CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico[1]

PERIODO [2]: 2016-2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: ALIPPI

NOMBRES: Adriana Mónica

Dirección Particular: Calle: Nº:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica: 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 Nº: S/N y 119
Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 0221 4236758 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

[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 2014 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2012 al 31-12-2013, para las presentaciones bianuales.

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Existe un creciente interés en el desarrollo de métodos de control de enfermedades apícolas que ayuden a reducir el uso de agroquímicos evitando contaminación de la miel. La enfermedad más grave de la etapa larval es la loque americana causada por la bacteria esporulada Gram positiva *Paenibacillus larvae* por lo que los objetivos de este trabajo apuntan al desarrollo de microorganismos como controladores biológicos directos o como productores de biocidas activos frente al patógeno. Estos antimicrobianos naturales permitirían disponer de una alternativa deseable a los sintéticos ya que tienen baja toxicidad en mamíferos, poco efecto sobre el ambiente y amplia aceptación pública. Adicionalmente, mediante la investigación de las bases moleculares de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *P. larvae* y bacterias esporuladas presentes en miel se pretende contribuir al conocimiento de la epidemiología de las cepas resistentes, evitando la difusión de las mismas.

7. 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, explicite la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

La República Argentina es el tercer productor internacional de miel con una producción media de 100.000 t anuales y un ingreso aproximado de 200 millones de dólares. No obstante, la principal limitante de la actividad apícola es un deficiente manejo sanitario y, dentro de ese contexto, la enfermedad más grave de la etapa larval de las abejas es la loque americana causada por la bacteria esporulada *Paenibacillus larvae.* Existe un creciente interés mundial en el desarrollo de métodos de control de enfermedades apícolas que ayuden a reducir el uso de agroquímicos evitando contaminación de la miel por lo que los objetivos de este proyecto se centran en desarrollar alternativas biológicas no contaminantes para el control de la loque americana de las abejas mediante el empleo de microorganismos como controladores biológicos directos o como productores de biocidas activos frente a *P. larvae*.

Las especies de *Bacillus* y *Brevibacillus* asociadas con abejas melíferas son una fuente interesante de compuestos bioactivos con usos potenciales más allá del campo de la apicultura. La mayoría de las especies de estos géneros producen una amplia gama de compuestos antimicrobianos, con actividad contra bacterias y hongos que incluye péptidos, lipopéptidos, bacteriocinas y BLIS. Con el objeto de buscar alternativas naturales para el control de loque americana y cría yesificada, se empleó una combinación de herramientas biológicas y moleculares para evaluar la actividad antagónica de 34 cepas bacterianas contra 7 cepas de *Paenibacillus larvae* y 2 cepas de *Ascosphaera apis* agentes causales de estas enfermedades.

Todas las cepas antagónicas se identificaron a nivel de especie mediante pruebas microbiológicas clásicas, perfiles metabólicos empleando las galerías API50 CHB y 20 E y por el análisis de la homología de las secuencias del gen 16S rDNA con las secuencias disponibles depositadas en el GenBank/EMBL empleando la base de datos BLASTn y limitando la búsqueda a cultivos tipo (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Todas las secuencias obtenidas se depositaron en GenBank. Se efectuó un análisis de correspondencia múltiple (MCA) para describir y analizar el potencial de los antagonistas bacterianos (n = 34) frente a *P. larvae* y *A. apis* tanto para compuestos difusibles como para volátiles empleando el software Statistica 7 (Statsoft). Los resultados obtenidos mostraron que la respuesta antagónica resultó cepa específica y

dependiente del medio de cultivo (MYPGP, ISO Sensi test y Agar cerebro corazón para *P. larvae)*. Se identificaron aquellos antagonistas activos frente a 7 cepas de *P. larvae* provenientes de distintos orígenes geográficos y con perfiles diferenciales de rep-PCR, incluyendo 2 cepas de Colecciones Internacionales). Con respecto a la actividad antagónica *in vitro* de estas cepas frente a *Ascosphaera apis,* se observó una muy alta capacidad antagónica de *B. subtilis, Br. laterosporus* y *Br. borstelensis* en los ensayos por difusión. A pesar de la variabilidad observada al probar compuestos difusibles y volátiles, se seleccionaron los antagonistas más potentes contra uno o ambos patógenos. La presencia de secuencias homólogas a 6 genes que codifican para la síntesis de los péptidos antimicrobianos bacilomicina L (*bmy*B), fengicina (*fen*D), bacilisina (*bac*A), subtilina (*spaS*), Iturina A (*itu*D, *lpa*-14; *itu*C), y Surfactina *(sfp; srfAA*) se analizó mediante PCR. La distribución y frecuencia de los genes peptídicos antimicrobianos dentro de los antagonistas bacterianos también resultó cepa-dependiente y muy variable, siendo los más frecuentes surfactinas (srfAA = 44% y lpa-14 = 38%), iturinas (ituD = 47%) y bacilisina (bacA = 32%). Este sería el primer registro de la asociación entre antagonismo y marcadores genéticos en cepas de *Bacillus* y *Brevibacillus* aisladas de fuentes de apiario para el control de *P. larvae* y *A. apis in vitro.*

Los resultados de este tema se resumen en los Anexos 4 y 10.

Adicionalmente, se caracterizaron dos compuestos de tipo bacteriocina (BLIS) obtenidos de distintas cepas de *Bacillus cereus* aisladas de la miel. Ambos BLIS mostraron una actividad inhibitoria altamente específica frente a 15 genotipos de *Paenibacillus larvae in vitro.* Ambos compuestos se caracterizaron como sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina (BLIS) y se mantuvieron estables y activos en un rango de pH de 3 a 7 y luego de un tratamiento a 70 ° C durante 30 min. La actividad antibacteriana se perdió por completo a valores de pH superiores a 8 o temperaturas superiores a 80 ° C. Los BLIS purificados de las cepas m6c m387 difirieron entre sí y de otros BLIS citados en *B. cereus* con respecto a sus pesos moleculares, actividad antibacteriana, valores de Concentración Inhibitoria Mínima y efectos de enzimas. Los hallazgos de este estudio sugieren que ambos compuestos pueden usarse potencialmente para controlar loque americana.

