

Caracterización de la variabilidad de cepas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx *et al.* en la Argentina

Luna, S.G.; A. Albanesi y C.R. López

RESUMEN

La bacteria *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx *et al* causa la enfermedad conocida como loque americana. Esta enfermedad es la más grave de las larvas de abejas (*Apis mellifera* L) y puede ocasionar la muerte de las colonias. El objetivo del presente trabajo fue clasificar las cepas de *P.l. larvae* aisladas de mieles de diferentes procedencias de la Argentina. El análisis factorial y el de agrupamientos permitió distinguir tres grupos de cepas de *P.l. larvae* en Argentina. Su diferenciación no se atribuyó a la procedencia, sino a caracteres morfológicos y bioquímicos diferenciales dentro de la especie.

Palabras clave: *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, loque americana, abejas, miel, sanidad apícola

Luna, S.G.; A. Albanesi y C.R. López 2002. Variability characterization of strains of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx *et al* in Argentina. Agriscientia XIX: 31-36

SUMMARY

The bacteria *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx *et al.* causes the most serious disease of bees known as American foulbrood. The objective of this work was to establish differences among the strains isolated from different Argentinean provenances. The Factorial and Cluster Analysis makes it possible to classify the strains into three groups in Argentina. Differences are not due to the provenance, but to morphological and biochemical characters within the species.

Key Words: *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, American foulbrood, bees, honey.

S.G. Luna y A. Albanesi, Cátedras de Microbiología Agrícola y Ecología, Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Belgrano (S) 1912, 4200. Santiago del Estero, Argentina. E-mail: albanesi@unse.edu.ar C.R. López, Cátedra de Mejoramiento Forestal, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Belgrano (S) 1912, 4200. Santiago del Estero, Argentina. Email: crl@unse.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* (White) Heyndrickx *et al.* (Heyndrickx *et al.*, 1996) es el agente causante de la enfermedad más grave de las larvas de abejas (*Apis mellifera* L), conocida como loque americana (Alippi 1991, 1992b). Produce grandes pérdidas en las colonias y a menudo las llevan a la muerte por debilitamiento. Es muy contagiosa y su diseminación se produce por el transporte de esporas de la bacteria por las abejas, materiales o herramientas apícolas, miel y polen contaminados (Alippi y Nuñez, 1991; Machová, 1993; Alippi, 1995; Alippi, 1996a).

P.l. larvae es una bacteria esporulada que en medio MYPGP forma colonias de color blanquecino o grisáceo, chatas, con superficie rugosa y borde irregular, Gram positivas y catalasa negativas que hidrolizan el almidón, producen diacetilo y reducen el nitrato a nitrito. Algunas cepas producen ácido a partir de manitol y no desarrollan en caldo nutritivo (Haynes, 1972; Lloyd, 1986; Alippi, 1992a; Nordstrom & Fries, 1995). Es un anaerobio facultativo que se desarrolla mejor en presencia de oxígeno (Dingman & Stahly, 1984)

La loque americana fue registrada por primera vez en Argentina en 1989 sobre panales de cría (Alippi, 1991) aunque su incidencia en mieles argentinas había sido citada en Dinamarca (Hansen, 1984). Actualmente, es una enfermedad que se encuentra distribuida en todo el territorio nacional.

Desde la primera detección en la Argentina (Alippi, 1991), la incidencia de la enfermedad aumentó gradualmente en la provincia de Buenos Aires (Del Hoyo *et al.*, 1993), con 59 localidades de 48 municipios afectados (Alippi, 1995).

El objetivo del presente trabajo fue clasificar las cepas de *P.l. larvae*, aisladas de mieles de diferentes procedencias de Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la variabilidad de las cepas

El material estuvo representado por 30 cepas de *P.l. larvae* extraídas de 9 procedencias argentinas tomadas del cepario de la cátedra de Microbiología Agrícola (FAyA-UNSE) y seleccionadas por la mayor concentración de esporas de *P.l. larvae* ml⁻¹ de miel. Se evaluaron las variables morfológicas y bioquímicas:

Variables morfológicas

Se realizaron 20 mediciones del ancho y longitud de las células vegetativas en cada una de las cepas con un microscopio Leicatype 020.518.500 DM/LS III/98 (aumento 400x).

