

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2012-2013

Legajo Nº: 247

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: ALIPPI

NOMBRES: ADRIANA MONICA

Dirección Particular: Calle: Nº:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): alippi@biol.unlp.edu.ar adrianaalippi@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

Optimización de técnicas de control de loque americana de las abejas y caracterización de la resistencia a tetraciclinas en bacterias esporuladas aeróbicas aisladas de miel.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 1 de abril de 1986

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: 29 de diciembre de 2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata - Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI)

Facultad: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Dirección: Calle: 60 y 119 S/N

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221 4236751 int. 423

Cargo que ocupa:

- *Investigadora Principal CIC*
- *Experta a cargo del Laboratorio de Referencia de loque americana de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal)*

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

No corresponde

.....

Firma del Investigador

Fecha...../...../...

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

La República Argentina se encuentra entre los cinco principales productores mundiales de miel de abejas con una producción media de 80.000 toneladas por año, de la cual se exporta alrededor del 95% generando un ingreso aproximado de 220 millones de dólares anuales (FOB) y, como país exportador se ubica en el segundo lugar después de China, aportando el 13% del total mundial. En el país, existen 3.000.000 colmenas manejadas por 30.000 productores y, la principal área productiva es la Zona Bonaerense que concentra el 50% de la producción nacional de miel registrando los mayores rendimientos por colmena.

No obstante, en nuestro país se viene experimentando, desde hace ya algunos años, una disminución en la producción pasando de 84.000 t en el período 2000-2009, a un promedio de 60.000 t en el período 2010-2011 debido a un deficiente manejo sanitario, por una falta de capacidad organizativa y por el escaso número de asociaciones que existen en el sector, estimándose que solamente el 20 % de los productores se encuentra involucrado con algún tipo de organización. La principal limitante de la producción es un deficiente manejo sanitario de las colmenas, y, dentro de ese contexto, la enfermedad más grave de la etapa larval de las abejas (*Apis mellifera* L.) es la loque americana causada por *Paenibacillus larvae*, una bacteria Gram positiva con la capacidad de formar esporas.

Esta enfermedad es altamente contagiosa y posee problemas únicos para su prevención y control debido a que las esporas bacterianas mantienen su capacidad infectiva durante tiempo prolongado y sobreviven bajo condiciones ambientales adversas. No existen brotes estacionales ya que se manifiesta en cualquier época del año con la condición que haya cría presente en la colmena. La loque americana aparece en la lista de enfermedades de la OIE (Office International des Epizooties - Organización Mundial de la Salud Animal), que incluye enfermedades transmisibles que son consideradas de impacto socio-económico y/o de importancia para la salud pública entre países y que influyen negativamente en el comercio internacional de animales y productos de origen animal. En la Argentina se emplea oxitetraciclina como alternativa a la quema de colmenas, pero su uso indiscriminado ha generado contaminación de las mieles, alteraciones en la microbiota del apiario y selección natural de cepas bacterianas resistentes por lo que existe un creciente interés a nivel mundial en el desarrollo de métodos de control de enfermedades y plagas apícolas que no sean contaminantes para evitar presencia de residuos indeseables en la miel.

Objetivo general:

Desarrollar alternativas biológicas no contaminantes para el control de loque americana mediante el empleo de cepas bacterianas antagónicas e investigar las bases genéticas de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *Paenibacillus larvae* y otras especies de bacterias Gram (+) presentes en miel.

Los principales resultados obtenidos durante el período informado se resumen a continuación:

6.1. Se determinó la presencia del determinante *tetL* en plásmidos mobilizables aislados de

cepas de *P. larvae* con alta resistencia a tetraciclina provenientes de EE.UU. Se obtuvieron las secuencias completas de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 provenientes de las cepas del patógeno resistentes a tetraciclina (Tc) y oxitetraciclina (OTC) pero sensibles a minociclina (Mn). Dichas secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso KF 433938 para pPL373, KF 536616 para pPL374 y KF440690 para pPL395. Se demostró experimentalmente la transferencia del plásmido pPL374 en la cepa de *B. subtilis* m351 y del plásmido pPL373 en la cepa de *B. subtilis* GSY1104 mediante conjugaciones en medio líquido. Al examinar ambas cepas dadoras de *P. larvae* PL373 y PL374 mediante la técnica de lisis *in situ* se observaron dos plásmidos de aproximadamente 5.000 pb y 8.000 pb, pero sólo el plásmido más pequeño era el que contenía el gen de resistencia a Tc. Luego de efectuar la secuenciación completa de los dos plásmidos más pequeños obtenidos de las cepas pPL373 y pPL374 confirmamos que el gen de resistencia era el *tetL* y no el *tetK* como creímos en un principio y que ambos replican por el mecanismo de círculo rodante encontrado en pequeños plásmidos movilizables de alto número de copias presentes en bacterias Gram (+). Todos los experimentos de conjugación empleando la cepa PL395 conteniendo solamente el plásmido pPL395 de 5.000 bp resultaron infructuosos, no obstante el pPL395 si pudo transferirse por electroporación a una cepa de *P. larvae* Tc^S. Los plásmidos pPL373 y pPL374 también pudieron transferirse por electroporación a la misma cepa de *P. larvae* Tc^S. En todos los casos los plásmidos se mantuvieron en forma estable en sus respectivos aceptores. La presencia de plásmidos con secuencias muy similares aislados de bacterias Gram (+) provenientes de distintas zonas geográficas y de distintos nichos ecológicos (suelo, hábitats marinos, alimentos) de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, *Lactobacillus* y *Bhargavaea* sugieren que los genes *mob* presentes en dichos plásmidos están involucrados en una exitosa THG. El uso extensivo de Tc y OTC para el control de loque americana en algunos países de América pudo haber contribuido al incremento del número de cepas resistentes de *P. larvae*, favoreciendo la transferencia de estos plásmidos entre cepas del mismo patógeno o desde o hacia otras especies de bacterias Gram (+) de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Paenibacillus* que pertenecen a la microbiota de la colmena (miel, tractos digestivos de abejas adultas y larvas, superficies florales y polen). El uso prolongado de tetraciclina en las colmenas afectadas por loque americana y otras enfermedades bacterianas estaría favoreciendo la ocurrencia de eventos de transferencia genética horizontal como se demostró en cepas del patógeno provenientes de EE.UU. (**Anexos 6, 12 y 18**).

