

Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol

S. R. FUSELLI*, S. B. GARCÍA DE LA ROSA, L. B. GENDE, M. J. EGUARAS, R. FRITZ

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Funes 3350, (7600) Mar del Plata, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: sfuselli@mdp.edu.ar

RESUMEN

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de una mezcla de dos aceites esenciales y timol frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de la enfermedad Loque americana, que afecta a las abejas. Los aceites esenciales utilizados fueron canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), con el agregado de timol, componente mayoritario del tomillo presente en un 39,9%. Los parámetros medidos fueron la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo Muller-Hinton, mediante dilución seriada, y la concentración bactericida mínima (CBM) en agar MYPGP. El aceite esencial de tomillo registró valores de CIM entre 150 y 250 mg/ml, y de CBM entre 200 y 300 mg/ml, mientras que para el aceite esencial de canela los valores de CIM y de CBM obtenidos fueron 50 a 100 mg/ml y 100 a 125 mg/ml, respectivamente. El timol presentó valores de CIM y de CBM similares, de 100 a 150 mg/ml. No se detectaron diferencias significativas entre las cepas bacterianas estudiadas, pero sí entre la actividad de los aceites esenciales y la del timol ($P < 0,01$). Un efecto inhibitorio sinérgico frente a Loque americana, evidenciado en la reducción de la CIM y de la CBM, fue obtenido mediante la utilización de una mezcla de 62,5% de aceite esencial de tomillo, 12,5% de aceite esencial de canela y 25% de timol.

Palabras clave: aceites esenciales, *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris*, timol, *Paenibacillus larvae*

ABSTRACT

Inhibition of *Paenibacillus larvae* employing a mixture of essential oils and thymol. *In vitro* antimicrobial activity of a mixture of two essential oils and thymol against *Paenibacillus larvae*, causal agent of American Foulbrood (AFB), was evaluated. The essential oils were extracted from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and thyme (*Thymus vulgaris*). The third component used, thymol, is the major component of the essential oil of thyme which contains 39.9 % of thymol. Minimal inhibitory concentration (MIC) in Mueller-Hinton broth by the tube dilution method and minimal bactericide concentration (MBC) on MYPGP agar were evaluated. Thyme registered MIC values of 150-250 mg/ml and MBC values of 200-300 mg/ml, while the MIC and MBC values obtained for cinnamon were of 50-100 mg/ml and 100-125 mg/ml. Thymol showed similar MIC and MBC values of 100-150 mg/ml. No significant differences between the bacterial strains were detected, but significant differences between essential oils and thymol activity were registered ($P < 0,01$). An inhibitory synergetic effect on AFB was observed reducing MIC and MBC values due to the use of a mixture of 62.5% of thyme, 12.5% of cinnamon and 25% of thymol.

Key words: essential oils, *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris*, thymol, *Paenibacillus larvae*

La patología conocida como Loque americana es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*. Afecta a los estadios de larva y de pupa de la abeja (*Apis mellifera* L.) y constituye uno de los principales problemas de la apicultura mundial. El uso de antibióticos, sulfas u otras sustancias quimioterapéuticas para el control de la enfermedad puede dar origen a la presencia de residuos de estos productos en la miel y en otros derivados de la colmena, lo que implica una reducción de la calidad, riesgo para su consumo y dificultad para su comercialización. La metodología del quemado de las colmenas ante un brote de la enfermedad no es preventiva y constituye una práctica muy costosa para el apicultor.

Los aceites esenciales o las mezclas provenientes de plantas aromáticas o especias han demostrado poseer actividad antimicrobiana contra distintas cepas de

P. larvae (1, 2, 6, 7, 9, 10, 17). Esto ofrece una alternativa natural deseable frente a los antibióticos y demás sustancias quimioterapéuticas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de una mezcla de dos aceites esenciales, el de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y el de tomillo (*Thymus vulgaris*), con el agregado de timol, frente a diferentes cepas de *P. larvae*.

