

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO

PERIODO 2014-2015

1. APELLIDO: PELLEGRINI

NOMBRES: MARIA CELESTE

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: MAR DEL PLATA *CP:* 7600 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información):

mariacelestepellegrini@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

"CONTROL BIOLÓGICO DE *Paenibacillus larvae*, AGENTE CAUSAL DE LOQUE AMERICANA EN COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS"

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01-04-2012

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01-04-2013

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01-04-2014

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Facultad: FACULTAD DE CS. EXACTAS Y NATURALES

Departamento: BIOLOGIA

Cátedra: -----

Otros: GRUPO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLOGÍA APLICADA (GIMA)-CENTRO DE INVESTIGACION EN ABEJAS SOCIALES (CIAS)

Dirección: Calle: FUNES *N°:* 3350

Localidad: MAR DEL PLATA *CP:* 7600 *Tel:* 0223-4752426

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: FUSELLI, SANDRA ROSA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: MAR DEL PLATA *CP:* 7600 *Tel:*

Dirección electrónica: sfuselli@mdp.edu.ar; sfuselli@gmail.com

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Durante el 1er año de Beca de Perfeccionamiento (Periodo: abril 2014-marzo 2015) se llevaron a cabo las investigaciones previstas en el plan de actividades propuesto.

De acuerdo a los objetivos planteados, que se mencionan a continuación, se efectuaron las siguientes actividades:

1- Caracterización química de aceites esenciales:

Durante el 1er y 2do año de Beca de Estudio se realizaron dos estancias de investigación en el Laboratorio de Ecología Química (LEQ), Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo (Uruguay), en el marco del Proyecto Conjunto de Investigación "MERCOSUR" (PPCP 032/2011), bajo la dirección de la Dra. Carmen Rossini con el fin de analizar químicamente diversos aceites esenciales (AEs). Los AEs fueron inyectados en un cromatógrafo gaseoso acoplado a masa (GC_MS) Shimadzu 2010-Shimadzu QP2010 utilizando una columna no polar (DB-5ms) y en un cromatógrafo gaseoso con un detector de ionización de llama (GC_FID) (Hewlett-Packard 5890 Series II). Durante el 1er año de Beca de Perfeccionamiento se finalizó con la identificación y cuantificación de los componentes químicos presentes en AEs empleados en nuestros estudios. Para la identificación de los componentes de los AEs, se compararon los índices de retención calculados de cada pico del cromatograma con aquellos reportados en librerías de datos del cromatógrafo de masa (NIST 05 y SHIM 2205) presentes en el Software Shimadzu 2010-Shimadzu QP2010 del correspondiente correspondiente GC_MS. Con respecto a la cuantificación de los componentes químicos de cada AE, se tuvo en cuenta el área que ocupaba cada pico (componente) respecto al área total de cada espectrograma obtenido por el GC_FID Hewlett-Packard 5890 Series II correspondiente. Los AE de Schinus molle, Minthostachys mollis, Salvia officinalis, Artemisia annua, Satureja odora, Lepechinia floribunda, Lippia turbinata, Wedelia glauca, Tagetes minuta, Aloysia polystachia, Heterothalamus allienus y Solidago chilensis pertenecientes a distintas zonas de Argentina fueron caracterizados químicamente. Asimismo, AEs no autóctonos de Argentina como Cymbopogon citratus, Rosmarinus officinalis, Eucaliptus citriodora, Cymbopogon nardus, Ocimum basilicum y Elettaria cardamomum fueron caracterizados químicamente.

2- Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cada uno de los aceites esenciales ensayados frente a Paenibacillus larvae:

La determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se efectuó mediante la modificación de la técnica de microdilución en caldo recomendada por la NCCLS (1999), la metodología empleada fue puesta a punto durante el 1er año de Beca de Estudio (Ver informe correspondiente al 2do año de Beca de Estudio).

Durante el 1er año de Beca de Perfeccionamiento se evaluó la actividad antimicrobiana de los siguientes aceites esenciales: Lippia turbinata (CIM=CBM=35.5 µg/mL), Schinus molle (CIM=CBM=31.25 µg/mL), Acantholippia seriphoides (CIM=CBM=62.5 µg/mL), Artemisia annua (CIM=CBM=37.5 µg/mL), Baccharis latifolia (CIM=CBM=4.7 µg/mL), Heterothalamus allienus (CIM=CBM=12.5 µg/mL), Satureja odora (CIM=CBM=17.5 µg/mL), Tagetes minuta (CIM=CBM=18.75 µg/mL), Wedelia glauca (CIM=18.75 µg/mL;

CBM=25 µg/mL); *Salvia officinalis* (CIM=200 µg/mL; CBM=250 µg/mL); *Solidago chilensis* (CIM=2000 µg/mL; CBM=2000 µg/mL), *Aloysia polystachia* (CIM=137 µg/mL; CBM=112 µg/mL) y *Lepechinia floribunda* (CIM=CBM=62.5 µg/mL) frente a cuatro cepas de *P. larvae*. Se está finalizando con la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes aceites esenciales frente a otras cepas de *P. larvae* de apiarios de Argentina que posee nuestro laboratorio.

Referencias:

-National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved Standard, NCCLS Document M31-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

3-Curvas de crecimiento de *P. larvae*

Con el fin de conocer la cinética de crecimiento de un cultivo de *P. larvae* se realizaron curvas de crecimiento bacteriano en caldo J (tripteína bacteriológica 20%, extracto de levadura 60%, K₂PO₃ 12% y glucosa 8%). Se inocularon 30 ml del caldo J con un pre-inóculo de 24hs de *P. larvae* (Densidad óptica (DO)₆₀₀: 0.05). Los cultivos obtenidos se incubaron por 72hs a 37°C, en condiciones aeróbicas (shaker a 150 rpm). Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos y se midió la DO₆₀₀ con espectrofotómetro (SP-1103) y se efectuó el recuento bacteriano (UFC/ml). Este procedimiento se ensayó en 6 cepas de *P. larvae*.

4- Liberación y caracterización de proteasas caseinolíticas de cultivos de *P. larvae*:

Se realizaron pre-inóculos de 24hs de *P. larvae* en tubos con 2 ml de caldo J, para luego ser utilizados en cultivos bacterianos (30 ml en caldo J). Estos últimos, se incubaron por 72hs a 37°C en condiciones aeróbicas (shaker a 150 rpm). Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos de incubación y se midió la DO₆₀₀ con espectrofotómetro (SP1103), se efectuó el recuento bacteriano (UFC/ml), se analizó la presencia de proteasas (en placas de agar leche, a partir del halo de proteólisis) y se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford (1976).