6.2. Se evaluó el desempeño diagnóstico del E-test comparándolo con el método de dilución en agar para la determinación cuantitativa de la sensibilidad/ resistencia de *Paenibacillus larvae* hacia tetraciclina y se correlacionaron las CIM obtenidas por ambos métodos comparando dos medios de cultivo aptos para el desarrollo de *P. larvae*, MYPGP e Iso-Sensi test agar®. No hubo discrepancias entre los valores de CIM obtenidos por dilución en agar y los obtenidos con E-Test en el caso del agar Iso-Sensitest, pero cuando se empleó MYPGP se encontraron diferencias entre los valores de CIM obtenidos por E-test y los obtenidos por dilución en agar, particularmente en el caso de las cepas resistentes por lo que se considera que el E-Test resulta un método satisfactorio y rápido para probar resistencia a Tc de *P. larvae* sólo si se emplea en combinación con el agar Iso-Sensitest (**Anexo 4**).

6.3. Para investigar el antagonismo entre especies bacterianas productoras de sustancias antagonicas y *Paenibacillus larvae* se utilizaron 10 cepas bacterianas de diferentes

especies de *Bacillus* y *Brevibacillus* seleccionadas a partir de resultados previos. Los sobrenadantes de las cepas provenientes de cultivos de 16 h de crecimiento a 32° C en medio tripticosa soya, fueron esterilizados por filtración y precipitados con sulfato de amonio 65 %. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de spot test utilizando la cepa *P. larvae* ATCC 9545 como indicador en comparación con cepas de *P. larvae* con diferentes genotipos de rep-PCR y provenientes de distintas regiones geográficas. Las muestras que mostraron halo de inhibición fueron ultrafiltradas y extraídas en butanol (0,7 volúmenes), evaporándose el solvente en rotavapor a presión reducida. El residuo se resuspendió en PBS y se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de spot test como se indicó previamente. Con esta metodología se obtuvieron sustancias antagónicas a partir de cultivos de *B. cereus* (cepas m6c y m 387) y de *B. licheniformis* (cepa m 347). Los componentes antagónicos se caracterizaron determinando el efecto del pH, de la temperatura y de distintas enzimas. La actividad antibacteriana es sensible a pH entre 8 y 10 y a temperaturas superiores a 70°C, en cambio se mantiene luego del tratamiento con enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina y proteinasa K, en un rango de pH entre 3 y 7. El tratamiento con otras enzimas como quimotripsina, papaína y lipasa disminuyó la actividad antimicrobiana dependiendo de la cepa de origen de las muestras evaluadas. La utilización de electroforesis en geles de poliacrilamida con tricina- SDS permitieron estimar el peso molecular entre 3,4 y 16,9 kDa. Los valores obtenidos de Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima permitieron concluir que los componentes antibacterianos resultaron bactericidas. El residuo acuoso de la extracción de butanol evaporado bajo presión reducida también mostró efecto antagónico pero con un perfil de proteínas de entre 16,9 y 26,6 Kd. Los resultados demostrarían que la actividad antagónica estaría relacionada con varios compuestos de diferente naturaleza. **(Anexo 22).**

6.4. Adicionalmente se analizó por PCR la presencia de marcadores genéticos para detectar la producción de péptidos antimicrobianos (PAM), empleando como molde ADN genómico total de cada antagonista y *primers* previamente descriptos para la amplificación de los genes requeridos para la producción de fengicina (*fenD*); bacilisina (*bacA*); iturinas (*ituC*, *ituA*, *ituD*, y *lpa-14*); bacilomicina (*bmyB*); surfactina (*srfAA*) y subtilina (*spaS*). Hasta el momento se encontró una correlación directa entre la presencia de estos genes y la inhibición bacteriana en el caso del grupo de las iturinas **(Anexo 21).**

6.5. Las especies fitopatógenas del género *Agrobacterium* inducen la formación de agallas en el cuello o la proliferación de raíces en cabellera en diversos hospedantes vegetales. Se caracterizaron 78 cepas patógenas de *Agrobacterium* aisladas de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) con síntomas de agalla de la corona **(Anexo 1)**. Ante la existencia de escasa información sobre la caracterización de la especie *Agrobacterium rubi* que afecta principalmente frambueso y arándano, adicionalmente se evaluó la diversidad de una colección de cepas aisladas de arándanos provenientes de distintas regiones de Argentina, estableciendo su grado de heterogeneidad mediante pruebas microbiológicas clásicas y técnicas de biología molecular **(Anexos 7 y 14)**.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la

publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

- 7.1.1.** **Alippi, A.M.,** López, A.C. & Balatti, P.A. Diversity among strains of four *Agrobacterium* species isolated from diseased plants of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 134: 415-430, 2012. DOI: 10.1007/s10658-012-0001-x. Holanda, ISSN 0929-1873.

