



Proyecto UNEP-GEF



*Desarrollo de un Marco Nacional de
Bioseguridad para Costa Rica*

***EVALUACIÓN Y GESTIÓN DE
RIESGO PARA LOS
MICROORGANISMOS
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS***

Elaborado por:

JENNY MUÑOZ VALVERDE

2004

Estrategias para la Evaluación y Gestión de Riesgo para los
Microorganismos Genéticamente Modificados (MGM's) en Costa Rica.

En este documento se tomarán en cuenta los siguientes microorganismos genéticamente modificados (MGM's):

1. Microorganismos destinados a procesos industriales: los utilizados en los procesos de fermentación.
2. Microorganismos utilizados en procesos de control biológico de plagas. Ejemplos:
 - El *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)
 - Agentes modificados para el control de plagas (MPCA's) en general que controlan una plaga, inhibiendo su crecimiento y reproducción, o causándole la muerte inmediata.
3. Microorganismos como *Rhizobia* y *Mycorrhizas* utilizadas para mejorar la incorporación de nutrientes en el suelo.

Objetivos de la modificación de estos organismos

- Se han hecho introducciones de cepas genéticamente diseñadas de *rhizobia* para que refuercen las cantidades de nitrógeno en los suelos agrícolas.
- Se han intentado modificaciones para reforzar la competitividad, la especificidad, el aumento de la nodulación, la ocupación del nódulo y la fijación de nitrógeno.
- Construir una *rhizobia* capaz de infectar a plantas que no producen nódulos como el trigo y la cebada que normalmente requieren de mucho fertilizante (nitratos) para el crecimiento.
- Se manipulan las *mycorrhizas* genéticamente para conferirles resistencia a fungicidas.

¹ Ingeniera en Biotecnología. Consultora para el Proyecto: UNEP – GEF “Desarrollo de un Marco Nacional en Bioseguridad para Costa Rica” 2004.

I. Introducción

1.1. Consideraciones generales

1.1.1. Asignamiento del nivel de confinamiento de los MGM's en forma general según la UNEP – GEF 2003

Antes de llevar a cabo las actividades de uso confinado con microorganismos modificados genéticamente ha de realizarse una evaluación de riesgos, para determinar si las actividades previstas requieren medidas de contención de nivel 1, 2, 3 ó 4, por lo que:

- el nivel 1 está previsto para actividades con microorganismos modificados genéticamente que casi no plantean riesgos para la salud humana o el medio ambiente.
- el nivel 2 está previsto para actividades con microorganismos modificados genéticamente que plantean un bajo riesgo para la salud humana o el medio ambiente.
- el nivel 3 está previsto para microorganismos modificados genéticamente que plantean un riesgo medio para la salud humana o el medio ambiente.
- el nivel 4 está previsto para actividades con microorganismos modificados genéticamente que plantean un alto riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

En el caso de que el MGM sea un virus se le asignan los siguientes niveles de confinamiento esto según el Reino Unido 1995 (Tzozos, 1995)

Nivel de confinamiento 1.

- Sobre-expresión de proteínas biológicamente activas

Nivel de confinamiento 2.

- Una partícula retroviral de replicación defectiva que lleve un gen capaz de infectar células humanas.

Nivel de confinamiento 3.

- Una partícula retroviral de replicación defectiva que lleve un oncogen y capaz de infectar células humanas.

II. Evaluación y gestión del riesgo

1. Evaluación del riesgo de MGM's en general

El proceso completo de evaluación del riesgo consta de dos procedimientos, que se resumen a continuación:

Procedimiento A

Determinación de las propiedades nocivas potenciales (peligro) del MMG y clasificación del MMG en un tipo inicial (tipos 1-4) a la luz de la gravedad de los efectos nocivos potenciales, y evaluación de las probabilidades de que se den estos efectos, estudiando la exposición (tanto de personas como del medio ambiente).

Procedimiento B

Determinación de la clasificación definitiva y de las medidas de confinamiento requeridas para la actividad. Confirmación, mediante un reexamen del procedimiento 1, de que la clasificación definitiva y las medidas de confinamiento son adecuadas.