Variables bioquímicas

Se realizaron las pruebas de presencia de catalasa, reducción de nitrato a nitrito, hidrólisis de almidón, producción de diacetilo (reacción de Voges-Proskauer), crecimiento en caldo nutritivo, producción de ácido a partir de manitol (Alippi, 1996b). Se hicieron 3 repeticiones por cepa y por prueba.

Análisis estadístico

Para ordenar y clasificar las muestras según las relaciones existentes entre las variables seleccionadas y las procedencias muestreadas, se aplicó el análisis factorial y el análisis de agrupamientos, seleccionando las variables longitud y ancho de las células vegetativas, crecimiento en caldo nutritivo y uso del manitol, sin estandarizar. No se consideraron en el análisis las variables presencia de catalasa, reducción de nitrato a nitrito, hidrólisis de almidón y producción de diacetilo, por ser redundantes.

Se utilizó el programa estadístico Statistica v. 5.1 (Statsoft Inc. 1995).

Para la variable longitud de las células vegetativas se utilizó el modelo jerárquico anidado $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + e_{ij}$, con $i = 1 \dots 9$; $j = 1 \dots 30$, con efectos aleatorios de procedencia y de cepa, donde Y_{ij} es la media de la variable Y evaluada en la procedencia i , en la cepa j , μ es el promedio general, α_i corresponde a las procedencias de las cepas, β_j es el efecto de la cepa anidada en la procedencia y e_{ij} , es el residuo. Se utilizó la prueba de "F" como prueba de hipótesis de cada fuente de variación. La participación porcentual de las variables clasificatorias sobre la variabilidad de los caracteres estudiados fue calculada a partir de los componentes de variancia estimados por el método de Máxima Verosimilitud Restringida (Reml). Se utilizó el programa estadístico SAS, versión 6.03(SAS Institute Inc.1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la variabilidad de las cepas

Los promedios de las pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas en las 30 cepas analizadas se resumen en la Tabla 1.

Para la tipificación de las cepas se utilizó la extracción inicial de componentes principales de los tres primeros ejes factoriales sin rotación que explican el 87,2% de la inercia de la nube de puntos. Las variables más contributivas a la inercia proyectada a lo largo de los ejes factoriales son: la longitud y el ancho de las células vegetativas en el primero; el uso del manitol en el segundo y el crecimiento en caldo nutritivo en el tercero (Tabla 2), constituyendo los ejes de "tamaño" (primero) y "crecimiento" (segundo y tercero).

El ordenamiento de las cepas en estos ejes factoriales mostró una configuración espacial que permitió clasificar a las cepas en tres posibles grupos (Figura 1).

El análisis de agrupamientos, usando los promedios y la distancia euclidiana, permitió confirmar el ordenamiento y clasificación propuesto por el análisis factorial (Figura 2). Los grupos son:

Grupo I: Incluye a las cepas 3, 4, 5, 7, 8,10,11, 12,13,14,16,17,18, 21,23, 24, 25, 28y 30, las que se caracterizan por que poseen células vegetativas medianas a largas (4,1 a 6,6 μ de longitud) y soportan elevado número de pasajes en caldo nutritivo.

Grupo II: incluye a las cepas 2, 6, 9, 20, 22, 26 y 27, caracterizadas por presentar bacilos cortos a medianos (3,26 a 5,6 μ de longitud) y por soportar

un número reducido de pasajes en caldo nutritivo.

Grupo III: Incluye a las cepas 1, 15, 19, y 29, que se caracterizan por presentar bacilos largos (de 5,7 a 6,7 μ de longitud), y por no tener crecimiento en caldo nutritivo.

Si bien Alippi (1999, comunicación personal) menciona la presencia en Argentina de dos razas de la especie bacteriana *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, el análisis realizado en este trabajo permitió definir la existencia de tres grupos de razas tomando en cuenta las variables consideradas.

Las procedencias se presentaron repartidas entre todos los grupos, aunque hay algunos con mayoría de cepas de algún origen en especial, como el grupo II que contiene a la mayoría de las cepas de Ceres (Santa Fé) y el grupo III que contiene a la mayoría de las cepas provenientes de La Pampa.

La variable longitud de las células vegetativas fue elegida para evidenciar si existían diferencias entre procedencias, por ser la de mayor aporte al componente principal I y la que mejor discrimina los grupos en el análisis de variancia ($p=0,0018$). No se evidenciaron diferencias significativas entre las procedencias de las cepas aisladas.

