

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE ESTUDIO

PERIODO Abril 2012- Abril 2013

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)

-ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTI-QUÓRUM SENSING (ANTI-QS) DE COMPUESTOS BIOACTIVOS OBTENIDOS DE HIERBAS AROMÁTICAS PARA EL CONTROL DE LOQUE AMERICANA.

El plan de actividades se adjunta al final de este informe.

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: Fecha de iniciación: 1/4/2012

2º AÑO: Fecha de iniciación:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: Fecha de iniciación:

2º AÑO: Fecha de iniciación:

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento: Biología

Cátedra:

Otros: Grupo de investigación Microbiología Aplicada - Laboratorio de Artrópodos

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

6. EXPOSICIÓN SINTETICA 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 primer año de BECA DE ESTUDIO se llevaron a cabo las investigaciones previstas en el plan propuesto. De acuerdo a los objetivos planteados, que se mencionan a continuación, se efectuaron las siguientes actividades:

1- Obtención y caracterización de aceites esenciales:

A partir de hierbas frescas y/o secas de *Aloysia polystachya* (burrillo), *Heterothalamus alienus* (romerillo), *Solidago chilensis* (vara de oro), *Lippia turbinata* (poleo) y *Mintostachys mollis* (peperina) se obtuvieron los aceites esenciales mediante arrastre con vapor, en un sistema tipo Clevenger en los laboratorios de la Universidad de la República, Facultad de Química, Cátedra de Ecología química (Uruguay). Los aceites esenciales fueron analizados en un cromatógrafo gaseoso acoplado a masa (GC_MS) (Shimadzu 2010-Shimadzu QP2010) utilizando una columna polar (AT-WAXms) y otra no polar (DB-5ms). Se identificaron los componentes químicos volátiles mayoritarios al 5%. Para su cuantificación se inyectaron las muestras en un detector de ionización de llama (GC_FID) (Hewlett- Packard 5890 Series II). La identificación de los componentes se efectuó comparando los índices de retención calculados de cada fragmento con aquellos reportados en librerías de datos del cromatógrafo de masa (NIST 05 y SHIM 2205). Los hidrolatos producidos por la destilación de las hierbas fueron liofilizados para su conservación. Asimismo, se adquirieron aceites esenciales de distintas regiones de Argentina (San Luis, Córdoba, Jujuy, Neuquén y Buenos Aires), tales como: *Salvia officinalis* (salvia), *Schinus molle* (aguaribay), *Lippia turbinata* (poleo), *Wedelia glauca* (sunchillo), *Heterotheca latifolia* (alcanforillo), *Tagetes minuta* (manzanilla), *Satureja odora* (muña-mula) y *Lepechinia floribunda* (salvia blanca), previamente caracterizados para ser empleados en el control de loque americana.

2- Aislamiento e identificación de cepas de *Paenibacillus larvae*, a partir de restos larvales de abejas, obtenidos de apiarios comerciales regionales con síntomas de Loque americana (LA):

De acuerdo a la metodología empleada por Alippi (1992) y Fuselli (2006), los restos removidos del interior de las celdas fueron depositados en tubos de ensayo con 5 ml de agua destilada estéril, se agitaron en vortex y fueron sometidos a shock térmico durante 15 minutos a 80 °C, para eliminar las formas no esporuladas y activar la germinación de *P. larvae*. Luego, se prepararon placas de Petri con 10 ml de un medio semi-selectivo, agar MYPGP (1% caldo Müller-Hinton, 1.5% extracto de levadura, 0.2% glucosa, 0.1% piruvato de sodio, 0.3% PO₄HK₂ y 2% agar bacteriológico) con el agregado de ácido nalidixico (concentración final de 9ug mL⁻¹), para inhibir el desarrollo de especies acompañantes. Luego, se procedió a la siembra por el método de agotamiento con ansa y se incubaron las placas a 36-37 ± 0,5 °C durante 48-72 hs en microaerofilia (10% v-v-1 de CO₂). La identificación inicial de los aislamientos se realizó mediante la observación macroscópica de las colonias bacterianas. Las colonias de *P. larvae* son blanquecinas, opacas, aplanadas, con bordes irregulares, de 1 a 3 mm de diámetro, con células de forma bacilar Gram (+) y con esporas. Las colonias presuntivas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas: Producción de catalasa, Reacción de Voges-Proskauer (VP), Reducción de Nitratos (NO₃⁻), Producción de indol, Hidrólisis del almidón, Utilización del citrato de sodio, Hidrólisis de la gelatina, Proceso de calor-

incubación en caldo nutritivo (CN) y Producción de ácido a partir de carbohidratos (Ver "Anexo").