Referencia:

-Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

5- Realización de zimografía para conocer la naturaleza de las proteasas liberadas por *P. larvae*. Procedimiento:

a- Concentración de las muestras: Muestras de sobrenadantes (SN) provenientes de cultivos de *P. larvae* de diferentes tiempos de incubación (67 y 72 hs) fueron concentradas por Amicon-Centrifugación YM 10. Para ello, se colocaron 500 µl de muestra en los centricones y se centrifugaron a 5000 g. Se tomaron muestras del concentrado retenido por la membrana y del filtrado resultante (retenido en los tubos colectores) y se efectuaron los ensayos de proteólisis en placas con agar leche. Como se observó actividad caseinolítica en la muestra retenida por la membrana, se tomó una alícuota y se conservó para su posterior análisis.

b- Preparación de los geles: Se realizó un gel separador (10%) y otro stacking (5%). El primero contenía Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%, Tris HCL 1,5 M ph 8.8, agua destilada, SDS 10%, Temed, Persulfato de amonio (APS) 10% y gelatina 1%. Y el segundo contenía Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%, Tris HCL 0.25 M ph 6.8, agua destilada, SDS 10%, Temed y APS 10%. Se procedió al armado del equipo electroforético con los correspondientes geles.

c- Preparación de las muestras: A las muestras conservadas (concentrado de proteasas) se les incorporó Sample Buffer (1x) al igual que a un marcador de peso molecular como BSA. Se sembraron las muestras por duplicado en las calles correspondientes.

d- Corrida electroforética: Se comenzó la corrida con los parámetros correspondientes al tamaño del gel (20mA para un gel pequeño) hasta que el frente de corrida estuvo en el límite inferior del gel.

e- Revelado: Una vez corrido el gel, se desarmó el equipo y los geles se lavaron con Tritón 2% (3 veces) durante 15 min para retirar el resto de SDS y luego 3 veces con agua bidestilada.

f- Incubación: El gel se dividió por la mitad: una fracción se incubó en una solución de Tris 0,25 M, NaCl 1M, CaCl₂ 0,025 M a 37°C (Control) y la otra, se incubó en una solución de Tris 0,25 M, NaCl 1M, CaCl₂ 0,025 M y 75 mM de EDTA (inhibidor de metaloproteasas) a 37°C.

g- Teñido de los geles: Se realizó la tinción con coomasie coloidal y posteriormente, se lavaron los geles con agua destilada.

La producción de proteasas extracelulares en cultivos de *P. larvae* se inició en la fase tardía de crecimiento exponencial y alcanzó un máximo en la fase estacionaria. Con la zimografía se detectó que el peso molecular de las proteasas era de 60 KDa y pertenecían al grupo de las metaloproteasas. Estos resultados permiten hipotetizar que la producción/liberación/activación de proteasas podría estar inducida en respuesta a una alta densidad celular bacteriana, que sería indicativo de un mecanismo de Quorum Sensing (QS) como regulador de proteasas.

6- Determinación de la regulación de la producción/liberación/activación de proteasas por quorum sensing:

Al producirse la liberación de proteasas en las etapas tardías de crecimiento de un cultivo bacteriano de *P. larvae* (alta densidad bacteriana), se hipotetizó que esta liberación estaría regulada por un mecanismo de QS. Para poner esto a prueba, en primer lugar se centrifugó un cultivo de 30 mL de *P. larvae* en estado estacionario (DO₆₀₀=2.5) y luego el sobrenadante se ultrafiltró (Amicon 30 KDa). El filtrado obtenido (llamado medio condicionado) se incorporó a un cultivo de *P. larvae* joven (DO=0.08) y se analizó a diferentes tiempos la liberación de proteasas a partir de placas de agar leche (también se realizaron controles en caldo J). Esto se realizó en tres cepas de *P. larvae*.

La detección de actividad proteasa en el cultivo con medio condicionado se observó 15hs antes que en el cultivo control, lo que indicaría que en el medio condicionado habría alguna molécula que actuaría como señal para el QS. Se conservaron muestras de sobrenadantes de cultivos control (sin medio condicionado) y de cultivos inducidos con el medio condicionado para realizar corridas electroforéticas.

7- Electroforesis en gel desnaturizante de poli(acrilamida): SDS-PAGE.

Con el fin de analizar la existencia de alguna/s proteína/s diferencial/es entre los cultivos control y los tratados con medio condicionado que pudiera ser la/s responsable/s de actuar como inductor para que se desarrolle el QS, se realizó una primera corrida electroforética preliminar. Procedimiento efectuado:

a- Concentración de las muestras: A los SN de las muestras control y las inducidas (con medio condicionado) se les incorporó ácido tricloroacético (TCA) 15% durante 30 minutos en hielo. Luego, se centrifugaron a 10.000 rpm y al precipitado se le agregó nuevamente TCA por otros 30 minutos. Posteriormente, se efectuaron 3 lavados con acetona fría (1ml) y se centrifugó 3 veces más. Por último, se descartó el sobrenadante

y se dejó toda la noche destapado. Las muestras se resuspendieron en sample buffer 5x con Dithiothreitol (DTT) y se hirvieron para romper posibles interacciones proteicas.

b- Preparación de los geles: Se realizó un gel separador y otro stacking. El primero contenía Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%, Tris HCL 1,5 M ph 8.8, agua destilada, SDS 10%, Temed y Persulfato de amonio (APS) 10%. Y el segundo contenía Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%, Tris HCL 0.25 M ph 6.8, agua destilada, SDS 10%, Temed y APS 10%. Se procedió al armado del equipo electroforético con los correspondientes geles.

c- Preparación de las muestras: A las muestras se les incorporó Sample Buffer (1x) al igual que a un marcador de peso molecular como Rainbow-Low Molecular Weight (Invitrogen). Se sembraron las muestras en las calles correspondientes.

d- Corrida electroforética: Se comenzó la corrida con los parámetros correspondientes según el tamaño del gel (20mA para un gel pequeño) hasta que el frente de corrida estuvo en el límite inferior del gel.

c- Fijación de los geles: Una vez corrido el gel, se desarmó el equipo y los geles se fijaron en 50% agua, 40% ethanol y 10% ácido acético toda la noche.

d- Teñido de los geles: Luego de la fijación del gel se efectuó la tinción con coomasie coloidal. Y posteriormente, se lavaron los geles con agua destilada.

e- Densitometría: La intensidad de las bandas proteicas resueltas por SDS-PAGE fueron analizadas y cuantificadas relativamente con el software IMAGEJ1.47.

Los resultados obtenidos de los estudios sobre el rol del quorum sensing (QS) en *P. larvae*, dio lugar a la redacción del manuscrito: "Possible role of quorum sensing in the etiological agent of American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*). Autores: María Celeste Pellegrini, Lucía Zalazar, Sandra Fuselli y Alejandra Ponce. Enviado a la revista FEMS Microbiology Letters.

Referencia: IMAGEJ1.47. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>.

- Durante el 2do año de Beca de Perfeccionamiento, se continuarán los estudios sobre la producción/liberación/activación de proteasas por quorum sensing (QS) en cultivos de *P. larvae*.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

Pellegrini, M.C., Alvarez, M.V., Ponce, A.G., Cugnata, N.M., De Piano, F.G., Fuselli, S.R (2014) Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6): 458-465.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.

(Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

- Pellegrini, M.C., Zalazar, L., Fuselli, S.R. y Ponce, A.G. Possible role of quorum sensing in the etiological agent of American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*). Enviado a la revista FEMS Microbiology Letters. Manuscript ID: FEMSLE-14-12-1017.

