

# Screening de cepas de *Bacillus* y *Brevibacillus* con Potencia Antagónica frente a Patógenos de Abejas. Correlación con la Presencia de Marcadores Genéticos de Péptidos Antimicrobianos.

AM Alippi<sup>1</sup>, AC López<sup>2</sup>, E Abrahamovich<sup>2</sup>, LC Bartel<sup>1</sup>
  
 Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI-CIC/UNLP), FCAyF, UNLP, La Plata
   
<sup>1</sup>CIC, Provincia de Buenos Aires, <sup>2</sup>CONICET-CCT La Plata E-mail: alippi@biol.unlp.edu.ar

## INTRODUCCION

La loque americana y la cría yesificada, enfermedades comunes de la etapa larval de las abejas, son causadas por la bacteria esporulada *Paenibacillus larvae* (PI) y el hongo *Ascosphaera apis* (Aa), respectivamente. El control biológico de estas enfermedades es una alternativa para sustituir el uso de medicamentos veterinarios y evitar la presencia de residuos tóxicos en miel. Una amplia variedad de bacterias producen lipopéptidos antimicrobianos (PAM), metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana que los ubica como antibióticos potenciales. Muchas especies de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* producen varios PAM, entre los que se encuentran polimixinas, iturinas, fengicinas, surfactinas, entre otros. Se busca contar con herramientas que permitan seleccionar aquellas antagonistas potentes con mínimos ensayos, de manera de profundizar el estudio sólo con las más promisorias.

## OBJETIVOS

- Screening de cepas de *Bacillus* y *Brevibacillus* aisladas de fuentes de apiario con antagonismo potente frente a PI y Aa.
- Identificar a nivel de especie a las cepas evaluadas.
- Determinar las condiciones de cultivo que favorecen la potencia antagónica por sustancias difusibles y volátiles.
- Evaluar capacidad surfactante y otras variables físico-químicas y su relación con el antagonismo.
- Definir si la presencia de marcadores genéticos de PAM es un buen indicador de potencia antagónica.

## MATERIALES Y METODOS

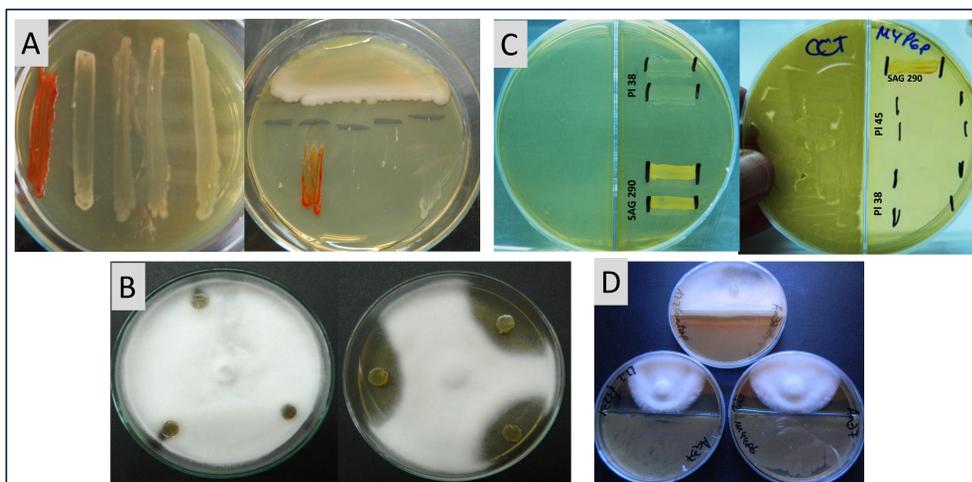
**Identificación de cepas:** Pruebas microbiológicas clásicas, perfiles metabólicos (API50CH/20E) y homología de secuencias del gen ADN<sub>r</sub> 16S.

**Antagonismo frente a PI y Aa:** Se evaluaron 35 cepas de *Bacillus* y *Brevibacillus* frente a 7 cepas de PI y 2 de Aa en tres medios de cultivo (MYPGP, ISO-SENSITEST y Agar Cerebro Corazón con Tiamina (CC)). Ensayo inhibición por sustancias difusibles y volátiles; evaluación de inhibición de estría bacteriana o desarrollo miceliar, a 24 y 48 hs (Figura 1).