- Producción y mantenimiento del cepario: Hasta la fecha se cuenta con 19 cepas de *P. larvae*. De las cuales, 9 son aislamientos de cuadros de cría, provenientes de: Necochea, San Clemente del Tuyu, Sierra de Los Padres (Mar del Plata), Coronel Vidal, Ayacucho, Mechongué y Estación experimental "Nágera" (Mar del Plata); 8 son cepas puras de Río Cuarto (Córdoba), Concordia (Entre Ríos), Río Negro, Estación experimental INTA Balcarce (Buenos Aires), Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Módena (Italia) y 1 es la cepa ATCC 9545 de referencia. Se conservan en agar MYPGP+20 % v/v de glicerol a -20°C.

Cada 20 días las cepas son repicadas en agar MYPGP y mantenidas en heladera a 2-4°C para contar con material fresco para la realización de los ensayos.

Referencias:

- 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.

- 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.

3- Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cada aceite esencial empleado frente a *Paenibacillus larvae*.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron mediante la técnica modificada de microdilución en caldo recomendada por NCCLS (1999). El método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano (Canton et al., 2000).

A partir de cepas de *P. larvae*, con 48 horas de crecimiento, se preparó un inóculo (107-108 células mL⁻¹) en agua peptonada (Absorbancia: 0,08-0,1 a 600 nm). Se sembraron placas de agar MYPGP con 100 µl del inóculo como control.

Se probaron los aceites esenciales de *Aloysia polystachia*, *Salvia officinalis* y *Solidago chilensis*. Con cada uno de los aceites ensayados se prepararon soluciones stock: 6000 µg mL⁻¹, 5400 µg mL⁻¹, 4800 µg mL⁻¹, 4200 µg mL⁻¹, 3600 µg mL⁻¹ y 3200 µg mL⁻¹, en caldo cerebro corazón y TWEEN 80 al 0,05%.

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos, a las que se les adicionó 100 µL de caldo cerebro corazón suplementado con 0,1 mgL⁻¹ de clorhidrato de tiamina (vitamina B1) y ácido nalidíxico 9µg mL⁻¹ en cada uno de los pocillos. Se incorporaron 100 µL de la solución stock del aceite esencial a testear en la primera columna de la microplaca y se realizaron diluciones seriadas al medio (1:2) desde el primer al décimo pocillo de cada fila. Finalmente, 50 µL del inóculo bacteriano fue incorporado en cada pocillo. Se incluyeron los siguientes controles: de viabilidad de la cepa en los pocillos número 11 y 12 (medio de cultivo más el inóculo bacteriano); de esterilidad del medio (medio de cultivo) y del agente antimicrobiano en las filas G y H (medio de cultivo + agua peptonada). Las microplacas fueron incubadas en microaerofilia a 36 °C por 48 horas y se procedió al revelado con Resarzurina 0,01% (azul: sin crecimiento bacteriano y rosa: crecimiento bacteriano). La última microcubeta sin crecimiento bacteriano (color azul) se consideró como la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Para determinar la CBM, se sembraron 100 µL de cada pocillo, sin crecimiento bacteriano, en placas con agar MYPGP que fueron incubadas en microaerofilia a 36 ± 0,5 °C durante 48-72 horas. La CBM correspondió a la última concentración del agente

antimicrobiano para la cual se observó un 99% de disminución en las UFC/ml (equivalente a tres ordenes menos de magnitud con respecto al control).