El aceite esencial de tomillo fue extraído mediante el método de destilación por arrastre con vapor (3), utilizando la sumidad florida seca y las hojas. Esta planta, que es un subarbusto aromático perenne perteneciente a la familia de las Labiadas y oriundo de la región mediterránea (en especial del sur de Italia), se ha distribuido prácticamente en todo el mundo. En la Argentina se cultiva, sobre todo, en el noreste, en San Luis, en

Córdoba y en el noroeste de la provincia de Buenos Aires (8).

La canela pertenece a la familia de las Laureáceas; es originaria de Ceilán, Malasia, Java e India meridional. De la corteza seca de árboles jóvenes de entre 3 y 5 años se obtiene el aceite esencial, que en este caso fue de procedencia italiana. El destilado de los aceites fue conservado a 5 °C.

Se obtuvieron 3 cepas de *P. larvae* procedentes de panales con síntomas clínicos de Loque americana, ubicados en las localidades de Miramar (38°15'S-57°50'W), Balcarce (37°52'S-58°15'W) y Vidal (37°27'S-57°44'W), provincia de Buenos Aires, Argentina. Las cepas se aislaron e identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales (4, 5, 18) y empleando el sistema API CH50 (BioMérieux, L'Étoile, Francia). Se conservaron en agar MYPGP (caldo Mueller-Hinton-extracto de levadura-glucosa-piruvato de sodio) con 20% v/v de glicerol, y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Células vegetativas de *P. larvae*, previamente cultivadas en agar MYPGP durante 48 horas a 35 °C, se suspendieron en agua bidestilada estéril, y la suspensión fue estandarizada a una concentración de 10⁷-10⁸ células/ml (15). Esta concentración correspondió a una absorbancia de 0,258, medida a 620 nm.

A fin de determinar los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para las distintas suspensiones bacterianas, se sembraron diluciones seriadas (1:2) en caldo Mueller Hinton (Merck, Darmstadt, Alemania), con el agregado de clorhidrato de tiamina 0,1 mg/ml a pH 7,1. Todos los tubos (incluso los controles) se incubaron a 35 °C ± 0,5 durante 48 horas en microaerofilia. El crecimiento se evaluó por observación de la turbidez desarrollada.

Para determinar los valores de la concentración bactericida mínima (CBM), los tubos negativos de la determinación de la CIM se sembraron en agar MYPGP suplementado con 9 mg/ml de ácido nalidíxico (13). Las placas se incubaron en microaerofilia a 35 °C ± 0,5 durante 48 horas. La cepa *P. larvae* ATCC 9545 (provisita por el Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, Italia) fue utilizada como estándar de control del rango de las CIM y las CBM.

Para la preparación de la mezcla de los aceites esenciales y el timol, se partió de soluciones madre que correspondieron a 4 mg/ml para el aceite de tomillo, 0,8 mg/ml para el aceite de canela y 1,6 mg/ml para el timol. Se empleó timol (5-metil-2 isopropil-1 fenol) grado analítico (Sigma-Aldrich Argentina). Los aceites esenciales fueron emulsionados con propilenglicol (1-2 propanodiol) grado analítico (Sigma-Aldrich Argentina) al 5% v/v (23).

Un mililitro de cada solución madre fue adicionado a 1 ml de caldo Muller-Hinton con el agregado de clorhidrato de tiamina 0,1 mg/ml a pH 7,1. Seis diluciones al

medio (1:2), en concentraciones decrecientes entre 2 mg/ml y 62,5 mg/ml para el aceite de tomillo, entre 400 y 12,5 mg/ml para el aceite de canela, y entre 800 y 25 mg/ml para el timol fueron realizadas a fin de obtener la dilución seriada. Un mililitro de suspensión bacteriana fue luego incorporado a cada tubo de la dilución seriada, a temperatura ambiente.

A fin de maximizar la actividad antibacteriana de la mezcla, se efectuó una dilución única a partir de los valores de CIM de cada componente (125, 25 y 50 mg/ml para el aceite esencial de tomillo, el de canela y para el timol, respectivamente). Se realizó para la mezcla el mismo procedimiento de dilución seriada que el descrito para la evaluación de la actividad antimicrobiana individual de los aceites esenciales y del timol.