- De Piano F.G, Maggi M, Pellegrini M.C, Cugnata N.M, Buffa F, Negri P, Fuselli S.R, Audisio C, Ruffinengo S. Effects of *Lactobacillus johnsonii* AJ5 metabolites on nutritional/immunological parameters, *Nosema ceranae* sporulation and performance of *Apis mellifera* colonies. Enviado a la revista Journal of Apicultural Research (27 de Octubre 2014).

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.

(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

A la fecha, se está llevando a cabo la redacción del review: "Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, causative agent of American Foulbrood", trabajo científico que recopila todos los antecedentes referidos a las diferentes alternativas naturales de control de Loque americana (AFB), tales como: aceites esenciales, jalea real, propóleos, bacterias y bacteriocinas, moléculas no convencionales y extractos vegetales.

Por otro lado se encuentra en etapa de elaboración un trabajo científico acerca de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *Solidago chilensis*, *Acantholippia seriphioides*, *Minthostachys mollis*, *Schinus molle*, *Baccharis* spp., *Lippia turbinata*, *Buddleja globosa* y *Aloysia polystachia* frente a *P. larvae*. Mediante el análisis quimiométrico se pretende correlacionar la actividad de cada aceite con los compuestos químicos que la componen. Los análisis microbiológicos in vitro fueron finalizados y en el presente se están realizando los análisis quimiométricos.

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

a- ASISTENCIA Y PRESENTACIONES A CONGRESOS.

-"Detección de Quorum Sensing y su posible rol en la virulencia de *Paenibacillus larvae*". Pellegrini, MC; Cugnata, NM; Zalazar, L; Marcangeli, J, Fuselli, SR y Ponce, AG. XI

Congreso Latinoamericano de Apicultura - 2014 FILAPI. 3 al 6 de Septiembre de 2014. Lugar de realización Pto. Iguazú, Misiones, Argentina. Presentado como POSTER.

-"Efectividad del ácido láurico y la menadiona en el control de Loque americana". Cugnata, NM; Pellegrini, MC; Guaspari, E; Alonso-Salces, RM; Marcangeli, J y Fuselli, SR. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura - 2014 FILAPI. 3 al 6 de Septiembre de 2014. Lugar de realización Pto. Iguazú, Misiones, Argentina. Presentado como POSTER.

-"Efecto de metabolitos bacterianos sobre la supervivencia de Apis mellifera". De Piano, FG; Maggi, M; Pellegrini, MC; Mitton, G; Varela, S; Eguaras, M; Audisio, MC y Ruffinengo, SR. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura - 2014 FILAPI. 3 al 6 de Septiembre de 2014. Lugar de realización Pto. Iguazú, Misiones, Argentina. Presentado como POSTER.

-"Detección de Quorum Sensing y su posible rol en la virulencia de Paenibacillus larvae". Pellegrini, MC; Cugnata, NM; Zalazar, L; Marcangeli, J; Fuselli, SR y Ponce, AG. IX Encuentro Anual Biólogos en Red. 20-21 de Noviembre de 2014. Lugar de realización: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Mar del Plata. Presentado como POSTER (no inédito).

-"Efectividad del ácido láurico y la menadiona en el control de Loque americana". Cugnata, NM; Pellegrini, MC; Guaspari, E; Alonso-Salces, RM; Marcangeli, J y Fuselli, SR. IX Encuentro Anual Biólogos en Red. 20-21 de Noviembre de 2014. Lugar de realización: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Mar del Plata. Presentado como POSTER (no inédito).

b- PRESENTACIONES A CONGRESOS EFECTUADAS:

-"Paenibacillus larvae protease as a virulence factor in honeybee larvae infection". María Celeste Pellegrini, Noelia Melina Cugnata, Elisa Guaspari, Rosa María Alonso-Salces, Alejandra Graciela Ponce, Rosana De Castro y Sandra Rosa Fuselli. Sixth european Conference of Apidology- Eurbee 6. 9-11 de Septiembre de 2014. Lugar de realización: Universidad de Murcia, Murcia, España. Presentado como POSTER.

-"Non-conventional molecules to control Paenibacillus larvae, causal agent of American foulbrood". Noelia Melina Cugnata, María Celeste Pellegrini, Rosa María Alonso-Salces y Sandra Rosa Fuselli. Sixth european Conference of Apidology- Eurbee 6. 9-11 de Septiembre de 2014. Lugar de realización: Universidad de Murcia, Murcia, España. Presentado como POSTER.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

CURSOS DE POST GRADO EFECTUADOS:

-Curso de posgrado "Avances en proteómica aplicada a la Investigación". 27 de octubre al 1 de Noviembre de 2014. Docentes responsables: Dra. Andreina Cesari, Dra. Silvia Moreno, Dr. Ansgar Poestch y Roberto Paggi. Carga horaria: 24 horas teóricas y 24 horas prácticas. Institución organizadora: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Calificación: 9 (nueve) Distinguido. Uvacs: 2,5.

-Curso de posgrado "Quimiometría". 17 al 21 de noviembre de 2014. Docentes responsables: Dra. Sandra Rosa Fuselli, Dr. Juan Antonio Fernandez Pierna y Dra. Rosa María Alonso Salces. Carga

horaria: 24 horas teóricas y 12 horas prácticas. Institución organizadora: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, CIAS-GIMA. Aprobado Uvacs: 2,5.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

-Adscripción "ad honorem" en la cátedra "Microbiología general", perteneciente a las carreras de Licenciatura en Ciencias Biológicas y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMDP. Segundo cuatrimestre año 2014 (6 horas semanales).

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

TESIS DOCTORAL (OCA N° OCA 1343/12) "Actividad antimicrobiana y anti-patogénica de sustancias bioactivas para el control de loque americana". Directora: Dra. Sandra R. Fuselli. Co-directora: Dra Alejandra Ponce. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Fecha de inicio: Septiembre 2012. En curso.
(Se adjunta 1er INFORME ESCUELA DE POSGRADO FCEyN-UNMdP correspondiente a 18 MESES).

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Título del Plan de Trabajo: "Control biológico de *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque americana en colonias de abejas melíferas".

Durante el 2do año de Beca de Perfeccionamiento se realizarán las siguientes actividades:

a- Identificación de los compuestos inductores de Quorum sensing.

A partir de los geles producto de corridas electroforéticas de muestras control (cultivo de *P. larvae*) y tratadas (cultivo de *P. larvae* en medio condicionado), se procederá a extraer las bandas diferenciales (con respecto al control) y se analizarán con un equipo MALDI-TOF en el Instituto Pasteur de Montevideo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas con el fin de identificar la/s proteína/s diferencial/es que podrían estar actuando como inductores para la producción/liberación/activación de proteasas.

b- Liberación de proteasas de *P. larvae* en presencia de aceites esenciales.

Se utilizará la técnica de azocaseína (Charney y Tomarelli, 1947) para la cuantificación de proteínas liberadas en cultivos líquidos de *P. larvae* en presencia de AE; para analizar si los AE producen una liberación de proteasas en cultivos de *P. larvae* diferente con respecto al control. También, se realizarán geles monodimensionales (SDS-PAGE) para analizar las posibles diferencias en el perfil proteico entre cultivos de *P. larvae* control y cultivos de *P. larvae* co-incubados con AEs.