La estimación de la variancia, calculada por el método Reml, fue de 0 % debida a la procedencia y de 33,5 % debida a la cepa. Ello demuestra que la variabilidad entre razas no debe asignarse al lugar de donde provienen, sino a las variaciones morfológicas y metabólicas de posibles razas, definidas por los tipos bioquímicos encontrados, presentes dentro de la especie *P.I. larvae*.

Se encontraron discrepancias en los resultados obtenidos por diferentes investigadores para la característica bioquímica de producción de ácido a partir de manitol en las mismas cepas de *P.I. larvae* (Gordon *et al.*, 1973; Jelinski, 1985).

Los caracteres variables en cuanto a propiedades bioquímicas pueden resultar importantes para ayudar a distinguir entre distintos tipos bioquímicos de *P.I. larvae* y su aparición relativa en los focos de contagio de la enfermedad. En el caso de nuestro trabajo, se tomaron como caracteres variables la producción de ácido a partir de manitol y al crecimiento en caldo nutritivo.

Se acepta que las cepas de *P.I. larvae* se distribuyen en zonas geográficas delimitadas (Djordjevic *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que en base a los grupos detectados a partir del análisis estadístico se podrían incluir a las cepas en tipos bioquímicos diferentes a pesar de tener la misma procedencia.

Por otra parte, Jelinski (1985) presenta cepas eu-

Tabla 1. Caracterización bioquímica y por tamaño de las cepas estudiadas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx *et al.*

Cepa	Procedencia	Largo	Ancho	Gram	Catalasa	Almidón	Diacetilo	Nitrato	Caldo nutritivo	Manitol
1	Sgo. del Estero	5,70	0,80	+	-	-	-	+	0	7,12
2	Sgo. del Estero	3,26	0,80	+	-	-	-	+	4	7,21
3	Sgo. del Estero	5,55	0,80	+	-	-	-	+	13	6,70
4	Sgo. del Estero	5,25	0,80	+	-	-	-	+	13	7,18
5	Tucumán	5,10	0,80	+	-	-	-	+	13	6,39
6	Rafaela (Sta. Fe)	3,67	1,13	+	-	-	-	+	7	7,32
7	Rafaela (Sta. Fe)	6,12	1,13	+	-	-	-	+	13	7,20
8	Ceres (Sta. Fe)	5,55	0,80	+	-	-	-	+	12	7,01
9	Ceres (Sta. Fe)	4,88	0,80	+	-	-	-	+	6	6,84
10	Ceres (Sta. Fe)	4,76	1,13	+	-	-	-	+	12	7,15
11	Ceres (Sta. Fe)	5,62	1,13	+	-	-	-	+	13	7,11
12	Ceres (Sta. Fe)	5,02	0,80	+	-	-	-	+	12	7,19
13	Ceres (Sta. Fe)	5,14	0,80	+	-	-	-	+	12	7,19
14	Ceres (Sta. Fe)	6,64	1,13	+	-	-	-	+	13	6,96
15	Cruz del Eje (Cba)	6,07	1,13	+	-	-	-	+	0	6,92
16	Cruz del Eje (Cba)	4,65	0,80	+	-	-	-	+	13	7,20
17	Entre Ríos	5,25	1,13	+	-	-	-	+	14	7,20
18	Entre Ríos	4,57	0,80	+	-	-	-	+	10	7,24
19	Entre Ríos	5,89	0,80	+	-	-	-	+	0	7,21
20	La Pampa	3,86	0,80	+	-	-	-	+	6	7,25
21	La Pampa	4,09	0,80	+	-	-	-	+	13	7,21
22	La Pampa	4,65	0,80	+	-	-	-	+	6	7,00
23	La Pampa	5,17	1,13	+	-	-	-	+	13	7,34
24	La Pampa	5,36	0,80	+	-	-	-	+	12	7,20
25	La Pampa	5,21	0,80	+	-	-	-	+	13	6,98
26	La Pampa	5,47	0,80	+	-	-	-	+	7	7,25
27	La Pampa	5,59	0,80	+	-	-	-	+	5	7,26
28	La Pampa	5,70	0,80	+	-	-	-	+	11	7,23
29	La Plata	6,67	1,13	+	-	-	-	+	0	7,12
30	Buenos Aires	4,99	0,80	+	-	-	-	+	13	6,85

