucósidos pudieran ser válidos para *O. antropii*; *E. coli* ATCC, y *P. aeruginosa* ATCC. En el caso de la especie *E. coli* y del género *Pseudomonas*, para la autora citada constituyen ejemplos de bacterias que desarrollan resistencia a aminoglucósidos por modificación en los sistemas de transporte de sus paredes celulares.

Para presentar resistencia frente a ambos tipos de antibióticos, en *B. pumilus*, pudieran emplearse todas las explicaciones anteriores.

5.2 Adquisición de secuencias génicas de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias

El hecho de que algunas bacterias se transformaran y otras no como es el caso de *S. maltophilia*, pudo deberse, además de sus capacidades individuales de transformación, a que la transformación natural por la cual puede ocurrir la TGH es un fenómeno que se da al azar (De Vries y Wackernagel, 2004), esta explicación también es válida para la adquisición de determinadas secuencias génicas de resistencia a los diferentes antibióticos indistintamente en las especies transformadas.

Pudiera sugerirse además, que la incorporación de secuencias de plásmidos estuviera influenciada por las características de la pared celular de las bacterias, ya que algunas son Gram positivas, como el género *Corynebacterium* y las especies del género *Bacillus* y las demás son Gram negativas, esperándose que la transformación pueda haber ocurrido mayormente en el segundo caso donde la pared celular a pesar de ser más compleja por presentar varias capas, contiene un menor contenido de peptidoglicano, que le proporciona menor rigidez y protección a la célula, a diferencia de las Gram positivas en las que el alto contenido de este polisacárido, al formar un enrejado más denso dificultaría la entrada de ADN (Madigan y Martinko, 2006). No obstante, estos resultados no permiten apoyar tal explicación porque especies de ambos tipos de bacterias se transformaron también de manera indistinta. Sería conveniente entonces desarrollar nuevos experimentos basados en la capacidad de transformación natural donde se estudien por separado ambos grupos morfológicos de bacterias, empleando una mayor cantidad de especies, para arribar a resultados más precisos que respalden la explicación dada, a través de análisis comparativos de ambos grupos.

También al ser obtenidos los aislados en diferentes estadios del cultivo *in vitro* (Alvarado, 2003), existe la posibilidad de que algunos compuestos del medio pudieran haber ejercido su influencia en la habilidad de transformación de las bacterias, ya sea de manera positiva o negativa, como ha sido el caso de aislados obtenidos de suelo no estéril (Nielsen y Van Elsas, 2001). Sin embargo, no podemos confirmar este hecho hasta que se hagan más investigaciones al respecto.

5.3 Frecuencias de transformación calculadas en las especies transformadas

Las frecuencias de transformación obtenidas de cada especie, en el caso de las transformadas, van desde muy bajas hasta elevadas, tomando como referencia resultados alcanzados por otros autores que han abordado en sus investigaciones el mecanismo estudiado en relación a la TGH (e.g. Heinemann y Traavik, 2004; Keese, 2008; De Vries *et al.*, 2001).

Se plantea que las frecuencias de transformación son bajas en organismos eucariotas multicelulares (Keese, 2008), sin embargo se obtuvieron frecuencias de este tipo con las bacterias, que son organismos procariotas, por ejemplo en los casos de *E. coli* y *B. subtilis*. Aunque el autor citado refiere que en organismos procariotas la transformación es moderada, otros plantean que también pueden ser bajas, tanto en condiciones de laboratorio (Kay *et al.*, 2002) como en la naturaleza (Gebhard y Smalla, 1999) resultados que se ajustan más a los obtenidos en el presente estudio.

Las elevadas frecuencias de transformación en bacterias se han relacionado con la intervención de virus en el proceso de transferencia horizontal de genes mediante las

infecciones de estos elementos genéticos a las células bacterianas (Breitbart y Rohwer, 2005); esto ya implica otro mecanismo por el cual ocurre la TGH, la transducción, diferente al utilizado para evidenciar la capacidad de transformación de las bacterias y con el cual se obtuvieron frecuencias altas; con ello se pudiera decir que de la transformación natural es posible esperar altos índices de transformación entre los microorganismos trabajados.