Referencia: Charney J y Tomarelli RM. Azocasein method. J Biol Chem 1947;171:501.

Una vez, que se hayan obtenido los resultados del screening de todos los aceites esenciales empleados en este estudio (evaluación de la actividad antimicrobiana y anti-QS frente a *P. larvae*), se llevarán a cabo los ensayos de Toxicidad.

c- Ensayos de Toxicidad en larvas y Toxicidad en abejas adultas con los aceites esenciales que resulten promisorios para el control in vitro de la enfermedad.

- Ensayos de Toxicidad en abejas adultas: Se determinará la CL50 de los AEs sobre abejas adultas por el método de exposición completa. La técnica de exposición completa se efectuará de acuerdo a la metodología empleada por Ruffinengo y colaboradores (2005).

Referencia: Ruffinengo S, Eguaras M, Floris I, Faverin C, Bailac P, Ponzi M (2005) LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology* 98: 651- 655.

- Ensayos de Toxicidad en larvas de abejas: Se llevará a cabo la puesta a punto de la técnica de la cría in vitro de larvas, teniendo en cuenta las recomendaciones propuestas por Crailsheim y colaboradores (2013). Posteriormente, se efectuarán los ensayos de toxicidad en larvas con placas de microdilución como estructura de soporte, según Evans (2004).

Referencias:

- Crailsheim K, Brodschneider R, Aupinel P, Behrens D, Genersch E, Vollmann J y Riessberger-Gallé, U (2013). Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *Journal of Apicultural Research* 52: 1.

- Evans, J. D. (2004). Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85(2): 105-111.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se efectuarán ensayos "in vivo" mediante la aplicación de los aceites esenciales autóctonos que resulten más promisorios, a diferentes dosis y formas de administración, en minicolonias de abejas.

El objetivo final del proyecto es seleccionar un aceite esencial autóctono que sea antipatogénico al controlar la liberación de proteasas de *P. larvae*, que no resulte tóxico para las abejas adultas y sus larvas y que controle a nivel colonia la enfermedad Loque Americana. En este sentido, la aplicación de un producto fitosanitario en mínimas concentraciones dentro de una colonia de abejas para el control de la enfermedad, contribuirá a la solución de los problemas derivados de la toxicidad o persistencia de plaguicidas sintéticos en el ambiente, cuyos residuos son generalmente no biodegradables.

Condiciones de 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 Becario, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

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

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario

FORMULARIO II-PLAN Y LUGAR DE TRABAJO

1. Denominación del trabajo

“Control biológico de *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque americana en colonias de abejas melíferas”.

2. Definición del problema y estado actual del conocimiento sobre la cuestión.

La apicultura de nuestro país ha demostrado ser altamente competitiva en el mercado mundial. En la provincia de Buenos se concentra el 60% de las colmenas del país, y por ende, un significativo porcentaje de la producción de miel argentina. Argentina se posiciona como un productor mundialmente reconocido por la calidad de sus mieles. Sin embargo, existen cuestiones de importancia que aún no han sido resueltas, especialmente en relación a los problemas sanitarios que condicionan el desarrollo de la actividad apícola en el país. Entre las enfermedades que afectan a la abeja melífera (*Apis mellifera*) con fuerte impacto negativo sobre su actividad se destaca Loque americana (LA), su agente etiológico es *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006), bacteria Gram positiva con capacidad de formar esporas que permanecen infectivas y viables por largos períodos y sobreviven frente a condiciones adversas (Morse y Nowogrodzki, 1990). LA se encuentra difundida mundialmente, con excepción de algunos países africanos y del sudeste asiático (Matheson, 1993, 1996; Ellis y Munn, 2005). En la Argentina se la detectó por primera vez en 1989 (Alippi, 1992) y en la actualidad se halla ampliamente diseminada en todas las áreas productoras de miel de nuestro país (Alippi, 1992; 1995; Alippi *et al.*, 2004). En la mayoría de los países desarrollados la quema de colmenas enfermas es la única alternativa para su control. En Europa, la enfermedad es de denuncia obligatoria y no está permitido realizar ningún tratamiento quimioterapéutico a las colonias que presenten signos clínicos de la enfermedad. Esto significa que las abejas y el material apícola contaminado debe ser destruido completamente (Anon, 2002). En algunos países, como Argentina, está permitido el uso de antibióticos para conservar el material vivo, estos eliminan los síntomas de la enfermedad en colmenas controlando únicamente las formas vegetativas de la bacteria, pero no las esporuladas. El clorhidrato de oxitetraciclina es la droga más utilizada para tal fin. Sin embargo, el uso indiscriminado e incorrecto de las sustancias quimioterapéuticas ha ejercido una fuerte presión de selección sobre las diferentes poblaciones bacterianas y ha generado la aparición de focos de resistencia en el mundo, incluida Argentina (Alippi y Reynaldi, 2006), así como también la presencia de residuos o metabolitos en miel y cera. En este contexto, es importante encontrar métodos alternativos de control que sean eficaces, inocuos y rentables. Las sustancias bioactivas, basados en ACEITES ESENCIALES (AE), representan una alternativa natural de tratamiento en particular para aquellas enfermedades relacionadas con la provisión de alimentos. Los aceites esenciales de *Acantholippia seriphoides*, *Tagetes minuta*, *Nardus lemongrass*, *Melaleuca viridiflora*, *Citrus paradisi*, *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Lavandula officinalis*, *Lepechinia floribunda*, entre otros, demostraron poseer actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *P. larvae* (Alippi *et al.*, 2001; Albo *et al.*, 2003; Eguaras *et al.*, 2005; Fuselli *et al.*, 2006a,b, 2007, 2008a,b, 2009; Gende *et al.*, 2007).

Nuevas investigaciones han sugerido que la secreción de factores de patogenicidad o de virulencia por parte de las bacterias juega un papel primordial en las infecciones debido a que dichos factores otorgan una ventaja en la competencia con otras bacterias (Raffa *et al.*, 2005). Estos procesos comunes a varias enfermedades bacterianas aparecen asociados a la densidad celular medida a través de la regulación de la expresión génica. **En tal sentido, a partir de la habilidad que tienen ciertas bacterias de poder comunicarse en función de la densidad celular, mecanismo conocido como Quorum sensing (QS), surge una nueva perspectiva de investigación mediante la aplicación de sustancias bioactivas (AE) como agentes terapéuticos, que actúen como inhibidores del mecanismo celular y que controlen la bacteriosis.** El QS ocurre a través de moléculas llamadas auto-inductores (Gram *et al.*, 2002), las cuales activan receptores que permiten la transcripción de genes que codifican la información necesaria para controlar diversos