Abstract: The aim of this study was to isolate, identify and analyze the diversity of the causative agents of crown galls and hairy roots from symptomatic plants of *Vaccinium corymbosum* by means of biological, biochemical and molecular tools. All the bacteria isolated from blueberries (n=78) were found to be *Agrobacterium* since they grew on three differential media, provoked cell and/or root proliferation on Kalanchoe, and contained a 730 bp partial sequence that codes for virulence genes within the virC operon found on Ti and/or Ri plasmids. Isolates were highly variable considering the ERIC-PCR patterns as well as biochemical reactions and were all represented by 7 different restriction patterns of the 16SrDNA. While most of the isolates belonged to *Agrobacterium* bv. 1 (n=33) or *Agrobacterium* bv. 2 (n=31) only fourteen were *Agrobacterium rubi*. A representative isolate of each of these three groups was further identified by sequencing the approximately 400 bp 16SrDNA. We concluded that *Vaccinium* plants are particularly susceptible to *Agrobacterium* bv. 1, *Agrobacterium* bv. 2, and also to *Agrobacterium rubi*. To our knowledge this is the first survey of *Agrobacterium* affecting blueberries in Argentina.

*Mi participación consistió en el desarrollo y puesta a punto de las técnicas para el aislamiento y detección de especies patógenas de **Agrobacterium**, aislamiento de la colección bacteriana, caracterización bioquímica de los mismos, pruebas de patogenicidad y bioensayos y redacción del manuscrito para su publicación.*

Se adjunta copia: Anexo 1

- 7.1.2.** de Graaf D.C., **Alippi A.M.,** Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S. & Genersch, E. Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1), 2013. DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11. ISSN 0021-8839.

Summary: American foulbrood is one of the most devastating diseases of the honey bee. It is caused by the spore-forming, Gram-positive rod-shaped bacterium *Paenibacillus larvae*. The recent updated genome assembly and annotation for this pathogen now permits in-depth molecular studies. In this paper, selected techniques and protocols for American foulbrood research are provided, mostly in a recipe-like format that permits easy implementation in the laboratory. Topics covered include: working with *Paenibacillus larvae*, basic microbiological techniques, experimental infection, and "omics" and other sophisticated techniques. Further, this chapter

covers other technical information including biosafety measures to guarantee the safe handling of this pathogen.

Mi participación consistió en la redacción completa del punto 3.6. Measuring susceptibility/resistance to antibiotics of Paenibacillus larvae y colaboré en la redacción y correcciones del punto 3. Basic microbiological techniques.

Se adjunta copia: Anexo 2

- 7.1.3.** López, A. C.; Minnaard, J.; Pérez, P.F. & **Alippi, A.M.** In vitro interaction between *Bacillus megaterium* strains and Caco-2 cells. *International Microbiology*, 16 (1): 27-33, 2013. DOI:10.2436/1501.01.177

Summary: To further our understanding of the virulence potential of *Bacillus megaterium* strains, cell association and invasion assays were conducted in vitro by infecting human enterocytes (Caco-2 cells) with 53 strains of this bacterium isolated from honey. Two series of experiments were performed: (i) necrosis and cell detachment assays with the supernatants of bacterial culture filtrates from 16-h cultures and (ii) adhesion/invasion assays in which cultured enterocytes incubated with bacteria from 3-h cultures were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium and chloramphenicol. The detachment of Caco-2 cells was evaluated by staining the cells with crystal violet. Necrosis was assessed by fluorescence microscopy of cells labeled with propidium iodide. Association (adhesion plus invasion) was determined by plate counts and invasion in an aminoglycoside protection assay. The results showed that spent culture supernatants detached and necrotized Caco-2 cells in a strain-dependent manner. Seven out of 53 *B. megaterium* filtered culture supernatants caused complete cell detachment. Suspensions of these same bacterial strains adhered and invaded enterocytes in 2-h infection experiments. To our knowledge, this is the first report on the interaction between *B. megaterium* and intestinal epithelial Caco-2 cells. [Int Microbiol 2013; 16(1):27-33]

En este trabajo, participé en el aislamiento y caracterización de las cepas de B. megaterium que se emplearon en los estudios de adhesión/invasión; en el análisis y discusión de los resultados y corrección del manuscrito para su publicación.

Se adjunta copia: Anexo 3

- 7.1.4.** **Alippi, A.M.;** Reynaldi, F.J. & López, A.C. Evaluación del método epsilométrico E-test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas. *Revista Argentina de Microbiología* 45 (4):257-261, 2013.

Resumen: La bacteria esporulada gram positiva *Paenibacillus larvae* es el agente causal de la loque americana de las abejas. El objetivo de este trabajo fue comparar las CIM de tetraciclina obtenidas por el método Etest y las obtenidas por el método de dilución en agar de 22 cepas del patógeno. Se encontró una concordancia de categoría del 100 % usando agar Iso-Sensitest (rango de $\pm 1 \log_2$ de dilución), mientras que con MYPGP la concordancia de categoría fue del 81,81 % (3 errores menores y 1 error muy mayor) (rango de $\pm 1 \log_2$ de dilución). Los resultados presentados sugieren que la combinación de las tiras de ETest con agar Iso-Sensi test sería una alternativa rápida y confiable para determinar las CIM de tetraciclina en *P. larvae*, sin embargo estos resultados deberán confirmarse en futuros estudios que contemplen un mayor número de aislamientos.

