CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico[1]

PERIODO [2]: 2014-2015

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Alippi

NOMBRES: Adriana Mónica

Dirección Particular: Calle: Nº:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"): 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 permiten 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 hacia áreas de baja incidencia.

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*.

Para disponer de antimicrobianos naturales de baja toxicidad en mamíferos, poco efecto sobre el ambiente y amplia aceptación pública se seleccionaron 31 cepas de diferentes especies de *Bacillus* y *Brevibacillus* aisladas de miel con potencial actividad antagónica.

Las cepas 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).

Durante el período informado se depositaron 28 secuencias del gen 16S rDNA en GenBank:

KP005455.1 GI:749386451 *Bacillus cereus* m387 (1364 pb)

KP005456.1 GI:749386452 *Bacillus cereus* m6c (1490 pb)

KU230012.1 GI:1008857159 *Bacillus cereus* MexB (1142 pb)

KU230013.1 GI:1008857160 *Bacillus cereus* Mex C (1379 pb)
KU230015.1 GI: 1008857162 *Bacillus cereus* mv33 (1428 pb)
KU230017.1 GI: 1008857164 *Bacillus cereus* mv50b (1411 pb)
KU230025.1 GI: 1008857172 *Bacillus cereus* m395 (1185 pb)
KU230037.1 GI: 1008857174 *Bacillus cereus* m434 (1421 pb)
KU230014 GI: 1008857161 *Bacillus clausii* Fr231 (1417 pb)
KU 230018.1 GI:1008857165 *Bacillus licheniformis* mv55(1494 pb)
KU 230028.1 GI: 1008857175 *Bacillus megaterium* m435 (1033 pb)
KU 230016.1 GI: 1008857163 *Bacillus pumilus* mv49b (1436 pb)
KU230019.1 GI:1008857166 *Bacillus pumilus* mv81 (1341 pb)
KU 230020.1 GI: 1008857167 *Bacillus pumilus* m116 (965 pb)
KU 230023 GI: 1008857170 *Bacillus pumilus* m350 (1396 pb)
KU 230024.1 GI: 1008857171 *Bacillus pumilus* m363 (1418 pb)
KU 230026.1 GI: 1008857173 *Bacillus pumilus* m414 (1498 pb)
KP177517.1 GI:749058066 *Bacillus subtilis* XX (1286 pb)
KP177516.1 GI:749058050 *Bacillus subtilis* m351 (955 pb)
KP177515.1 GI:749058034 *Bacillus subtilis* m347 (1384 pb)
KU 230021.1 GI: 1008857168 *Bacillus subtilis* m329 (1151 pb)
KU 230022.1 GI: 1008857169 *Bacillus subtilis* m334 (1426 pb)
KP177514.1 GI:749058012 *Brevibacillus borstelensis* RC (1474 pb)
HQ339952.1 GI:309756389 *Bacillus amyloliquefaciens* DmB3 (1314 pb)
HQ111354.1 GI:307716053 *Bacillus subtilis* DmB55 (1472 bp)
HQ111353.1 GI:307716052 *Bacillus subtilis* DmB47 (1470 pb)
HQ111352.1 GI:307716051 *Bacillus subtilis* DmB4 (1477 pb)
Enviada: KX102627 *Brevibacillus laterosporus* BLAT169 1.377 pb

Los 31 antagonistas se evaluaron en 3 medios de cultivo diferentes (MYPGP, ISO Sensi test y Agar cerebro corazón) 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) . Los resultados obtenidos demostraron que la potencia antagónica resultó dependiente tanto del medio de cultivo como de la cepa antagonista ensayada. Las especies con mayor capacidad antagónica frente a la mayoría de las cepas de *P. larvae* fueron *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. cereus* tanto por difusión como por volátiles. Por otra parte, las cepas de *Br. laterosporus* resultaron muy efectivas por difusión pero mostraron nulo o escaso antagonismo por volátiles.

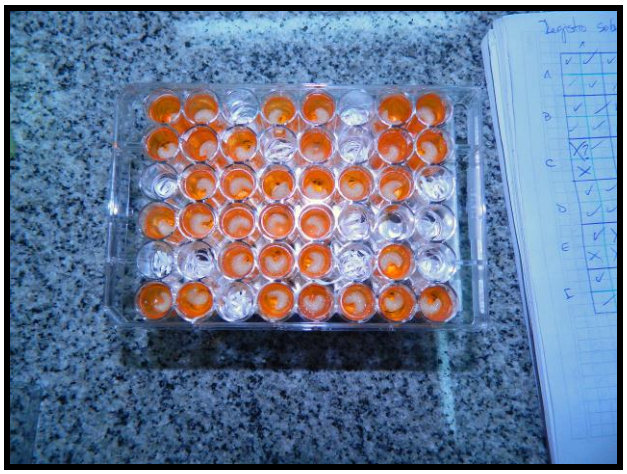
También se ensayó la actividad antagónica in vitro de estas cepas frente a *Ascosphaera apis,* agente causal de la cría yesificada de las abejas dónde se observó una muy alta capacidad antagónica de *B. subtilis* y *Br. borstelensis* en los ensayos por difusión, mientras que por volátiles mostraron una potencia menor al 50%.