mecanismos bioquímicos asociados con la supervivencia y patogenicidad bacteriana. Estas moléculas auto-inductoras han sido identificadas como oligopéptidos en bacterias Gram positivas y como homoserina lactonas (AHL) en bacterias Gram negativas (Ryan y Dow, 2008; Di Cagno *et al.*, 2011). El QS permite a una población de bacterias generar respuestas que resultan ventajosas para su supervivencia como es el aumento en el acceso a otros nichos y a nutrientes más complejos, la producción de defensas contra el sistema inmune de hospedadores eucariotas o contra otros microorganismos y la generación de polimorfismos mejores adaptados al ambiente (Swift *et al.*, 2001). Así es como el QS regula diversas funciones en las bacterias como luminiscencia, producción de antibióticos, factores de virulencia, formación de biofilm, interacciones planta-microorganismo y motilidad (Rasmussen *et al.*, 2000; Hentzer *et al.*, 2002; McClean *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2009). **Teniendo en cuenta la importancia del mecanismo de QS en los procesos de infección bacteriana, el uso de compuestos anti-quorum sensing (anti-QS) es de gran interés para afrontar esta problemática** (Rice *et al.*, 2005; Adonizio *et al.*, 2006) Estos compuestos “anti-patogénicos”, en contraste con los antimicrobianos, no producen la muerte celular ni detienen el crecimiento y se supone que no conducen al desarrollo de cepas resistentes (Otto, 2004). El inhibidor ideal del QS quedaría definido como una molécula de bajo peso molecular y alta efectividad que exhibe un alto grado de especificidad en la regulación del QS sin producir ningún efecto tóxico (Truchado *et al.*, 2012). La mayoría de los compuestos anti-QS identificados son de origen vegetal (Bauer y Teplitski, 2001; Choo *et al.*, 2006). Los AE de clavo de olor, canela, menta, peperina, lavanda, romero, rosa y geranio demostraron poseer actividad anti-QS, utilizando como bacteria indicadora a *Chromobacterium violaceum*, productora de violaceína (Ahmad *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009; Szabó *et al.*, 2010 y Olivero *et al.*, 2011). Del mismo modo, uno de los más importantes factores de virulencia que podría estar asociado al mecanismo de QS, son las proteasas producidas por una gran variedad de microorganismos. Hrabák y Martinek (2007) caracterizaron las proteasas de *P. larvae*, las cuales se producen durante el crecimiento y la esporulación de la bacteria. Antúnez *et al.* 2009, 2010, 2011 (a,b) determinaron que *P. larvae* produce y secreta diferentes proteínas con actividad proteolítica durante la replicación vegetativa, tales como metaloproteasas y enolasas. Ambas proteínas son producidas dentro de la célula, secretadas al medio externo, permanecen en la superficie de las esporas y están probablemente involucradas en la degradación de los tejidos larvales (Glinski y Jarosz, 1998).

La evaluación de la actividad antimicrobiana y anti-patogénica de ACEITES ESENCIALES provenientes de PLANTAS O HIERBAS AUTÓCTONAS DE ARGENTINA, son investigaciones poco desarrolladas hasta el presente, sobre todo teniendo en cuenta la evaluación de las PROPIEDADES ANTI-QS y ANTI-PROTEOLÍTICAS de estas sustancias bioactivas frente a *P. larvae*.

En este contexto, la aplicación de **nuevos productos fitosanitarios** ambientalmente más seguros contribuirá a la solución de los problemas derivados de la toxicidad o persistencia de plaguicidas sintéticos en el ambiente, cuyos residuos son generalmente no biodegradables.

3. Trabajo previo realizado referente a este proyecto

Durante el primer año de Beca de Estudio (BE) y en el período correspondiente al segundo año de Beca, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de plantas aromáticas o especias de: *Aloysia polystachia*, *Cimhopogon nardus*, *Solidago chilensis* y *Salvia officinalis* frente a cepas de *P. larvae* (Ver informe de actividades del 1er y 2do año de BE), con resultados alentadores. El aceite esencial de *A. polystachia* presentó una alta capacidad inhibitoria *in vitro* frente a *Paenibacillus larvae*. Cabe destacar, que la metodología utilizada fue puesta a punto durante el período de Beca de Estudio, a los efectos de introducir cambios que optimicen las técnicas utilizadas anteriormente por el grupo de investigación. Asimismo, fueron identificados y caracterizados químicamente 13 aceites esenciales, tales como: *Schinus molle*, *Minthostachys mollis*, *Salvia officinallis*, *Artemisia annua*, *Satureja odora*, *Lepechinia floribunda*, *Lippia turbinata*, *Wedelia glauca*, *Tagetes minuta*, *Artemisia dracunculus*, *Ocimum basilicum*,

Elettaria cardamomum y *Rosmarinus officinalis*; a fin de correlacionar estos resultados con su potencial actividad biológica.

Se realizaron ensayos preliminares sobre la actividad anti-Quorum sensing de los aceites de *S. officinalis*, *M. mollis*, *S. odora*, *S. molle*, *L. floribunda* y *A. annua* sobre *C. violaceum*, como bacteria indicadora. Todos los aceites ensayados presentaron actividad anti-QS. No obstante, la CIMQS de *A. polystachia* fue 0.055%v/v, concentración a la cual el aceite esencial no presentó actividad antimicrobiana.

Los resultados obtenidos dieron lugar a la redacción del trabajo de investigación: Antiquorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. Pellegrini, M.C.; Alvarez, M. V.; Ponce, A. G.; Cugnata, N. M.; De Piano, F. G.; Fuselli, S. R. (2013). Enviado a la revista Journal Essential Oil Research, 10412905 (ISSN). En evaluación final.

Proyección de las investigaciones:

Como proyección de las investigaciones propuestas, para el período de Beca de Perfeccionamiento, se llevará a cabo la evaluación de la liberación diferencial de proteasas de *P. larvae* en presencia de aceites esenciales y se cuantificarán las proteínas liberadas. Considerando, como base la siguiente Hipótesis de trabajo: la patogenicidad de *P. larvae* se rige a través de un sistema de QS, dada por la secreción de enzimas proteolíticas que se inhiben mediante el uso de diferentes bioactivos a sus CIMQS.

Una vez efectuado el screening de los aceites esenciales, considerando ensayos de actividad antimicrobiana, anti-quorum sensing y anti-proteolítica, se elegirán los aceites esenciales que resulten más promisorios. Luego, se evaluará su toxicidad en abejas y de acuerdo a los resultados obtenidos se probarán a campo en diferentes dosis y formas de administración en las colonias de abejas.

4. Objetivo(s) general(es) y objetivos particulares

El OBJETIVO GENERAL del presente plan de investigación es determinar las propiedades antimicrobianas y anti-patogénicas de ACEITES ESENCIALES, provenientes de PLANTAS O HIERBAS AUTÓCTONAS DE ARGENTINA, para el tratamiento de colonias de abejas afectadas por el patógeno bacteriano *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque americana.

La evaluación de la actividad anti-Quorum sensing y anti-Proteolítica de estas sustancias bioactivas (AE) frente a *Paenibacillus larvae*, son investigaciones no desarrolladas hasta el presente.