En este trabajo, seleccioné las cepas de mi colección bacteriana a utilizar, efectué los ensayos de laboratorio de CIM por difusión en agar y E-test y redacté el manuscrito.

Se adjunta copia: Anexo 4

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

7.2.1. Alippi, A.M. Chapter 2.16 (a) Bacterial diseases of honeybees, en el libro: Bee health and veterinarians, editado por la OIE.

Summary: The two major bacterial brood diseases affecting honeybees worldwide are European foulbrood (EFB), caused by *Melissococcus plutonius*, and American foulbrood (AFB), caused by *Paenibacillus larvae*. The spread of both diseases is facilitated by common beekeeping practices such as exchanging hives and bee materials between colonies, managing numerous hives in confined areas and the trading of queens, colonies, package bees and honey. EFB and AFB are classified within the OIE list and are considered to be of socioeconomic impact and significance in the international trade of bees and bee products. This subchapter will focus on the diagnosis, epidemiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of bacterial diseases.

Mi participación consistió en escribir el capítulo de enfermedades bacterianas de las abejas, del cual se adjuntan las pruebas de galera.

Se adjunta copia: Anexo 5

7.2.2. Alippi, A. M., León, I. & López, A.C. Comparison of tetracycline-resistance encoding plasmids from different *Paenibacillus larvae* strains isolated from commercial honeys. Aceptado: *International Microbiology*, 2014.

Abstract: American Foulbrood of honeybees is the most devastating bacterial disease affecting honeybee brood worldwide and is caused by the spore-forming Gram-positive bacterium *Paenibacillus larvae*. In most North and South American honey-producing countries, the antibiotic oxytetracycline has been used by beekeepers since last century to prevent and control AFB in honeybee colonies as an alternative to the burning of infected beehives. In the last decade, tetracycline-resistant isolates of *P. larvae* have been detected and correlated with the presence of native plasmids carrying known tetracycline resistance determinants. We presented the complete nucleotide sequences of three native plasmids isolated from different tetracycline-resistant strains of *P. larvae*. The nucleotide sequences of pPL373, pPL374 and pPI395 were almost identical varying only 0.08-0.18% indicating that they share a common origin. The three plasmids were also highly similar (99%) to those small tetracycline-encoding plasmids —pMA67, pBHS24, pBSDMV46A, pDMV2, pSU1, pAST4 and pLS55— that replicate by

the rolling circle mechanism. The nucleotide sequences comparisons suggested the presence of the same plasmid transfer origin-like site (*oriT*) and also mobilization genes (Mob) similar to those founded on pMV158 MOB family of plasmids. The main differences between pPL373, pPL374, and pPI395 and the previously reported *P. larvae* plasmid pMA67 are in the *oriT* region and Mob genes that could indicate differences in mobilization and/or conjugation capacities. pPL373, pPL374, and pPI395 were transferred separately by electroporation and stably maintained into the tetracycline-susceptible *P. larvae* NRRL B-14154 in which it autonomously replicated. Electrocompetent cells of the strain NRRLB-14154 with a characteristic red phenotype was used as a recipient, and tetracycline-resistant *P. larvae* transformants exhibiting red color were obtained. All the electrotransformants were cured by heat treatment combined with acridine orange. The cured electrotransformants recovered their original susceptible phenotype. In addition, BOX-PCR fingerprinting was used to confirm the identity of the recipient, electrotransformants, and cured strains. The presence of nearly identical plasmids in five different genera of Gram-positive bacteria, i.e., *Bhargavaea*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus* and *Sporosarcina* coming from diverse ecological niches, reaffirms the existence of a genetic transfer of this Tet-resistant plasmid among environmental bacteria from soils, food and marine habitats and pathogenic bacteria like *P. larvae*.

Mi participación consistió en efectuar el aislamiento y caracterización de los tres plásmidos de resistencia a tetraciclina, la comparación y anotación de las secuencias completas de los mismos, preparación de las células electrocompetentes, participación en los experimentos de transformación, análisis de los resultados y redacción del manuscrito final.

Se adjunta copia: Anexo 6

- 7.2.3.** Abrahamovich, E.; López, A.C. & Alippi, A.M. Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos. En prensa: *Revista Argentina de Microbiología*, 2014.

Se estudió la diversidad de una colección de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos provenientes de distintas regiones de la República Argentina estableciendo su grado de heterogeneidad mediante pruebas microbiológicas clásicas y técnicas de biología molecular. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y fisiológicas, rep-PCR y RFLP del gen 23S ADNr demostraron una alta variabilidad intra-específica tanto fenotípica como genotípica.

Mi participación consistió en el aislamiento e identificación primaria de los aislamientos bacterianos, diseño de los experimentos a realizar, análisis de resultados y corrección del manuscrito.

Se adjunta copia: Anexo 7

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

- 7.3.1.** López, A. C.; Minnaard, J.; Pérez, P. F. & Alippi, A. M. A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. Enviado: *Food Microbiology*.

Resumen: Outbreaks of *Bacillus cereus* infection/intoxication are not commonly reported because symptoms are often mild, and the disease is self-limiting. However, hypervirulent strains increase health risks. We report a case, which occurred in Argentina, of severe food

poisoning illness on a healthy adult woman associated to *Bacillus cereus* strain MVL2011. The studied strain was highly cytotoxic, showed high ability to detach Caco-2 cells and was positive for the hblA, hblB, and hblC genes of the hbl complex, bceT, entS and ces. As it is considered that *B. cereus* emetic cluster evolved from a panmictic population of diarrhoeal strains, *B. cereus* MVL2011 could constitute an intermediate strain between diarrhoeal and emetic strains.