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 (*fen*D); bacilicina (*bac*A); iturinas (*itu*C, *itu*A, i*tu*D, y *lpa*-14);

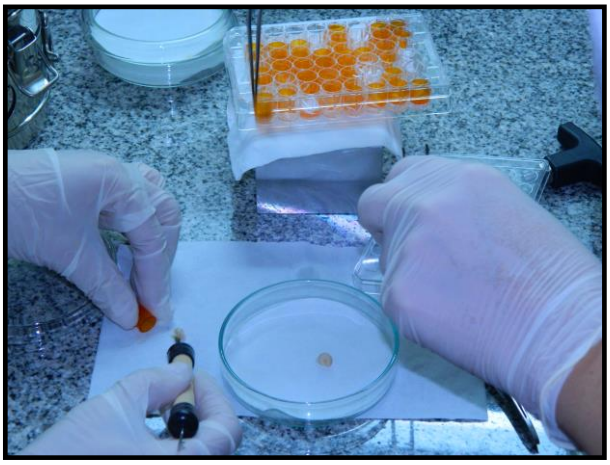
bacilomicina (bmyB); surfactina (srfAA y sfp), subtilina (spaS) y lichenicina (LicA). El 40 % de las cepas resultaron positivas tanto para surfactinas como para iturinas. Las cepas *B. subtilis* xx y m351 resultaron potentes antagonistas de *P. larvae* y presentaron secuencias homólogas a 7 genes. La capacidad surfactante se evaluó por la técnica de gota colapasada dónde *B. subtilis* m347 y m334 resultaron potentes surfactantes.

La potencia antagónica observada en función del medio de cultivo y las cepas enfrentadas tiene una variabilidad intrínseca. Con excepción de *B. pumilus*, se observó que la mayor actividad antagónica estaba relacionada con el número de genes vinculados a la producción de PAM presentes en cada una de las cepas antagonistas.

Se está poniendo a punto una técnica para el mantenimiento de larvas en el laboratorio, inoculación de las mismas con esporas de *P. larvae* suministradas junto con el alimento y posterior evaluación de biocidas antagónicos y esporas bacterianas. Hasta el momento las larvas se desarrollaron en forma satisfactoria con un porcentaje de mortandad de entre el 20 y 30% para los testigos. Se logró obtener abejas obreras nacidas en laboratorio a partir de larvas extraídas de la colmena en el estadio L1.



Larvas (L3) alimentadas artificialmente



Traslarve a placas con papel de filtro (L4)

Prepupa

Nacimiento de abejas viables (D22)

Se evaluó 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 167 cepas aisladas 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 *B. cereus sensu lato*, *B. megaterium, B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus, B. coagulans, B. macerans, B. laterosporus, B. brevis, P. alvei, P. larvae* y *P. polymyxa*. 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.

Se determinó la presencia del determinante *tet*L 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 rtesistentes 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 contenía el gen de resistencia *tet*L 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

Importancia del trabajo con relación a los intereses Provinciales:

La Argentina es el tercer productor 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. En el país existen 5.000.000 de colmenas manejadas por 30.000 productores y, la principal

área productiva de miel es la Provincia de Buenos Aires que concentra más del 50% de la producción y registra los mayores rendimientos por colmena.

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 el mantenimiento de los equipos del laboratorio 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.*

8.1.1. Alippi, A.M. Tesis Doctoral: 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. Calificación: Sobresaliente 10 - *Cum Laude*- 2015. Disponible en el Repositorio Institucional de la UNLP- SEDICI. http://hdl.handle.net/10915/45262.

Resumen: La enfermedad más grave de la etapa larval de las abejas (*Apis mellifera* L.) es la loque americana, causada por la bacteria esporulada Gram (+) *Paenibacillus larvae*. Es muy 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 existiendo brotes estacionales ya que se manifiesta en cualquier época del año con la condición que haya cría presente en la colmena. La enfermedad tiene difusión mundial y 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 la detectó por primera vez en 1989 y actualmente está ampliamente diseminada en todas las áreas productoras de miel. Con el objeto de estudiar la diversidad de *Paenibacillus larvae* se aplicaron procedimientos de microbiología clásica y de biología molecular para caracterizar una colección de 455 cepas del patógeno. El cepario de trabajo se conformó con 106 aislamientos obtenidos de larvas de abejas con síntomas de la enfermedad, con 307 cepas aisladas de mieles contaminadas de distintos orígenes geográficos, 21 cepas provistas por otros laboratorios y 21 cepas de Colecciones Internacionales. Se identificaron 54 aislamientos de restos larvales y/o escamas con síntomas clínicos de la enfermedad y 252 aislamientos de mieles provenientes de distintas localidades de la Argentina. A partir de material de panales con síntomas clínicos remitidos por investigadores de otros países, se obtuvieron 52 aislamientos conformados por 3 aislamientos de Alemania, 5 de Francia, 5