**Detección de genes PAM:** Se analizó por PCR la presencia de 7 secuencias homólogas (SH) de distintos genes relacionados con la producción de PAM (Figura 3A).

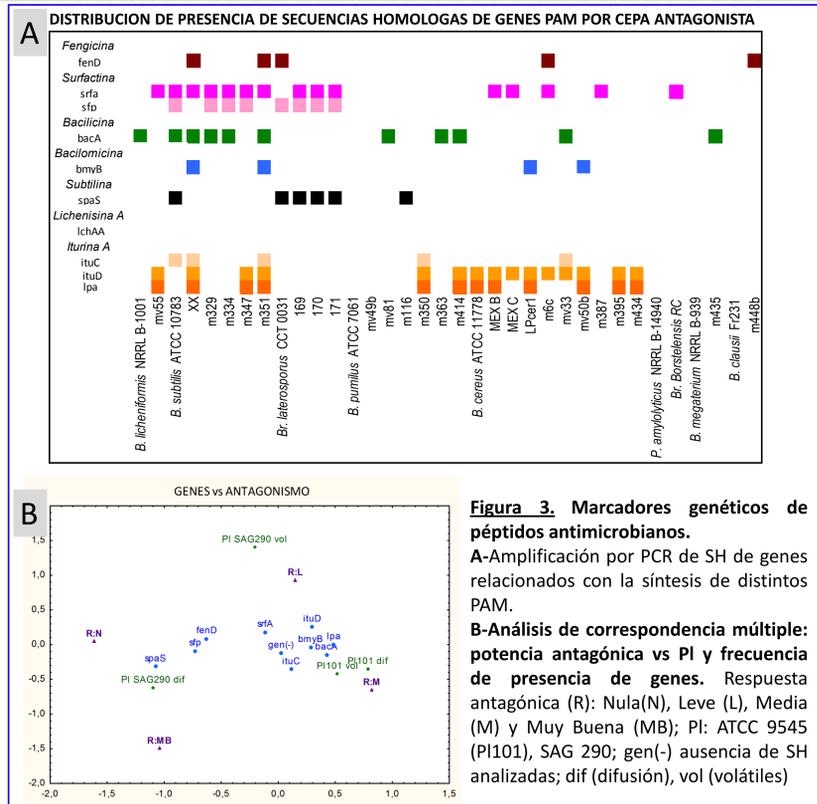
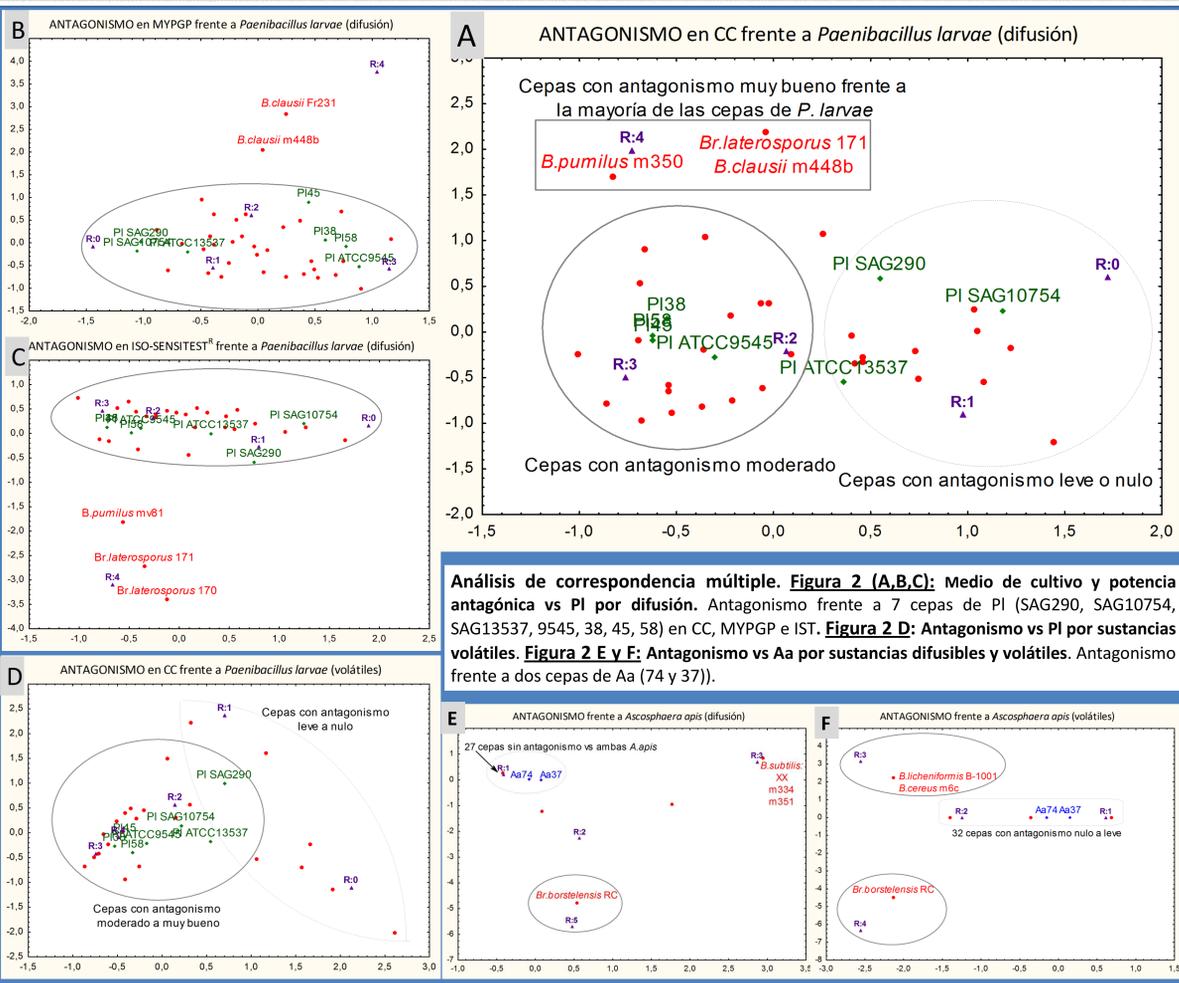
**Otras variables:** Se evaluó la capacidad surfactante (Gota colapsada), formación de película superficial y precipitado pH2 de sobrenadantes de cultivo líquido (MYPGP, CC, IST, TS; 31°C, 110 rpm, cada 24 h durante 6 días).