Procedimiento A

1. Determinación de las propiedades nocivas (peligro) del MMG
2. Aspectos que deben estudiarse:

2.1. Organismo receptor

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y si son vectores de transmisión de enfermedades,
- naturaleza de los vectores en relación con la capacidad de transferir o movilizar el material genético insertado, y la frecuencia de movilización,
- diversidad de hospederos (si procede),
- todo rasgo fisiológico significativo que pueda alterarse en el MMG final y, si procede, su estabilidad,
- hábitat natural y distribución geográfica,
- participación activa en procesos ambientales (tales como fijación del nitrógeno o regulación del pH),

- interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas),
- capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas).

2.2. Organismo donante

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades,
- naturaleza de los vectores,
- secuenciación,
- tipo de movilización (por ejemplo flagelos)
- presencia de genes que confieren resistencia a sustancias antimicrobianas, incluidos los antibióticos,
- diversidad de hospederos,
- otros rasgos fisiológicos pertinentes.

2.3. Inserto

- identidad y función específicas del inserto (genes),
- nivel de expresión del material genético insertado,
- fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede,
- historia de las modificaciones genéticas previas, si procede,
- situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedero debido a la inserción).

2.4. Vector

- Naturaleza y fuente del vector,
- estructura y cantidad de todo ácido nucleico del vector y / o donante que quede en la construcción final del microorganismo modificado,
- Si está presente en el MMG final, frecuencia de movilización del vector insertado y / o capacidad de transferencia de material genético.

2.5. MMG resultante

2.5.1. Aspectos de salud humana

- efectos tóxicos o alérgicos previstos del MMG y / o sus productos metabólicos,
- comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental,
- capacidad de colonización prevista,

- si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes,
- enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia,
- dosis infecciosa,
- posibilidad de supervivencia fuera del hospedero humano,
- estabilidad biológica,
- mecanismos de resistencia a los antibióticos,
- alergenicidad,
- toxicidad,
- disponibilidad de terapias apropiadas en caso de infecciones.

2.5.2. Aspectos ambientales

- ecosistemas a los que el microorganismo podría “escapar” accidentalmente a partir del sistema de confinamiento,
- supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes,
- resultados previstos de la interacción entre el microorganismo modificado y los organismos o microorganismos que pudieran verse expuestos en caso de liberación accidental al entorno,
- efectos conocidos o previstos sobre plantas y animales como, por ejemplo, patogenicidad, toxicidad, alergenicidad, vector de patógenos, resistencia a los antibióticos y colonización,
- posibles implicaciones en procesos biogeoquímicos,

3. Clasificación inicial del MMG

-Indicar la clasificación del microorganismo en los tipos del 1 al 4 (niveles de asignamiento por la UNED y GEF).

4. Evaluación de las probabilidades de que se produzcan efectos nocivos

- 4.1. Características de las actividades que vayan a realizarse.
- 4.2. Concentración y escala (producción o multiplicación)

4.3. Condiciones de cultivo

- 4.3.1. Entorno potencialmente expuesto se limita al entorno del lugar de trabajo y al área que rodea directamente las instalaciones.
- 4.3.2. Presencia de especies susceptibles
- 4.3.3. Si el entorno puede apoyar la supervivencia del MMG.
- 4.3.4. Efectos sobre el entorno físico
- 4.3.5. Determinación de la clasificación definitiva y las medidas de confinamiento
- 4.3.6. Confirmación de la idoneidad de las medidas de confinamiento definitivas

2. Evaluación del riesgo de MGM's utilizados en procesos industriales

Los siguientes factores deben ser considerados en la evaluación de los riesgos potenciales en el ambiente de los microorganismos utilizados en procesos de fermentación en caso de que sean liberados (Tzotzos, 1995):

- a. El volumen / biomasa apropiados para ser liberados.
- b. El conocimiento o comportamiento predecible del organismo, incluyendo los factores que afecten su supervivencia, multiplicación y diseminación.
- c. La descripción de los ecosistemas dentro de los cuales los organismos pueden ser diseminados, y el conocimiento de los impactos conocidos o predecibles en tales ecosistemas, incluyendo los efectos en plantas, animales y microorganismos (ejemplo: patogenicidad, toxicidad, virulencia, alergicidad, colonización, etc.).
- d. La capacidad de las técnicas para la detección, identificación y monitoreo del organismo y así como para la detección de transferencia de material genético nuevo a otro organismo.