de Italia, 9 de N. Zelanda, 6 de Polonia, 11 de Sudáfrica, 4 de Suecia, 1 de Túnez y 8 de Uruguay. Adicionalmente se aislaron 18 cepas de mieles de Italia, 17 de mieles de EE.UU., 7 de mieles de Francia, 5 de mieles de España, 3 de mieles de Canadá, 2 de mieles de Sudáfrica, 1 de miel de Brasil, 1 de miel de Túnez y 1 de miel de Panamá conformando un total de 55 cepas obtenidas de mieles de otros países productores. Fueron recibidas como cultivo 42 cepas: 2 de Argentina, 2 de Bélgica, 2 de Chile, 2 de Japón, 3 de Inglaterra, 4 de República Checa, 10 de EE.UU. y 13 de origen desconocido. Si bien la colección estuvo integrada por un alto número de cepas provenientes de Argentina (n= 308) el trabajo se realizó también sobre un número considerable de cepas (n=147) de otros orígenes que resultó adecuado para los estudios de diversidad. Adicionalmente, con el fin de incluir controles, se emplearon 5 cepas de Colecciones Internacionales que en la actualidad se clasifican como *Paenibacillus larvae* pero que pertenecían a la anterior subespecie *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* (1 de EE.UU., 1 de Canadá, 1 de Francia y 2 de origen desconocido). Otras cepas de este grupo proveniente de EE.UU. fueron gentilmente cedidas por el Dr. D. P. Stahly para los estudios con el bacteriófago PPL1c del capítulo III. Se constituyó un segundo cepario con una colección de 282 aislamientos bacterianos de otras especies esporuladas aerobias conformado por 129 aislamientos de *Bacillus cereus,* 62 de *Paenibacillus alvei*, 52 de *Bacillus megaterium,* 8 de *Bacillus mycoides,* 6 de *Bacillus subtilis*, 6 de *Lysinibacillus sphaericus,* 5 de *Bacillus thuringiensis,* 5 de *Brevibacillus laterosporus,* 5 de *Bacillus circulans,* 2 de *Bacillus licheniformis,* 1 de *Bacillus polymyxa* y 1 de *Bacillus pumilus.* Adicionalmente, se emplearon 41 cepas recibidas de Colecciones Internacionales y pertenecientes a distintas especies de los géneros *Paenibacillus, Bacillus, Brevibacillus*, *Lysinibacillus y Virgibacillus.*

En el Capítulo II se caracterizaron las 455 cepas de *Paenibacillus larvae* mediante técnicas microbiológicas. El agregado de ácido nalidíxico al medio de cultivo a una concentración final de 9 µg/ml resultó adecuado para la obtención de cultivos puros de *Paenibacillus larvae* evitando el sobredesarrollo del saprobio *Paenibacillus alvei* comúnmente presente en las larvas de abejas. Con respecto a los aislamientos provenientes de muestras de mieles, el agregado de la combinación de antibióticos ácido nalidíxico y ácido pipemídico al medio MYPGP permitió obtener colonias de *Paenibacillus larvae* y mayormente inhibió el desarrollo de otras especies esporuladas presentes en este tipo de muestras, ya que más del 80% de las muestras analizadas contenía más de una especie bacteriana resistente al tratamiento de *shock* térmico de 80 °C. Independientemente del origen geográfico y/o floral de las mieles analizadas aquí, las especies esporuladas aerobias encontradas con mayor frecuencia han sido *Paenibacillus larvae, Paenibacillus alvei, Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus pumilus*. Paralelamente y, en menor proporción, se hallaron cepas de *Brevibacillus laterosporus, Bacillus mycoides, Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis, Bacillus circulans, Paenibacillus polymyxa, Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus licheniformis.* Mientras que *Paenibacillus larvae* y *Paenibacillus alvei* están asociados con enfermedades de las abejas, *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* son especies ubicuas frecuentes en todo tipo de suelos, sus esporas sobreviven la distribución en polvos y aerosoles siendo vehiculizadas desde estos lugares a otros hábitats como las superficies florales. Paralelamente, *Bacillus megaterium* junto con *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Bacillus cereus, Bacillus circulans* y *Paenibacillus alvei* son las especies predominantes en los tractos digestivos de larvas, abejas adultas y heces de las mismas. También en este capítulo, se determinó que la configuración superficial de las esporas bacterianas vistas al MEB resultó coincidente con lo descripto por otros autores para cada una de las especies analizadas.