La frecuencia de transformación más elevada obtenida para *P. stutzeri*, no concuerda con lo obtenido por De Vries *et al.*, (2001) en cuyo estudio no se detectó la toma por parte de esta especie, de ADN de plantas transgénicas modificadas con el gen *nptII* que codifica para la resistencia a kanamicina. Esto pudo deberse a dos causas: las formas de material genético empleados en ambos estudios y el lugar del cual se obtuvo la especie. Los autores referidos utilizaron ADN cromosomal de plantas y obtuvieron la bacteria de la rizosfera de estas en el campo, y en el presente trabajo se utilizó ADN plasmídico y la bacteria se aisló de medios de cultivo sintéticos que tienen incorporados compuestos que pudieran influir en la capacidad de transformación de las especies bacterianas, aspecto discutido con anterioridad (Acápite 5.2).

El hecho de que algunos de los aislados tengan un índice de transformación más alto que los anteriormente descritos, revela una situación de riesgo que tiende a acrecentarse por los sistemas de micropropagación *in vitro*, ya que el, o los transgenes pueden estabilizarse y transmitirse a sucesivas generaciones (Bošković *et al.*, 2010), impulsados aquellos por las secuencias que facilitan la transferencia (Bock, 2009).

5.4 Adquisición de plásmidos completos por TGH en algunas especies

En este aspecto, realizado con el fin de tener un elemento más a la hora de evaluar los riesgos de la TGH en las especies bacterianas, las colonias más propensas a haber adquirido el plásmido completo pueden haber sido aquellas que expresaron resistencia a los tres antibióticos.

El hecho de que las bandas de ADN plasmídico aislado de dichas colonias, en algunos casos no coincidieran exactamente con las del patrón, pudo deberse a que el plásmido una vez en el interior de las células transformadas recircularizara perdiendo secuencias, fenómeno que pudo afectar su tamaño original (Tortora, 1997).

También, que algunas poblaciones bacterianas mostraran resistencia a los antibióticos por separado y no en su conjunto, pudo deberse al cambio dinámico del número de copias del plásmido incorporado como respuesta al medio de cultivo utilizado (Galindo *et al.*, 1990), pero tendrían que realizarse más investigaciones en este sentido para obtener una respuesta convincente.

5.5 Evaluación de riesgos en base a los resultados obtenidos

Sobre la base de los resultados obtenidos a partir de la transformación de las bacterias, constituye un riesgo la presencia de especies transformables, en el caso de las que mostraron las menores frecuencias los riesgos pueden ser catalogados como insignificantes o bajos, lo cual coincide con otros estudios sobre el tema que han establecido estos mismos niveles y a

los que ya nos hemos referido. En las demás especies donde las frecuencias de transformación fueron elevadas, los riesgos catalogados como moderados o altos, no coinciden con los reportados en la literatura consultada (e.g, De Vries *et al.*, 2001).

Bacillus licheniformis y *Corynebacterium* spp .al ser habitantes de la rizosfera de plantas transgénicas según Siciliano y Germida, (1999) y comportarse como transformantes naturales en este estudio, pueden ser tomadas como base para fundamentar la medidas de bioseguridad de estas plantas y de otras que tengan asociadas de una u otra forma a estas especies.

Aunque *B. pumilus* no mostró transformación natural, también se puede tener en cuenta para el análisis anterior.

Aunque los autores referidos no identifican en su estudio especies particulares del género *Pseudomonas* que son endofíticas o rizosféricas, los resultados con las especies de este género también pueden ser tomados en consideración, mayormente con *P. stutzeri* que mostró la frecuencia de transformación más alta y que ha sido también descrita por Lorenz y Wackernagel, (1994).

