



Cuantificación de *Bradyrhizobium diazoefficiens* viables en inoculantes utilizando la técnica PMA-qPCR.



Galiñanes A², Cap M.¹, Frydman C.¹, Aranguiz C.², Faraco I.², Andriolo L.², Parreño V.¹ y Mozgovoij, M.¹.

¹ INTA – Instituto Tecnología de Alimentos, Hurlingham, Argentina. ICYTAS – Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables, INTA-CONICET. ² Rizobacter S.A.
Contacto: agalinanes@rizobacter.com.ar.

INTRODUCCIÓN

Bradyrhizobium diazoefficiens SEMIA 5080 es una bacteria clave en la producción de inoculantes por su capacidad para fijar nitrógeno en leguminosas. La determinación de la concentración bacteriana se realiza mediante la técnica de recuento en placa, un método microbiológico tradicional que puede ver retrasada la toma de decisiones.

El PMA (propidium monoazide) es un colorante fotorreactivo que se intercala en el ADN de células muertas e impide su amplificación. Su selectividad se basa en que la membrana bacteriana intacta es impermeable al colorante, por lo que solo penetra células con membranas comprometidas. Una vez dentro, se une al ADN de forma irreversible, impidiendo que sea amplificado por PCR. De este modo, al combinar PMA con qPCR, es posible amplificar únicamente el ADN de células viables, lo que representa una alternativa más rápida y precisa para la cuantificación bacteriana en inoculantes.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue validar una técnica rápida y confiable basada en PMA-qPCR para cuantificar células viables de *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 en inoculantes comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Inóculo:

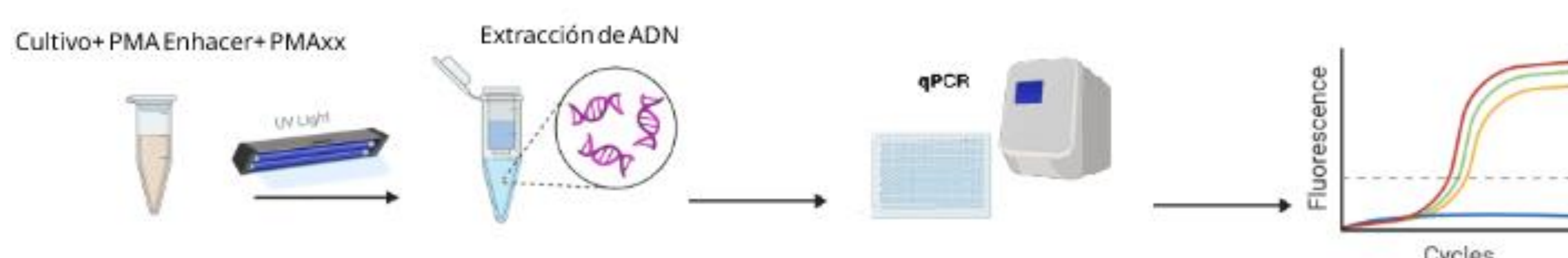
Se utilizó la cepa SEMIA 5080 en fase exponencial (8,64 log UFC/mL). Una alícuota fue inactivada por calor (95 °C, 10 min) y otra se mantuvo viable. Las células viables se diluyeron en serie (1:10).

2. Extracción de ADN y qPCR:

El ADN se extrajo con el kit TianAmp (Tiangen, China). Se diseñó un ensayo qPCR específico con primers y sonda TaqMan dirigidos a regiones conservadas de *B. diazoefficiens*. La amplificación se realizó en StepOnePlus (Thermo Fisher), con curvas estándar construidas con diluciones seriadas de ADN extraído de un cultivo bacteriano con concentración conocida (10⁸–10² UFC/mL).

3. Tratamiento con PMA:

Se utilizaron concentraciones de entre 50–100 µM de PMAxx. Las muestras se incubaron 30 min protegidas de la luz, se fotoactivaron con luz LED azul por 15 min y se centrifugaron para eliminar el exceso de reactivo antes de la extracción de ADN.



Diseño experimental:

Determinación de la concentración mínima de PMA.

Se evaluaron 3 concentraciones de PMA (50, 75 y 100 µM) sobre cultivos muertos (4 a 9 log UFC/mL) para establecer el nivel mínimo necesario para inhibir la amplificación.

Evaluación de la interferencia del PMA sobre células viables.