Se realizaron controles positivos y negativos del caldo Mueller-Hinton, del agar MYPGP y del emulsionante. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los datos de CIM y de CBM obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA factorial de doble clasificación. Dicho análisis evaluó la existencia de diferencias entre cepas bacterianas y entre la actividad de los aceites esenciales y del timol, así como su interacción. Dados los resultados obtenidos en el ANOVA, se utilizó el método comparativo de medias de Tukey, a fin de detectar diferencias entre los aceites esenciales y el timol como agentes antimicrobianos.

Las 3 cepas de *P. larvae* aisladas fueron gram-positivas, catalasa y Voges-Proskauer negativas. Estos microorganismos producen indol, licuan la gelatina pero no hidrolizan el almidón. Los sustratos que permitieron identificarlas como *P. larvae* fueron fructosa (negativa), esculina (negativa) y D-tagatosa (positiva), coincidiendo con los resultados obtenidos por Carpana (11).

Según Alippi *et al.*, 2001 (7) los principales componentes del aceite esencial de tomillo son el timol (39,9%), el α -cimeno (18,1%) y el α -terpineno (13,1%), mientras que Floris *et al.*, 1996 (17) determinaron que el aldehído cinámico (79,3%), el eugenol (11,9%) y el α -pineno (1,8%) son los principales componentes de la canela.

Los valores promedios de CIM y de CBM de cada uno de los aceites esenciales y del timol, frente a cada cepa aislada, se presentan en la Tabla 1. Los valores individuales de CIM para el aceite de canela variaron entre 50 y 100 mg/ml, mientras que el aceite esencial de tomillo presentó valores de CIM entre 150 y 250 mg/ml, lo que indica una alta actividad antibacteriana contra la bacteria causante de Loque americana por parte del primero. Mediante pruebas realizadas *in vitro*, Alippi *et al.* (7) determinaron que los aceites esenciales que mostraron mayor actividad antibacteriana contra *P. larvae* fueron el de pasto limón (*Cymbopogon citratus*), con valores de CIM entre 50 y 100 mg/ml, y el de tomillo, con valores de CIM entre 100 y 150 mg/ml, dependiendo de la cepa analizada.

Tabla 1. Valores promedio y desviaciones estándar de CIM y de CBM para los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y de tomillo (*Thymus vulgaris*) y para el timol, frente a tres cepas de *P. larvae* aisladas de las localidades bonaerenses de Balcarce, Miramar y Vidal.

Procedencia de la cepa	Aceite esencial de canela		Aceite esencial de tomillo		Timol	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Balcarce	83,3 ± 25,8	108,3 ± 12,9	191,7 ± 20,4	250,0 ± 0,0	116,7 ± 25,8	133,3 ± 25,8
Miramar	58,3 ± 20,4	112,5 ± 13,7	241,7 ± 20,4	291,7 ± 20,4	100,0 ± 0,0	133,3 ± 25,8
Vidal	83,3 ± 25,8	108,3 ± 12,9	216,7 ± 25,8	241,7 ± 20,4	133,3 ± 25,8	133,3 ± 25,8

Los valores de concentración están expresados en mg/ml

El aceite esencial de canela tiene mayor poder de inhibición que el de tomillo, como queda demostrado por la reducción de los valores de la CIM (Tabla 1), y resulta altamente efectivo contra esta patología. En ensayos *in vitro* con aceite esencial de canela, Floris y Carta (16) obtuvieron valores de CIM y de CBM similares a los de este estudio.

Los análisis efectuados con timol dieron como resultado valores individuales de CIM y de CBM similares frente a las 3 cepas estudiadas, los que oscilaron entre 100 -150 mg/ml. El timol es un compuesto que presenta una efectiva actividad antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (20). En colmenas inhibe el crecimiento del moho *Ascosphaera apis* (12) y es empleado en preparaciones comerciales para el control de *Varroa destructor* (14, 19).