Objetivos particulares

- 1.- Identificar, cuantificar y caracterizar los componentes químicos principales de los aceites esenciales empleados en este estudio.
- 2- Establecer la actividad antimicrobiana de las sustancias bioactivas (aceites esenciales), mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), frente a *Paenibacillus larvae*.
- 3- Establecer cuantitativamente la actividad anti-quorum sensing (anti-QS) de cada uno de los aceites esenciales ensayados.
- 4- Analizar la inhibición de la actividad patogénica de *P. larvae* frente a la aplicación de las sustancias bioactivas.
- 5.-Determinar mediante bioensayos *in vitro* la Concentración Letal (CL50) individual de cada aceite esencial sobre *Apis mellifera*.
- 6.- Determinar los índices de selectividad (IS) de cada aceite.
- 7.-Seleccionar los aceites más promisorios, de acuerdo a su IS, que podrán ser suministrados en el interior de colonias de abejas afectadas por *P. larvae*.

5. Métodos y técnicas a emplear.

Material biológico: Se utilizarán en los ensayos experimentales cepas de *P. larvae* de referencia (ATCC 9545) y cepas de *P. larvae* provenientes de distintas regiones geográficas de Argentina, que fueron apropiadamente aisladas e identificadas de acuerdo a la metodología empleada por Fuselli (2006).

Aceites esenciales: Se evaluará la actividad bactericida y anti-patogénica de hierbas o especias provenientes de distintas regiones de Argentina (Provincia de San Luis, Córdoba, Jujuy, Neuquén y Buenos Aires), tales como: *Buddleja globosa* (matico), *Baccharis latifolia* (chilca), *Lippia turbinata* (poleo), *Acantholipia seriphioides* (poleo), *Artemisia absinthium* (ajenjo), entre otras. Los aceites esenciales se obtendrán por hidrodestilación por arrastre con vapor. El arrastre con vapor podrá hacerse con generación del mismo *in situ* o con generación externa del mismo, tanto en equipo de laboratorio tipo Clevenger, como en alambiques de mayor capacidad.

-Identificación y caracterización de los aceites esenciales:

La identificación y caracterización química de los aceites esenciales se efectuará mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) y un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama (GC-FID). Los análisis se realizarán por triplicado y la cantidad relativa de cada componente se estimará a partir del área del pico correspondiente, expresado como el porcentaje del área total del pico en el cromatograma. La identificación de los componentes del AE se llevará a cabo mediante la comparación de los índices de retención calculados con los reportados por Adams (2007) y Pherobase (EL-Sayed, 2011) y mediante los patrones de fragmentación que figuran en librerías de datos (NIST 05 y SHIM 2205).

Ensayos in vitro:

- **Actividad antimicrobiana del aceite esencial sobre *P. larvae*:** Se evaluará mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). La CIM se efectuará mediante el método de microdilución en caldo (caldo infusión cerebro-corazón suplementado con 0,1 mgL⁻¹ de clorhidrato de tiamina (vitamina B1) (Shimanuki y Knox, 1991) y 9µg/ml de ácido nalidíxico, utilizando microplacas de 96 microcubetas, incubadas en microaerofilia a 36±0,5 °C durante 48-72 horas. La CBM se efectuará transfiriendo 100 µL desde cada una de las microcubetas negativas a agar MYPGP (Dingman y Stahly, 1983) a 36±0,5 °C, 48-72 horas.

- **Cálculo de la relación CBM/CIM:** El efecto antibacteriano de los aceites esenciales se determinará mediante la relación CBM/CIM y se comparará con valores estándar (Krogstad y Moellering, 1985). Se considera efecto bactericida cuando el valor de CBM/CIM es ≤2, efecto bacteriostático cuando el valor de CBM/CIM resulta ≥4 y <32 y efecto tolerancia cuando el valor CBM/CIM es ≥32.

- **Actividad anti-quorum sensing (anti-QS) de los aceites esenciales:** Los ensayos de caracterización preliminar anti-QS de los bioactivos utilizados se llevarán a cabo a través del método de cuantificación de violaceína (pigmento) producida por la bacteria *Chromobacterium violaceum* siguiendo la metodología propuesta por Choo *et al.*, (2006), en la cual 1mL del cultivo bacteriano tratado con los diferentes bioactivos a diversas concentraciones se centrifugará a 13.000 rpm durante 10 minutos con el fin de precipitar la violaceína y descartar el sobrenadante. La violaceína se solubilizará y homogenizará en 1 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO) y se centrifugará a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se medirá la producción del pigmento por absorbancia a 585 nm.

- **Curva de Crecimiento de *P. larvae* en medio líquido:** se realizará una curva de crecimiento bacteriano de *P. larvae* en caldo cerebro corazón. Para ello se inoculará medio líquido hasta 0.1 de Densidad óptica (DO) 600nm partiendo de un pre-inóculo de 24hs (DO aproximada 0.5). Los cultivos se incubarán por aproximadamente 72hs en condiciones aeróbicas (150 rpm) a 37°C. Se procederá a tomar alícuotas de dicho cultivo a diferentes tiempos y se medirá la DO a 600nm.

-**Actividad anti-proteolítica de los aceites esenciales sobre el secretoma de *P. larvae*:** Se preparará una suspensión bacteriana de *P. larvae* (de un cultivo puro) de 1.10⁸ UFC/ml (tubo N°1 de la escala de McFarland) en agua peptonada. 10ml de esta suspensión será utilizado para inocular 20ml de caldo cerebro corazón. Cultivos de *P. larvae* se pondrán en contacto con cada uno de los

aceites esenciales a diferentes concentraciones. Se incubarán a 37°C en un shaker orbital a 150 rpm por 72hs y posteriormente se centrifugarán a 14.000 x g por 20 minutos y se reservará el sobrenadante. Para medir el efecto de los aceites sobre el secretoma de *P. larvae*, se efectuará un análisis cualitativo: los sobrenadantes se sembrarán en diversos medios sólidos (ej. agar leche-descremada) y se medirá el diámetro de los halos producidos por las proteasas; y se realizará un análisis cuantitativo midiendo las proteínas liberadas por el método de Bradford (1976).

- **Cálculo de la CL50 individual:** Cada uno de los aceites será evaluado siguiendo la metodología de Ruffinengo *et al.* (2005). Se prepararán diferentes concentraciones de aceite en agua destilada y se aplicarán sobre la superficie interna de cápsulas de Petri. Como control, se utilizarán placas solo con agua destilada. Para cada concentración se efectuarán 5 réplicas. Posteriormente, se colocarán 5 abejas adultas más un alimentador con candy (mezcla de azúcar impalpable y agua). Como testigos se considerará un grupo control sin ningún tratamiento y otro con suministro de Dimetoato (tóxico estándar). Las cápsulas se incubarán a 30°C y 70% HR. A las 24, 48 y 72 hs se registrará la mortandad de abejas en cada tratamiento. Mediante un análisis probit, teniendo en cuenta la mortalidad natural diaria (Abbot, 1925), se estimará la CL50 para cada principio activo.