Estos resultados se resumen en el Anexo 1 (Minnaard y Alippi, *Letters in Applied Microbiology* 63: 442-449, 2016)

Se evaluó la eficacia del medio cromogénico HiCrome™ Bacillus Agar para efectuar una identificación rápida de bacterias esporuladas aeróbicas de la miel y confeccionar una paleta de colores. Para ello, se probaron 167 aislamientos de miel y se compararon con cepas de referencia de Colecciones Internacionales (n=21). Las placas sembradas se incubaron a 37 °C bajo condiciones aeróbicas y se evaluaron a las 24 y 48 h registrando color y aspecto de las colonias, presencia de pigmentos difusibles y cambios de coloración del medio de cultivo. Mediante el empleo de HiCrome™ Bacillus agar fue posible diferenciar *Bacillus cereus sensu lato*, *B. megaterium, B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus, B. coagulans, Paenibacillus macerans, P. alvei, P. larvae*, *P. polymyxa, Brevibacillus laterosporus*, *Br. Brevis y Lysinibacillus sphaericus*. Para la confirmación de la identidad a nivel de especie se usó una combinación de técnicas microbiológicas clásicas que incluyó: observación microscópica de las esporas y células vegetativas bacterianas determinando tamaño, ubicación dentro del esporangio, presencia de vacuolas en el citoplasma junto con una batería de pruebas bioquímicas simples (CATalasa-LECitinasa-ARAbinosa-MANitol-ALMidón-GELatina-NITrato-TIRosinasa-ANAerobiosis-INDol-HEMólisis-Vogues-Proskauer). El medio cromogénico HiCrome™ Bacillus Agar resultó eficiente en comparación con los medios de cultivo comunes para la identificación presuntiva de las especies de *Bacillus, Paenibacillus* y *Brevibacillus* aisladas de miel permitiendo una diferenciación rápida en casos de mieles que contienen más de una especie bacteriana.

Resumen de resultados en Anexo 11 y manuscrito en redacción (8.4.1).

En otro orden, y, en colaboración con el grupo de investigación del LABEA CIC, UNS, Bahía Blanca liderado por las Dras. Liliana Gallez y Leticia Fernández, se avanzó en el estudio del polen apícola, especialmente en lo referido a su caracterización microbiológica a nivel de la cadena de procesamiento diseñada por la Cooperativa Apícola Pampero. Dentro de la diversa microbiota presente en el polen, se encuentra *Bacillus cereus* que ocasiona patologías intestinales que cursan con diarrea y/o vómitos ejerciendo sus efectos biológicos mediante la producción de toxinas y otros factores de virulencia. Se evaluó la presencia de factores de virulencia en cepas de *B. cereus sensu lato* aisladas de polen para consumo humano mediante PCR y cebadores diseñados en base a secuencias homólogas a los genes *hbl*A, *hbl*B, *hbl*D, *hbl*C del complejo HBL; *ces* (cereulida); *ctyk* (citotoxina K); enterotoxina T *(Et)*, *Nhe* (complejo no hemolítico) y s*psh* (fosfolipasa C). A partir de 64 muestras analizadas se obtuvieron 54 aislamientos (84%) de *B. cereus s.l*. caracterizados por morfología de colonias, pruebas bioquímicas y observación microscópica. El 98% de los mismos contenía al menos uno de los genes analizados. Nuestros hallazgos sugieren que el polen podría vehiculizar enfermedades transmisibles por alimentos debido a la presencia de cepas de *B. cereus s.l.* conteniendo los genes necesarios para sintetizar toxinas.
En relación a esta línea de polen, los resultados se han presentado en trabajos a Congresos (Anexos 13, 16, 19 y 21) y una publicación de divulgación (Anexo 9).

Importancia del trabajo con relación a los intereses Provinciales:

La Argentina es el tercer productor y segundo exportador internacional de miel de abejas con una producción media de 100.000 t anuales, de la cual se exporta el 90% generando un ingreso aproximado de 150-200 millones de dólares anuales (FOB). En el país existen 3.000.000 de colmenas manejadas por 30.000 productores y, la principal área productiva de miel es la Provincia de Buenos Aires que concentra alrededor del 50% de la producción y registra los mayores rendimientos por colmena. La miel argentina es muy cotizada por su color claro pero está compitiendo en la franja de menores precios al venderse como materia prima a granel, sin tipificación ni control de calidad. Para explotar convenientemente los mercados de las mieles orgánicas, monoflorales y/o artesanales se requiere el ajuste de tecnología, la organización de un control de calidad y la correcta adecuación a las normativas vigentes de los países compradores. Habida cuenta de la tendencia de los mercados internacionales hacia productos diferenciales por calidad u origen botánico, la Argentina cuenta con un extraordinario potencial para desarrollar estos productos, pudiendo generar un incremento extra de hasta el 30% en el precio de venta internacional. Por otra parte, la producción de alimentos, particularmente de frutos, granos y semillas, requieren el servicio de polinización que brindan las abejas. La escasez de polinizadores es actualmente una problemática seria tanto en Europa como en América del Norte, y todavía no hay una clara conciencia de ello en nuestra región. Para garantizar la sostenibilidad de la industria apícola debido a la creciente demanda de miel orgánica y la reducción de la dependencia de los antibióticos se requiere un enfoque de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que puede combinarse con agentes de control biológico producidos por bacterias aisladas de fuentes del apiario.

Dificultades

Como lo expresado en informes anteriores, no cuento con personal de apoyo ni personal técnico por lo que debo invertir parte de mi tiempo en la preparación y esterilización de todos los medios de cultivo que utilizo, lavado de material de vidrio, preparación de buffers y soluciones, colorantes, etc., como así también ocuparme del mantenimiento de los equipos del laboratorio, mantenimiento del cepario bacteriano y todo tipo de tareas administrativas.

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

8.1 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. asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra en el Repositorio CIC Digital.*

8.1.1. Minnaard J. & **Alippi, A.M.** Partial characterization of bacteriocin-like compounds from two strains of *Bacillus cereus* with biological activity against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease. *Letters in Applied Microbiology* 63: 442-449, 2016. DOI: 10.1111/lam.12665.UK. ISSN 0266-8254.

Abstract: American Foulbrood, caused by the spore-forming Gram-positive bacterium *Paenibacillus larvae,* is the most severe bacterial disease affecting honeybees worldwide. Two bacterial isolates showing specific inhibitory activity against *P. larvae* were identified as *Bacillus cereus* by 16S rDNA sequencing. Antagonistic compounds were obtained from cell-free supernatants of strains m6c and m387 growing on Trypticase Soy Broth and concentrated by NH_4SO_4 precipitation, ultrafiltration, and butanol extraction. Both compounds were characterized as bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). BLISm6c and BLISm387 were stable at 70 °C for 30 min and active in the pH range from 3 to 7. The antibacterial activity was completely lost at pH values higher than 8 or temperatures greater than 80 °C. Both BLIS have a narrow activity range and highly inhibit the growth of *Paenibacillus larvae.* BLIS m6c and BLIS m387 differ from each other and another BLIS produced by *B. cereus* concerning their molecular weights, antibacterial activity, Minimal Inhibitory Concentration values, and effects of enzymes. The findings of this study suggest that BLISm6c and BLIS m387 can potentially be used to control AFB.

Keywords: *Paenibacillus larvae*, AFB, *Bacillus cereus,* biocontrol, BLIS, bacteriocins.