Los resultados del ANOVA indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) en la respuesta de las distintas cepas bacterianas estudiadas, si bien se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre la actividad de los aceites esenciales y la del timol. Asimismo, el análisis comparativo de medias de Tukey, a partir de valores de CIM y de CBM, mostró diferencias significativas entre el aceite esencial de tomillo y el de canela (Tabla 2).

Existen antecedentes de la utilización de mezclas de aceites esenciales o de algunos de sus componentes para controlar la actividad biológica de hongos (22) y de bacterias (7, 21).

Para probar la efectividad y maximizar su actividad antibacteriana frente a *Loque americana*, se efectuó una mezcla de los aceites de canela y de tomillo con el agregado de timol, a partir de los valores individuales de CIM de cada componente. La composición de la mezcla obtenida fue de 62,5% de aceite de tomillo, 12,5% de aceite de canela y 25% de timol. Los valores promedio de CIM y de CBM obtenidos para la mezcla fueron de 66,6 mg/ml y 95,83 mg/ml, respectivamente, de modo que se obtuvo una significativa reducción con respecto a los valores de CIM y de CBM individuales de cada uno de los componentes, de hasta un 69% y un 63% respectivamente (Figura 1).

Tabla 2. Diferencias entre pares de medias para los valores de CIM y de CBM ordenadas para el aceite esencial de canela (C), el timol (Ti) y el aceite esencial de tomillo (To), frente a tres cepas de *P. larvae*.

CIM	C	Ti	To
C	-	ns	+
Ti	41,7	-	ns
To	141,7	100,0	-

CBM	C	Ti	To
C	-	ns	++
Ti	23,6	-	+
To	151,4	127,8	-

Valor crítico para la CIM: $W_{0,05}=121,3$; $W_{0,01}=152,7$

Valor crítico para la CBM: $W_{0,05}=103,8$; $W_{0,01}=130,6$

++: diferencias altamente significativas; +: diferencias significativas y ns: diferencias no significativas.

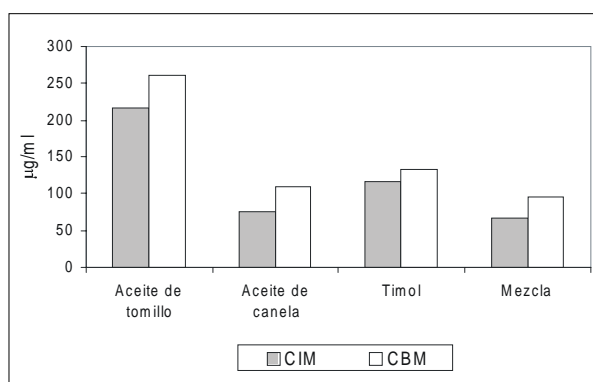


Figura 1. Valores promedio de CIM y de CBM de cada uno de los componentes individuales y de la mezcla (mg/ml) frente a *P. larvae*.

Frente a la cepa control (ATCC 9545) los valores promedio de CIM y de CBM fueron de 216,7 mg/ml y 261,1 mg/ml para el tomillo; de 75 mg/ml y 109,7 mg/ml para la canela y de 116,7 mg/ml y 133,3 mg/ml para el timol,

respectivamente. Para la mezcla se obtuvo en promedio una CIM de 67,5 mg/ml y una CBM de 96,4 mg/ml, valores similares a los obtenidos para las tres cepas analizadas.

El efecto sinérgico obtenido al utilizar la mezcla representa una importante ventaja frente al uso de aceites esenciales individuales, dado que se utiliza una menor cantidad y se potencia su efecto.

En todos los casos, la utilización de los aceites esenciales para el control de Loque americana es una alternativa natural que no presenta contraindicaciones ni deja residuos tóxicos en los productos provenientes de la colmena, y pueden ser aplicados por el productor en cualquier período del año. Utilizando aceites esenciales y sus mezclas, Albo *et al.* (1) no obtuvieron resultados relevantes para el control de Loque americana en campo, probablemente debido a la formulación, a la dosis o al método de administración. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio son un buen punto de comienzo para continuar investigando los aceites esenciales y sus mezclas, así como su formulación y administración, como métodos de control alternativo de Loque americana.