En el capítulo III se demostró que el bacteriófago PPL1c resultó una herramienta útil para la identificación y diferenciación rápida de cepas de *Paenibacillus larvae,* como complemento de otras características fenotípicas. El fago mostró ser altamente específico a nivel de

especie encontrándose un 98 % de cepas de *Paenibacillus larvae* susceptibles al mismo mientras que el resto de las especies de *Paenibacillus, Bacillus, Brevibacillus, Lysinibacillus* y *Virgibacillus* resultaron resistentes.

En el capítulo IV se estableció que la técnica de rep-PCR resultó adecuada para determinar la variabilidad de las poblaciones de *Paenibacillus larvae* dónde se halló una alta homogeneidad genética. El empleo de los cebadores BOX y REP reveló la existencia de 4 perfiles de *fingerprints* a los cuales denominamos A, B, C y D respectivamente, mientras que las cepas de colección pertenecientes al ex. grupo *pulvifaciens* mostraron el perfil distintivo E. Cuando se emplearon los cebadores ERIC, con excepción de algunas cepas provenientes de Colecciones Internacionales, todos los aislamientos obtenidos de larvas y mieles presentaron un perfil ERIC-I coincidente con lo descripto también por otros investigadores y sólo se halló el perfil ERIC-II en cepas pigmentadas enviadas de la Colección del SAG. Mientras que el perfil ERIC-I es el de mayor distribución a nivel mundial, el perfil ERIC-II ha sido citado en Alemania, Finlandia, Suecia y Austria y, muy recientemente, en muestras de Canadá y Nueva Zelanda. Las cepas pertenecientes al perfil ERIC I estudiadas en esta tesis a su vez se subdividían en alguno de los 4 perfiles BOX (A, B, C o D) y presentaban colonias "típicas" de *Paenibacillus larvae* no pigmentadas, de color entre blanquecino y grisáceo y formas ligeramente rugosas en agar MYPGP y en agar Columbia suplementado con sangre ovina (Capítulo II). Por otra parte las cepas de colección del grupo ex *pulvifaciens*, analizadas aquí (n=5) presentaron un perfil ERIC–IV / BOX-E. Si bien en este trabajo no se encontró ningún representante del genotipo ERIC-II, a excepción de los cultivos enviados por el SAG, el mismo pudo haber pasado inadvertido en el análisis de mieles debido a la alta contaminación de las mismas con otras especies esporuladas Gram (+) que hizo imprescindible someter a las muestras a un shock térmico previo al aislamiento en medios semi-selectivos. En el capítulo IV también se concluyó que el gen 16S rRNA es polimórfico entre las especies esporuladas aerobicas comúnmente presentes en la miel, no obstante, no se detectaron polimorfismos a nivel intra-especie en las cepas de *Paenibacillus larvae* de distintas regiones geográficas cuando se emplearon las endonucleasas (*Alu* I, *Msp* I, *Hae* III, *Cfo*I, *R*sa I y *Taq* I).

En cuanto a las comparaciones entre perfiles de rep-PCR y RFLP se observó que los 4 patrones de BOX-PCR observados (A, B, C y D) y los fingerprints ERIC-I y ERIC-II se correlacionaron con el perfil A obtenido por *Hae*III, mientras que las cepas de colección que mostraron un perfil BOX-E y un perfil ERIC-IV se correlacionaron con el perfil B obtenido con la endonucleasa *Hae*III. Lo mismo ocurrió con la enzima *Hinf*I dónde las cepas pertenecientes a los perfiles ERIC-III y BOX-E mostraron un patrón B y las cepas con perfiles ERIC-I o ERIC-II y BOX-A, BOX-B, BOX-Cy BOX-D no presentaron un sitio de corte con esta endonucleasa.

En el capítulo V se seleccionó un subconjunto de aislamientos de *Paenibacillus larvae* de distintos orígenes geográficos y perfiles de *fingerprints* para determinar la sensibilidad/ resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina mediante las técnicas de CIM y de difusión en agar. La distribución de la sensibilidad por CIMs de la población bacteriana analizada varió entre 0,062 y 128 µg/ml de Tc sugiriendo una distribución bimodal con dos sub-poblaciones que claramente difirieron en su sensibilidad, con 76% de cepas S (CIM entre 0,062 y 2 µg/ml) y 24 % de cepas dentro del rango de la zona I y R. Las cepas I provenían en su mayoría de Argentina y las S cuyos valores de CIM resultaron los más bajos, de países europeos, lo cual es esperable dado que en casi toda la UE está prohibido el uso de antibióticos en apicultura, mientras que en países como EE.UU., Canadá y Argentina, entre otros, es usual el empleo de OTC para el control de loque americana en las colmenas afectadas.