Participé en el diseño experimental, efectué las pruebas de identificación de las cepas bacterianas y los ensayos de antagonismo in vitro. Redacté el manuscrito para su publicación.
Se adjunta Copia. Anexo 1 – *En repositorio CIC Digital.*

8.1.2. Wolcan S.M., Malbrán I.,Mourelos C.A, Sisterna, M. N., González, M. P., **Alippi**, **A. M**., Nico, A. &. Lori G.A. Carnation Diseases. En: Plant Disease Management. Handbook of Florist's Crops Diseases, editado por McGovern R. J. & lmer W. H.- Springer.

Abstract: Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is one of the most popular and traditional cut flowers worldwide. This species has been used extensively by breeders for centuries, and as a result many cultivated hybrids exist. Several diseases affect quality. Among fungal diseases caused by soilborne pathogens, Fusarium wilt is the most devastating carnation disease worldwide. None of the management practices currently available completely control Fusarium wilt of carnation; only the integration of different control measures allows management of the disease. The most important bacterial diseases affecting carnation are caused by *Burkholderia* species. This cut flower is affected by eight viruses that reduce the quantity and quality of production. The vegetative propagation of the crop favors the dispersal of these pathogens as well as the fungi and bacteria that colonize xylem tissues. So, meristem-tip culture of healthy mother plants is recommended. Several plant pathogenic

nematode species of different trophic habits can infect carnation. Nevertheless, only root-knot and cyst nematodes, of genera *Meloidogyne* and *Heterodera*, respectively, are of significance because of their economic impact. The integration of different control practices is the best strategy for the management of most diseases.

Key words: *Dianthus caryophyllus,* carnation*, Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi, Burkholderia andropogonis, Burkholderia caryophilli, Carnation etched ring virus*, *Carnation ringspot virus*, *Meloidogine*, *Heterodera*.

Escribí la parte 3: Bacterial and Phytoplasma diseases y participé en la corrección general del inglés del capítulo.

Se adjunta Copia del Capítulo: Anexo 2. - *En repositorio CIC Digital.*

8.1.3. Wolcan S.M., Malbrán I.,Mourelos C.A, Sisterna, M. N., González, M. P., **Alippi**, **A. M**., Nico, A. &. Lori G.A. Gypsophila Diseases. En: Plant Disease Management. Handbook of Florist's Crops Diseases, editado por McGovern R. J. & lmer W. H. -Springer.

Abstract: *G. paniculata* L ("Baby's breath"), is a worldwide crop mainly used as a filler cut flower. It is commercially propagated vegetatively to preserve the ornamental characteristics of the plant. Among fungal diseases caused by soilborne pathogens, *Phytophthora* species and *Rhizoctonia solani,* due to their irreversible rotting of plants, are the most devastating gypsophila disease worldwide. *Pythium* species and *R. solani* are especially destructive in the process of rooting cuttings. In adult plants, *Fusarium* species produce rotting of basal tissues resulting in death. Powdery mildew caused by *Erysiphe buhrii* is important on aerial parts, producing in some countries nearly 100% of disease incidence at harvest. Crown gall has been reported in all continents and few viruses and nematodes are cited.

Key words: *Gypsophila paniculata, Phytophthora nicotianae = P. parasitica, Rhizoctonia solani,* powdery mildew, *Erysiphe buhrii*, Pythium root rot, Fusarium stem rot, *Meloidogyne* spp.

Escribí la parte 3. Bacterial and Phytoplasma diseases y participé en la corrección general del inglés del capítulo.

Se adjunta Copia del Capítulo: Anexo 3 - *En repositorio CIC Digital.*

8.2 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.*

No consigna.

8.3 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.*

8.3.1. Bartel, L.C., Abrahamovich, E., Mori, C. López, A.C. & **Alippi, A.M.** Antagonism and genetic markers in *Bacillus* and *Brevibacillus* strains: potential biocontrollers of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. Enviado: Journal of Apicultural Research, 2017.

Abstract: Species of *Bacillus* and *Brevibacillus* associated with honeybees are interesting sources of bioactive compounds with potential uses beyond the field of apiculture. Most *Bacillus* species and related genera produce a broad range of antimicrobial compounds, with activity against bacteria and fungi that include peptides, lipopeptides, bacteriocins and BLIS. By using a combination of biological and molecular tools, we evaluated the antagonistic activity of 34 bacterial strains against *Ascosphaera apis* and *Paenibacillus larvae,* the causal agents of American Foulbrood and Chalkbrood diseases of honey bee larvae. Our results showed that the antagonistic response was strain-specific and species-specific, and also medium dependent. Despite the variability observed by testing diffusible and volatile compounds, we were able to select the most potent antagonists against one or both pathogens. The presence of homologous sequences to 6 genes encoding for the synthesis of the antimicrobial peptides Bacillomycin L (*bmyB*), Fengycin (*fenD*), Bacilysin (*bacA*), Subtilin (*spaS*), Iturin A (*ituD*, *lpa-14*; *ituC*), and Surfactin (*sfp*; *srfAA*) was assayed by PCR. The distribution and frequency of the homologous antimicrobial peptide genes within the bacterial antagonists were also strain-dependent and highly variable, being the most frequent surfactins (*srfAA*=44% and *lpa-14*=38%), iturins (*ituD*=47%) and bacilysin (*bacA*=32%). We also identified those antagonists active against different *P. larvae* genotypes. To our knowledge, this is the first report of the association between antagonism and genetic markers in *Bacillus* and *Brevibacillus* strains isolated from apiarian sources and its biocontrol potential against *P. larvae* and *A. apis in vitro.*
Se adjunta copia: Anexo 4.

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

8.4.1. Alippi, A.M. & Abrahamovich E. HiCrome Bacillus agar for presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples. Inédito.

Los bacilos aeróbicos formadores de esporas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Lysinibacillus* son las especies bacterianas que aparecen con mayor frecuencia en la miel por ser habitantes normales de la microbiota de la colmena y de las superficies florales. En la práctica, las mieles, según su origen geográfico y tipo floral, presentan variaciones en cuanto a presencia y cantidad de esporas bacterianas. Habida cuenta de que en una misma muestra de miel se puede encontrar más de una especie de este grupo bacteriano, resulta sumamente útil el empleo de un medio de cultivo eficaz para la diferenciación preliminar de las mismas basado en las diferencias de color tanto del sustrato como de las colonias bacterianas. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la eficacia del medio cromogénico HiCrome™ Bacillus Agar para la diferenciación directa de las especies esporuladas aeróbicas de la miel y confeccionar una paleta de colores. Para ello, se probaron 174 cepas aisladas de miel y se compararon con cepas de referencia de Colecciones Internacionales (n=22). Las placas sembradas se incubaron a 30 y 37 °C bajo condiciones aeróbicas y se evaluaron a las 24 y 48 h registrando color y aspecto de las colonias, presencia de pigmentos difusibles y cambios de coloración del medio de cultivo. Mediante el empleo de HiCrome™ Bacillus agar fue posible diferenciar *B. cereus sensu lato*, *B. amyloliquefaciens, B. badius, B. circulans, B. clausii, B. firmus, B. licheniformis, B. macerans, B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumilus, Brevibacillus borstelensis, Br. brevis, Br. laterosporus, Lysinibacillus fusiformis, L. sphaericus, Paenibacillus amylolyticus, P. alvei*, *P. apiarius, P. larvae, P. polymyxa* y *Rummeliibacillus stabekisii.* Adicionalmente, se desarrolló un protocolo para el

aislamiento directo de las esporas de miel. El medio cromogénico HiCrome Bacillus Agar resultó eficiente en comparación con los medios de cultivo comunes para la identificación presuntiva de las especies esporuladas aeróbicas aisladas de miel permitiendo una diferenciación rápida en casos de mieles que contienen más de una especie bacteriana. La técnica podría aplicarse para el aislamiento de especies de *Bacillus* y géneros relacionados a partir de muestras de distintos tipos de alimentos.

