

# **EFFECTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *ACHYROCLINE SATUREIODES* SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ESPORA DE *PAENIBACILLUS LARVAE***

**DISCIPLINA: Microbiología, enfermedades infecciosas y parasitarias**

PIMENTEL BETANCURT, D.; PALLETTI ROVEY, M. F.; CASSINA, C.; BEOLETTA, V.; OLIVA, Ma. De las M.; MARIOLI, J. M.

## **INTRODUCCION**

La Loque Americana (LA) es una bacteriosis que afecta a *Apis mellifera* L. *Paenibacillus larvae*, es el agente etiológico y sus esporas poseen la capacidad infectiva, además de ser altamente resistentes. El control se realiza con antibióticos, que pueden dejar residuos en la miel, generando inconvenientes de calidad y comercialización (Alippi. 1995; Genersch. 2010). En consecuencia, se hace necesaria la búsqueda de nuevas sustancias capaces de controlar la bacteria o su espora y que no dejen residuos (Fuselli et al. 2006; Poppinga and Genersh. 2015). Los productos derivados de plantas medicinales constituyen una alternativa antimicrobiana, además de ser una estrategia no contaminante. *Achyrocline satureioides* (Lam.) es ampliamente utilizada en América del sur debido a sus propiedades farmacológicas y antibacterianas (Retta et al. 2012). En este trabajo se evaluó el efecto del extracto hexánico (EH) de *A. satureioides* sobre el crecimiento y la esporulación de *P. larvae* bajo distintas condiciones de cultivo.

## **MATERIALES Y METODOS**

Se incubó una cepa de *P. larvae* en Caldo J, en agitación a 37°C sin adicionarle extracto hexánico (EH) de *A. satureioides* (control) y en presencia del mismo, realizando la curva en frasco y tubos de ensayo en dos condiciones: 1) con agitación, 2) sin agitación. El EH se adicionó desde el inicio del ensayo, a una concentración de 2 ½ CIM (1 µg/mL). Se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar la DO, realizar el recuento de viables (UFC/mL) y evaluar la presencia de esporas. Para esto último se calentaron las muestras para eliminar las células vegetativas y recuperar las esporas; se sembraron en placas con agar MYPGP, se incubaron a 37°C en microaerofilia por 48h, y luego se contaron las colonias para calcular el efecto del EH sobre la germinación de las mismas. Además, se incubaron nuevamente los tubos que recibieron el tratamiento térmico.

## **RESULTADOS**

El crecimiento en el tiempo de *P. larvae* en frascos pudo ser evaluado hasta las 30 h, ya que luego se contaminaron fácilmente; en cambio el crecimiento en tubos permitió hacer un seguimiento prolongado. En condiciones de agitación se observaron mayores valores de DO con respecto a las curvas sin agitación, aunque no presentaban diferencias significativas. El ensayo en tubo sin agitación, permitió observar el crecimiento hasta la fase exponencial, mientras que con agitación se observaron todas las fases del crecimiento. A partir de las 30 h comenzó la fase estacionaria y permaneció incluso a las 48 h. El tratamiento con el EH, con y sin agitación, afectó el crecimiento de *P. larvae* desde el inicio y por lo tanto no se observaron cambios en la DO a lo largo del ensayo. Se determinaron las velocidades de crecimiento de cada curva, con y sin EH, encontrando disminución de la velocidad en presencia del EH, tanto para el ensayo en agitación como sin agitación (60,8% y 70,2% respectivamente). Se observó turbidez en los tubos sin EH, debido al crecimiento bacteriano; por el contrario, en los tubos de tratamiento no se observó turbidez a lo largo de todo el ensayo. En las placas con agar MYPGP, se obtuvo

menor crecimiento de las muestras provenientes del tratamiento con EH, comparado con las placas del control en las cuales se observó crecimiento confluyente. En los tubos que se mantuvieron en incubación (con y sin extracto) no se observaron cambios de turbidez en el tubo con tratamiento, mientras que el tubo control continuaba con abundante turbidez.

## **DISCUSION**

Tanto en agitación (lo que favorece la aireación del medio), como sin ella, el microorganismo creció satisfactoriamente sin diferencias significativas entre las dos condiciones, a pesar de que es un microorganismo que es favorecido por la microaerofilia. Además, el cultivo en tubos permitió realizar el seguimiento del crecimiento por más tiempo manteniendo la pureza de la cepa. Se lograron observar las distintas etapas de crecimiento de *P. larvae* y el tiempo que tarda en completar su crecimiento. En el ensayo de evaluación del efecto del EH sobre el crecimiento y la germinación de la espora, se observó muy bien efecto antimicrobiano, debido a que se mantuvo constante la DO y se observó escasa o nula turbidez en el tubo con el extracto. Esto estaría indicando la efectividad del EH de *A. saturoioides* para inhibir el crecimiento de *P. larvae* ya que estaría inhibiendo la proliferación de la célula vegetativa y la germinación de la espora. La espora en presencia del EH (tubo) no fue capaz de germinar, pero al pasarla a un medio fresco (agar MYPGP) sin presencia del EH (agente estresante) si lo hizo. De estos resultados, se deduce que la espora en presencia del EH se encontraría en un estado de latencia metabólica y dado que la germinación es el primer paso de la infección, estar empleando el extracto podría ser una medida preventiva y prometedora para el control de la LA.

## **CONCLUSIONES**

- La incubación en tubos fue más efectiva que en frasco ya que permitió determinar las etapas de crecimiento de *P. larvae*.
- El EH redujo el crecimiento del microorganismo desde el primer contacto, presentando diferencias significativas en el crecimiento de *P. larvae* en el control y en el tratamiento,
- El EH de *A. saturoioides* produjo inhibición sobre la germinación de la espora y sobre la célula vegetativa.

## **BIBLIOGRAFIA**

- ALIPPI A M. *Microbiología SEM* 11. 1995. 343-350.
- FUSELLI S R, GARCÍA DE LA ROSA S B, GENDE L B, EGUARAS M J, FRITZ R. *Revista Argentina de Microbiología*. 2006. 38: 89-92.
- GENERSH E. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010. 103: S10-S19.
- POPPINGA L; GENERSCH E. *Current Opinion in Insect Science*. 2015. 10:29–36.
- RETTA D, DELLACASSA E, VILLAMIL J, SUÁREZ S A, BANDONI A L. *Industrial Crops and Products*. 2012. 38: 27– 38.