Al comparar las CIM obtenidas por E-test con las obtenidas por dilución en agar, en el caso de agar Iso-Sensi Test hubo concordancia de categoría del 100 %, encontrándose la misma

proporción de cepas susceptibles y resistentes que por la técnica de dilución en agar; pero al emplear MYPGP hubo concordancia de categoría del 81,81 %. Se concluye entonces que la combinación de las tiras de E-Test con el agar ISO-Sensi Test representa una alternativa válida para determinar las CIM de tetraciclina en cepas de *Paenibacillus larvae.* Es importante destacar que todas las cepas de *Paenibacillus larvae* ensayadas mostraron un desarrollo confluente en Iso-Sensi test, el cual podría usarse también como medio alternativo para el desarrollo de las células vegetativas de este patógeno.

Se obtuvieron las secuencias completas de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395. Dichas secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso KF 433938 para pPL373, KF 536616 para pPL374 y KF440690 para pPL395, provenientes de las cepas PL373, PL374 y PL395, respectivamente que presentaban resistencia a Tc y OTC. Hemos demostrado experimentalmente la transferencia del plásmido pPL374 en la cepa de *Bacillus subtilis* m351 y del plásmido pPL373 en la cepa de *Bacillus subtilis* GSY1104 mediante conjugaciones en medio líquido. Al examinar ambas cepas dadoras de *Paenibacillus larvae* PL373 y PL374 mediante la técnica de lisis *in situ* se observaron dos plásmidos de aproximadamente 5.000 bp y 8.000 bp, pero sólo el plásmido más pequeño era el que contenía el gen de resistencia a Tc. Luego de efectuar la secuenciación completa de los plásmidos más pequeños obtenidos de las cepas pPL373 y pPL374, respectivamente confirmamos que el gen de resistencia es el *tet*L y no el *tet*K 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 movilización por conjugación empleando la cepa PL395 que contiene un único plásmido de 5.000 bp denominado pPL395 resultaron infructuosos, no obstante el ADN plasmídico obtenido de la cepa PL395 si pudo transferirse por electroporación a una cepa de *Paenibacillus larvae* Tc^S. Los plásmidos pPL373 y pPL374 también pudieron transferirse por electroporación a la misma cepa de *Paenibacillus larvae* Tc^S. En todos los casos los plásmidos se mantuvieron en forma estable en sus respectivos aceptores. Los plásmidos más grandes contenidos en las cepas PL373 y PL374, podrían codificar para funciones conjugativas y, al coexistir en la misma cepa bacteriana aportarían a los plásmidos movilizables pPL373 y pPL374 las funciones conjugativas necesarias para su movilización por conjugación; por lo que se justifica estudiarlos en profundidad y secuenciarlos para clarificar los mecanismos de transmisión plasmídica de *Paenibacillus larvae* en la naturaleza. 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* nos sugieren que los genes *mob* presentes en dichos plásmidos pueden estar 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 *Paenibacillus 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.

Pablabras clave: Loque americana - abejas - *Paenibacillus larvae* - Resistencia a Tetraciclina - Biodiversidad - PCR

Se adjunta copia en CD y copias del Diploma y Acta: Anexo 1

8.1.2. Alippi, A. M., León, I. & López, A.C. Identical tetracycline-resistance encoding plasmids from different *Paenibacillus larvae* strains isolated from commercial honeys. *International Microbiology* 17: 49-61, 2014. ISSN 1139-6709. **IF: 2.197**

Abstract: *Paenibacillus larvae,* the causal agent of American foulbrood disease in honeybees,acquires tetracycline-resistance via native plasmids carrying known tetracycline-resistance determinants. From three *P. larvae* tetracycline-resistant strains isolated from honeys, 5-kb-circular plasmids with almost identical sequences, designated pPL373 in strain PL373, pPL374 in strain PL374, and pPL395 in strain PL395, were isolated. These plasmids were highly similar (99%) to small tetracycline-encoding plasmids (pMA67, pBHS24, pBSDMV46A, pDMV2, pSU1, pAST4, and pLS55) that replicate by the rolling circle mechanism. Nucleotide sequences comparisons showed that pPL373, pPL374, and pPL395 mainly differed from the previously reported *P. larvae* plasmid pMA67 in the *ori*T region and *mob* genes. These differences suggest alternative mobilization and/or conjugation capacities. Plasmids pPL373, pPL374, and pPL395 were individually transferred by electroporation and stably maintained in tetracycline-susceptible *P. larvae* NRRL B-14154, in which they autonomously replicated. The presence of nearly identical plasmids in five different genera of gram-positive bacteria, i.e., *Bhargavaea, Bacillus, Lactobacillus,Paenibacillus*, and *Sporosarcina*, inhabiting diverse ecological niches provides further evidence of the genetic transfer of tetracycline resistance among environmental bacteria from soils, food, and marine habitats and from pathogenic bacteria such as *P. larvae.* [Int Microbiol 2014; 17(1):49-61].

Key words: American Foulbrood disease (AFB)- *Paenibacillus larvae* -tetracycline resistance - plasmids - honeybees.

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 2.

8.1.2. 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. *Food Microbiology* 46: 195-199, 2015. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.005. ISSN: 0740-0020. **IF: 3.375**

Abstract: 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.