Se adjunta copia: Anexo 8

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

No consigna

7.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

- 7.5.1. Alippi, A.M.** The reference laboratory for American Foulbrood La Plata, pp. 47-48. En: *Diseases of Honey Bees - Sub Regional Training Seminar-* P. Bastiaensen, F. Diaz, M. Allsopp, N. Mapitse & B. Mtei - OIE (World Organisation for Animal Health), 2011.

Se adjunta Copia: Anexo 9

- 7.5.2. Alippi, A.M.** Bacterial brood diseases: European Foulbrood, pp. 57-59. En: *Diseases of Honey Bees - Sub Regional Training Seminar-* P. Bastiaensen, F. Diaz, M. Allsopp, N. Mapitse & B. Mtei - OIE (World Organisation for Animal Health), 2011.

Se adjunta Copia: Anexo 10

- 7.5.3. Alippi, A.M.** Bacterial brood diseases: American Foulbrood, pp. 60-62. En: *Diseases of Honey Bees - Sub Regional Training Seminar-* P. Bastiaensen, F. Diaz, M. Allsopp, N. Mapitse & B. Mtei - OIE (World Organisation for Animal Health), 2011.

Se adjunta Copia: Anexo 11

- 7.5.4. Alippi, A.M.** Control and eradication of American Foulbrood, pp. 68-69. En: *Diseases of Honey Bees - Sub Regional Training Seminar-* P. Bastiaensen, F. Diaz, M. Allsopp, N. Mapitse & B. Mtei - OIE (World Organisation for Animal Health), 2011

Se adjunta Copia: Anexo 12

Nota: Estas comunicaciones se adjuntan al presente informe pese a que su fecha de publicación figura como del año 2011, en realidad el libro recién salió publicado en el año 2012.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

7.6.1. Informe de actividades del año 2012 del Laboratorio de Referencia de loque americana. Presentación anual a la OIE. Se adjunta copia. **Anexo 13.**

7.6.2. Informe de actividades del año 2013 del Laboratorio de Referencia de loque americana. Presentación anual a la OIE. Se adjunta copia. **Anexo 14.**

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

No consigna

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

No consigna

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

No consigna

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

No consigna

8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

No corresponde ya que no se efectuaron desarrollos tecnológicos durante el período informado.

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

Desde el año 2005 estoy a cargo del servicio de diagnóstico de la Unidad de Bacteriología del CIDEFI en temas relacionados con diagnóstico de enfermedades de origen bacteriano en cultivos de interés económico y servicio de diagnóstico de enfermedades de las abejas. También se efectúan entrenamientos personalizados en diversas técnicas desarrolladas en el laboratorio.

Durante el año 2012 se efectuaron diagnósticos en el área de Fitobacteriología con un total de 49 servicios realizados y 1 diagnóstico en el área de Sanidad Apícola. Se procesaron 167 muestras en total. Adicionalmente, se proveyeron muestras de ADN genómico total de *Paenibacillus larvae*, y cepas de referencia a otros laboratorios. Durante el año 2013 se realizaron un total de 46 servicios y se procesaron 74 muestras en total.

La facturación ascendió a \$ 131.636 para el año 2012 y \$ 99.280 para el año 2013.

Se adjunta copias de las planillas con los listados de servicios efectuados durante el período informado: Anexos 15 y 16.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

No consigna

10.2 DIVULGACIÓN

10.2.1. Entrevista para BA Noticias, "El mundo de las abejas es fascinante" 27 de octubre de 2012 http://www.youtube.com/watch?v=fR1CExtniks&feature=player_embedded#t=4s

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

1. *Becario de entrenamiento CIC*, Srta. Eliana Abrahamovich. Tema: Estudio de la biodiversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos. Acta 1352 2/8/11. Desde el 1 de octubre de 2011 al 30 de septiembre de 2012.
2. *Becaria Tipo I CONICET*: Ing. Agr. Eliana Eliana Abrahamovich. Tema: Estudios sobre la transferencia horizontal de resistencia a tetraciclina en bacterias esporuladas aisladas de colmenas de abejas melíferas. Desde el 1 de abril de 2013 a la fecha.
3. *Investigadora Asistente CONICET*: Dra. Ana Claudia López. Tema: Estudio de los factores de virulencia de cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* aisladas de miel y sus mecanismos de resistencia a tetraciclina. Desde 1 de abril de 2009 hasta la fecha.
4. *Becaria Post-doctoral ANPCyT*: Dra. Laura Bartel. Tema: Desarrollo de herramientas ecológicas para la prevención y el control de la loque americana de las abejas mediante el empleo de bacterias antagonistas aisladas de miel y/o sus metabolitos biológicamente activos en colmenas infectadas. Desde abril 2014 a la fecha.

12. DIRECCION DE TESIS. Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.

1. *Directora de Trabajo final:* Srta. Eliana Eliana Abrahamovich. Tema: “Caracterización de cepas de *Agrobacterium rubi*, bacteria patógena de frutales” Expte. No. 200-3370/12, resolución No. 44/95 de la UNLP y resolución No. 322/06 de la Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, 2012. Fecha de defensa: 26/3/13. Calificación: Sobresaliente 10. Se adjunta constancia: **Anexo 17.**
2. *Directora de Tesina de Grado:* Sta. Consuelo Mori, Tema “Análisis por PCR de péptidos antimicrobianos presentes en cepas de bacterias esporuladas aisladas de miel con propiedades antibacterianas y antifúngicas”. Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Co-directora: Dra. Ana C. López, desde mayo 2013 a la fecha.