3. Evaluación del riesgo de MGM's utilizados en procesos de control biológico de plagas (Tzotzos, 1995)

Se dispone de guías y protocolos para la evaluación de los riesgos asociados con el uso ambiental de pesticidas microbiológicos. Estas guías describen en términos generales, el tipo de datos que podrían ser requeridos. Estos son conocidos como "aspectos que deben de tomarse en consideración", y provienen de fuentes de países u organizaciones como Australia, Canadá, Nueva Zelanda, OECD y los Estados Unidos. A continuación se indican los componentes necesarios que se deben de tomar en cuenta para la liberación al ambiente de Agentes Modificados para el Control de Plagas (AMCP's).

1. Resumen de la prueba:

- Objetivo.
- Viabilidad
- Beneficios y riesgos.
- Justificación.

2. Características genéticas de los organismos (parientes y receptores):

- Identificación:
 - Descripción taxonómica.
- Genotipo:
 - Caracterización del material genético: cromosoma, transposones, plásmidos.
- Potencial para la transferencia del gen:
 - Capacidad de transducción, transformación, conjugación.
 - Evidencia de intercambio en la naturaleza con otros microorganismos.
- Fenotipo:
 - Razón lógica para la selección.
 - Cambios anticipados en el hospedero.
 - Requerimientos de cultivo, ciclo de vida, habitat.
 - Datos de patogenicidad (tipo, virulencia).
 - Resistencia antibiótica.
 - Datos de supervivencia y persistencia.
 - Mecanismos de control: agentes naturales, desinfectantes efectivos.

3. Introducción del material genético:

- Como modificar:
 - Fuente y función del ADN insertado.
 - Métodos usados para identificar, aislar e insertar el ADN.
- Vector:
 - Identificación.
 - Sitio de la inserción del gen.
 - Método de introducción al hospedero.
 - Caracterización de los genes insertados:
 - Localización, cantidad, estabilidad
 - Comparación del AMCP con parientes silvestres.
 - Datos de laboratorio que describan la supervivencia relativa, la persistencia, o multiplicación y la diseminación.

4. Consideraciones ambientales (parientes y receptores):

- Organismo:
 - Habitat.
 - Factores de supervivencia:
 - Datos del microambiente, condiciones ambientales que favorecen o desfavorecen la supervivencia y crecimiento.
 - Datos sobre la supervivencia, replicación, diseminación y potencial para interacciones biológicas.
 - Identificación de efectos adversos potenciales específicos.
- Prueba:
 - Condiciones de la prueba.
 - Localización.
 - Características del sitio:
 - Probabilidad de diseminación,
 - Confinamiento.
 - Procedimientos a ser empleados:
 - Procedimientos de confinamiento en el sitio (físicos, biológicos), procedimientos de transporte, entrenamiento del personal, procedimientos de seguridad.
- Monitoreo:
 - Procedimientos a ser empleados:
 - Descripción de las técnicas.
 - Discusión sobre datos disponibles en recolección, sensibilidad y confiabilidad de las técnicas con AMCP y parientes.
- Procedimientos de mitigación:
 - Procedimientos de finalización.
 - Procedimientos de disposición.
 - Procedimientos de desinfección.

Se asume que el agente de control biológico será liberado a larga escala y en una alta concentración y se debe de considerar los efectos ambientales en el sentido de los factores climáticos.

Aunque este organismo no tiene efecto ecológico adverso, se ha sugerido que la pérdida potencial del AMCP como agente pesticida efectivo ha sido considerado como parte de la evaluación de riesgo.

Información requerida para una evaluación de riesgos que identifica cuatro atributos:

1. La modificación genética.
2. El fenotipo del organismo de tipo silvestre
3. El fenotipo del organismo generado.
4. El ambiente específico involucrado.