Keywords: *Bacillus cereus,* ephitelial cells, virulence, genes, detachment, necrosis, food poisoning

En este trabajo, participé en el aislamiento y caracterización de la cepa de B. cereus; en el análisis y discusión de los resultados y redacción del manuscrito para su publicación.

Se adjunta copia: Anexo 3.

8.1.3. Abrahamovich, E.; López, A.C. & **Alippi, A.M.** Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46 (3):237-241, 2014. ISSN 0325-7541. **IF: 0.864**

Resumen: 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, así como mediante rep-PCR y RFLP del gen 23S ADNr, demostraron una alta variabilidad intra-específica, tanto fenotípica como genotípica.
Palabras clave: *Agrobacterium rubi;* Agallas; Arándanos; Diversidad; rep-PCR.
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 4.

8.1.4. Alippi, A.M. Chapter 2.5. The first Inspection in Laboratory. Pg. 113-116. In *Bee Health and Veterinarians*, OIE (World Organisation for Animal Health). Editor: W. Ritter. 2014. ISBN 978-92-9044-923-2, 316 pp. ISBN 978-92-9044-923-2.
Summary: The purpose of this section is to recognise in the laboratory any bnormalities in brood samples and adult bees for further selection of the most appropriate diagnostic tests to identify the major bee diseases and pests. Preliminary diagnoses of American foulbrood, European foulbrood, chalk brood, nosemosis, viral diseases and parasitic honeybee mites are presented.
Keywords: American foulbrood – Brood samples – Chalk brood – European foulbrood - viruses – Nosemosis – Parasitic honeybee mites – Preliminary diagnosis.
Mi participación consistió en la redacción del *capítulo 2.5.*
Se adjunta copia: Anexo 5.

8.1.5. Alippi, A.M. Chapter 2.6. Bee Diseases (Pathogenesis, epidemiology, diagnosis, therapy and prophylaxis). 2.6.A. Bacterial diseases of honey bees. Pg. 117-124. In *Bee Health and Veterinarians*, OIE (World Organisation for Animal Health), Editor: W. Ritter. Editor: W. Ritter. 2014. ISBN 978-92-9044-923-2. 316 pp.

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.
Keywords: American foulbrood – Bacterial diseases – Brood – Control – European foulbrood- Honey – Honeybees – *Melissococcus plutonius* – *Paenibacillus larvae* – Prophylaxis – Spores
Mi participación consistió en la redacción del *capítulo 2.6.*
Se adjunta copia: Anexo 6.

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.

8.2.1. 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 a worldwide crop mainly used as a filler cut flower.
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 y Constancia. Anexo 7.

8.2.2. 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.

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 y Constancia: Anexo 8

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. Minaard 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. Enviado: *Letters in Applied Microbiology*

Significant and impact of the study:
An Integrated Pest Management (IPM) approach is needed to ensure the sustainability of the beekeeping industry due to the increasing demand for organic honey and the reduction of dependence on antibiotics. Biocontrol agents produced by bacteria isolated from apiarian

sources seem promising and able to combine with an IPM strategy. The most significant findings of this study are the characterization of bacteriocin-like compounds (BLIS) obtained from two strains of *Bacillus cereus* isolated from honey. Both BLIS have a narrow activity range and highly inhibit the growth of *Paenibacillus larvae,* the causal agent of American Foulbrood disease of honey bees.

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.

Se adjunta Copia: Anexo 9

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

No consigna

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 2013 del Laboratorio de Referencia de loque americana. Presentación anual a la OIE.

Se adjunta copia: Anexo 10.

8.6.2. Informe de Actividades del año 2014 del Laboratorio de Referencia de loque americana. Presentación anual a la OIE.

Se adjunta copia: Anexo 11

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 año 2014 se efectuaron 69 diagnósticos en el área de Fitobacteriología y 4 diagnósticos en el área de Sanidad Apícola, se efectuó una extracción de ADN bacteriano y posterior análisis de secuencia del gen 16SrADN e Inscripción en GenBank y se cedieron 2 cepas Bacterianas de la Colección de aislamientos de la UB.CIDEFI. La facturación ascendió a un total de $ 91.350 de los cuales la Facultad y la Asociación Cooperadora retuvieron el 15%.
Se adjunta planilla con detalle de los servicios : Anexo 12.

Durante el año 2015 se efectuaron efectuaron 27 diagnósticos en el área de Fitobacteriología y se identificaron 7 aislamientos bacterianos recibidos como cultivo. La facturación ascendió a un total de $ 34.750 de los cuales la Facultad y la Asociación Cooperadora retuvieron el 15%.
Se adjunta planilla con detalle de los servicios : Anexo 13.