La determinación de la CIM y CBM de cada aceite esencial fue realizada por triplicado. Los ensayos de actividad antimicrobiana fueron efectuados frente a 10 cepas de *P. larvae*.

En la determinación de la CIM se presentaron dificultades con respecto a la dilución de los aceites ensayados. A tal fin, se probaron diferentes agentes diluyentes, tales como: propilenglicol 5%v/v, MYPGP 0,15%, agar-agar 0,15% y caldo cerebro corazón. Finalmente se obtuvo una correcta emulsión del aceite en 1 ml de caldo cerebro corazón enriquecido con TWEEN 80 0,5%.

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.

-Canton R, García JE, Gómez-Lus ML, Martínez L, Rodríguez C, Vila J (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica, Ed: JJ Picazo CL. Pág. 11: 1-44.

4- Determinación in vitro de la Concentración Letal (CL50) individual de cada aceite esencial sobre *Apis mellifera*.

Se está llevando a cabo la optimización y puesta a punto de la técnica de determinación de la Concentración letal de cada aceite esencial, a fin de determinar la dosis de aceite que resulte inocua para las abejas. Se consideraron 2 metodologías: Exposición completa, donde se analiza la acción que ejerce el aceite por contacto, evaporación o ingesta siguiendo la metodología de Ruffinengo et al. (2005) y por Administración sistémica, donde se evalúa cómo afecta la ingesta de diferentes concentraciones del aceite en cada uno de los individuos seleccionados de las colmenas siguiendo el protocolo de EPPO (1992).

En el segundo año de beca de estudio se continuará con la determinación de la CL50 para cada aceite esencial ensayado.

Referencias:

- EPPO (1992) OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. www.eppo.org.

- 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.

5- Determinación del Índice de selectividad (IS) de cada aceite.

A partir de los resultados de los ensayos de determinación de la CL50, se podrá calcular el IS de cada aceite. Estos estudios se continuarán durante el segundo año de beca de estudio.

6- Estudios de la actividad anti-quórum sensing (anti-QS) de cada uno de los aceites esenciales ensayados.

Se estudiaron las propiedades anti-quorum sensing de los aceites esenciales de: *Salvia officinalis*, *Mintostachys mollis*, *Satureja odora*, *Schinus molle*, *Lepechinia floribunda* y *Artemisia annua*, utilizando a *Chromobacterium violaceum* como indicador. Se efectuaron ensayos de difusión en disco, a fin de analizar cualitativamente el efecto de

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. Un mililitro del cultivo bacteriano tratado con cada bioactivo se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos para precipitar la violaceína y descartar el sobrenadante. Este pellet se solubilizó y homogeneizó en 1 mL de DMSO (dimethyl sulfóxido). Luego, se midió por absorbancia a 585 nm la violaceína resuspendida. A fin de identificar o determinar si el descenso en la producción del pigmento violeta se debía a un bloqueo en el sistema de quorum sensing o a un efecto antimicrobiano sobre *C. violaceum* se llevaron a cabo ensayos de macrodilución y microdilución. En el primer caso, tubos conteniendo 5 ml de LB (Luria-Bertani, 1% tripteína bacteriológica, 0.5% extracto de levadura y 1% cloruro de sodio), suplementados con diferentes concentraciones de cada uno de los aceites ensayados fueron inoculados con 15 μ l de un cultivo fresco de *C. violaceum* (1×10^8 CFU ml⁻¹) e incubados a 30 °C durante 48 horas. Para determinar la concentración bacteriana, se efectuaron diferentes diluciones con agua peptonada de cada tubo y se sembraron 100 μ l en placas con agar LB, que fueron incubadas a 30 °C por 24 horas para luego cuantificar las UFC/ml⁻¹. Por otro lado, se procedió con la metodología explicada en el punto 6.3 (utilizando 5 μ l de inóculo bacteriano) para efectuar los ensayos de microdilución.

Asimismo, se realizaron ensayos de microdilución de los aceites frente a cepas patógenas de referencia, utilizadas regularmente en ensayos de actividad antimicrobiana, tales como: *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos en los estudios de la actividad anti-quórum sensing (anti-QS) dio lugar a la redacción del trabajo:

- 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) el 13 de febrero de 2013.