Estos hallazgos muestran la posibilidad que existe de liberar hacia el campo, junto a las plantas transgénicas, una microbiota acompañante ya transformada en el caso de las que coinciden con las endofíticas. Pero, como la investigación fue llevada a cabo con un vector artificial, el cual puede facilitar la aceptación del ADN por las bacterias llamadas naturalmente competentes (Bensasson *et al.*, 2004) y en condiciones *in vitro* óptimas para el proceso, donde no influyen los factores del ambiente en el que se desarrollan las plantas mencionadas,

podiera variar el nivel de riesgo natural que puede haber respecto a la TGH con estos microorganismos.

También constituye un factor de riesgo el hecho de que algunas bacterias hayan podido incorporar el plásmido de forma completa, si tenemos en cuenta que este vector presenta genes de resistencia a tres antibióticos, y que vectores semejantes se pudieran emplear para la transformación genética de plantas, pero, por la explicación anterior, sugerida por Bensasson *et al.*, (2004), el nivel de riesgo pudiera también variar.

Es más factible el contacto íntimo de las bacterias con las células vegetales durante los procedimientos de rutina al multiplicar las plántulas, debido a los daños que se les produce cuando se cortan para fragmentarlas. Estas superficies expuestas de tejido “desnudo” son la mejor vía para permitir a las bacterias entrar en contacto con las células dañadas, y de esta manera, con el ADN desnudo, lo cual ocurre en la naturaleza a una menor frecuencia (Nielsen *et al.*, 2001), en comparación con las manipulaciones en los laboratorios dedicados a la micropropagación. La posibilidad de intercambio de material genético fue comprobada también en el caso de los injertos (Stegemann y Bock, 2009), así puede fundamentarse también el factor de riesgo con relación a las plantas transgénicas.

No obstante a los resultados obtenidos, debe aún hacerse hincapié en la búsqueda de nuevas técnicas para aumentar la sensibilidad de los métodos actuales con respecto a la TGH en los microorganismos, y no solamente en los ensayos de campo (Heinemann y Traavik, 2004) sino también en los laboratorios de cultivos celulares de plantas.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Se constató la Transferencia Génica Horizontal en bacterias contaminantes de los cultivos *in vitro* de la caña de azúcar, transformadas bajo condiciones de laboratorio a frecuencias desde muy bajas hasta elevadas por un vector utilizado en la transformación genética de plantas.
2. Se logró establecer niveles de riesgo biológico desde insignificantes hasta altos a partir de las frecuencias con las cuales se transformaron las especies bacterianas estudiadas.
3. La capacidad que presentan estas bacterias para incorporar ADN foráneo, constituye un factor de riesgo en el caso de que estas especies también se relacionen con plantas genéticamente modificadas tanto en esta fase de cultivo como en el campo, por la posible transmisión, a otros microorganismos, de transgenes que puedan adquirir por el proceso abordado.

Recomendaciones

7. RECOMENDACIONES

1. Incluir en estudios posteriores relacionados con el tema, otros microorganismos contaminantes de los cultivos *in vitro* de plantas, por ejemplo, hongos filamentosos y levaduras.
2. Realizar el trabajo con ADN de plantas transgénicas, y para detectar la presencia de este en los microorganismos transformados, utilizar métodos de detección más sensibles tales como el PCR.
3. Extender la investigación a la microbiota que está presente tanto en la fase de adaptación de plantas transgénicas bajo condiciones controladas, como en aquella que se desarrolla en el campo junto a estas plantas en dicha fase de su establecimiento.
4. Considerar los resultados obtenidos basados en la transformación de los microorganismos empleados, cuando se evalúen los riesgos de plantas genéticamente modificadas.

