

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO

PERIODO 2015-2016

1. APELLIDO: PELLEGRINI

NOMBRES: MARIA CELESTE

Dirección Particular: Calle:

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: 01-04-2015

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

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

Facultad: CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento: BIOLOGIA

Cátedra: ----

Otros: GRUPO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLOGIA 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:

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 2do año de Beca de Perfeccionamiento (Período: Abril 2015- Marzo 2016) se llevaron a cabo las investigaciones previstas en el plan de actividades propuesto. De acuerdo a los objetivos planteados, se efectuaron las siguientes actividades:

- ACEITES ESENCIALES COMO ANTIMICROBIANOS

1-Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de aceites esenciales autóctonos frente a *Paenibacillus larvae*, mediante la técnica de microdilución en caldo recomendada por la NCCLS (1999) modificada, que fue puesta a punto durante el 1er año de Beca de Estudio CIC.

Durante el periodo correspondiente al 2do año de Beca de Perfeccionamiento se finalizaron los ensayos in vitro de CIM y CBM sobre 10 aislamientos de *P. larvae* (cepas pertenecientes a nuestro laboratorio). Aceites esenciales empleados: *Lippia turbinata* (CIM=CBM: 37.5-75 µg/mL), *Solidago chilensis* (CIM=CBM: 50 µg/mL), *Schinus molle* (CIM=CBM: 31.25-62.5 µg/mL), *Aloysia polystachia* (CIM=CBM: 25-50 µg/mL), *Acantholippia seriphioides* (CIM/CBM: 31.25-62.5 µg/mL / 62.5-125 µg/mL), *Baccharis latifolia* (CIM=CBM: 4.7-37.5 µg/mL), *Mintostachys mollis* (CIM=CBM: 37.5-75 µg/mL), *Artemisia annua* (CIM=CBM: 18.75-37.5 µg/mL), *Heterothalamus alienus* (CIM=CBM: 12.5-25 µg/mL), *Satureja odora* (CIM=CBM: 17.5-25 µg/mL), *Tagetes minuta* (CIM=CBM: 18.75-37.5 µg/mL), *Wedelia glauca* (CIM/CBM: 18.75-37.5 µg/mL / 37.5-75 µg/mL) y *Lepechinia floribunda* (CIM=CBM: 31.25-62.5 µg/mL).

Referencia:

-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.

2- Estudio de los efectos de los aceites esenciales sobre la membrana plasmática de *P. larvae*:

Con el fin de analizar si los aceites de *L. turbinata*, *S. chilensis*, *S. molle*, *A. polystachia*, *A. seriphioides*, *B. latifolia*, *M. mollis* actúan como antimicrobianos provocando daños en la membrana plasmática de las células de *P. larvae*, se llevaron a cabo ensayos donde se midió el "uptake" del cristal violeta y la liberación de productos intracelulares a 260 nm cuando las células de *P. larvae* fueron expuestas a concentraciones altas de los aceites esenciales (superiores a la CIM de cada aceite). Se siguió el procedimiento descrito por Devi et al. (2010). Se determinó que *A. seriphioides* y *A. polystachia* mostraron ser los aceites con mayor poder de disrupción de la membrana plasmática (mayor uptake de cristal violeta y mayor liberación de productos intracelulares), en cambio *B. latifolia* no presentó ningún efecto sobre la misma.

Referencia:

Devi, KP; Nisha, SA; Sakthivel, R y Pandian, SK. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130 (1), 107-115.

ACEITES ESENCIALES COMO ANTI QUORUM SENSING SOBRE PAENIBACILLUS LARVAE

Teniendo en cuenta que las proteasas liberadas por *P. larvae*, en fase estacionaria, estarían reguladas por quorum sensing (QS) (ver Informe correspondiente a 1er año Beca de Perfeccionamiento), se analizó si los aceites esenciales autóctonos tienen efecto sobre las proteasas como inhibidoras de QS.