Referencias:

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

7- Selección de los aceites más promisorios, de acuerdo a su IS, para ser aplicados en el interior de colonias de abejas afectadas por *P. larvae*.

Este último objetivo del plan de actividades se alcanzará una vez que se obtenga el Índice de selectividad (IS) de cada aceite esencial. Estos estudios se continuarán durante el segundo año de beca de estudio.

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.

- Principal J., Barrios C., Pellegrini MC., Fuselli S. y Morales Y. (2012) Origen botánico de las mieles de *Apis mellifera* L. producidas en la cuenca del Embalse Guaremal, Estado Yaracuy, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 30(1):91-98.

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.; Alvarez, M. V.; Ponce, A. G.; Cugnata, N. M.; De Piano, F. G.; Fuselli, S. R. (2013). Antiquorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. Enviado a *Journal Essential Oil Research*, 10412905 (ISSN), 13 de febrero de 2013.

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)

En el marco de los proyectos del grupo de investigación, que se mencionan a continuación, se están llevando a cabo las siguientes actividades:

1.- Proyecto "PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE ACEITES ESENCIALES AUTÓCTONOS FRENTE A *PEANIBACILLUS LARVAE*, AGENTE CAUSAL DE LOQUE AMERICANA".

Hasta el momento, se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Salvia officinalis*, *Aloysia polystachia*, *Solidago chilensis* y *Cymbopogon nardus* frente a 10 cepas de *P. larvae*. Se utilizó la metodología de microdilución en caldo (ver ítem 6.3). Se obtuvieron los siguientes valores promedios de CIM y CBM: *S. officinalis* y *C. nardus* (175 ug ml⁻¹); *A. polystachya* (87,5 ug ml⁻¹) (al igual que su valor de CBM) y *S. chilensis* (mayor a 2000ug ml⁻¹). A partir de los resultados obtenidos se descarta como posible agente antimicrobiano al aceite esencial de *S. chilensis*. Se continuarán los estudios en el segundo año de beca.

2. Proyecto: "CONTROL DE LOQUE AMERICANA MEDIANTE ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS NO CONTAMINANTES BASADAS EN MOLECULAS NO CONVENCIONALES".

Se estan llevando a cabo estudios sobre el potencial bactericida de ácidos grasos saturados para ser empleados en colonias de abejas afectadas por la bacteria *P. larvae*. Se empleó hasta el momento el ácido láurico. El método testeado y seleccionado para la disolución del ácido láurico fue físico, el mismo consistió en la ruptura de los cristales de la molécula mediante la utilización de un taladro con mecha de teflón. El vehículo utilizado fue el medio de cultivo en el que se realizaron los ensayos, garantizando así la total inocuidad del diluyente. Los valores de CIM registrados fueron 13,54 y 27,08 µg /ml, encontrándose diferencias significativas entre las diferentes cepas y presentando una actividad antimicrobiana acorde con lo hallado en otras publicaciones. Asimismo, se evaluó la toxicidad del ácido láurico sobre *A. mellifera* evidenciando diferencias significativas de acuerdo a la forma de administración (sistémica o completa). Las concentraciones letales medias (CL50) para ambos métodos de administración decrecieron con el tiempo de exposición evidenciando una mayor toxicidad a lo largo del tiempo. Los valores obtenidos por el método de exposición completa fueron superiores, en comparación a los obtenidos por el método de administración sistémica, hecho que indica una mayor seguridad al aplicar el ácido láurico por exposición completa. Se continuarán los estudios en el segundo año de beca.

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)

- Presentación del trabajo en formato poster: "Antiquorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America". Autores: Pellegrini, M.C.; Alvarez, M. V.; Ponce, A. G.; Cugnata, N. M.; De Piano, F. G.; Fuselli, S. R. en el "Symposium internacional de l'AFERP et de STOLON". 22-24 de mayo de 2013. Bruselas. Bélgica.