Se analizaron 3 concentraciones de bacterias viables (6, 7 y 8 log UFC/mL) con y sin tratamiento con PMA.

Cuantificación de células viables en presencia de altas cantidades de células muertas.

Se mezclaron bacterias vivas con una concentración conocida de células muertas. Se comparó la detección con y sin PMA.

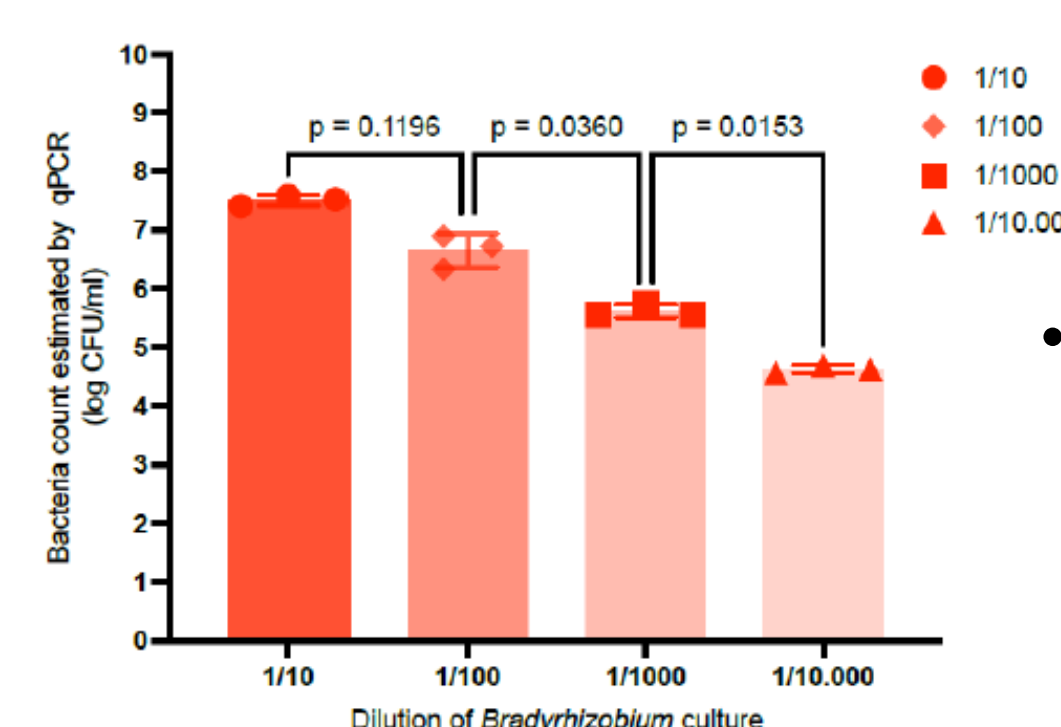
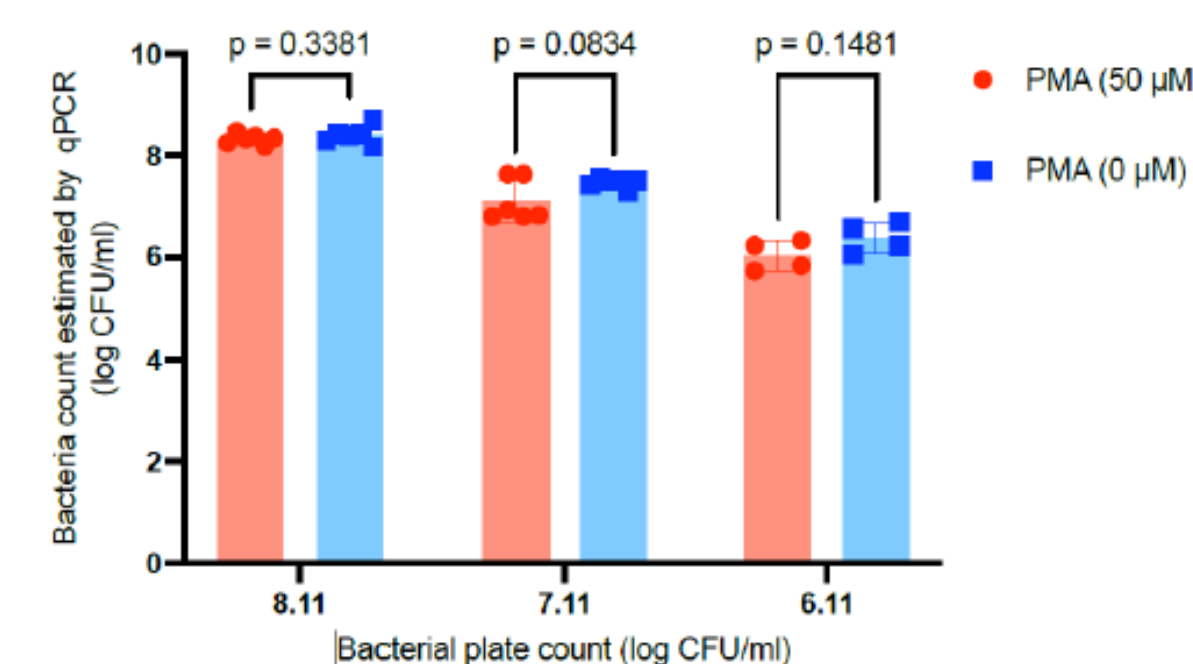
Discriminación de viables en mezclas cercanas.