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

8.6 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.*

8.6.1. Informe de Actividades del año 2016 del Laboratorio de Referencia de loque americana. Presentación anual a la OIE.
Se adjunta copia: Anexo 5 - *En repositorio CIC Digital.*

8.6.2. Informe de Actividades del año 2017 del Laboratorio de Referencia de loque americana. Presentación anual a la OIE.
Se adjunta copia: Anexo 6 - *En repositorio CIC Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 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

9.2 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

9.3 **PROYECTOS POTENCIALMENTE TRASNFERIBLES, 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

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

9.5 *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 dado que no se efectuaron desarrollos tecnológicos durante el período informado.

10. 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.*

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.
Durante el período 2016- 2017 se efectuaron 15 diagnósticos en el área de Fitobacteriología y se cedieron 2 cepas Bacterianas de la Colección de aislamientos de la UB.CIDEFI. La facturación ascendió a un total de $ 32.400 de los cuales la Facultad y la Asociación Cooperadora retuvieron el 15%. El monto restante se reinvirtió en materiales de laboratorio.
Nota: No se adjuntan copias de los informes técnicos elaborados ni los nombres de los solicitantes por la existencia de un compromiso de confidencialidad entre el investigador y el cliente. Se adjunta planilla con detalle de los servicios: Anexo 7

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA DE POST GRADO:

11.1.1. Protocolos de Trabajos Prácticos para el curso de Post-Grado para técnicos de SENASA Perú. "Curso Taller Internacional Apícola. Estrategias sanitarias para el diagnóstico y control de las enfermedades de las abejas" 10 pp. 2016. SENASA, Lima Perú.
Se adjunta copia: Anexo 8 - *En repositorio CIC Digital.*

11.2 DIVULGACIÓN

11.2.1. Fernández, L.A.; Gallez, L. M.; Pérez,M. B.; **Alippi, A.M**.; López, F. & Iaconis, E. Microbiología Apícola: Valorización del polen en la industria alimentaria**.** Ciencia y Abejas año XX No. 115, pg. 3-6. nov.-dic. 2017**.**
Se adjunta copia: Anexo 9 - *En repositorio CIC Digital.*

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

12.1. *Becaria de nivel superior,* Dra. Laura Bartel. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). En el marco del proyecto PICT 2012-189. 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. Desde abril 2014 hasta el 31 de marzo de 2016.

12.2. *Becaria Doctoral 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 hasta el 31 de marzo de 2018.

12.3. *Becaria de Perfeccionamiento CICPBA:* Dra. Laura Bartel. Tema: Identificación y caracterización de metabolitos bioactivos producidos por bacterias Gram-positivas aisladas de miel. Posible utilidad como herramienta de control biológico contra microorganismos patógenos de importancia agronómica. Desde el 1 de mayo 2016 hasta el 30 de noviembre de 2016.

12.4. *Investigadora Asistente CIC:* Dra. Laura C. Bartel. Tema: Identificación y caracterización de metabolitos bioactivos producidos por bacterias Gram-positivas aisladas de miel. Posible utilidad como herramienta de control biológico contra microorganismos patógenos de importancia agronómica. Desde el 1 de diciembre de 2016 al 31 de diciembre de 2017.

13. 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.*

13.1. *Directora de Tesis* de la Ing. Agr. Eliana Abrahamovich Carrera del Doctorado en de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Tema: Estudios sobre la transferencia horizontal de resistencia a tetraciclina en bacterias esporuladas aisladas de colmenas de abejas melíferas. Co-directora: Dra. A. C. López. Desde octubre de 2016 hasta marzo de 2018. Expte 200-4532/13. Categoría: CONEAU A, con calificación Sobresaliente (10), acta N^0 47, fecha: 23 de marzo de 2018.

14. 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.*

14.1. Alippi, A.M; López, A.C.; Abrahamovich, E. & Bartel, L. *"Screening* de cepas de *Bacillus* y *Brevibacillus* con potencia antagónica frente a patógenos de abejas y correlación con la presencia de marcadores genéticos de péptidos antimicrobianos". *MA -0227*. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología - XIV Congreso Argentino de Microbiologia, Rosario, Santa Fe, Argentina 26-30 de septiembre de 2016.
Se adjunta copia resumen y Poster : Anexo 10 - *En repositorio CIC Digital.*

14.2. Alippi, A.M. & Abrahamovich, E. "Diferenciación directa de especies de *Bacillus* y géneros relacionados presentes en miel empleando el medio Hicrome Bacillus agar" *MA-0265.* XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología - XIV Congreso Argentino de Microbiologia, Rosario, Santa Fe, Argentina 26-30 de septiembre de 2016.
Se adjunta copia resumen, Poster y Constancia : Anexo 11

14.3. Abrahamovich, E.; López, A.C.; & **Alippi, A.M.** "Correlación entre la presencia de plásmidos y resistencia a tetraciclina en cepas de *Bacillus cereus* aisladas de miel". MA-0463, pg. 47. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología - XIV Congreso Argentino de Microbiologia, Rosario, Santa Fe, Argentina 26-30 de septiembre de 2016.
Se adjunta copia resumen, constancia y Poster : Anexo 12 - *En repositorio CIC Digital.*

14.4. Alippi, A.M.; Fernández, L.; Susca Tomba, J.; López, F. & Gallez, L. Caracterización microbiológica de polen apícola recolectado en dos períodos de cosecha" *MA-0464.* XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología - XIV Congreso Argentino de Microbiologia, Rosario, Santa Fe, Argentina 26-30 de septiembre de 2016.
Se adjunta copia resumen, constancia y Poster : Anexo 13- *En repositorio CIC Digital.*

14.5. *Workshop "Hacia la formación de una Red Latinoamericana de Investigación en Abejas Melíferas",* INIA, La Estanzuela, Colonia, Uruguay- 24 y 25 de noviembre de 2016.
Se adjunta constancia: Anexo 14

14.6. Sánchez M.C.; Clemente G.E.; Yommi A.K.; **Alippi A.M**. y Ridao A. del C. Detección y caracterización de *Pseudomonas* de kiwi en la Provincia de Buenos Aires. Libro de Resúmenes, A1-124, p. 183. 4° Congreso Argentino de Fitopatología, 19-21 de abril de 2017, Mendoza, Argentina.