**Estadística:** Análisis de correspondencia múltiple (STATISTICA, StatSoft 7) comparando medios de cultivo, potencia antagónica, presencia de genes PAM (Figuras 2 A,B, C, D, E, F y 3B)



**Figura 1.** Ensayos de Antagonismo frente a distintas cepas de PI y Aa. Antagonismo por sustancias difusibles vs distintas PI (A) y Aa (B). Antagonismo por sustancias volátiles vs distintas PI (C) y Aa (D).

## RESULTADOS



### Resultados principales:

- Identificación de 28 cepas de las especies: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. clausii*, *Brevibacillus borstelensis* y *Br. laterosporus*.
- La potencia antagónica es dependiente del medio de cultivo y del antagonista ensayado. CC resultó mejor medio de cultivo para la mayoría de los antagonistas. *Br. laterosporus*, *B. pumilus* y *B. subtilis* fueron las especies con mejores resultados frente a ambos patógenos.
- Capacidad surfactante variable según el medio y el tiempo de cultivo. Cepas de *B. subtilis* resultaron las mejores en todos los medio ensayados, mientras que las de *B. cereus* tuvieron nula capacidad surfactante. Las demás especies mostraron resultados nulo a medio en alguno de los medios ensayados.
- Surfactina, Bacilicina e Iturina A resultaron las SH más frecuentes (40% cepas). La cantidad y distribución de SH por especie es variable y no responde a un patrón común entre cepas. A mayor cantidad de SH mayor potencia antagónica, aunque la ausencia de SH no indica la ausencia de antagonismo.

## CONCLUSIONES

La potencia antagónica observada en función del medio de cultivo y las cepas enfrentadas tiene una variabilidad intrínseca.

La correlación entre presencia de genes PAM, capacidad surfactante e inhibición del desarrollo de PI o Aa permitirían seleccionar cepas potencialmente útiles como biocontroladoras.