Cada nivel es determinado por una modificación específica. Para evaluar la modificación genética, por ejemplo, se requiere de información acerca del carácter y de la estabilidad del ADN insertado, la naturaleza de la modificación (ejemplo, eliminación, sustitución, cambio), la función y la fuente del ADN, el vector y su fuente, así como también la información sobre cualquier vector de ARN o de ADN que permanece en el genoma modificado. Por ejemplo, si la fuente del vector o del ADN transferido es un patógeno, se requerirá información adicional, así como de la relación del vector o del ADN con la patogenicidad del donante.

Los atributos fenotípicos especifican características como el nivel de domesticación, facilidad de control, estatus de la plaga, supervivencia, rango y prevalencia del intercambio genético para los organismos de tipo silvestre y su infectividad, cambios en la utilización del sustrato, resistencia a enfermedades o enemigos naturales, así como cambios en la susceptibilidad a antibióticos y a los cambios ambientales.

En el siguiente cuadro se indica un resumen de los requerimientos de inscripción de un AMCP

Cuadro 1. Resumen de los requerimientos de inscripción de un AMCP

Análisis del producto	Toxicología	Peligros a organismos no-blanco
<p><i>Requerido:</i> Identidad del producto Proceso de manufactura Propiedades: físicas y químicas Ingredientes inactivos Submisión de la prueba</p>	<p>Toxicología aguda Incidentes de hipersensibilidad Resultados de exámenes de cultivo de tejidos (para agentes virales)</p>	<p>Efectos en: Vida silvestre terrestre y acuática. Plantas e insectos no blanco.</p>
<p><i>Puede ser requerido:</i></p>	<p>Toxicidad aguda Efectos reproductivos Oncogenicidad</p>	<p>Exámenes de patogenicidad crónica. Estudios del ciclo de vida de los peces Exámenes de campo simulado o actual</p>

Los protocolos disponibles para determinar el peligro (punto A) y la exposición (punto B) de los AMCP's comprenden:

A. Consideración sobre los datos para la evaluación de los riesgos:

1. Principios de los exámenes:

- a. Exámenes múltiples de dosis anticipadas.
- b. Máxima dosis peligrosa usada si se obtienen resultados positivos.

2. Exámenes en especies simples (no complejas):

- a. Toxicidad de una dosis oral simple.
- b. Toxicidad dietética.
- c. Bio- ensayo agudo en peces de agua dulce
- d. Exámenes de invertebrados de agua dulce.
- e. Plantas no blanco.
- f. Insectos no blanco.
- g. Especies no blanco.

B. Puntos sobre datos para la evaluación de la exposición

Datos específicos requeridos:

1. Destino biológico del gen:

- a. Hábitat del AMCP.
- b. Factores de supervivencia y replicación.
- c. Flujo génico
- d. Construcción genética, probabilidad de transferencia y expresión.
- e. Nivel de expresión.

2. Destino químico del gen:

- a. Destino del producto gen / gen en el suelo.
- b. Destino del producto gen / gen en el agua.

4. Evaluación del riesgo de microorganismos como *Rhizobia* y *Mycorrhizas*

La estructura para la evaluación del riesgo consta de varios objetivos:

- a) Identificación de los riesgos potenciales que pueden ocurrir por la nueva combinación genética.
- b) Estimación de la probabilidad de que un riesgo sea real por la evaluación de la exposición, del nivel del riesgo y de sus consecuencias, considerando sus magnitudes perjudiciales y la probabilidad de su realización.
- c) Selección o asignación de la contención apropiada y de las medidas de manejo.

4.1. Información requerida para la aplicación de liberaciones en campo de *Rhizobia* y *Mycorrhizas*

Es importante evaluar los efectos ambientales potenciales en cuanto a la familiaridad con los microorganismos particulares, sus funciones y sus ambientes designados.