Este trabajo fue presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología, realizado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, del 17 al 21 de octubre de 2004.

Agradecimientos: Esta investigación fue subsidiada por la Universidad Nacional de Mar del Plata (Proyecto EXA 233/02, de la Dra. Rosalía Fritz) y por el PICT 08-704 ANPCyT del Dr. Martín Eguaras.

BIBLIOGRAFÍA

- Albo GN, Cerimele E, Re MS, De Giusti MR, Alippi AM. Ensayos de campo para evaluar la efectividad de algunos aceites esenciales. *Vida apícola* 2001; 108: 41-6.
- Albo GN, Henning C, Ringuelet JA, Reynaldi FJ, De Giusti MR, Alippi AM. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 2003; 34: 417-37.
- Aldicara JR. Essential oil. En: Macketta JJ, Cunningham WA, Dekker M, editors. *Encyclopedic of Chemical Processing and Design*. New York, 1976, p. 262.
- Alippi A. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera* in Argentina. *J Apic Res* 1991; 30: 75-80.
- Alippi AM. Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM* 1992; 8: 115-8.
- Alippi AM, Ringuelet JA, Cerimele EL, Re MS, Henning CP. Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood Disease. *J. Herbs, Spices and Med. Plants* 1996; 4: 9-16.
- Alippi AM, Ringuelet JA, Henning CP, Bandoni A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de algunos aceites esenciales y mezclas de esencias sobre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Vida Apícola* 2001; 106: 41-4.
- Alonso JR. Bases clínicas y farmacológicas. En: *Tratado de fitomedicina*. Buenos Aires, Argentina, Isis SRL, 1998, p. 112-3.
- Bazzoni E, Floris I. Azione *in vitro* di diversi oli essenziali contro *Paenibacillus larvae* e *Ascosphaera apis*. *Atti Apilombardia* 1999; 98: 191-7.
- Calderone NW, Shimanuki H. An *in vitro* evaluation of botanical compounds for the control of the honeybee pathogens *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the secondary invader *B. alvei*. *J Essent Oil Res* 1994; 6: 279-87.
- Carpana E, Marocchi L, Gelmini L. Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie* 1995; 26: 11-6.
- Colin ME, Ducos de Lahitte I, Larribau E, Boué T. Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie* 1989; 20: 221-8.
- Dingman DW, Stahly DP. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 860-9.
- Eguaras M, Ruffinengo S, Faverin C, Cora D, Palacio A, Basualdo M. Eficacia del timol en el control de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), un parásito de la abeja melífera. *Revista Argentina de Producción Animal* 2002; 22: 438.
- FDA (Food and Drug Administration) App.3.73. En: *Bacteriological Analytical Manual*. Ed 8th. AOAC International, Gaithersburg, USA, 1998, p. 581.
- Floris I, Carta C. *In vivo* activity of *Cinnamomum zeylanicum* Nees essential oil against *Bacillus larvae* White. *Apicultura* 1990; 6: 57-61.
- Floris I, Carta C, Moretti M. Activités *in vitro* de plusieurs huiles essentielles sur *Bacillus larvae* White et essai au rucher. *Apidologie* 1996; 27: 111-9.
- Gordon RE, Haynes WC, Pang H-N C. The genus *Bacillus*. En: *Agricultural Handbook No. 427*. USDA. Washington, 1973, p. 283.
- Imdorf A, Kilchenmann V, Maquelin C, Bogdanov S. Optimierung der Anwendung von "Apilife VAR" zur Bekämpfung von *Varroa jacobsoni* Oud in Bienenvölkern. *Apidologie* 1994; 25: 49-60.
- Juven BL, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994; 76: 626-31.
- Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 453-62.
- Montes-Belmont R, Carvajal M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J Food Protec.* 1998; 61: 616-9.
- The Merck Index. *Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 12 ed Merck Research Laboratories Division of Merck & CO., Inc. Whitehouse Station, N. J, 1996, p. 8040.