Tabla 2. Coeficientes de las variables en los componentes principales y porcentaje de variancia explicada en cada componente principal.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Longitud de las células vegetativas	-0,844	0,236	0,195
Ancho de las células vegetativas	-0,764	-0,301	-0,401
Crecimiento en caldo nutritivo	0,133	0,479	-0,848
Uso del manitol	0,106	0,890	-0,269
Variancia explicada (%)	33,2	29,2	24,8

ropeas y americanas compartiendo el mismo tipo bioquímico. Djordjevic *et al.* (1994), al estudiar similitudes entre cepas a partir de la endonucleasa de restricción del ADN, indicó que las variabilidades encontradas en cinco tipos diferentes de *P.l. larvae* pueden ser reflejo de la diversidad genética presente en las poblaciones naturales de la especie, y que los tipos encontrados mostraban mayores similitudes cuanto más cercanas eran las procedencias geográficas. Estos últimos investigadores trabajaron con cepas de procedencias geográficas tan dispersas como Australia, Nueva Zelandia, Tasmania, México e Islas Fidji, por lo que la escala a la que aplicaron sus resultados abarca una amplitud mucho

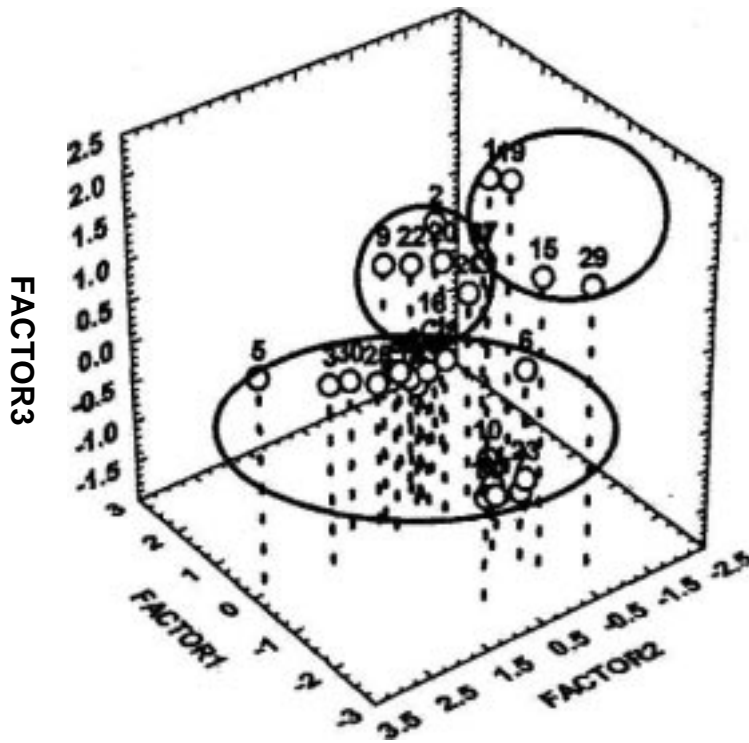


Figura 1. Ordenamiento espacial de las cepas de *P.l. larvae* en los tres primeros ejes factoriales. Los círculos indican el agrupamiento de las cepas. Los números designan a cada cepa según la Tabla 1.