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)

- VIAJE DE ESTUDIO (2012):

En el marco del Proyecto Conjunto de Investigación "MERCOSUR" PPCP 032/2011, Director: Dr. Martín Eguaras (CONICET-UNMDP) y co-directora: Dra. Sandra Fuselli (CIC-UNMDP) (2011-2014), se llevó a cabo una estancia de investigación en el Laboratorio de Química Ecológica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo (Uruguay), bajo la dirección de la Prof. Agr. Carmen Rossini, Ph.D. (03/09/2012 al 21/09/2012). Se efectuó la caracterización química y cuantificación de los componentes volátiles de diversos aceites esenciales, tales como *Aloysia polystachya* (burrito), *Heterothalamus alienus* (romerillo), *Solidago chilensis* (vara de oro), *Lippia turbinata* (poleo) y *Mintostachys mollis* (peperina) mediante la utilización del un GC-MS y GC-FID (ver ítem 6.1).

-CURSO DE PERFECCIONAMIENTO (2012-2013):

Curso de "Producción apícola" avalado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (Septiembre de 2012 a Abril de 2013). Lugar de realización: Finca Santa Paula (Mar del Plata). En curso.

-CURSO DE POST-GRADO (2012):

"SEMIOQUÍMICOS Y SUS POTENCIALES APLICACIONES EN CONTROL DE PLAGAS". Institución organizadora: UNMDP. Docente responsable: Dra. Sandra Fuselli y Dra. Carmen Rossini. 14 al 16 de Noviembre de 2012. Carga horaria: 24 horas teóricas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMDP. Calificación: 9 (nueve) distinguido.

-MATERIA DE POSGRADO (2012): "Sanidad Apícola". cursada en el segundo cuatrimestre de 2012. Aprobada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNMDP).

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

-

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

-

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

Inscripción a la carrera de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. TESIS DOCTORAL: "Actividad antimicrobiana y anti-patogénica de sustancias bioactivas para el control de loque americana". Directora: Dra. Sandra R. Fuselli. Co-directora: Dra Alejandra Ponce. OCA1343/12.

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)

PLAN DE TRABAJO: "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTI-PATOGÉNICA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS PARA EL CONTROL DE LOQUE AMERICANA"

De acuerdo a los resultados de las investigaciones realizadas durante el primer año de beca, se concluye que los valores de CIM y CBM hallados en los aceites esenciales de *A. polystachia*, *C. nardus* y *S. officinalis* frente a diez cepas de *P. larvae* fueron inferiores a 200ug ml⁻¹, hecho que evidencia que con el agregado de una baja concentración de aceite (87.5ug/ml en el caso de *A. polystachia*) se podría controlar in vitro el crecimiento y la proliferación de la bacteria esporulada *P. larvae*. Asimismo, los aceites esenciales ensayados de *S. officinalis*, *M. mollis*, *S. odora*, *S. molle*, *L. floribunda* y *A. annua* presentaron actividad anti quorum sensing a concentraciones subletales sobre *C. violaceum*, siendo *M. mollis* el aceite con mayor capacidad anti-QS.

A su vez, *M. mollis* y *S. molle* presentaron mayor actividad bacteriostática y bactericida frente a *E. coli*, *S. aureus* y *L. innocua*.

Por otro lado, el patógeno bacteriano *P. larvae* produce y secreta diferentes proteasas durante la replicación vegetativa, tales como metaloproteasas y enolasas; factores de virulencia que podrían estar regulados por quorum sensing (Antunez, 2009).

Considerando este mecanismo de acción y los resultados obtenidos hasta el momento, se pretende continuar con las siguientes investigaciones durante el segundo año de beca:

- Analizar si los aceites con actividad anti-quorum sensing disminuyen la actividad proteolítica de *P. larvae* y
- Determinar la actividad antimicrobiana in vitro de nuevos aceites esenciales considerando el más efectivo para el control de loque americana.