Se evaluó la capacidad del método para discriminar bacterias vivas en concentraciones muy próximas.

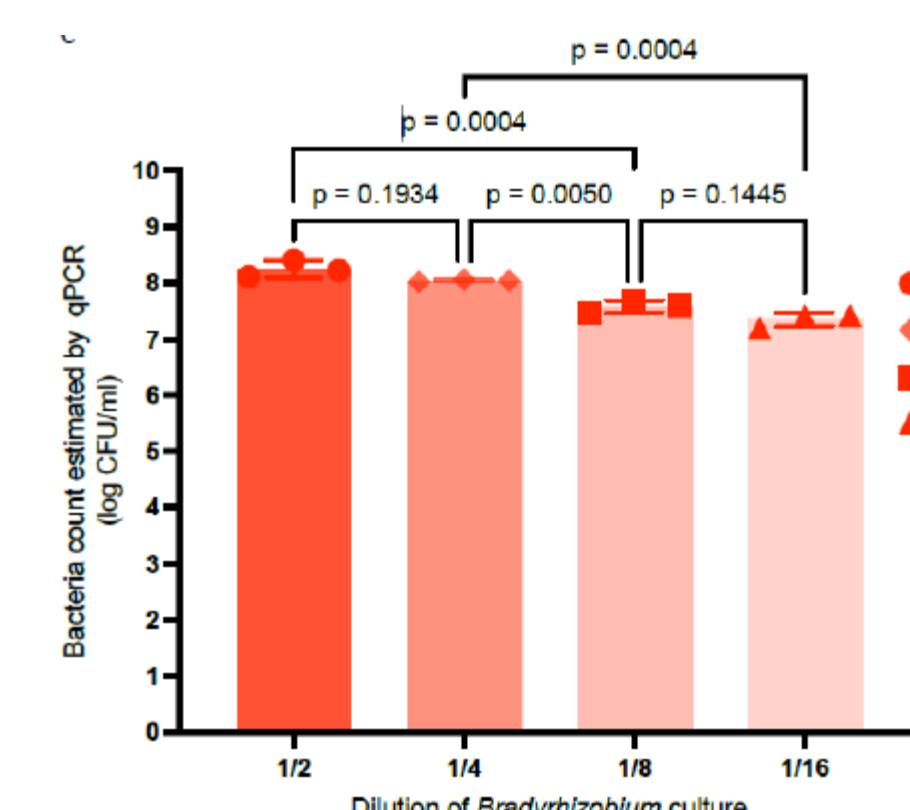
Validación en productos comerciales. Se aplicó PMA-qPCR y recuento en placa a productos almacenados durante 0, 12 y 24 meses.

RESULTADOS

- Figura 1: Evaluación de la posible interferencia de PMA en la amplificación de diferentes concentraciones de células viables.