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA DE POST GRADO

11.1.1. Guía de Trabajos Prácticos: Enfermedades Bacterianas. Para el Curso "Diagnóstico y Control de enfermedades de las abejas" organizado por el CEBASEV, Balcarce, 29 de septiembre al 2 de octubre de 2015.
Se Adjunta copia: Anexo 14

11.2 DIVULGACIÓN
No consigna

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 a la fecha.

12.3. *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. Co-director: Dr. Pedro A. Balatti. Desde 1 de abril de 2009 hasta diciembre de 2014.

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 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. 2013-2014. Fecha de defensa: 13 de junio de 2014.

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.*
No consigna.

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

15.1. *Curso de Redacción de papers científicos en inglés-Módulos I y II.* CIDCA UNLP. La Plata, 18 al 25 de agosto de 2015. Carga horaria: 30 hs**.**
Se adjunta Certificado de Aprobación: Anexo 15

15.2. Capacitación: *"HLB la enfermedad que amenaza la citricultura Argentina".* Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 15 de octubre de 2014.
Se adjunta Certificado de asistencia: Anexo 16

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° 1266/14. Expediente No. 2157-1332/2014-0. Responsable: **A.M. Alippi**. Monto $ 10.000.

16.2. Subsidio otorgado el Consejo Interuniversitario Nacional (CIN). Proyecto PDTS-CIN-CONICET. Aprobacion de la financiación 11/6/15 por Res. CE 1055/15. Proyecto nº 180. Tema: Investigaciones en microbiología apícola: fortaleciendo el desarrollo de una apicultura sustentable. Inv. Responsable: Leticia A. Fernández (UNS). Grupo responsable: **A.M. Alippi (UNLP)** y M. Benitez Ahrens (UNJu). Monto: $ 200.000.

16.3. Subsidio otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs. As. (CIC). 2014. Resolución No. 1194/14. 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 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.

16.5. 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. Período: 2013-2016.

16.6. 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: J. Minnaard y **A. M. Alippi.**

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.
No consigna

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: Reuniones mensuales de 2 hs.*

19.2. Evaluadora Externa para un ingreso a la carrera de Investigador del CONICET, marzo de 2016.

19.3. Coordinadora 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 hs y participación on line.*

19.4. *Evaluadora externa* de un pedido de promoción en la Carrera de Investigador de CONICET, marzo de 2014. *Evaluación on line*

19.4. Editora Asociada: *Journal of Apicultural Research,* INGLATERRA. ISSN 0021-8839, desde febrero 2005 a la fecha. *Porcentaje de tiempo: entre 3 y 4 horas semanales (on line).*

20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*
No consigna.

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. *Jurado de Tesis de Maestría en Biología,* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia. Tesista: Lic. Jennifer Sanchez Chica. Tema: "Caracterización microbiológica y molecular de aislamientos de *Bacillus cereus* obtenidos de alimentos pulverizados recolectados en el Valle de Aburra". Fecha de defensa: 26 de mayo de 2015. *Evaluación a distancia.*
Se adjunta Constancia: Anexo 17

21.2. Disertante en el Curso "Diagnóstico y control de enfermedades de las abejas" organizado por el CEBASEV, (Centro Colaborador de la OIE), INTA, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, Universidad Nacional de Mar del Plata, y el Ministerio de Educación. Balcarce, Prov. de Bs. As entre el 29 de septiembre y 2 de octubre de 2015.
Se adjunta Invitación y Certificación: Anexo: 18.

21.3. *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.

21.4. *Reviewer* para Revista Argentina de Microbiología "RAM-D-15-00148: Novel bioassay with *Bacillus megaterium* to detect tetracycline in miel", diciembre, 2015.

21.5. *Reviewer* para Plant Disease "PDIS-08-15-0880-PDN: First report pods and seeds rot of *Medicago sativa* caused by Pseudomonas aeruginosa in China", noviembre 2015.

21.6. *Reviewer* para Plant Disease "PDIS-06-15-0715-PDN: First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in Georgia, USA", Julio 2015.

21.7. *External Reviewer* para Assesment and Control Bureau. Safe Environments Directorate, Health Canada. Biologist Biotechnology I - New Substances. Tema: "Screening Assessment for *Bacillus circulans* ATCC 9500", mayo, 2015.

21.8. *Reviewer* para Journal of Microbiology and Antimicrobials "JMA-07.04.15-0340" Antimicrobial activity of *Bacillus cereus*. Isolation, identification and the effect of carbon source and nitrogen source on its antagonistic activity, abril de 2015.

21.9. *Reviewer* para Apidologie "APID-D-14-00183" Chemical composition and antimicrobial potential of plant essential oils on *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American

foulbrood, febrero de 2015.

21.10. *Reviewer* para Apidologie "APID-D-14-00176" Preliminary evaluation of glucose oxidase and its products in vitro antimicrobial activities on *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 vegetative form, diciembre de 2014.

21.11 *Reviewer* para Applied Biochemistry and Biotechnology "ABAB-D-14-01218" Susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* to different extracts obtained from *Achyrocline satureioides*, noviembre de 2014.