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

13.1. Alippi, A.M. I Jornadas nacionales de tomate fresco. Organizado por: INTA- Acohofar-Fac. Cs. Agrarias y Forestales UNLP- Ministerio de Asuntos Agrarios de la Prov. de Bs. As. “Bacteriosis en el cultivo de tomate”, Resumen en Actas, pg. 28-29, Ediciones INTA. Estación Experimental Gorina, Ministerio de Asuntos Agrarios, 15 al 17 de mayo de 2012.

Participación: Oradora por invitación del Comité organizador.

13.2. Alippi, A.M. 2012 *International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control- 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology.* “Epidemiology of Tetracycline resistant strains of *Paenibacillus larvae*, the cause of American Foulbrood, in the Americas”. Resumen en Actas, pg. 80, Abstract No. 62. Buenos Aires, Argentina, Agosto 5-9, 2012. **Participación:** Oradora por invitación del Comité organizador. Se adjunta copia del resumen en Actas: **Anexo 18.**

13.3. Bolla, P.A., Minnaard, J., Rolny, I.S., López, A.C., Tiscornia, I., Bollati-Fogolín, M., **Alippi, A.M.** y Pérez, P.F. “Activación de la vía NFκB en células HT-29_{NF-KB-GFP} infectadas con *Bacillus cereus* MVL2011”. *XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos – IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos – III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos.* Resumen en Actas #0186, pg. 119 – LAS-ICMSF- DAMyC. 26 al 29 de noviembre de 2012, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Participación: Presentación de Poster. Se adjunta copia: **Anexo 19.**

13.4. López, A.C., Minnaard, J., Pérez, P.F. y **Alippi, A.M.** “Caso de intoxicación alimentaria ocasionada por la cepa de *Bacillus cereus* MVL2011 aislada de matambre de pollo”. *XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos – IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos – III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos.* Resumen en Actas # 0343, pg. 129 – LAS-ICMSF- DAMyC. 26 al 29 de noviembre de 2012, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Participación: Presentación de Poster. Se adjunta copia: **Anexo 20.**

13.5. Alippi, A.M., Minnaard, J. López, A.C. “Producción de iturinas, biológicamente activas obtenidas de cepas de distintas especies de *Bacillus* aisladas de miel”. Resumen en

Actas –S03.5 # 0358, PG. 28-29. *XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos – IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos – III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos. AAM – LAS-ICMSF- DAMyC. 26 al 29 de noviembre de 2012, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.*

Participación: Presentación oral. Se adjunta copia del resumen: **Anexo 21.**

13.6. Minnaard, J., Reynaldi, F.J., Leniz D., Albo, G.A., López, A.C. y **Alippi, A.M.** “Desarrollo de una alternativa biológica no contaminante para la prevención y el control de la loque americana de las abejas, enfermedad causada por *Paenibacillus larvae*. *XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 – II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental.* Buenos Aires, Argentina. 22-26 de septiembre de 2013.

Participación: Presentación oral. Se adjunta copia del resumen: **Anexo 22.**

13.7. Fernández, L., **Alippi, A.M.** y Gallez, L. “Biopesticidas: Efecto del propoleos sobre *Botrytis cinerea*”. *XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 – II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental.* Buenos Aires, Argentina. 22-26 de septiembre de 2013.

Participación: Presentación de Poster. Se adjunta copia: **Anexo 23.**

13.8. Abrahamovich, E., López, A.C. y **Alippi, A.M.** “Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos cultivados en Argentina”. *XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 – II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental.* Buenos Aires, Argentina. 22-26 de septiembre de 2013. **Participación:** Presentación de Poster. Se adjunta copia: **Anexo 24.**

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

No realizados durante el período informado.

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Como directora y/ o personales:

1. Subsidio Institucional otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). Resolución N° 2410/12, 21 de mayo de 2012. Responsable: **A.M. Alippi**. Monto: \$ 6.300.
2. Subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT 2012 / 0189. Tema: “Desarrollo de herramientas ecológicas para la prevención y el control de la loque americana de las abejas mediante el empleo de bacterias antagónicas aisladas de miel y/o sus metabolitos biológicamente activos en colmenas infectadas”. Investigador responsable: **A. M. Alippi**. Colaboradores: A. C. López y F. J. Reynaldi. Monto: \$ 315.000.
3. Subsidio Institucional otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). 2013. Responsable: **A.M. Alippi**. Monto: \$ 7.000.
4. Subsidio para la Asistencia de Reuniones Científicas y Tecnológicas otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC) Acta de Directorio N° 1386/13, Resolución No. 449/13, 15 de julio de 2013. Evento: “XIII Congreso

Argentino de Microbiología 2013 - II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental”,
Responsable: **A.M. Alippi**. Monto: \$ 1.000.

Como colaboradora:

1. Subsidio otorgado por CONICET PIP 2012-2014, resolución 1675, Tema: “Estudio de la actividad biológica in vitro de cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* aisladas de miel” Monto \$ 36.000, Directora: Ana C. López, Colaboradores: Jessica Minnaard y **A. M. Alippi**.