Se adjunta copia resumen y Poster: Anexo 15

14.7. Fernández, L.A.; Susca Tomba, J.; López F.; **Alippi A.M**. y Gallez, L.M. Caracterización microbiológica y química de polen apícola en apiarios del centro-sur de la provincia de Buenos Aires. Resumen 94, Libro de Resúmenes. XVII Jornadas Argentinas de Microbiología- Jornadas Bioquímicas del Sur Argentino, 7- 9 de junio, 2017, Bahía Blanca, Argentina.
Se adjunta copia constancia: Anexo 16

14.8. Sánchez,M.C.; Clemente, G.E.; Yommi, A.K.; **Alippi, A.M.** & Ridao, A. del C. Absence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit leaves and flowers from Buenos Aires Province, Argentina. IX International Symposium on Kiwifruit, Septiembre 6-9, 2017, Porto, Portugal.
Se adjunta copia resumen: Anexo 17- *En repositorio CIC Digital.*

14.9. Alippi, A.M. Conferencista invitada: Tema: "Diagnosis and detection of different genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease" *OIE Symposium on Emerging Agents in honey bees and OIE-listed diseases- 45th APIMONDIA International Apicultural Congress.*, Septiembre 29- Octubre 4, 2017**.** Estambul, Turquía.
Se adjunta copia resumen, programa invitación y certificado: Anexo 18

14.10. Fernández, L.A., Susca Tomba, J., Pérez, M., **Alippi, A.M.,** López, F. & Gallez, L. Evaluación microbiológica de la calidad higiénica y de la seguridad sanitaria en la producción de polen apícola. XVL Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Septiembre 18-20, Mar del Plata, Argentina.
Se adjunta copia certificado: Anexo 19.

14.11. López A.C. y **Alippi, A.M.** Diferenciación rápida de especies de *Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* aisladas de miel mediante PCR-RFLP. Poster B20. *IV Congreso argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental- I Jornada de Microbiología General [IV CAMAYA -I Microgen*] - Asociación Argentina de Microbiología - Mar del Plata, Argentina, 11- 13 de abril de 2018**.**
Se adjunta copia resumen y Poster : Anexo 20- *En repositorio CIC Digital.*

14.12. López A.C., Fernández L., Gallez L.M. y **Alippi, A.M.** Detección de cepas de *Bacillus cereus sensu lato* con potencial toxicogénico en muestras de polen apícola. Poster B19- *IV Congreso argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental- I Jornada de Microbiología General [IV CAMAYA -I Microgen*] - Asociación Argentina de Microbiología - Mar del Plata, Argentina, 11-13 de abril de 2018**.**
Se adjunta copia resumen y Poster : Anexo 21- *En repositorio CIC Digital.*

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

Ninguno durante el período informado

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

16.1. Subsidio Institucional otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). Resolución N° 305/17. Monto $ 16.000. Tema: 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. Responsable: **A.M. Alippi**.

16.2. Subsidio Institucional otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). Resolución N° 274 del 11/7/2016. Expediente No. 2157-2198/2016-0. Tema: 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. Responsable: **A.M. Alippi**. Monto $ 13.000.

16.3. Subsidio otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). 2014. Resolución No. 1194/14. Período 2014-2017. Proyecto inter-institucional de fortalecimiento del sector apícola bonaerense. Tema: Estrategias de valorización de la apicultura en el sur bonaerense. Monto: $ 147.000. Investigador responsable: L. Gallez. Grupo Responsable: **A.M. Alippi**, S. Fuselli y M.I. Yeannes.

16.4. Subsidio para la Asistencia de Reuniones Científicas y Tecnológicas otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). Resolución Nº 274/16, Expediente Nº 2157-2198/2016-0, 13 de julio de 2016. Evento: ALAM CAM 2016, XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología. Responsable: **A.M. Alippi**. Monto: $ 5.000.

16.5. Subsidio para equipamiento otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT E-2014-0147. Proyecto: Consolidación de un Centro para el diagnóstico de Fitopatógenos y Entomopatógenos y para el desarrollo de herramientas de biocontrol. Investigador responsable: P. A. Balatti. Grupo Responsable: **A.M. Alippi**, G.L. Lori y A.C. López. Monto: $ 600.000.

16.6. Subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT 2012 / 0189. Duración: 3 años. 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. Período: 2013-2016. Finalizado: 20 de noviembre de 2017.

17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*
No consigna.

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

Ninguno en el período informado

19. 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.*

19.1 Miembro del Consejo Directivo del CIDEFI (representante por el claustro de investigadores). Desde noviembre de 2015 a la fecha. *Porcentaje de tiempo: Cuatro reuniones mensuales de 2 hs c/u.*

19.2. Miembro de la Comisión Asesora Honoraría de Ciencias Agrícolas, Producción y Salud Animal de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), resolución No. 1280 de fecha 20 de octubre de 2014. *Porcentaje de tiempo: Reuniones mensuales de 4-5 hs y participación on line variable según el cronograma de evaluaciones.*

Se adjunta nota: Anexo 22

19.3. Editora Asociada: *Journal of Apicultural Research,* INGLATERRA. ISSN 0021-8839, desde febrero 2005 a la fecha. *Porcentaje de tiempo: entre 4 y 6 horas semanales (on line).*

19.4. Evaluadora Externa para un ingreso a la carrera de Investigador del CONICET, marzo de 2016.
Se adjunta constancia: Anexo 23.

19.5. Evaluadora Externa para la Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. Proyecto: 2015-7583: Incidencia, diversidad y toxigenicidad de *Bacillus cereus* aislados de alimentos listos para el consumo en población infantil vulnerable en el área metropolitana del Valle de Aburrá, febrero de 2016.

19.6. Evaluadora de un proyecto de Investigación Científica Tecnológica (PICT tipo B-Investigadores jóvenes) para la presentación PICT 2016, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT). Noviembre, 2016**.**

19.7. Evaluadora de un proyecto de Investigación Científica Tecnológica (Temas abiertos-Equipo de trabajo) para la presentación PICT 2016 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT). Marzo, 2017.
Se adjunta constancia: Anexo 24

19.8. *Jurado de Tesis de Magister Scientiae,* Faculty of Science, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa. Tesista: Z. Mbele. Título: "Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates from South Africa". Marzo de 2017.

19.9. *Jurado de Tesis Doctoral,* Area Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Tesista: Ing. Agr. Eliana Wassermann. Tema: Estructura poblacional y caracterización genética de los factores de patogenicidad de cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, presentes en el cinturón verde de Buenos Aires-La Plata. Fecha de defensa: 28 de marzo de 2017.
Se adjunta copia del Acta: Anexo 25

19.10. Evaluadora Externa para *New Sustances Assessment and Control Bureau Health Canada, Gobierno de Canadá.*
Se adjunta carta de agradecimiento: Anexo 26.