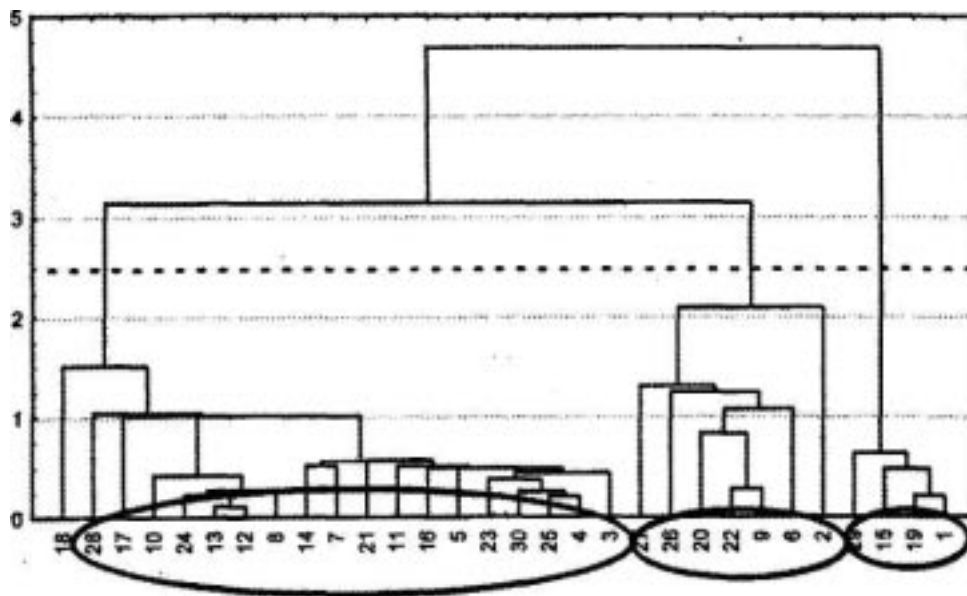


Figura 2. Dendrograma del análisis de conglomerados, mostrando la separación jerárquica en tres grupos por similitud entre las cepas de *P.l. larvae*. Los números designan a cada cepa según la Tabla 1.

mayor a la del presente trabajo, que examinó cepas del centro-norte de Argentina.

El análisis multivariado permitió distinguir tres grupos de *P.l. larvae* y su diferenciación no se atribuyó a la procedencia, sino a caracteres morfológicos y bioquímicos diferenciales dentro de la especie.

A fin de esclarecer la cuestión de la presencia de tipos bioquímicos diferentes en una misma procedencia, sería oportuno realizar en futuras investigaciones una detallada anamnesis de las colmenas que dan origen a las cepas aisladas y complementar los estudios de tipos bioquímicos con otros de caracterización genética (fingerprints de ADN de las cepas aisladas).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. Adriana Alippi por la colaboración prestada para este trabajo

BIBLIOGRAFÍA

- Alippi, A.M., 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research*. 30(2): 75-80.
- Alippi, A.M., 1992a. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of AFB of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Arg. de Microbiología*. 24: 67-72.
- Alippi, A.M., 1992b. Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM*. 8:115-118.
- Alippi, A.M., 1995. Loque americana: Problemática actual en Argentina. *Vida Apícola*. 73:49-53.
- Alippi, A.M., 1996a. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM*. 11 (1995): 343-350.
- Alippi, A.M., 1996b. Curso internacional de post-grado: loque americana de las abejas. Técnicas de laboratorio para la detección de *Paenibacillus larvae* W. Protocolos de técnicas. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.
- Alippi, A.M.; L. Nuñez, 1991. La loque americana en Argentina. *Vida Apícola*. 49: 20-24.
- Del Hoyo, M; M. Basualdo; E. Figini, y C. Carrasco 1993. Ocurrencia de *Paenibacillus larvae* W en colonias de *Apis mellifera*. *Anales de la IX Reunión y Asamblea Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico*.
- Dingman, D.W. and D.P. Stahly, 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(4): 860-869. Citado por Nordstrom, S. and I. Fries 1995. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apicultural Research*. 34(2): 97-103.
- Djordjevic.S.; M. Ho-Shon and M. Horntzky, 1994. DNA restriction endonuclease profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae*. *J. Apic. Research*. 33(2): 95-103.
- Gordon, R.E.; W. C. Haynes and C.H.N. Pang, 1973. The genus *Bacillus*. *Handb. Agric.U.S. Dep. Agric* N° 427.
- Hansen, H., 1984. Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey. *Tidsskr Planteavl*. 88: 325-328.
- Haynes, W., 1972. The Catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *American Bee Journal*. III (4) 130-131.
- Heyndrickx, M.; K. Vandemeulebroecke; B. Hoste; P. Janssen; K. Kersters; P. De Vos; N.A. Logan; N. Ali and R.C.W. Kerkeley 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvificiens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1993, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvificiens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 270-279.
- Jelinski, M., 1985. Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie*. 16(1), 69-76.
- Lloyd, J., 1986. Simplified laboratory diagnosis of American foulbrood disease. *J. Apic. Research*. 25(1): 55-57.
- Machová, M., 1993. Resistance of *Bacillus larvae* in beeswax. *Apidologie*. 24: 25-31.
- SAS Institute Inc., 1988. SAS/STAT User's Guide, release 6.03 edition. Cary, N.C.
- StatSoft Inc., 1995. STATISTICA for Windows (Computer program). Tulsa, OK. StatSoft Inc., Tulsa, OK.