Bibliografia Citada

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alvarado, C.Y. (2003): **Incidencia, identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*)**. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 98 pp.
- Bauer, A.W., W.M. Kirby, J.C. Sherris y M. Truck (1966): Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 6-493.
- Benssason, D., J.L. Boore, y K.M. Nielsen (2004): Genes without frontiers? **Heredity.** 92: 483-489.
- Bergthorsson, U., A.O. Richardson, G.J. Young, L.R. Goertzen y J.D. Palmer (2004): Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101(51): 17747-17752.
- Bertolla, F. y P. Simonet (1999): Horizontal gene transfer in the environment: Natural transformation as a putative process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. **Res. Microbiol.** 150(46): 375-384.
- Blum, S.A.E., M.G. Lorenz y W. Wackernagel (1997): Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soil. **System. Appl. Microbiol.** 20: 513-521.
- Bock, R. (2009): The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. **Trends in Plant Sci.** 15(1):11-22.
- Bošcović, J.V., Isajev, V.V., Prijić, Ž.S., Zečević, V.M., Hojka, Z.M. y G.K. Dozet, (2010): Assessing ecological risks and benefits of genetically modified crops. **Journal of Agricultural Sciences.** 55(1): 89-101.

Bibliografía Citada

- Brataas, I.O., J. Eggert, I.M. Gronsberg, J.L. Ray, C.C. Jacobsen, K.M. Nielsen, L. Nordgaard, D. Quist y A. Utness (2006): **Holistic foundations for Assessment and Regulation of Genetic Engineering and Genetically Modified Organisms – A Laboratory Manual.** University of Tromso Editorial, Tromso, Noruega, 45 pp.
- Breitbart, M. y F. Rohwer (2005): Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends Microbiol.** 13: 278-284.
- De Vries, J., P. Meier y W. Wackernagel (2001): The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. By transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. **FEMS Microbiol. Let.** 195: 211-215.
- De Vries, J. y W. Wackernagel (2004): Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. **Plant and Soil.** 266: 91-104.
- Friesen, T.L., E.H. Stuckenbrock, Z. Liu, S. Meinhardt, H. Ling, J.D. Faris, J.B. Rasmussen, P.S. Solomon, B.A. McDonald y R.P. Oliver (2006): Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. **Natur. Gen.** 38(16): 953- 956.
- Galindo, E., F. Bolivar y R. Quintero (1990): Maximizing the expresión of recombinant proteins in *Escherichia coli* by manipulation of culture conditions. **J. Ferment. Bioeng.** 69(3):159-165.
- Gavan, T. (1974): Prueba *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana. **Clin. Med. Nort. Amer.** 58: 493-504.
- Gebhard, F. y K. Smalla (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.
- Heinemann, J.A. y T. Traavik (2004): Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants **Nat. Biotechnol.** 22(12):1120-1132.

Bibliografía Citada

- Herman, E.B. (1996): Microbial contaminations of plant tissue cultures. **Agritech Consultants, INC SHRUB OAK.**
- Ho, M.W., T. Traavik, R. Olsvik, B. Tappeser, V. Howard, C. von Weizsacker, y G. McGavin (1998): Gene Technology and Gene Ecology of Infectious Diseases. **Microb. Ecol. in Health and Disease.** 10: 33-59.
- Jain, R., M.C. Rivera y J.A. Lake (1999): Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96(12):3801-3806.
- Jorgensen, J.H., R. Cleeland, W.A. Craig y G. Doern (1993): **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**-Third Edition; Approved Standard. En: NCCLS document M7-A3. 13 (25):24-25.
- Kay, E., T.M. Vogel, F. Bertolla, R. Nalin, y P. Simonet (2002): In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(12): 3345-3351.
- Keese, P. (2008): Risks from GOMs due to Horizontal Gene Transfer. **Environ. Biosafety Res. Rev.** 7: 123–149.
- La Rosa, J.,M. Lorenzo,J.J. Vilaragut, L. Pastor, O. Rodríguez, T. Campos, L. García, y J. Verdera, (2006): **Organismos vivos modificados. Guía para evaluación y gestión de riesgos.** Centro Nacional de Seguridad Biológica, La Habana, Cuba. 22-35 pp.
- Lorenz, M.G. y W. Wackernagel (1987): Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 53: 2948–2952.
- Lorenz, M.G. y W. Wackernagel (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiol. Rev.** 58: 563-602.
- Madigan, M.T. y J.M. Martinko (2006): Apéndice 2: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. En: Madigan, M.T. y J.M. Martinko (2006): **Biology of**