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

20.1 Experta Invitada a cargo de clases teóricas y prácticas del curso de Post-Grado para técnicos de SENASA Perú. "Curso Taller Internacional Apícola. Estrategias sanitarias para el diagnóstico y control de las enfermedades de las abejas"- SENASA, Lima, Perú, 8 y 9 de junio de 2016. Carga horaria: 20 hs.

21. 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.*

21.1. *Reviewer* para SpringerPlus "PLUS-D-16-01409: Molecular identification of bacterial pathogens isolated from honey (Processed and unprocessed) and their inhibition by medicinal plants", abril, 2016.
21.2. *Reviewer* para Indian Journal of Medical Research. "IJMR_1295_16**:** Antagonistic activity of

bacteriocin isolated from Gram positive bacteria", octubre 2016.

21.3. *Reviewer* para Archives of Microbiology."AOMI-D-16-00461 Functionality of the Tn916 in *Paenibacillus larvae",* octubre 2016.

21.4. *Reviewer* para Plant Disease. "Plant Disease Note PDIS-10-16-1538-PDN: First Report of *Pantoea stewartii* as Pathogen Causing Jackfruit Bronzing Disease in Malaysia", noviembre 2016.

21.5. *Reviewer* para Current Microbiology "CMIC-D-16-00921: Antagonistic bacterial isolates from *Apis cerana* colonies in Vietnam against the causal agent of American foulbrood of honeybees; *Paenibacillus larvae"*, diciembre 2016

21.6. *Reviewer* para la Revista Argentina de Microbiología: "RAM-D-17-00006- Microbiological assessment of honey in México / Calidad Microbiológica de la miel en México", febrero de 2017.

21.7. *Reviewer* para Agri Gene: "AGGENE-D-17-00016: *Paenibacillus larvae* subspecies with dissimilar virulence patterns also group by vegetative growth characteristics and enolase isozyme biochemical properties", marzo de 2017.

21.8. *Reviewer* para Journal of Applied Microbiology: "JAM 2017-0621 Unbiased random mutagenesis contributes to a better understanding of the virulent behaviour of *Paenibacillus larvae."*, mayo de 2017**.**

21.9. Pasantía de entrenamiento: Dra. Leticia Fernández, Investigadora CONICET UNS. Temas desarrollados: Técnicas de aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus cereus* provenientes de polen - Técnicas de cultivo y esporulación de *Paenibacillus larvae*. 26 al 30 de junio de 2017.

21.10. Reviewer para Insect Science: "ISN-2017-09-410-Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen; *Paenibacillus larvae",* octubre de 2017.

21.11. *Reviewer* para Environmental Microbiology Reports: "MN EMIR-2017-1714 - Population structure and antimicrobial susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolates from American foulbrood cases in *Apis mellifera* in Japan", noviembre de 2017.

21.12. *Reviewer* para Veterinary Quarterly: "TVEQ-2017-0069: Detection and quantification of *Paenibacillus larvae* spores on samples of bees, honey and hive debris as a tool to predict the onset of American Foulbrood", diciembre de 2017**.**

21.13. *Reviewer* para Applied and Environmental Microbiology: "AEM02259-17. A PCR-based method for distinguishing between two common beehive bacteria, *Paenibacillus larvae* and *Brevibacillus laterosporus",* diciembre de 2017**.**

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

"Diversidad de *Paenibacillus larvae* mediante tipificación multilocus de secuencias y estudio de los metabolitos activos de cepas de *Bacillus* y *Brevibacillus* frente al patógeno"

Dado el creciente interés mundial en el desarrollo de métodos de control de enfermedades bacterianas de las abejas en reemplazo de los antibióticos actualmente prohibidos en muchos países productores de miel, uno de los objetivos principales de este proyecto es identificar microorganismos capaces de controlar directa o indirectamente a los distintos genotipos de *P. larvae* poniendo énfasis en la caracterización de aquellos productores de biocidas. De esta forma se podrá disponer de una alternativa de control de la enfermedad de baja toxicidad en mamíferos, poco efecto sobre el ambiente y amplia aceptación pública. El presente proyecto, propone la utilización combinada de estudios dirigidos a investigar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. larvae* mediante

técnicas de tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing,* MLST) y por otro lado, desarrollar procedimientos ecológicamente limpios para el control de la loque americana.

Hipótesis de trabajo

- Las poblaciones de *Paenibacillus larvae* presentan diversidad a nivel de MLST y la misma está correlacionada con ciertas características fenotípicas y virulencia.
- La miel contiene bacterias esporuladas biológicamente activas frente a diferentes genotipos de *P. larvae* e inocuas para abejas y larvas.
- Las bacterias esporuladas de la miel sintetizan diferentes biocidas con actividad diferencial frente a distintos genotipos de *P. larvae.*
- Estos biocidas son inocuos para el ser humano y no contaminan la miel ni el medio ambiente.

Objetivos específicos

- Estudiar la diversidad de una población de cepas de *Paenibacillus larvae* aisladas de larvas de abejas y de muestras de miel de distintos orígenes geográficos aplicando procedimientos de biología molecular y bioinformática.
- Caracterizar biocidas de origen bacteriano antagónicos frente a *P. larvae* e identificar la naturaleza química de los componentes bioactivos.
- Adaptar un modelo *in vivo* con larvas de abejas mantenidas en laboratorio para el estudio de los metabolitos activos producidos por especies de *Bacillus* y *Brevibacillus.*
- Evaluar el efecto de los antagonistas (tanto esporas como extractos purificados de biocidas) en larvas mantenidas bajo condiciones de laboratorio con síntomas de loque americana.

Plan de trabajo

1. Selección de cepas de *Paenibacillus larvae*: En el laboratorio se cuenta con una colección de 465 cepas de *P. larvae* de distintos orígenes geográficos caracterizada por rep-PCR, resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina, tilosina y características fenotípicas (Alippi *et al.,* 2004; Alippi, 2015) provenientes de Alemania, Argentina, Aruba, Austria, Bélgica, Bolivia, Brasil, Canadá, Cuba, Chile, España, EE.UU., Francia, Inglaterra, Italia, Japón, Nueva Zelanda, Panamá, Polonia, República Checa, Sudáfrica, Suecia, Tunicia y Uruguay. Además, se cuenta con cepas de referencia provenientes de Colecciones Internacionales (N=26). Se seleccionarán cepas de distintos perfiles representativos de rep-PCR obtenidos con los cebadores BOX y ERIC y a su vez de distintos orígenes geográficos.
2. Obtención de ADN genómico total de las cepas de *P. larvae:* Se empleará el método de extracción directa de ADN crudo a partir de colonia bacteriana de 24 h desarrollada en MYPGP (Dingman & Stahly, 1983) de acuerdo con la metodología descripta por Alippi y Aguilar (1998a; 1998b). Adicionalmente se emplearán kits comerciales para la extracción del ADN genómico total (Quiagen® - InBio Highway®).
3. Análisis de la diversidad genética utilizando la técnica de Tipificación multilocus de secuencias (MLST):
   3.1. Amplificación por PCR: Se analizarán 7 genes de mantenimiento *(housekeeping)* utilizando metodología previamente descripta (Krongdang et al., 2017; Morrissey et al., 2015) y empleando como molde el ADN extraído previamente (punto 2). Los productos de amplificación se resolverán en geles de agarosa y serán fotografiados y digitalizados empleando el sistema de captura digital de geles Digi Doc-it UVP.