- **Cálculo del índice de selectividad y elección de los aceites más promisorios:** Se calcularán los índices de Selectividad (IS) de cada aceite esencial testeado, teniendo en cuenta la CL50 de abejas estimadas para las 24 hs y la CIM estimada para *P. larvae*. IS: CL50 de abejas/CIM agente antimicrobiano para *P. larvae*. Los aceites esenciales que presenten valores de IS mayor, serán seleccionados para ser evaluados en el interior de las colonias de abejas.

6. Cronograma mensual de actividades a desarrollar en el período de la beca.

	Identificación y caracterización de los AE	Actividad anti-QS	Curva de Crecimiento <i>P. larvae</i>	Actividad anti proteolítica	Actividad antimicrobiana	CL50 individual	IS
2013							
ABRIL	+	+					
MAYO	+	+	+				
JUNIO	+	+	+	+			
JULIO		+		+			
AGOSTO		+		+	+		
SEPTIEMBRE				+	+		
OCTUBRE				+	+		
NOVIEMBRE					+	+	
DICIEMBRE					+	+	
2014							
ENERO						+	
FEBRERO						+	+
MARZO							+

7. Bibliografía

-Abbott, W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology,18: 265-267.

-Adams, R (2007) Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured publishing Corporation Illinois, Carol Stream.

-Adonizio, AL; Downum, K; Bennett, BC y Mathee, K (2006) Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. Journal of Ethnopharmacology, 105: 427–435.

-Ahmad, I; Zahin, M; Aqil, F; Khan, M y Ahmad, S (2009) Novel approaches to combat drug resistant bacteria. En: New Strategies Combating Bacterial Infections ed. Ahmad, I and Aqil F. pp. 47-70. Germany: Wiley- Blackwell, Wiley

-Albo, G; Henning, C; Ringuelet, J; Reynaldi, F; De Giusti, M y Alippi, A (2003) Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. Apidologie, 34:1-10.

-Alippi, AM (1992) Characterization of *Bacillus larvae* White, the causal agent of AFB of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. Revista Argentina de Microbiología 24: 67-72.

-Alippi, AM (1995) Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinean honeys by using a semiselective medium. Microbiología SEM, 11, 343-350.

- Alippi, A; Ringuelet, J; Henning, C y Bandoni, A (2001) Loque americana. Actividad antimicrobiana in vitro de algunos aceites esenciales y mezclas de esencias sobre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Vida Apícola, 106: 41-44.
- Alippi, AM; Reynaldi, FJ; López, AC; De Giusti, MR y Aguilar, MO (2004) Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. Journal of Apicultural Research, 43 (3): 135-143.
- Alippi, AM y Reynaldi FJ (2006) Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. Journal of Invertebrate Pathology, 91:141-146.
- Anon (2002). Föreskrifter om ändring i Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 1992:38) om bekämpning av amerikansk yngelröta och varroasjuka hos bin. SJVFS 2002: 46.
- Antúnez, K; Anido, M; Schlapp, G; Evans, JD y Zunino, P (2009). Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. Journal of Invertebrate Pathology, 102: 129–132.
- Antúnez, K; Anido, M; Evans, JD y Zunino, P (2010). Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. Veterinary Microbiology, 141: 385–389.
- Antúnez, K; Anido, M; Arredondo, D; Evans, JD y Zunino, P. (2011a). *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. Veterinary Microbiology, 147: 83–89.
- Antúnez, K; Arredondo, D; Anido, M y Zunino, P (2011b). Metalloprotease production by *Paenibacillus larvae* during the infection of honeybee larvae. Microbiology, 157: 1474–1480
- Bauer, W y Teplitski, M (2001) Can plant manipulate bacterial quorum sensing? Australian Journal of Plant Physiology, 28:913-921.
- Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.
- Choo, J; Rukayadi, Y y Hwang, J (2006) Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. Letters in Applied Microbiology, 42: 637-641.
- Di Cagno, R; De Angelis, M; Calasso, M y Gobbetti, M (2011) Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. Journal of proteomics, 74:19–34.
- Dingman, D y Stahly, D (1983) Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. Applied and Environmental Microbiology, 46:860-869.
- El-Sayed A (2011) The pherobase: database of pheromones and semiochemicals. In : the Pherobase, 2003-2011. Disponible en: <http://www.pherobase.com>
- Eguaras, M; Fuselli, S; Gende, L; Fritz, R; Ruffinengo, S; Clemente, G; Gonzalez, A; Bailac, P y Ponzi, M (2005) An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. Journal of Essential Oil Research, 17: 336-340.
- Ellis, JD y Munn, PA (2005). The worldwide health status of honey bees. Bee World 86: 88-101.
- Fuselli, SR (2006) Tesis doctoral “Actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a *Paenibacillus larvae*”. Doctorado en Ciencias-Area Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales. UNMdP.
- Fuselli, S; García de la Rosa, S; Gende, L; Eguaras, M y Fritz, R (2006a) Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils, against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB). Journal of Apicultural Research and Bee World, 45(1):2-7.
- Fuselli, SR; García de la Rosa, SB; Gende, LB; Eguaras, MJ y Fritz, R. (2006b) Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Revista Argentina de Microbiología, 38: 89-92.
- Fuselli, S; García de la Rosa, S; Eguaras, M; Fritz, R; Ndagijimana, M; Vannini, L y Guerzoni, M (2007) Efficacy of indigenous plant essential oil Andean thyme (*Acantholippia seriphoides* A. Gray) to control American foulbrood (AFB) in honey bee (*Apis mellifera* L.) hives. Journal of Essential Oil Research, 19: 514-519.
- Fuselli, S; García de la Rosa, SB; Eguaras, M y Fritz, R (2008a) Susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* to essential oils distilled from exotic and indigenous Argentinean plants. Journal of Essential oil Research, 20: 464-470.
- Fuselli, SR, García de la Rosa, SB, Eguaras, M J y Fritz, R (2008b). Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(10): 2067–2072.
- Fuselli, SR; Maggi, M; García de la Rosa, SB; Eguaras, MJ y Fritz, R (2009) In vitro antibacterial and antiparasitic effect of citrus fruit essential oils on the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* and the parasitic mite *Varroa destructor*. Journal of Apicultural Research and Bee World, 48 (1): 77-78.
- Gende, L; Maggi, M; Formato, G; Damiani, N; Ruffinengo, S; Velis, G; Fritz, R y Eguaras, M (2007) Actividad antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, propiedades fisicoquímicas, y toxicidad sobre *Apis mellifera*