1-Liberación de proteasas de *P. larvae* en presencia de aceites esenciales: Con el fin de determinar si existen diferencias en la liberación de proteasas de *P. larvae* en presencia de aceites esenciales con respecto al control, se efectuaron los siguientes ensayos:

Con pre-inóculos de 24hs de *P. larvae* en caldo J, se prepararon cultivos con una DO inicial de 0.2 (600 nm) en Erlenmeyers de 30 ml con caldo J empleando distintos volúmenes de los aceites esenciales de *L. turbinata*, *S. chilensis*, *S. molle*, *A. polystachia*, *A. seriphioides*, *B. latifolia*, *M. mollis*, *A. annua*, *H. allienus*, *S. odora*, *T. minuta*, *W. glauca*, *L. floribunda* y *S. odora*. Luego, se obtuvieron alícuotas a distintos tiempos y se midió la DO a 600 nm en un espectrofotómetro SP1103. Finalmente, se analizó la presencia de halo de proteólisis en placas de agar leche en el sobrenadante (SN) de todos los cultivos. Se observaron diferencias en cuanto al tamaño del halo de proteólisis de las muestras control con respecto a las muestras provenientes de cultivos crecidos con diferentes aceites esenciales; las muestras provenientes de cultivos con aceites presentaron halos más pequeños que las control, lo que indicaría que la actividad proteolítica de las proteasas liberadas por *P. larvae* estaría disminuida en presencia de aceites esenciales. Próximamente se realizará la cuantificación de la actividad proteolítica por azocaseína siguiendo el protocolo de Charney y Tomarelli (1947) con todas las muestras que están conservadas en heladera.

Referencia: Charney, J y Tomarelli, RM. 1947. Azocasein method. The Journal of Biological Chemistry, 171-501.

2-Efecto de los aceites esenciales sobre las proteasas liberadas por *P. larvae*:

Para determinar si los aceites esenciales tienen o no un efecto directo sobre las proteasas liberadas por *P. larvae*, se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

-A partir de cultivos de *P. larvae* en caldo J en fase estacionaria se centrifugaron alícuotas y el SN (con proteasas) se expuso a diferentes volúmenes de los aceites esenciales de: *L. turbinata*, *S. chilensis*, *S. molle*, *A. polystachia*, *A. seriphioides*, *B. latifolia*, *M. mollis*, *A. annua*, *H. allienus*, *S. odora*, *T. minuta*, *W. glauca* y *L. floribunda*, por un espacio de 30 minutos a 36 °C. Posteriormente, 50 ul de cada una de las muestras fueron introducidas en pozos de placas de agar leche para analizar la presencia de actividad proteolítica. No se observaron diferencias en cuanto al tamaño del halo de proteólisis de las muestras control con respecto a las muestras de proteasas en contacto con los aceites. Se concluye que los aceites no tendrían ningún efecto sobre las proteasas una vez liberadas, sino que tienen influencia sobre la producción y/o liberación de las mismas (a partir de los resultados expuestos en el punto 1).

- MECANISMO DE QUORUM SENSING EN PAENIBACILLUS LARVAE

Con el fin de conocer cómo se lleva a cabo el mecanismo del QS en *P. larvae* y qué moléculas estarían involucradas en la señalización, se efectuaron los siguientes ensayos:

1-Inducción del SN de *P. larvae* sobre *Chromobacterium violaceum* 026:

Para comprender cómo es el mecanismo de quorum sensing en *P. larvae*, se analizó si en el sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria de la bacteria, se hallaban lactonas. Estas moléculas podrían estar actuando como inductores del quorum sensing. Para ello, en primer lugar, se colocaron con hisopo 100 ul de *Chromobacterium violaceum* 026 - DO 0.1 (600

nm) - (cepa mutante no produce lactonas naturalmente, por lo tanto, no produce violaceína a menos que se la induzca con lactonas externas), por toda la superficie de una placa con agar LB. En segundo lugar, se hicieron pozos y se introdujeron 50 ul del sobrenadante de un cultivo de *C. violaceum* 046 (salvaje, productora de lactonas y de violaceína) en etapa estacionaria (control positivo de inducción), 50 ul de caldo LB (control negativo de inducción) y 50 ul de medio condicionado (sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria ultrafiltrado con Amicon 30 KD de *P. larvae* (Ver Informe 1º año Beca de Perfeccionamiento). No hubo resultados positivos, es decir, como se presumía *P. larvae* no liberaría lactonas como molécula inductora o al menos no libera el tipo de lactonas que actúan como inductor del QS en *C. violaceum*.