La evaluación de riesgo debe incluir la siguiente información:

1. El tipo de modificación genética y las propiedades que confiere al microorganismo
2. El potencial de transferencia del gen del microorganismo que se introduce en otra microbiota.
3. Las propiedades biológicas del microorganismo, su persistencia y supervivencia.
4. El papel funcional del organismo en el ecosistema.
5. El transporte del microorganismo dentro del sitio, por métodos de aplicación, o por medios naturales (los efectos climáticos), así como por vectores mecánicos y animales.
6. Los posibles efectos en la estructura y función del ecosistema si un rasgo genético debe persistir por mucho mas tiempo o si se extendió a un ambiente no blanco o a otro organismo.
7. Medidas de contención y de manejo para la protección de la salud humana.
8. Un plan de contingencia en caso de una liberación no planeada, incluso los procedimientos de finalización.
9. Los nombres del personal responsable de la liberación, así como la localización del sitio, que incluya el número de visitas que se hacen.
10. Los planes para supervisar la salud de los empleados que llevan a cabo los experimentos, que incluya un registro profesional de experimentos efectuados, de organismos utilizados, y de los productos del gen que se expresaron.

4.2. Riesgos potenciales de la liberación de *Rhizobia* y *Mycorrhizas* nativas y genéticamente modificadas.

4.2.1. Liberación de *Rhizobia* nativa en el suelo

Las cepas de *Rhizobium* pueden ser estables una vez introducidas en el suelo, pero hay que tener cuidado con la introducción de una especie no silvestre o de una cepa seleccionada.

4.2.1.1. Liberación de MGM's en el suelo

- La preocupación se ha centrado en la supervivencia de los MGM's, en su persistencia y en la posibilidad de transferencia a los cultivos subsecuentes; su potencial para diseminar ADN genéticamente modificado a poblaciones silvestres microbianas; y su potencial para desequilibrar los procesos ecológicos.
- Se debe de conocer todos los métodos de transferencia de *Rhizobia* GM en el ambiente como: conjugación o transducción, transducción y la transformación.
- El potencial para el intercambio del gen entre microorganismos distantes relacionados dentro del ecosistema del suelo depende de: la inserción (la restricción / la modificación del ADN extraño que puede ocurrir en la célula hospedera), integración en el genoma del hospedero, establecimiento y expresión del gen.

4.2.2. La Persistencia de *Rhizobia* en el suelo: consideraciones ecológicas

Se deben de estudiar todos los factores ambientales que afectan la persistencia de los MGM's, así como la estabilidad y la expresión de su genoma, como: tipo de suelo, nutrientes, disponibilidad de humedad, pH, temperatura, químicos inhibitorios y factores biológicos como la depredación y la competencia.

4.2.3. La extensión y dispersión de *Rhizobia*

Rhizobia puede dispersarse en las parcelas durante la aplicación y lixiviación a través del suelo, también se puede esparcir por el agua, o ser diseminada por el viento, y pueden transportarse por los animales, humanos o maquinaria. Controlar la dispersión por insectos puede ser difícil en el campo.

4.2.4. La Transferencia del gen y dispersión en *Mycorrhizas*

- La dispersión de la información genética puede ocurrir a través del crecimiento vegetativo, así como de la dispersión de las esporas (cuerpos fructíferos) e hifas.
- Se debe de considerar aquellas que producen cuerpos fructíferos sobre el suelo, así como la dispersión de las esporas por el viento, por mamíferos, moluscos, el hombre y algunos insectos. Algunas *mycorrhizas* forman trufas que los animales desentierran y consumen propagando sus esporas.

4.2.5. Persistencia de las *Mycorrhizas* en el suelo

Se debe considerar en las introducciones de *mycorrhizas* GM, que éstas pueden persistir en el suelo por largos periodos de tiempo en forma de esporas, micelio, pueden estar en los tejidos de las plantas (especialmente en la madera) y como hifas en el suelo.