- de los aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). ATTI del Congreso Malattie delle api e residui nei prodotti dell' alveare. Ed Melitense. pp. 55-61.
- Genersch, E.; Forsgren, E.; Pentikäinen, J.; Ashiralieva, A.; Rauch, S.; Kilwinski, J. y Fries, I. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal Systematic Evolution of Microbioly, 56:501-511.
- Gliński, Z y Jarosz, J (1998). Exoproteinase of *Bacillus larvae* destroys the in vitro antibacterial activity of cecropins of lepidopteran insects and antibacterial response peptides from the honeybee. *Apiacta*, 33: 1-8.
- Gram, L; Ravn, L; Rasch, M; Bruhn, J; Christensen, A y Givskov, M (2002) Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 78:79-97.
- Hentzer, M; Riedel, K; Rasmussen, T; Heydorn, A; Andersen, J; Parsek, M; Rice S; Eberl, L; Molin, S; Høiby, N; Kjelleberg, S y Givskov, M (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148: 87-102.
- Hrabák, J y Martinek, K (2007). Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Apicultural Research*, 46: 160-164
- Khan, MS; Zahin, M; Hasan, S; Husain, FM y Ahmad I (2009) Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in applied microbiology*, 49: 354-360.
- Krogstad, DJ y Moellering, RC (1985) "Antimicrobial Combinations". En "Antibiotics in Laboratory Medicine". Ed. Lorian, V. Baltimore: Williams & Wilkins, 15:537-595.
- Matheson, A (1993) World bee health report. *Bee World* 74: 176-212.
- Matheson, A (1996) World bee health report. *Bee World* 77: 45-51.
- McClean, R; Pierson, L y Fuqua, C (2004) A simple screening protocol for the identification of quórum signal antagonist. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 351-360
- Morse, RA y Nowogrodzki, R (Eds.) Honey bee pests, predators and diseases. Second Ed, 1990. Cornell University Press, pp 474.
- Olivero, VJT; Pájaro, CN y Stashenko, E (2011) Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus *Piper*. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 18(1): 77-82.
- Otto, M (2004) Quorum sensing control in *Staphylococci* a target of antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiology Letters*, 241:135-141
- Raffa, RB; Iannuzzo, JR; Levine, DR; Saeid, KK; Schwartz, RC y Sucic, NT (2005) Bacterial communication (quorum sensing) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312: 417-23.
- Rasmussen, T; Manefield, M; Andersen, J; Eberl, L; Anthoni, U; Christophersen, C; Steinberg, P; Kjelleberg, S y Givskov, M (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia*. *Microbiology* 146: 3237-3244.
- Rice, S; Mcdougald, D; Kumar, N y Kjelleberg, S (2005) The use of quorum sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm associated infections. *Current opinion in Investigational Drugs*, 6:178-184.
- Ryan, R y Dow, J (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, 154: 1845-1858.
- Ruffinengo, S.; Eguaras, M.; Floris, I.; Faverin, C.; Bailac, P.; Ponzi, M. (2005) LD50 and repellent effect to *Varroa destructor* mite of different essential oil from Argentina wild plants species. *Journal of Economic Entomology*, 98: 651-655.
- Shimanuki, H y Knox, D. (1991) Diagnosis of honey bee diseases-Handbook N° AH-690. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, USA, pp. 53.
- Svensson, S; Davis, L; Mackichan, J; Allan, B; Pajaniappan, M y Thompson, S (2009) The CprS sensor kinase of zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Molecular Microbiology*, 71:253-72.
- Swift, S; Downie, J; Whitehead, N; Barnard, A; Salmond, G y Williams, P (2001) Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in Microbial Physiology*, 45: 199-270.
- Szabó, MA; Varga, GZ; Hohmann, J; Schelz, Z; Szegedi, E; Amaral, J y Molnár, J (2010) Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research*, 24: 782-786. -Truchado, P; Tomás-Barberán, F; Larrosa, M, y Allende, A (2012). Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food control*, 24(1-2): 78-85.

8. Vinculación del plan de trabajo con otros proyectos de investigación en ejecución en el mismo lugar de trabajo.

El plan de trabajo propuesto forma parte de las tareas programadas del PICT 1624-2008: "ACEITES ESENCIALES: Estrategia alternativa no contaminante para el control de Loque americana",

Investigador responsable: Dra. Sandra Rosa Fuselli (CIC–UNMdP), 2010-2014; Financiamiento: \$120.000; PROYECTO CONJUNTO DE INVESTIGACIÓN “MERCOSUR” (PPCP 032/2011) Director: Dr. Martín Eguaras (CONICET-UNMdP), Co-directora: Dra. Sandra R. Fuselli (CIC-UNMdP), 2011-2014. Financiamiento \$75.000 y del Proyecto REDES V: Proyecto de Investigación Conjunto Universidades de Argentina-Bélgica-España: “Sanidad apícola: Sustancias bioactivas para el control de loque americana”. **Proyecto N°: 14-15-115** (2013). Otorgado por: Programa de Promoción de la Universidad Argentina (PPUA). Investigador responsable: Dra Sandra Fuselli (CIC–UNMdP). Financiamiento: \$30.000.

Recursos financieros solicitados: "Plaguicidas naturales para el control de loque americana y loque europea en colonias de abejas melíferas". Programa de subsidios para proyectos de investigación científica y tecnológica de la CIC. Convocatoria 2013. Período: 2014-2015. IR: Dra. S.R. Fuselli. GR: Dra. R.M. Alonso Salces.

Del lugar de trabajo

1. Identificación del lugar donde se realizará el plan de trabajo

El plan de trabajo se efectuará en el Laboratorio de Microbiología Aplicada-Artrópodos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350. Nivel 0. TE: 54+0223-4752426 interno 27 - FAX 54+0223-4753150. Directora: Dra. Sandra R. Fuselli (Grupo de investigación “Microbiología aplicada”, OCA N° 1872/13).

2. Descripción de la infraestructura y servicios disponibles en relación a los requerimientos del plan de trabajo.

Para el desarrollo del PLAN DE TRABAJO, el Grupo de Investigación posee un Laboratorio de Microbiología Aplicada (15 m²) y una oficina en dependencias del Departamento de Biología – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección de la Dra. Sandra Rosa Fuselli. Se cuenta con infraestructura y equipamiento necesario en dicha área: Cuarto de siembra, Estufas de cultivo, Estufa de esterilización, Autoclave eléctrico, Shaker Orbital, Heladera y freezer, Balanzas analíticas y granataria, micropipetas, Vortex, Baño termostático, Microondas, PHímetro digital, Centrífuga, Espectrofotómetro, medios de cultivos específicos, material de vidrio, etc. y equipamiento menor para determinaciones fisicoquímicas. La identificación y caracterización de los AE se efectuará mediante un cromatógrafo de gases Shimadzu 2010 acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu QP2010 (GC-MS) y un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama Hewlett-Packard 5890 Serie II (GC-FID) en la Universidad de La República (Uruguay) mediante PPCP 032/2011. El material vivo que se utilizará en los bioensayos se recolectará de apiarios experimentales ubicados en la Estación Costera J. J. Nágera-UNMdP y de apiarios comerciales, a los cuales se tiene acceso a través de SENASA, INTA y Ministerio de Asuntos Agrarios. La Dra. Alejandra Ponce, Investigadora adjunta de CONICET (Co-directora), efectúa sus investigaciones en la Facultad de Ingeniería como Integrante del Grupo de Investigación de Ingeniería de Alimentos (GIIA) - UNMdP, bajo la Dirección de la Dra. Sara I. Roura. Cuenta con la infraestructura y equipamiento necesario para efectuar parte del plan de trabajo. El equipamiento más relevante del Laboratorio es: Espectrofotómetro UV-1601, Baños termostáticos con sistema de circulación, Baños de inmersión con circulación y Laboratorio microbiológico con flujo laminar.