Bibliografía Citada

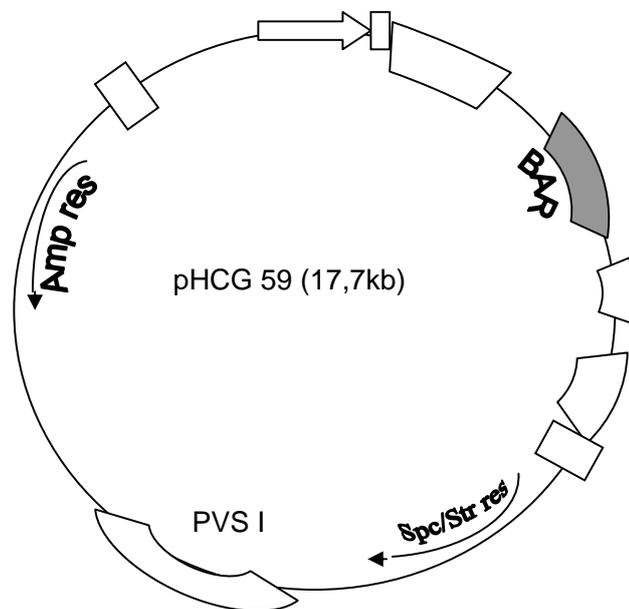
- microorganisms**, Eleven Edition. Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey, United States of America. pp. A-7–A-14.
- Nielsen, K.M., A.M. Bones, K. Smalla y J.D. van Elsas. (1998): Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? **FEMS Microbiol. Ecol. Rev.** 22: 79-103.
- Nielsen, K.M., K. Smalla, y J.D. van Elsas (2000): Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(15): 1237-1242.
- Nielsen, K.M. y J.D. van Elsas (2001): Stimulatory effects of compounds present in the rhizosphere on natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 in soil. **Soil Biol. and Biochem.** 33: 345-357.
- Nielsen, K.M., J.D. van Elsas y K. Smalla (2001): Dynamics, horizontal transfer and selection of novel DNA in bacterial populations in the phytosphere of transgenic plants. **Ann. Microbiol.** 51: 79-94.
- Nielsen, K.M. y J.P. Townsend (2004): Monitoring and modeling horizontal gene transfer. **Nat. Biotechnol.** 22(9): 1110-1114.
- Nikoh, N. y A. Nakabachi (2009): Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. **BMC Biol.** 7:12.
- Pérez, R.M.D. (1998): Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. **Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.** 22(3): 58-67
- Ricard, G., N.R. McEwan, B.E. Dutilh, J. Jouany, D. Macheboeuf, M. Mitsumori, F.M. McIntosh, T. Michalowski, T. Nagamine y C.J. Newbold (2006): Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. **BMC Genomics.** 7: 22.

Bibliografía Citada

- Sambrook, J. y D.W. Russell (2001): Apéndice 2: Media; Capítulo 1: Plasmids and their usefulness in molecular cloning. En: **Molecular cloning. A laboratory manual**. Third Edition. Cold Spring Harbor, New York, United States of America. 3: A₂₋₂; 1.33.
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann y E. Kandeler (2001): Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(9): 4215-4224.
- Siciliano, S.D. y J. Germida (1999): Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microb. Ecol.** 29: 263-272.
- Stegemann, S. y R. Bock, (2009): Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. **Science.** 324: 649-651.
- Tortora, G.J. (1997): **Microbiology: an introduction**. Six Edition. Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, California, United States of America. 232-237 pp.
- Welch, R.A., V. Burland, G. Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E.L. Buckles, S.R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G.F. Mayhew, D.J. Rose, S. Zhou, D.C. Schwartz, N.T. Perna, H.L. Mobley, M.S. Sonnenberg y F.R. Blattner (2002): Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 17020–17024.