2- Identificación y análisis del posible inductor del Quorum sensing en *P. larvae* mediante equipo MALDI-TOF:

A partir de geles SDS-PAGE de muestras control (cultivo líquido de *P. larvae*) y muestras tratadas (cultivo de *P. larvae* crecido en medio condicionado) (Ver Informe de 1º año de Beca de Perfeccionamiento), se extrajo la banda diferencial más notoria (con respecto al control) y se analizó con un equipo MALDI-TOF en el Instituto Pasteur de Montevideo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, para identificar la proteína diferencial que podría estar actuando como inductor para la producción/liberación/activación de proteasas en *P. larvae*.

La banda analizada por espectrometría se analizó con el software Mascot (version 2.1; www.matrixscience.com) con los siguientes parámetros de búsqueda: *Paenibacillus larvae* as taxonomy, + 0.08 Da for the protein mass tolerance, + 0.35 Da for the MS/MS fragment mass tolerance y la oxidación fue incluida como posible modificación. "No restrictions" fue agregado en la masa molecular proteica. Sólo las proteínas candidatas con un significativo score de Mascot fueron tenidos en cuenta. La proteína fue identificada como "Hypothetical protein of *Paenibacillus larvae*" (NCBI accession number gi 738761489). Utilizando diversos predictores de bioinformática se determinó que el número de aminoácidos era de 66, peso molecular de 18,35 KDa, índice de inestabilidad de 20.33 lo que la hace una proteína estable, pI teórico de 5.2, vida media estimada de 10 hs, índice alifático de 97.47 e hidrofobicidad de -0.113. No se encontraron dominios conservados. Se predijo un péptido señal con un sitio de corte en la posición 25 y 26 y el tipo de secreción es "non-classical".

Los resultados obtenidos permitieron la escritura del trabajo titulado: Possible role of quorum sensing in the etiological agent of American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*). Pellegrini, M.C., Zalazar, L., Fuselli, S.R. y Ponce, A.G; que fue enviado a la revista Journal of Apicultural Research para su publicación.

Aclaración o dificultades encontradas: No se pudieron analizar en el Instituto Pasteur (Montevideo) todas las bandas proteicas resultantes de los geles, dado el alto costo de las determinaciones.

3- Análisis "in silico" de genes en *P. larvae*:

A través de la herramienta BLAST que brinda el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) se buscaron genes que regulan el QS en otros microorganismos, en el genoma de *P. larvae*. No se encontraron genes de otras bacterias gram positivas que estén asociados a la regulación del QS, en el genoma de *P. larvae*.

ACTIVIDAD ANTI-QS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE *C. VIOLACEUM* 046

1-Actividad anti Quorum Sensing de aceites esenciales sobre *C. violaceum*:

Se estudiaron las propiedades anti-QS de los aceites esenciales de *Lippia turbinata*, *Solidago chilensis*, *Acantoliphia seriphoides*, *Baccharis latifolia*, *Heterothalamus allienus*, *Tagetes minuta* y *Wedelia glauca*, utilizando a *Chromobacterium violaceum* como indicador, con el objetivo de finalizar con la caracterización de los aceites esenciales utilizados. Se

efectuaron ensayos de difusión en disco para analizar cualitativamente el efecto de cada aceite esencial sobre *C. violaceum*. Asimismo, de acuerdo al protocolo de Choo y colaboradores (2006) se procedió a la cuantificación de la producción de violaceína cuando la bacteria indicadora fue expuesta a diferentes concentraciones del aceite (explicado el procedimiento en 1° Informe de Beca de Estudio). *L. turbinata* y *A. polystachia* resultaron ser los aceites esenciales con mayor actividad anti-QS sobre *C. violaceum* ya que con una concentración de 0.016 y 0.02 %v/v respectivamente la producción de violaceína fue de alrededor del 30% no mostrando efectos sobre la viabilidad de la bacteria.