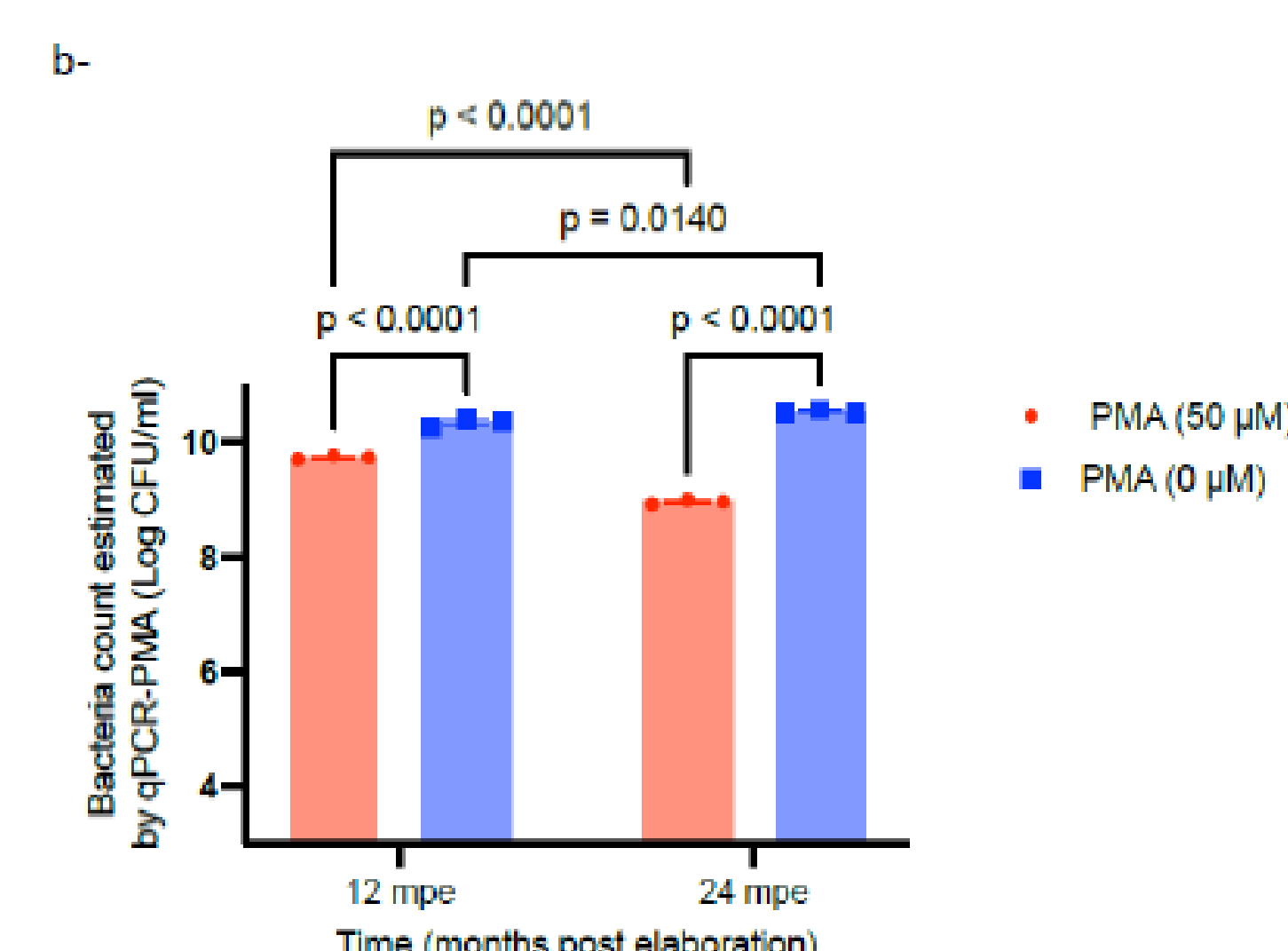
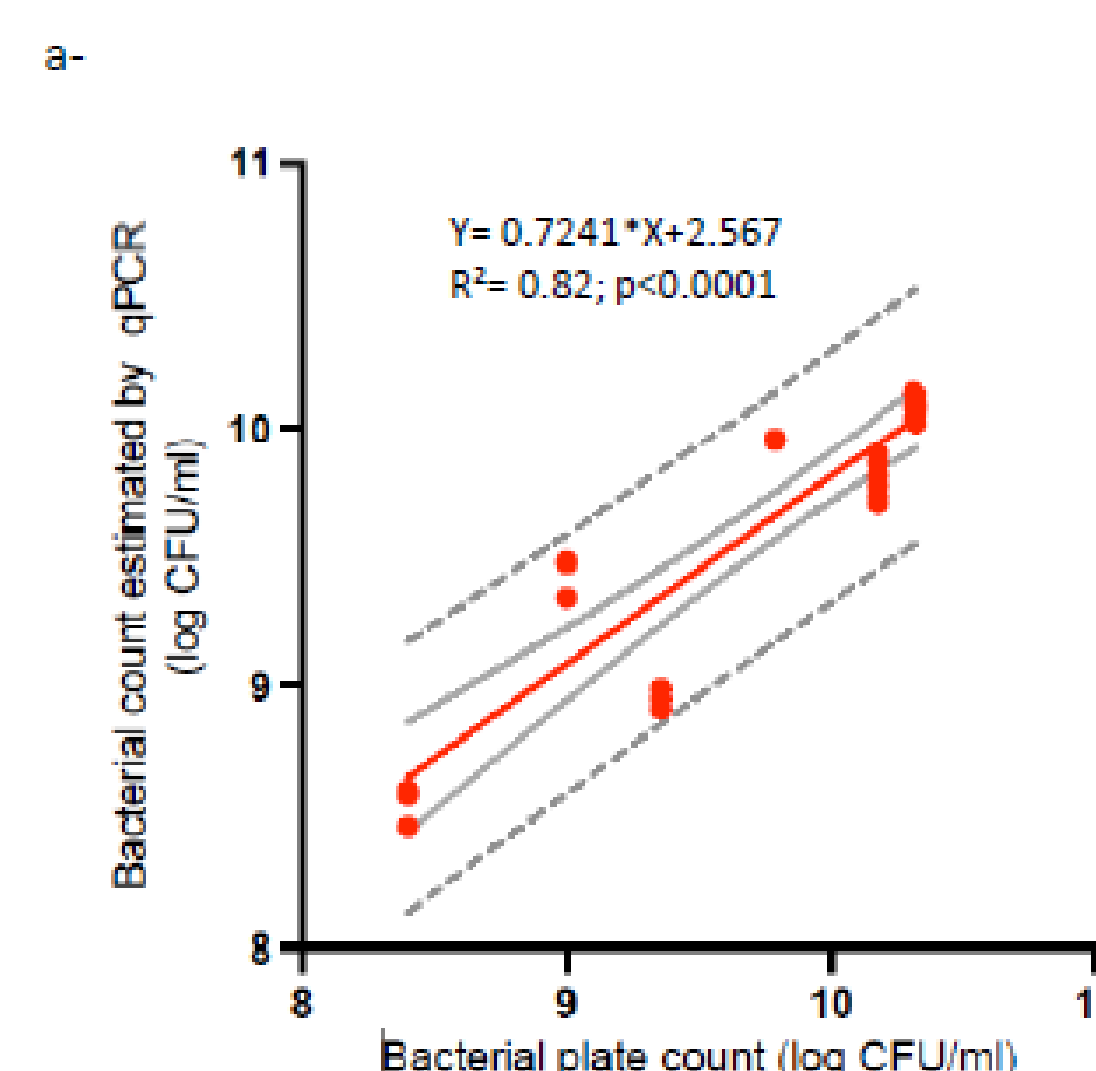


- Figura 2: Evaluación de la precisión de la PMA-qPCR en la cuantificación de bacterias viables en presencia de una alta concentración de células no viables.



- Figura 3: Evaluación del rendimiento de la qPCR con PMA para distinguir células viables de no viables en un rango de concentración cercano.

- Figura 4: Validación de la metodología utilizando lotes del producto final en tres tiempos de almacenamiento (0, 12 y 24 meses después de la elaboración). (a) Regresión lineal entre las bacterias viables estimadas por PMA-qPCR y el recuento bacteriano en placa. (b) Comparación de los recuentos bacterianos promedio entre diferentes tiempos de almacenamiento (12 y 24 meses después de la elaboración), con y sin tratamiento con PMA.



CONCLUSIONES

La técnica permitió discriminar entre concentraciones bacterianas incluso en presencia de altos niveles de células muertas.

Se validó el método sobre productos comerciales almacenados hasta 24 meses, observando una correlación del 82% con la metodología tradicional, reduciendo así el tiempo de análisis de 120 a 5 horas. Este trabajo demuestra que PMA-qPCR es una herramienta eficiente para el control de calidad en bioinsumos, permitiendo un monitoreo rápido y preciso de viabilidad bacteriana.