

XV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA (CAM 2019)

La alfalfa es una especie difícil de ensilar debido a su bajo valor de carbohidratos hidrosolubles, mayor contenido de proteína y una alta resistencia a la disminución del pH. El objetivo fue aplicar cultivos mixtos de bacterias lácticas (BL) en ensilajes de alfalfa para cumplir con diferentes propósitos: mejorar la fermentación y la digestibilidad del material ensilado e inhibir microorganismos indeseables en este ecosistema.

Materiales y Métodos: Estudios previos permitieron seleccionar BL por su velocidad de reducción del pH, capacidad de inhibir hongos toxicogénicos y bacterias patógenas. A partir de esta selección se formularon dos MIX de BL para ser ensayadas en microsilos. MIX 1: *L. plantarum* RC015; *L. acidophilus* RC020 y *L. rhamnosus* RC007. MIX 2: *Pediococcus acidilactici* RC002; *P. acidilactici* RC003 y *L. plantarum* RC018. Cada cepa creció por separado en caldo MRS, se centrifugó, lavó y resuspendió en solución fisiológica a una concentración de 1x10⁶ UFC/ml. Se armaron silos de 2 Kg de alfalfa picada en bolsas de polietileno y cerradas al vacío. Los silos fueron inoculados con el MIX1 o el MIX 2 o con solución fisiológica sola, para los silos controles. Los silos se mantuvieron a temperatura ambiente y se tomaron muestras a los días 7, 30 y 90 post ensilajes para recuento de hongos y levaduras y análisis físicoquímicos (pH, materia seca, cenizas, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, proteína bruta). A los 90 días los silos fueron expuestos al aire durante 10 días para medir la estabilidad aeróbica de los mismos.

Resultados: El pH disminuyó rápidamente en los silos inoculados; a partir del día 7 se observó una diferencia estadísticamente significativa entre inoculados y control, la cual se mantuvo a lo largo de todo el ensayo. Los silos inoculados mostraron una reducción en el valor de fibra detergente neutra (parámetro relacionado a material menos digestible) a partir de los 30 días post ensilaje, con respecto al control. La inoculación con ambos MIX disminuyó el crecimiento de hongos potencialmente toxicogénicos en ensilaje de maíz pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Luego de la apertura del silo, la temperatura interna de los silos controles siempre estuvo más de dos grados por encima de la temperatura ambiente, no así en los silos inoculados donde se mantuvo igual a la temperatura ambiente. Este dato junto con un notorio incremento en el pH (8.7) y en el recuento de hongos y levaduras, demuestran un deterioro aeróbico intensivo en los silos controles respecto de los inoculados.

Conclusiones: Los MIX ensayados muestran su potencial para ser utilizados como inoculantes en ensilado de alfalfa ya que mejoran la fermentación, digestibilidad y calidad microbiológica de los mismos, a la vez que mantienen la estabilidad aeróbica luego de la apertura del silo.

MI 103

0277 - PRESENCIA DE XANTHOMONAS ARBORÍCOLA EN DIFERENTES ESTADOS FENOLÓGICOS DEL NOGAL – CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA RESPONSABLE DE LA BACTERIOSIS Y NECROSIS APICAL DEL NOGAL

MARANGI, Maria Julia¹ | TEMPERINI, Carolina Virginia² | FERNANDEZ, Diana³ | PARDO, Alejandro Guillermo⁴ | POSE, Graciela Noemí⁴

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO NEGRO - CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS¹; UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO NEGRO²; INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA³; UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES - CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS⁴

Introducción y Objetivos: La bacteriosis (BN) y la Necrosis Apical Marrón (NAM) son enfermedades del nogal que afectan a los frutos producidas por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. En el último caso, los géneros fúngicos micotoxicogénicos *Fusarium* y *Alternaria* están también involucrados. Ambas producen importantes pérdidas económicas ya que provocan la caída prematura de frutos, además de afectar la calidad. Si bien casos de BN fueron ampliamente reportados, durante 2013-2014 se registraron caídas prematuras de nueces en plantaciones del Valle Medio de Río Negro, reportándose NAM por primera vez en el país. El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de *X. arboricola* en los diferentes estados fenológicos del nogal y caracterizar la población bacteriana, estudios no realizados previamente en nuestro país.

Materiales y Métodos: Se realizaron dos muestreos anuales (2016, 2017) en plantaciones de Luis Beltrán, desde yemas y amentos en reposo invernal, hasta frutos inmaduros. Se analizó la flora superficial e interior de cada órgano. Los aislamientos se realizaron en los medios Luria Bertani (bacterias) y Agar Papa Dextrosa suplementado con Cloranfenicol (0.1g/L) (hongos). Las colonias sospechosas de ser *Xanthomonas* fueron sembradas en un medio diferencial para dicho género, Xan-D. La identidad de las mismas se confirmó mediante técnicas moleculares. Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el kit "DNeasy blood and tissue mini kit" (Qiagen) con un protocolo de pre-tratamiento para bacterias Gram negativas. El ADN genómico extraído se cuantificó utilizando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies). Se realizó la amplificación (PCR) y secuencia de los fragmentos amplificados con los primers especie específicos para *X. arboricola* XarbQF y XarbQR (gen qumA - quinato deshidrogenasa). La caracterización de la población bacteriana se realizó mediante pruebas morfológicas (tinción de Gram, determinación de pigmentos en Agar F), fisiológicas (crecimiento en Agar Nutritivo a 35°C y conteniendo un 3% NaCl), bioquímicas (catalasa, oxidasa, producción de indol, reducción del nitrato) y nutricionales (hidrólisis de almidón, esculina y tween 80, digestión de gelatina y caseína, actividad ureasa).