III. Manejo y gestión del riesgo

1. Confinamiento de MGM's utilizados en procesos industriales

1.1. Trabajo bajo confinamiento a larga escala (Tzotzos, 1995)

- El peligro del crecimiento industrial a gran escala de los MGMs es el nivel ampliado de operación, en donde se incrementa el volumen probable de escape, así como de la concentración y la duración de la exposición a los MGM's.
- Se están modificando microorganismos seguros transgénicos, por medio de la inserción de segmentos de ADN que faciliten la manufactura de nuevos productos. Aquí, no surgirán consideraciones de seguridad más allá de las ya establecidas para el producto en sí mismo.
- Hay varios pasos involucrados en el procesamiento, cada uno ellos requiere de una valoración individual: por ejemplo, considerar si hay fermentación antes del proceso.
- La vasta mayoría de aplicaciones a larga escala de MGMs, usará organismos de bajo riesgo, para garantizar solo la utilización de un confinamiento mínimo.
- El mínimo de confinamiento es conocido con la aplicación de Buenas Prácticas a Larga Escala (BPLE) (siglas en ingles GLSP). Las BPLE no involucrarán medidas de confinamiento más allá de las que el proceso necesita.

Los siguientes principios fundamentales de seguridad ocupacional e higiene deben ser aplicados para las BPLE, así como para todos los niveles de confinamiento:

- a. Se debe mantener una baja exposición al ambiente y al lugar de trabajo en relación con cualquier agente biológico, físico o químico.
- b. Se deben ejecutar las medidas de control con el uso de ropa de protección personal adecuada y de equipo especial cuando sea necesario.
- c. Se debe de examinar, cuando es necesario, la presencia de procesos orgánicos viables fuera del confinamiento físico primario.
- d. Se debe de proveer entrenamiento al personal.
- e. Se debe de formular e implementar códigos locales de práctica para la seguridad del personal.

Para permitir la designación de las BPLE, el MGM no debe ser un patógeno, debe ser seguro en el bioreactor, como en el organismo hospedero, y no debe tener consecuencias adversas en el ambiente, ya que los microorganismos serán liberados en varias etapas del proceso de fermentación y en las etapas primarias del procesamiento.

2. Confinamiento de MGM's utilizados en procesos de control biológico de plagas.

2.1. Confinamiento

Existen 2 tipos de confinamiento:

- El confinamiento físico: que implica el uso de estructuras (invernaderos) o encierros para eliminar la posibilidad de dispersión de los organismos modificados.
- El confinamiento biológico: el organismo puede ser usado o examinado en un lugar que dificulte su supervivencia y / o su dispersión.

2.2. Mitigación

- Pueden ser las técnicas de uso de químicos, tratamientos de calor, u otras formas de esterilización.
- Es posible controlar los niveles de las poblaciones microbianas mediante el uso de métodos específicos con efectos a corto, mediano o largo plazo.

El cuadro 2 describe los procedimientos para el control de microorganismos indeseables.

Cuadro 2: Control de microorganismos indeseables

Inmediato (De horas a varios días para alcanzar el efecto)	Corto plazo (Hasta tres años para alcanzar el efecto)	Largo plazo (Más de tres años para lograr el efecto)
Fumigación Inundación Químicos	Fumigación Inundación Químicos Erosión controlada Rectificaciones del suelo	Fumigación Inundación Erosión controlada Rectificaciones del suelo

También el control puede lograrse mediante la presencia de un gen represor el cual es activado mediante un componente particular en el ambiente y cualquier MPCA que contiene esta combinación de genes letales y promotores muere.

3. Medios para mitigar el riesgo potencial de *Rhizobia* y *Mycorrhizas*

- La mitigación de riesgo puede ser por desinfección y por control del gen en el ambiente.
- Por la reducción de la posibilidad de transferencia del gen a el ambiente y por la contención de la propagación.

3.1. Métodos

3.1.1. Desinfección

- Puede lograrse por esterilización a vapor (autoclave) o por aplicación de desinfectantes, pero estos métodos no pueden utilizarse en el campo, al finalizar un ensayo o en una emergencia, debido a la naturaleza heterogénea del área y a los efectos adversos en los cultivos y en los organismos asociados no blanco.
- En el campo, la desinfección se basa en el empleo de quemas y la eliminación del cultivo, en el autoclavado del residuo del cultivo y en la aplicación de químicos.

3.1.2. Construcción del gen

- Ya que el intercambio genes ocurre frecuentemente en las bacterias, es deseable usar combinaciones del gen que minimicen la posibilidad de transferencia entre ellas.