A tal fin, se llevará a cabo las siguientes actividades que se mencionan a continuación:

1- Se determinará la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales autóctonos de *Heterothalamus alienus* (romerillo), *Lippia turbinata* (poleo), *Mintostachys mollis* (peperina), *Salvia officinalis* (salvia), *Schinus molle* (aguaribay), *Wedelia glauca* (sunchillo), *Heterotheca latifolia* (alcanforillo), *Tagetes minuta* (manzanilla), *Satureja odora* (muña-muña) y *Lepechinia floribunda* (salvia blanca), entre otros, frente a *P. larvae*.

2- Se determinará in vitro la Concentración Letal (CL50) individual de cada aceite esencial sobre *Apis mellifera*, mediante la técnica de exposición completa y/o administración sistémica.

La técnica de exposición completa se efectuará de acuerdo a la metodología empleada por Ruffinengo y colaboradores (2005). Se prepararán diluciones adecuadas de los aceites que serán aplicadas en la superficie interior de las cápsulas de petri. Se agregarán 5 abejas adultas y un recipiente con agua embebida en una esponja y candy (mezcla de azúcar impalpable y agua, 3:1) para su alimentación. Se realizarán 5 réplicas por tratamiento y

controles. Las placas serán mantenidas en incubadora a 29°C y 60% de HR. La mortalidad de los individuos será cuantificada a las 24, 48 y 72 horas para cada concentración. Mediante un análisis probit se estimará la CL50 para las abejas a cada tiempo de observación. La administración sistémica seguirá las indicaciones del protocolo establecido por EPPO (1992). Se ensayarán diversas concentraciones de aceites en una solución con jarabe de azúcar (2:1) al 10%v/v. Se realizarán dos controles: uno con solución azucarada (2:1) y otro con el diluyente del aceite-jarabe al 10%v/v. Por tratamiento se efectuarán veinte réplicas siendo cada una de ellas un individuo. Al inicio del ensayo (tiempo cero) las abejas de cada tratamiento serán alimentadas individualmente con una dosis de 20 µl de cada una de las concentraciones. Luego de su consumo se suministrará candy (mezcla de azúcar impalpable y agua, 3:1) libre de aceite para que las abejas se alimenten ad libitum. La tasa de mortalidad de las abejas será registrada diariamente hasta las 72 horas y será comparada con las registradas para los grupos control. Los resultados serán analizados calculando la CL50 a las 24, 48 y 72 horas teniendo en cuenta la mortalidad natural diaria (Abbott, 1925).

Referencias:

- Abbott W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- EPPO (1992) OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. www.eppo.org.
- 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.

3- Se establecerán los índices de selectividad (IS) de cada aceite testado.

Se calcularán los índices de Selectividad (IS) teniendo en cuenta la CL50 de abejas estimadas para las 24 hs y la CIM frente a *P. larvae*.

IS: CL50 de abejas/CIM agente antimicrobiano para *P. larvae*.

4- Se comprobará cuantitativamente la actividad anti-quórum sensing (anti-QS) de cada uno de los nuevos aceites esenciales a emplear.

Se llevará a cabo el mismo procedimiento (ver ítem 6.6) para los aceites esenciales de: *Heterothalamus alienus* (romerillo), *Lippia turbinata* (poleo), *Mintostachys mollis* (peperina), *Salvia officinalis* (salvia), *Schinus molle* (aguaribay), *Wedelia glauca* (sunchillo), *Heterotheca latifolia* (alcanforillo), *Tagetes minuta* (manzanilla), *Satureja odora* (muña-muña) y *Lepechinia floribunda* (salvia blanca), entre otros.

5- Se estudiará la actividad anti-proteolítica de los aceites esenciales sobre el secretoma de *P. larvae*.

Se prepararán cultivos activos de *P. larvae* los cuales se pondrán en contacto con los diferentes agentes bioactivos. Se incubarán a 37°C con agitación durante 72 horas, se centrifugará a 14.000 x g durante 20 minutos. Se determinará actividad enzimática utilizando los sobrenadantes. La actividad proteolítica de cada muestra se evaluará de acuerdo a la metodología empleada por Antúnez et al. (2009).

Referencias:


- Antúnez, K.; Anido, M.; Schlapp, G.; Evans, J. D. 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.

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 períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.


.....
Firma del Director


.....
Firma del Becario