21.12. *Reviewer* para Journal of Food Science and Technology. "JFST-D-14-01000". Determination of genetic diversity of the *Bacillus cereus* isolates of various origin through Rep-PCR fingerprinting, Septiembre de 2014**.**

21.13. *Reviewer* para Apidologie. "APID-D-14-00072": Characterization and epidemiology of *Paenibacillus larvae* isolates from American foulbrood outbreaks in Northern and Central Italy, junio de 2014.

21.14. *Reviewer* para Journal of Applied Microbiology "JAM-2014-0627":Antidermatophytic effect of a *Bacillus mojavanesis* strain isolated from mumijo a traditional Mongolian medicine, Abril de 2014.

21.15. *Reviewer* para Plant Pathology "PP-14-033": Screening a bacterial collection of pith necrotic Solanaceae for the assessment of genetic diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* species. Febrero, 2014.

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.*

"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"

Se continuará con el plan presentado durante el período anterior, que se resume a continuación:

Hipótesis de trabajo

- 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.
- 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.
- Existe una transferencia horizontal de genes de resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina entre *P. larvae* y otras bacterias Gram (+) presentes en las colmenas.

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) en larvas infectadas con loque americana mantenidas bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto de los biocidas purificados en larvas inoculadas con esporas de *P. larvae* mantenidas bajo condiciones de laboratorio.
- Determinar si los microorganismos antagonistas y/o biocidas purificados son efectivos para el control de loque americana en colmenas.
- Investigar la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina en las poblaciones de *P. larvae* y otras especies de *Paenibacillus* y *Bacillus* comúnmente presentes en miel y otros materiales del apiario y su posible correlación con la presencia de plásmidos salvajes.
- Caracterizar, secuenciar y comparar los diferentes plásmidos conteniendo determinantes de resistencia a tetraciclinas aislados de las bacterias del apiario.
- Efectuar ensayos de conjugación entre cepas bacterianas resistentes y susceptibles que comparten el mismo nicho ecológico.
- Efectuar ensayos de transferencia por electroporación de ADN plasmídico hacia cepas susceptibles.

Plan de trabajo

1. Selección de cepas antagonistas de *Paenibacillus, Bacillus* y *Brevibacillus* aisladas de miel.
2. Extracción de ADN genómico total de las cepas bacterianas de interés mediante el empleo de *kits* comerciales.
3. Análisis por PCR de marcadores genéticos para detectar producción de péptidos antimicrobianos (PAM) empleando como molde el ADN obtenido en 6) y *primers* previamente descriptos para la amplificación de los genes requeridos para la producción de fengicina (*fen*D); bacilisina (*bac*A); iturinas (*itu*C, *itu*A e *itu*D); bacilomicina (*bmy*B); surfactina (*srf*AA) y subtilina (*spa*S).
4. Determinación de correlaciones entre capacidad antagónica y presencia de genes requeridos para la producción de PAM
5. Secuenciación del gen 16s rDNA para confirmar la identificación de las especies bacterianas utilizadas.
6. Concentración y purificación de los biocidas.
7. Medición de la actividad de los biocidas *in vitro* mediante la técnica del spot test.
8. Caracterización bioquímica de los biocidas obtenidos y determinación de la sensibilidad al calor, pH y actividad enzimática.
9. Ensayos *in vitro* de inoculación de larvas de 24 h con esporas de *P. larvae* y co-inoculación con esporas de antagonistas, concentrado de biocidas en comparación con controles sin enfermedad y con la enfermedad sin la presencia de los antagonistas. Medición de la DL_{50}
10. Evaluación de los antagonistas y biocidas que mostraron buen comportamiento en 9) en colmenas inoculadas artificialmente con loque americana.
11. 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.

12. Determinación de sensibilidad/resistencia antimicrobiana a tetraciclina (Tc) , oxitetraciclina (OTC) y minociclina (Mn) por técnicas de dilución en agar
13. Análisis por PCR de los genes de resistencia a tetraciclina determinando la presencia de los determinantes *tet*L, *tet*K, *tet*M, *tet*A, *tet*Q, *tet*S, *tet*T, *tet*(32) y *tet*Z que han sido citados en bacterias Gram (+). El análisis se efectuará tanto sobre ADN genómico total como sobre ADN plasmídico obtenidos mediante extracción por *kits* comerciales para determinar si dichos genes tienen ubicación cromosomal o plasmídica.
14. Estudio de los perfiles plasmídicos de las cepas resistentes a Tc, OTC y Mn mediante la técnica de lisis alcalina *in situ*.
15. Pruebas de conjugación entre cepas dadoras con fenotipo de resistencia a Tetraciclina y aceptoras con fenotipo susceptible.
16. Ensayos de electroporación de ADN plasmídico conteniendo genes de resistencia a tetraciclina y cepas electrocompetentes aceptoras con fenotipo susceptible.

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 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.