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

Durante el período 2012-2013 se generó un ingreso al laboratorio de \$ **230.916** en concepto de servicios tecnológicos a terceros que luego de descontadas las correspondientes retenciones para la Cooperadora y FCAyF (15%) se reinvertió en la compra de insumos y equipamiento menor de laboratorio.

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

- 17.1. Premio 2013: *Medalla de oro*. Honorable Cámara de Senadores de la Provincia de Buenos Aires: Mujer destacada – Foro abierto y participativo- 8 de marzo de 2013.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

1. Evaluadora externa del Programa de Crédito Fiscal, Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. , mayo de 2012.
2. Jurado de Tesis Doctoral, Area Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Tesista: Lic. Miriam Iurlina. Tema: Actividad antimicrobiana de la miel y propóleos. Mar del Plata. Defensa: Mayo de 2012. Se adjunta constancia: **Anexo 25**.
3. Evaluadora externa del Programa de Crédito Fiscal, Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As, junio de 2012.
4. Jurado de Tesis de Maestría, en Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Tesista: Víctor Manuel Tibata Rodríguez – Tema: Enfermedades con impacto sanitario y productivo en la apicultura colombiana y determinación del grado de africanización. En curso, I seminario de evaluación: octubre 2012.
5. *Reviewer* para un *Grant* del College and Community Innovation Program (NSERC), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Tema: Honey Bee Diagnostic Services in the Peace County, noviembre de 2012.
6. *Evaluadora externa* de un informe anual de investigador (CERZOS, CONICET), Tema: Control Biológico de *Nassella trichotoma* y *Nassella neesiana*, Bahía Blanca, noviembre de 2012.
7. *Jurado de Tesis de Magister Scientiae*, Faculty of Natural and Agricultural Science,

- Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa. Tema: Characterisation of the *Agrobacterium* species from woody hosts in South Africa, Diciembre de 2012.
8. *Jurado de Tesis Doctoral*, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Tesista: Bioq. Ivanna Rolny. Tema: Microorganismos intestinales: “Estudio de *Bacillus cereus* en modelos de interacción con el hospedador”. Expediente No. 0700-011716/004-2012. Fecha de defensa: Defensa: 22 de marzo de 2013. Se adjunta constancia: **Anexo 26**.
 9. *Evaluadora externa* de un informe anual de investigador (CERZOS, CONICET), Tema: Control biológico de *Araujia hortorum* (Apocynaceae), Bahía Blanca, noviembre de 2013.
 10. *Miembro de la HCA en Agronomía*, Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. De Bs. As.

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.

No consigna

20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.

- 20.1 *Reviewer* para Journal of Invertebrate Pathology, Ref. JIP-12-89 “A scientific note on the intestinal bacteria across life stages of the Japanese honeybee *Apis cerana japonica*”, Marzo, 2012.
- 20.2 *Reviewer* para Journal of Applied Microbiology – JAM, Ref. JAM-2012-0577 “Analysis and characterization of cultivable extremophilic hydrolytic bacterial community in heavy-metal-contaminated soil from the Atacama desert and their biotechnological potentials”, Abril, 2012.
- 20.3 *Reviewer* para Plurithematic issue of the OIE Scientific and Technical Review, “Recent molecular biology methods for fowlbrood and nose-mosis diagnosis”, Mayo, 2012.
- 20.4 *Consultoría* dentro del marco del Laboratorio de referencia de la OIE, Donald P. Breakwell, Department of Microbiology and Molecular Biology, Brigham Young University, Provo, USA. Provisión de una muestra del bacteriófago PPL1c para estudios genómicos, mayo de 2012.
- 20.5 *Reviewer* para Journal of Invertebrate Pathology, Manuscript Number: JIP-12-149- “Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials”, Junio de 2012.
- 20.6 *Reviewer* para Encyclopedia of Food Microbiology 2nd Edition – Elsevier, chapter: “IDENTIFICATION METHODS | RFLP”, Junio de 2012.
- 20.7 *Reviewer* para Revista Colombiana de Biotecnología, “Effective β -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in indica rice calli” Registro: 18-07, Noviembre de 2012
- 20.8 *Reviewer* para Journal of Economic Entomology, “In vitro evaluation of the effects of essential plant oils on *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American fowlbrood”, MS Number: EC-13-091, marzo de 2013.
- 20.9 *Reviewer* para Microbial Biotechnology, “The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in

- Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay”, MS Number: MICROBIO-2013-040-RA, abril de 2013.
- 20.10. *Consultoría* dentro del marco del Laboratorio de referencia de la OIE, Dr. Xu Jin Beijing Technology and Business University, St.11 # FuCheng, HaiDian District, Beijing, China. Asesoramiento en técnicas de ERIC-PCR, mayo de 2013.
- 20.11. *Reviewer* para PLOS One “PONE-D-13-43331, Properties of Bacteriocin Produced by *Bacillus cereus* Ni10 Isolated from the Intestinal Contents of the Japanese Honeybee, *Apis cerana japonica*”, Noviembre de 2013.
- 20.12. *Reviewer* para PLOS One “PONE-D-13-38625 Effect of bodily fluids from honey bee (*Apis mellifera*) larvae on growth and genome-wide transcriptional response of the causal agent of American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*)”, Noviembre de 2013.
- 20.13. *Reviewer* para BMC Microbiology MS 2052922945114461: “Methods for developing treatment strategies against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease”, Diciembre de 2013.
- 20.14. *Reviewer* para Applied and Environmental Microbiology “AEM04049-13”: Low-molecular weight metabolites secreted by *Paenibacillus larvae* as potential virulence factors of American Foulbrood, Diciembre de 2013.