Anexos

Anexo 1. Mapa del plásmido pHCG 59 de *Escherichia coli*, cepa: XL-1 Blue, con secuencias génicas de resistencia a los antibióticos Ampicilina (Amp res), Espectinomicina y Estreptomicina (Spc/Str res).



Anexo 2. Protocolo de aislamiento de ADN plasmídico (minialcalino). En: Sambrook y Rusel (2001).

- 1- Inocular tubos que tengan 3 ml de medio LB con la bacteria y el antibiótico correspondiente.
- 2- Dejar crecer en agitación toda la noche.
- 3- Centrifugar los precultivos en eppendorf por 5 min. a 8000 g.
- 4- Desechar totalmente el sobrenadante.
- 5- Agregar 100 µl de TE y resuspender en vórtex.
- 6- Añadir 200 µl de NaOH/SDS. Invertir 5-6 veces suavemente.
- 7- Incubar en hielo 5 min.
- 8- Añadir 150 µl de KacO 5/3 M Ph 4.8. Mezclar vigorosamente 5 a 6 veces
- 9- Incubar en hielo 10 min.
- 10- Centrifugar 10 min. a 6000 rpm.
- 11- Pasar sobrenadante a otro tubo sin tomar nada del precipitado.
- 12- Añadir 200 µl de isopropanol.
- 13- Incubar a 4°C 2 horas o a 0-20°C 30 min. o a 0-70°C 10 min.
- 14- Centrifugar a 8000 g por min.
- 15- Extraer sobrenadante con pipeta y desechar.
- 16- Agregar etanol frío al 70 % (0.5 a 1.0 ml) y mezclar por unos minutos.
- 17- Centrifugar a 8000 g por min. por 10 min. y desechar el etanol con pipeta.
- 18- Poner a secar al vacío por unos 30 min.
- 19- Resuspender con 50 µl de agua.
- 20- Guardar a 4°C o a 20°C.

Anexo 3. Cepas bacterianas utilizadas para el estudio, provenientes de la Colección de Cultivos Microbianos del laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Identificadas por Alvarado (2003).

CCIBP–Sp105: *Bacillus licheniformis* (Weigmann 1898)

CCIBP–M65: *Bacillus pumilus* (Meyer y Gottheil 1901)

CCIBP–M27: *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835)

CCIBP–E556: *Burkholderia cepacia* (Pallarini y Holmes 1981)

CCIBP–ER-25: *Corynebacterium* spp. (Lehmann y Neuman 1896)

CCIBP–E523: *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter 1886)

CCIBP–M29: *Ochrobactrum antropii* (Holmes 1988)

CCIBP–E267: *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872)

CCIBP–E437: *Pseudomonas stutzeri* (Lehmann y Neuman 1896)

CCIBP–E658: *Serratia ficaria* (Grimont, Grimont y Starr 1979)

CCIBP–E419: *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni y Bradburry 1993)

Escherichia coli (Migula 1895) ATCC 10145

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter 1872) ATCC 11775

Anexo 4. Ubicación taxonómica de las especies bacterianas utilizadas, según Madigan y Martinko, (2006).

Dominio: Bacteria

Filum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rizobiales

Familia: Brucellaceae

Género: Ochrobactrum

Especie: ***O. antropii***

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Burkholderiaceae

Género: Burkholderia

Especie: ***B. cepacia***

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: Stenotrophomonas

Especie: ***S. maltophilia***

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: Pseudomonas

Especies: ***P. aeruginosa***

P. stutzeri

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: Escherichia

Especie: ***E. coli***

Género: Klebsiella

Especie: ***K. pneumoniae***

Género: Serratia

Especie: ***S. ficaria***

Filum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

Especies: ***B. licheniformis***

B. pumilus

B. subtilis

Filum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Subclase: Actinobacteridae

Orden: Actinobacteriales

Suborden: Corynebacterineae

Familia: Corynebacteriaceae

Género: Corynebacterium

Especie: ***C. spp.***