Referencia: Choo, J; Rukayadi, Y y Hwang, J. 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 637-641.

- ENSAYOS SOBRE LARVAS DE ABEJAS

Se llevaron a cabo ensayos sobre larvas de abejas para determinar si los aceites esenciales ensayados controlan la enfermedad (Loque Americana).

1-Cultivo de larvas de *Apis mellifera* in vitro (Técnica puesta a punto durante 2do año Beca de Perfeccionamiento).

Para efectuar ensayos sobre larvas de abejas fue necesario criarlas "in vitro". Para ello se tuvieron en cuenta las técnicas de Evans (2004) y Crailsheim, et al. (2013). Se tomaron cuadros de cría con larvas de 24 hs, provenientes del apiario "Abeja Mansa" ubicado en Santa Paula (Mar del Plata), y se colocaron con mucho cuidado en la misma posición en la que estaban en el cuadro sobre cada pocillo de placas microtiter de 96 pocillos (base plana). Cada pozo contenía 10 ul de una solución de jarabe, compuesto por fructosa (18%), Glucosa (18%), extracto de levadura (3%) y jalea real comercial (66%). La placa se incubó dentro de un recipiente hermético con agua en su base por 24hs a 34.5 °C. El segundo día no se realizó ningún procedimiento y al tercer día se alimentaron con 20 ul de jarabe, al cuarto día con 50 ul y al quinto y sexto día se alimentaron con 100 ul de la solución de jarabe. La viabilidad de las larvas criadas in vitro siempre fue superior al 90%, considerándola exitosa.

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.

2-Infección de larvas de *Apis mellifera* in vitro con esporas de Loque Americana: Para infectar a las larvas de abejas primero fue necesario preparar una suspensión de esporas de Loque Americana. Se sembraron placas de petri con medio J con aislamientos de *P. larvae* y se incubaron a 37°C durante 48 hs. Posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 días. Luego se tomaron ansadas del material, se resuspendieron en 1 ml de agua peptonada y se centrifugaron a 12.247 x g durante 40 minutos tres veces descartando el sobrenadante en cada procedimiento. Luego, la suspensión se incubó a 4°C durante 30 días.

Para hacer el conteo del número de esporas de la suspensión obtenida, se calentó durante 15 minutos a 65°C una alícuota (para activar la germinación) y se plaquearon diluciones seriadas de la misma en agar MYPGP 2%. Las placas se incubaron por 6 días aproximadamente a 37°C y se realizó el recuento de UFC (1UFC=1 espora viable).

Para infectar las larvas de abejas con las esporas, el día del traslarve (pasaje de larvas del cuadro a la placa multiwell) se tuvo en cuenta que la suspensión final en el jarabe debía ser entre 600-1000 esporas/ul. La infección sólo se realizó el primer día, desde el tercer día se

procedió a la alimentación como fue explicado en el apartado 1 (Cultivo de larvas de *Apis mellifera* in vitro). Con una suspensión de 600 esporas/ μ l de jarabe, la infección fue efectiva sobre las larvas. Hubo mortalidad en un 100% (se comparó con un control de 100% de viabilidad).