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

“Optimización de técnicas de control de loque americana de las abejas y caracterización de la resistencia a tetraciclinas en bacterias esporuladas aeróbicas aisladas de miel”

Objetivos generales

- A. Desarrollar alternativas biológicas no contaminantes para el control de la loque americana de las abejas.
- B. Investigar las bases genéticas de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *Paenibacillus larvae* y otras especies de *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* comúnmente presentes en miel.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los microorganismos antagonistas (tanto esporas como células vegetativas bacterianas) sobre larvas y abejas adultas.
- Evaluar el efecto de los microorganismos antagonistas sobre células eucarióticas en cultivo.
- Investigar el antagonismo en colmenas entre especies bacterianas biológicamente activas frente a *Paenibacillus larvae* y su potencialidad como herramientas de control biológico.
- Caracterizar biocidas de origen bacteriano antagónicos frente a *P. larvae* determinando: actividad biológica, toxicidad para larvas, abejas adultas y células eucarióticas en cultivo.
- Delinear en colmenas la ruta farmacocinética de los antagonistas y/o biocidas seleccionados.

- Identificar la o las formas farmacéuticas de aplicación en colmenas más eficientes para cada microorganismo o biocida a probar que asegure su llegada al “target” (intestino de las larvas de menos de 48 hs.).
- Evaluar la actividad de los biocidas seleccionados en colmenas infectadas por loque americana.

Hipótesis de trabajo

- *Existen diversos tipos de resistencia a tetraciclina en P. larvae y la misma puede transferirse en poblaciones bacterianas en forma horizontal mediante plásmidos y/o transposones.*
- *La miel contiene bacterias esporuladas biológicamente activas frente a P. larvae e inocuas para abejas y larvas.*
- *Las bacterias esporuladas de la miel sintetizan diferentes biocidas con actividad diferencial frente a P. larvae.*
- *Estos biocidas y/o antagonistas bacterianos son inocuos para el ser humano y no contaminan la miel ni el medio ambiente.*
- *La respuesta esperada en colmenas depende de las distintas formas farmacéuticas de aplicación de los biocidas.*
- *Estos biocidas y/o antagonistas bacterianos son eficaces para su empleo en colmenas para prevención y control de loque americana mediante técnicas de manejo integrado.*

Plan de trabajo

1. Selección de cepas bacterianas con resistencia a tetraciclinas en las poblaciones de *Paenibacillus larvae* y cepas de otras especies de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* comúnmente presentes en miel.
2. Determinación de sensibilidad / resistencia antimicrobiana a tetraciclina (Tc) , oxitetraciclina (OTC) y minociclina (Mn) por técnicas de dilución en agar
3. Análisis por PCR de los genes de resistencia a tetraciclina determinando la presencia de los determinantes *tetL*, *tetK*, *tetM*, *tetA*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tet(32)* y *tetZ* que han sido citados en bacterias Gram (+)
4. Estudio de los perfiles plasmídicos de las cepas resistentes a Tc, OTC y Mn y su correlación con fenotipos resistentes
5. Selección de cepas antagonistas de *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* aisladas de miel.
6. Extracción de ADN genómico total de las cepas bacterianas de interés mediante el empleo de kits comerciales.
7. Análisis por PCR de marcadores genéticos para detectar producción de péptidos antimicrobianos (PAM) empleando como molde el ADN obtenido en 6) y primers previamente descritos para la amplificación de los genes requeridos para la producción de fengicina (*fenD*); bacilisina (*bacA*); iturinas (*ituC*, *ituA* e *ituD*); bacilomicina (*bmyB*); surfactina (*srfAA*) y subtilina (*spaS*).
8. Determinación de correlaciones entre capacidad antagónica y presencia de genes requeridos para la producción de PAM
9. Secuenciación del gen 16s rDNA para confirmar la identificación de las especies bacterianas utilizadas.
10. Purificación de los biocidas.

11. Medición de la actividad de los biocidas *in vitro* mediante la técnica del spot test.
12. Caracterización bioquímica de los biocidas obtenidos y determinación de la sensibilidad al calor, pH y actividad enzimática.
13. Pruebas de toxicidad sobre abejas adultas, larvas y células eucarióticas en cultivo.
14. Administración de preparados de biocidas y antagonistas por vía digestiva a abejas para cuantificar y evaluar cinéticamente su pasaje a larvas jóvenes y miel
15. Evaluación de antagonistas y biocidas activos para el control de loque americana en colmenas inoculadas artificialmente

Impacto sobre el sector socio-económico y/o sector productivo de la Provincia de Buenos Aires

Mediante el desarrollo de alternativas biológicas no contaminantes, este proyecto apunta hacia el manejo racional de la enfermedad bacteriana de las abejas de mayor impacto económico en nuestro país: la loque americana. El logro de un producto (miel y subproductos de la colmena) sin contaminantes químicos evitará el rechazo de embarques de miel por contaminación con residuos de antibióticos.

Las líneas de investigación desarrolladas tienen un alto impacto para la región bonaerense habida cuenta que la Provincia de Buenos Aires concentra más del 50% de la producción total de miel de la Argentina y registra los mayores rendimientos por colmena. Con el logro de los objetivos propuestos, los apicultores obtendrán un producto final apto para ser comercializado como miel orgánica, que posee un mayor valor agregado con respecto a la miel de producción standard.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
 - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.