3.1.3. Control del gen en el medio ambiente

- Los genes pueden ponerse bajo control por medio de un promotor que responda a estímulos para una función intencional en el ambiente.
- En *rhizobium*, es posible inducir la expresión del gen agregando metabolitos de la planta, como los flavonoides presentes en exudados de la raíz y por consiguiente, las bacterias de *rhizobia* sólo expresarán sus genes cuando estén en presencia de una raíz de leguminosa.

3.1.4. Disminución de la transferencia del gen hacia el medio ambiente.

- En las bacterias, esto puede lograrse por la eliminación de los genes requeridos para la transferencia, en sí misma, o usando genes de autoeliminación en el caso de *rhizobium*.
- Las *mycorrhizas* GM tendrían que ser “desactivadas” para asegurar que la anastomosis por las hifas, o que la producción de ascosporas no ocurra. Las cepas diseñadas para la especificidad de la modificación asegurarían la protección de plantas no blanco.

3.2. Reducción del riesgo de supervivencia de los MGM's después de la liberación

- La supervivencia a largo plazo de MGM's liberados en el ambiente es indeseable.
- La mejor opción es el diseño de cepas con supervivencia y capacidad reproductora reducidas, con baja resistencia a cambios ambientales o con tendencia de perder la función específica de selección y los genes letales. También podrían insertarse los genes de autoeliminación a las *mycorrhizas*.

3.2.1. Detección de organismos Introducidos

- Las bacterias pueden ser detectadas e identificadas por el uso de genes marcadores.
- La detección de *ectomycorrhizas* involucra el aislamiento y el cultivo en medios con agar en el laboratorio, seguido por la inducción de los cuerpos fructíferos o por la reacción con otras cepas de verificación anteriormente conocida.
- Se puede hacer un análisis de ADN directamente extraído del suelo, pero también pueden usarse ensayos *in situ*: como métodos inmunológicos, uso de sondas específicas de ADN o de ARN homólogo, o métodos de fluorescencia.

- También pueden utilizarse modelos matemáticos para predecir el comportamiento y la dispersión de los microorganismos modificados en el ambiente.

3.2.2. Pruebas de campo

Las pruebas de campo en pequeña escala son útiles para evaluar el riesgo cuando los efectos ecológicos potenciales son grandes. No obstante, no han podido realizarse evaluaciones integrales que incluyan aspectos como la transferencia a pájaros, insectos y mamíferos.

Literatura Consultada

- Directiva 90/219/CEE del Consejo de 23 de abril de 1990 relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente <<http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-5/pdfs-es/900219es.pdf>>
- Dole, J and Persley, G.1996. Enabling the Safe Use of Biotechnology: Principles and Practice. Environmentally Sustainable Development (ESD) Studies and Monographs Series N 10. Editorial: The World Bank. Washington, USA. págs 73.
- Notas de Orientación para la Evaluación del Riesgo descrita en el anexo III de la Directiva 90/219/CEE relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente. Comunidades Europeas. <http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=es&type_doc=Decision&an_doc=2000&nu_doc=608>
- PNUMA. 1995. Directrices técnicas Internacionales del PNUMA Sobre Seguridad de la Biotecnología. Editorial: PNUMA. Nairoi – Kenya. Pág 30
- Traynor, P; Frederic, R and Koch, M. 2002. Biosafety and Risk Assessment in Agricultural Biotechnology. Publication The Agricultural Biotechnology Support Project, Institute of International Agriculture and Michigan State University USA. Págs 142.
- Tzotzos, G. 1995. Genetically Modified Organism: A Guide to Biosafety. UNIDO – ICGEB - UNEP).Editorial: CAB INTERNATIONAL United Kingdom – England. Págs 64 – 109.
- PNUMA y FMAM. 2003. Proyectos PNUMA / FMAM sobre la aplicación de marcos nacionales de bioseguridad. Guía para la aplicación de los marcos nacionales de bioseguridad. <[www.unep.ch/biosafety/pdf_files/ Impl.Guide-RegReg%20ES.pdf](http://www.unep.ch/biosafety/pdf_files/Impl.Guide-RegReg%20ES.pdf)>