3- Infección de larvas y tratamiento con aceites esenciales:

Con el fin de analizar si los aceites esenciales de *Lippia turbinata*, *Solidago chilensis*, *Acantholippia seriphoides*, *Baccharis latifolia*, *Heterothalamus allienus*, *Tagetes minuta* y *Wedelia glauca*, controlaban la enfermedad de las larvas por esporas de Loque Americana, se llevo a cabo el siguiente procedimiento:

En la placa microtiter se efectuó control de viabilidad (larvas de 24 hs alimentadas con jarabe), control de infección (larvas de 24 hs alimentadas el primer día con jarabe y esporas), tratamiento (larvas de 24 hs alimentadas el primer día con jarabe, esporas y aceite esencial en diversas concentraciones) y en los días sucesivos con jarabe y aceite en las concentraciones correspondientes. Asimismo, se efectuaron análisis de toxicidad de los aceites sobre las larvas (larvas de 24 hs alimentadas desde el primer día con jarabe y las concentraciones de aceite utilizadas en el tratamiento). Los aceites que se probaron hasta el momento son: *S. molle* y *S. chilensis*, ninguno demostró controlar la enfermedad de Loque Americana utilizando 40 veces el valor de la MIC correspondiente. Es necesario seguir aumentando la concentración de aceite en el jarabe y probar el resto de los aceites esenciales.

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.

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.)

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 *Journal of Apicultural Research*. Manuscript ID: TJAR-2015-0058.

2- Pellegrini M. C.; Cugnata N. M.; Guaspari E.; Aubone I.; De Piano F. G.; Antunez K.; Alonso-Salces R. M.; Fuselli S. R. Control of *Paenibacillus larvae*, causative agent of American foulbrood in honey bees. A review. Enviado a *Apidologie* APID-D-15-00184.

3- 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. Manuscript ID: TJAR-2015-0045

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

(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Cugnata, N., Guaspari, E., Pellegrini, M.C., Fuselli, S y Alonso-Salces, R.M. Optimal concentration of organic solvents to be used in the broth microdilution method to determine the antimicrobial activity of natural products against *Paenibacillus* larvae.

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)

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*. Se está llevando a cabo el análisis quimiométrico de los resultados a fin de correlacionar la actividad de cada aceite con sus componentes químicos. Asimismo, se realizaron estudios del mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre las células vegetativas de *P. larvae*. Todos 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)

1.- 10mo Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal, BioVeg 2015. 11 al 15 de Mayo de 2015. Ciego de Avila. Cuba. "Productos naturales para el control de *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana". Cugnata, NM; Pellegrini, MC; Guaspari, E; Alonso-Salces, RM y Fuselli, SR. Comunicación oral.

2.- 2do Congreso Internacional Científico/Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Organizado por: CIC. 1 de Octubre de 2015. Teatro Argentino, La Plata, Argentina. "Posible rol de quorum sensing en *Paenibacillus larvae*". M. Celeste Pellegrini (autora), Alejandra G. Ponce (co-directora) y Sandra R. Fuselli (directora). 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)

1-Curso de posgrado: "Semioquímicos II: Potenciales aplicaciones en control de plagas". 30 de marzo al 1 de abril de 2015. Docentes responsables: Dr. Andrés GONZÁLEZ RITZEL - Ph. D. Carmen

ROSSINI. Carga horaria: 24 horas. Institución organizadora: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Calificación: 9 (nueve) Distinguido. Uvacs: 2.

2-Curso de posgrado: "Historia de la Ciencia en la Argentina". 10 de abril a junio de 2015. Docente responsable: Dr. Guillermo Denegri. Carga horaria: 72 horas (un cuatrimestre). Institución organizadora: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Trabajo final en revisión.

3-Curso de posgrado: "Tópicos selectos en sanidad Apícola". 23 al 27 de noviembre de 2015. Docentes responsables: Dra. Liesel Brenda GENDE, Dr. Matías Daniel MAGGI, Dr. Martín Javier EGUARAS, Dr. Jorge Augusto MARCÁNGELI y Dr. Sergio Roberto RUFFINENGO. Carga horaria: 40 horas. Institución organizadora: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Trabajo final en elaboración.