3.2. Purificación y secuenciación de fragmentos de PCR: Los fragmentos obtenidos en el punto 3.1 se purificarán mediante precipitación con isopropanol (Applied Byosistems, 2009) y se secuenciarán utilizando los servicios de secuenciación de la empresa Macrogen®, Corea.

3.3. Análisis multilocus de las secuencias: Se emplearán herramientas bioinformáticas comparando los resultados obtenidos con los depositados en las bases de datos del Imperial College de Londres (mlst.net) y de la Universidad de Oxford (pubmlst.org) para *P. larvae.*

3.4. Análisis de resultados y correlación con otras características: Se realizarán análisis de correspondencia múltiple y componentes principales utilizando características fenotípicias, resistencia a antibióticos, perfiles de rep-PCR y los resultados del análisis de MLST (punto 3.3)

4. Selección de los antagonistas bacterianos: Sobre la base de estudios previos (Alippi & Reynaldi, 2006; Minnaard & Alippi, 2016 y Bartel *et al.,* 2017) se seleccionarán las mejores cepas antagonistas productoras de biocidas de naturaleza proteica (BLIS) y/o productoras de lipopéptidos cíclicos con capacidad surfactante que resultaron activos frente a distintos genotipos de *P. larvae.* Se continuarán estudiando los biocidas obtenidos de las cepas *Bacillus subtilis* m334, m347 y XX, *B. cereus* m6c y m387; *B. pumilus* mv81; *B. clausii* Fr231; *Brevibacillus laterosporus* BLAT170 y BLAT171 y *Brevibacillus borstelensis* RC.
5. Determinación preliminar de la naturaleza proteica de los biocidas: Para determinar si los biocidas tienen algún componente proteico de tipo bacteriocinas o BLIS, se empleará la técnica del spot test en pocillos de acuerdo con técnicas previamente descriptas (Alippi & Reynaldi, 2006) y colocando en uno de los pocillos un cristal de pronasa E (Berić *et al.,* 2012, 2013). Las placas se pre-incubarán a 4 °C durante 1 hora para permitir la difusión del biocida y luego se transferirán a 37 °C y se incubarán durante 48 hs, al cabo de las cuales se medirán los halos de inhibición en comparación con el control y el tratamiento con pronasa E. La ausencia total o parcial de un halo de inhibición alrededor del tratamiento con pronasa E + biocida indicará su naturaleza proteica.
6. Obtención y purificación parcial de biocidas de naturaleza proteica: Los antagonistas que mostraron ser inhibidos por el tratamiento con pronasa E se harán crecer en el medio de cultivo líquido óptimo para cada cepa según resultados previos (Bartel *et al*., 2017) hasta fase estacionaria temprana. Las células bacterianas y esporas se eliminarán por centrifugación y las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitarán con sulfato de amonio a distintos niveles de saturación. Para minimizar la cantidad de sulfato de amonio presente en la muestra, el precipitado se disolverá en PBS pH 6.8 y el volumen será reducido por ultrafiltración hasta 100 veces del sobrenadante original. Las bacteriocinas se purificarán mediante extracción con butanol o cloroformo (2:3 de solvente:muestra), el solvente será evaporado y la fracción proteica se disolverá en PBS (Oscáriz & Pisabarro, 2000; Berić *et al.,*2013).
7. **Caracterización preliminar de lipopéptidos:** Como muchas especies del género *Bacillus* han sido citadas como productoras de más de una sustancia antagónica para diferentes especies de microorganismos, se estudiará también si los antagonistas que presentan mayor actividad biológica contra *P. larvae* producen lipopéptidos cíclicos (surfactinas, iturinas y fengicinas). Una primera aproximación de la presencia de estos compuestos se efectuará adicionando HCl concentrado a los sobrenadantes filtrados de cultivos bacterianos en medio líquido, si aparece un precipitado se sospechará su síntesis (Yousef *et al.,* 2004). Para la obtención de lipopéptidos crudos, se efectuará una precipitación adicionando HCl 12N al sobrenadante de un cultivo líquido hasta llegar a pH2, y posteriormente se extraerá con metanol, eliminando el mismo bajo presión reducida quedando un residuo sólido que se suspenderá en agua destilada conteniendo cantidad suficiente de NaOH para llegar a pH 8, la solución se filtrará por Whatman No. 1 y se llevará nuevamente a pH2 con 12N de HCl. Los lipopéptidos se re-

purificarán concentrando por centrifugación y disolviendo en 1 ml de metanol (Hsieh *et al.,* 2008). El solvente será evaporado y el residuo resuspendido en PBS.