XV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA (CAM 2019)

Resultados: *X. arboricola* y *Alternaria sp.* se aislaron en todos los estados fenológicos, excepto en flores femeninas y estigmas. El 81% de los aislamientos resultaron ser *X. arboricola*, confirmando la identidad del patógeno. La población bacteriana resultó ser Gram negativa, catalasa positiva, oxidasa negativa. No produjo pigmentos en Agar F, creció débilmente en Agar Nutritivo a 35°C y toleró un 3% de NaCl. Posee actividad lipolítica y capacidad para hidrolizar almidón y esculina, digerir gelatina y caseína. No posee actividad ureasa y no se observó producción de indol, ni de nitratos.

Conclusiones: A partir del estudio se comprobó la fase de dormancia de *X. arboricola* en el interior de órganos florales durante la época invernal. Los patógenos están presentes de manera cíclica en las plantaciones.

MI 104

0338 - BACTERIAS ESPORULADAS AEROBIAS ASOCIADAS CON POLEN APÍCOLA

ALIPPI, Adriana Mónica¹ | FERNÁNDEZ, Leticia Andrea² | LÓPEZ, Ana Claudia³

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE FITOPATOLOGÍA (CIDEFI), FACULTAD DE CS. AGRARIAS Y FORESTALES, UNLP¹; LABORATORIO DE ESTUDIOS APÍCOLAS, DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR²; CENTRO DE INVESTIGACIONES DE FITOPATOLOGÍA (CIDEFI) - FACULTAD DE CS. AGRARIAS Y FORESTALES - UNLP³

Introducción y Objetivos: El polen apícola es el resultado de la aglutinación del polen de flores con néctar y sustancias salivares de las abejas, recolectado y transportado por las mismas a la colmena. Este polen es un producto natural que queda expuesto a las condiciones ambientales, por lo que contiene una variada microbiota representada principalmente por lactobacilos, levaduras y bacterias esporuladas procedentes de las mismas abejas, de las superficies florales, de otros insectos o de las prácticas apícolas. Las especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, entre otros, son las citadas con mayor frecuencia en miel, larvas y abejas adultas. Muchos representantes son ubicuos y, entre ellos, se encuentran especies patógenas como *Paenibacillus larvae*, agente causal de la enfermedad de las larvas de abejas denominada loque americana y *Bacillus cereus sensu lato* y *Bacillus megaterium* potencialmente enterotóxicos para el hombre. El objetivo del presente trabajo fue identificar a las especies esporuladas aerobias presentes en la microbiota del polen.

Materiales y Métodos: Las muestras de polen fresco obtenido directamente de trampas de apiario, sin ningún tipo de procesamiento, fueron diluidas en buffer fosfato salino pH 7,2 (1 g en 10 ml); luego de un filtrado por Whatman # 3, se centrifugaron a 9.500 X g durante 30 minutos, eliminando sobrenadante y dejando 3 ml del fluido que se sometió a shock térmico (80 °C -15 min). Alícuotas de 100 µl se sembraron por triplicado en MYPGP adicionado con ácido nalidíxico y pipemídico para el aislamiento de *P. larvae*; en PEMBA para el aislamiento de *Bacillus* del grupo *cereus* y en Hicrome Bacillus agar para la diferenciación de otras especies. A partir de 25 muestras de polen de distintos orígenes geográficos de la Argentina se identificaron 65 aislamientos bacterianos que se separaron por morfología de las colonias desarrolladas en MYPGP, PEMBA y Hicrome Bacillus agar, reacción de catalasa, observación microscópica de células vegetativas, esporas y presencia de glóbulos lipídicos en el citoplasma. Los distintos grupos bacterianos se identificaron a nivel de especie mediante el análisis de los polimorfismos del gen 16s rRNA por la técnica de PCR/RFLP amplificando el ADN genómico total mediante los cebadores 27f/1492r y posterior incubación con las endonucleasas *AluI*, *HaeIII*, *CfoI* y *TaqI*.

Resultados: Las especies más frecuentes fueron *B.cereus sensu stricto* (29%); *Bacillus subtilis* (17%), *B. megaterium* (15%) y *P. larvae* (9%) y, en menor proporción *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus polymyxa* y *Rummeliibacillus stabekisii*.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que el polen contiene una microbiota similar a la de la miel pero con características propias pudiendo vehicular agentes causales de enfermedades en las abejas, debido a la presencia de *P. larvae*, como también enfermedades transmisibles por alimentos, debido a la presencia de *B. cereus* y *B. megaterium*.

MI 105

0369 - IMPACTO DE DOS CULTIVOS DE COBERTURA Y DE SU INOCULACIÓN CON DOS RIZOBACTERIAS BENÉFICAS SOBRE EL APORTE DE BIOMASA Y LA DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EDÁFICAS

ESCOBAR ORTEGA, Jhovana Silvia¹ | AGUILAR VASQUEZ, Noemi Nancy² | AVILA, Teresa² | GARCÍA DE SALAMONE, Inés Eugenia³

CONICET¹; CENTRO DE INVESTIGACIONES FITOECOGENÉTICAS DE PAIRUMANI, COCHABAMBA BOLIVIA.²; CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA, FAUBA³