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 2015 (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)

-En el marco del proyecto MINCYT/FNRS: "POLIFENOLES DE LA MIEL: I. Nuevo método rápido de análisis mediante técnicas espectroscópicas vibracionales. II. Evaluación de la actividad inhibitoria Quorum Sensing", Directora: Dra. S. Fuselli, he llevado a cabo las siguientes actividades:

Se analizó la actividad anti-quorum sensing de las mieles codificadas como 14080005, 14070027, 14080073 y 14080076. Se utilizó como microorganismo indicador del quorum sensing (QS) a la cepa *Chromobacterium violaceum* ATCC (American Type Culture Collection) 12472 (Instituto Malbrán, Argentina). Esta cepa produce y responde a moléculas autoinductoras lo que la hace una excelente indicadora del QS. *C. violaceum* fue incubada bajo condiciones de aerobiosis en caldo Luria-Bertani (LB) (tripteína bacteriológica 1 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v) y cloruro de sodio 1 % (p/v)) a 30°C por 24 horas. Con el objetivo de estudiar la actividad anti-QS de las mieles 14080005, 14070027, 14080073 y 14080076 se realizaron cultivos de *C. violaceum* (1 x 10⁸ UFC/ml) en presencia de distintas concentraciones de las mieles. Para ello *C. violaceum* fue inoculado en tubos de ensayo conteniendo LB (5 ml) suplementado con mieles hasta obtener diferentes concentraciones (0.4, 0.3, 0.2, 0.1 g/ml). En algunos casos, también se analizaron las concentraciones: 0.16, 0.12, 0.06, 0.05, 0.04, 0.02 g/ml. Los cultivos fueron incubados a 30°C por 48 horas. La producción de violaceína fue cuantificada siguiendo el protocolo de Choo et al. (2006): 1 mL de cada uno de los cultivos bacterianos fue centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para precipitar el pigmento insoluble. El pellet fue resuspendido en 1mL de dimetilsulfoxido (DMSO; Biopack, Argentina) y homogeneizado con vortex. Se determinó la producción de violaceína con un espectrofotómetro UV-visible a 585nm (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Se realizaron también cultivos de *C. violaceum* en caldo LB sin el agregado de ninguna miel (control). Los ensayos se realizaron por triplicado.

La inhibición o el descenso en la producción de violaceína puede ser el resultado de: (i) bloqueo en el mecanismo de QS o (ii) inhibición en el crecimiento celular (actividad antimicrobiana). Para determinar la concentración bacteriana, se hicieron diluciones en agua peptonada estéril (peptona 0.1 % (p/v) y cloruro de sodio 0.85 % (p/v)) de cada uno de los cultivos, que fueron sembradas en placas con agar LB (tripteína bacteriológica 1 % (p/v),

extracto de levadura 0.5 % (p/v), cloruro de sodio 1 % (p/v) y agar bacteriológico 1.5 % (p/v) e incubadas a 30°C por 24 horas. Fueron contadas las colonias (CFU/mL). Resultados obtenidos: Ninguna de las mieles ensayadas a las concentraciones estudiadas presentó actividad anti-QS.

-En el marco del proyecto de investigación "Calidad y trazabilidad de mieles argentinas" bajo la dirección de la Dra. S. Fuselli / Ing. María Isabel Yeannes (Marzo 2014 a Diciembre 2015) he participado como evaluador sensorial de mieles de distintas regiones de Argentina.

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

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

En el periodo de prórroga, se finalizarán los ensayos de control de la enfermedad Loque Americana con aceites esenciales en larvas de abejas criadas "in vitro" y con los aceites esenciales que resulten promisorios para el control in vitro de la enfermedad, se completarán los ensayos de toxicidad en larvas y posteriormente en abejas adultas. Los ensayos de toxicidad en abejas adultas se harán por el método de exposición completa (Ruffinengo et. al., 2005). Asimismo, se efectuará la ESCRITURA, CORRECCIÓN Y PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL "Actividad antimicrobiana y anti-patogénica de sustancias bioactivas para el control de loque americana". OCA N° 1343/12. Directora: S. Fuselli y Co-directora: A. Ponce. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Referencias:

- 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.

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:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. 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 periodos que se establezcan en los cronogramas anuales.