8. **Medición de la actividad de los biocidas:** La actividad de los distintos biocidas (obtenidos en 6 y 7) será evaluada en medio sólido preparando diluciones de cada concentrado y se probarán mediante la técnica del spot test en pocillos (sembrando gotas de 10 µl en cada uno) en placas con medio MYPGP (Dingman & Stahly, 1983) sembradas con el correspondiente cultivo indicador de *P. larvae* desarrollado en MYPGP semisólido a una concentración del orden de 10^8 células/ml. Las placas se pre-incubarán a 4 °C durante 1 hora para permitir la difusión del biocida y luego se transferirán a 37 °C y se incubarán durante 48 hs, al cabo de las cuales se medirá el halo de inhibición. Una unidad de actividad (UA) será definida como la recíproca de la dilución que produzca una zona de inhibición detectable expresada en UA/ml (Minnaard & Alippi, 2016).
9. **Determinación de huella peptídica MALDI TOF-TOF:** Para estimar el peso molecular de los péptidos que conforman el extracto purificado, (bacteriocina/s y/ó polipéptido/s ó la mezcla de varias de estas sustancias), se analizará por MALDI-TOF TOF, comparando luego con bases de datos en busca de homología con estructuras ya descriptas. Eventualmente, se aplicará el análisis por nanoHPLC- ESI/Orbitrap que permitiría determinar el peso molecular de los péptidos y la secuencia de aminoácidos que los conforman. El análisis se tercerizará en servicios especializados (CEQUIBIEM-UBA/CONICET).
10. **Adaptación de un modelo *in vivo* con larvas de abejas melíferas en condiciones controladas de laboratorio:** Se empleará una combinación de las técnicas descriptas por Kaftanoglu y col. (2011) y Crailsheim y col. (2013). Las larvas se obtendrán de una colmena donde se colocará un canasto técnico con un cuadro de cría sin reina para permitir que nazca toda la cría y las abejas limpien. Luego se encerrará la reina en el canasto dejando que aove, y retirándola posteriormente. El cuadro con huevos se dejará dentro del canasto durante 3 días y se llevará al laboratorio (larvas de 1 día de edad). Se prepararán placas de 48 pocillos colocando un rollo de hilo dental estéril por pocillo y humedecido con 300 µl de glicerol al 15,5% p/v. Sobre los mismos, se colocarán cúpulas de crianza de reinas estériles. Las larvas se trasladarán desde el panal mediante miniespátula (1 larva por pocillo) y se alimentarán diariamente mediante una dieta compuesta de jalea real, extracto de levadura, glucosa y fructosa (Kaftanoglu *et al.,* 2011). Las larvas en las placas se incubarán a 34 °C ± 0,5 °C; 96% HR, y al sexto día se trasladarán a Placas de Petri con discos de papel de Filtro estériles manteniéndolas sin alimentar a 34,5 °C ± 0,5 °C y HR del 70 % hasta el momento de su nacimiento.
11. **Ensayos *in vitro* de inoculación de larvas de 24 h con esporas de *P. larvae*:** Las larvas de 24 h que poseen mayor susceptibilidad a la enfermedad (obtenidas según detalle del punto 13) se inocularán con esporas de los diferentes genotipos de *P. larvae* (determinados en el punto 3.3.) agregando esporas de *P. larvae* a la dieta (Genersch *et.al,* 2005). Se calcularán los valores de DL_{50}. Para comparar si existen diferencias significativas entre los valores de supervivencia de las larvas sometidas a los distintos tratamientos se empleará la prueba de Mantel-Cox (log-rank test). Se corroborará mediante aislamientos en medios semi-selectivos (Alippi, 1995) y observaciones microscópicas la presencia de esporas y/o células vegetativas de *P. larvae* en las larvas inoculadas.
12. **Ensayos *in vitro* de co-inoculación de larvas de 24 h con esporas de *P. larvae* y esporas de los antagonistas o biocidas purificados:** Las larvas de 24 h (obtenidas según detalle del punto 13) se co-inocularán con esporas de antagonistas o extractos de biocidas, en comparación con controles sin enfermedad y con la enfermedad sin la presencia de los antagonistas agregando esporas de *P. larvae* a la dieta de acuerdo con la técnica detallada por Genersch y col (2005). Se calcularán los valores de DL_{50}. Para comparar si existen diferencias significativas entre los valores de supervivencia de las larvas sometidas a los distintos tratamientos se empleará la prueba de Mantel-Cox (log-rank test). Se corroborará mediante aislamientos en medios semi-

selectivos (Alippi, 1995) y observaciones microscópicas la presencia de esporas y/o células vegetativas de *P. larvae* en las larvas inoculadas.

Bibliografía citada

1. Alippi, A.M. 1995. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM* 11: 343-350.
2. Alippi, A.M. 2015. Evaluación de la diversidad fenotípica y genotípica de cepas de *Paenibacillus larvae* patógenas de abejas melíferas e investigación de los mecanismos moleculares de la resistencia a tetraciclina. Tesis Doctoral, Faultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, 292 pp.
3. Alippi, A.M. & Aguilar, O.M. 1998a. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *J. Invertebr. Pathol,* 72(1): 21-27
4. Alippi, A.M. & Aguilar, O.M. 1998b. Unique fingerprints of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains. *J. Apic. Res*. 37: 273-280
5. Alippi, A.M. & Reynaldi, F.J. 2006. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae* the causal agent of American Foulbrood of honey bees by selected strains of aerobic spore forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 141-146.
6. Bartel, L.C., Abrahamovich, E., Mori, C. López, A.C. & Alippi, A.M. 2017. Antagonism and genetic markers in *Bacillus* and *Brevibacillus* strains: potential biocontrollers of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. Enviado: Journal of Apicultural Research.
7. Berić, T., Kojić M., Stanković, S., Topisiridović, Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., & Fira D. 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol. Biotecnol*. 50: 25-31.
8. Berić, T., Stanković, S., Draganić V., Kojić M., Lozo J. & Fira D. 2013. Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. *J. Appl. Microbiol.* 116: 502-510.
9. Crailsheim, K., Brodschneider, R., Aupinel, P., Behrens, D., Genersch, E., Vollmann, J., & Riessberger-Gallé, U. 2013. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *Journal of Apicultural Research*, *52*(1), 1–16.
10. Dingman, D W. & Stahly, D. P. 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 860-869.
11. Genersch E., Ashiralieva A., Fries I. 2005. Strain and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees *Appl. Environ. Microbiol.* 11, 7551–7555.
12. Hsieh, F-C., Li, M-C-, Lin T-C., & Kao, S-S. 2004. Rapid Detection and Characterization of surfactin-Producing *Bacillus subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. *Current Microbiology* 49: 186-191.
13. Hsieh, F-C., Lin, T-C, Meng, M. & Kao, S-S. 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide Iturin A. *Current Microbiology* 56: 1-5.
14. Jack, R.W., Tagg, J.R., & Bibek, R., 1995. Bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171–200.
15. Kaftanoglu, O., Linksvayer T.A. & Page, R.E. Jr. 2011. Rearing honey bees, *Apis mellifera*, *in vitro* 1: Effects of sugar concentrations on survival and development. *Journal of Insect Science* 11:96.
16. Krongdang S., Evans J.D., Pettis J.S. & Chantawannakul, P. 2017. Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PloS ONE* 12 (5)| htpps://doi.org/10.1371/journal.pone.0176831.
17. Minnaard J. & Alippi A.M. 2016. Partial characterization of bacteriocin-like compounds from two strains of *Bacillus cereus* with biological activity against *Paenibacillus larvae,* the causal agent of American Foulbrood disease. *Letters in Applied Microbiology* 63: 442-449.
18. Morrissey,B.J., Helgason, T., Poppinga, L., Fünfhaus, A. , Genersch, E. & Budge, G.E. 2015. Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental Microbiology* 17: 1414–1424.
19. Oscáriz, J.C. & Pisabarro, A.G. 2000. Characterization and mechanism of activity of cerein 7, a bacetriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* 89: 361-369.

20. Youssef, N., K. E. Duncan, D. Nagle, K. N. Savage, R. Knapp, & M. J. McInerney. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 56: 339–347.

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 los mismos.

Mediante la aplicación de la técnica de MLST se analizará una colección de cepas de *P. larvae* con el objeto de estudiar patrones globales en la estructura poblacional y su correlación con resistencia a antibióticos y virulencia, brindando nueva información sobre este importante patógeno.

Las líneas de investigación desarrolladas tienen un alto impacto para la región bonaerense habida cuenta que la Provincia de Buenos Aires concentra alrededor 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 estándar.

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 22).
   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.gob.ar (puntos 1 al 22), 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.

C. Sistema SIBIPA:
   a. Se deberá peticionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

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.