

Extracto de *Melia azedarach* y aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha piperita* y *Lavandula officinalis* como control de *Paenibacillus larvae*

Liesel B. Gende^{1,2,3}, Judith Principal^{4*}, Matías D. Maggi², Sara M. Palacios⁵,
Rosalía Fritz¹ y Martín J. Eguaras^{2,3}

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350. (7600) Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

³ CONICET. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

⁴ Estación de Apicultura, Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. *Correo electrónico: jprincipal@ucla.edu.ve

⁵ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.

RESUMEN

Loque americana es una enfermedad que afecta a larvas y pupas de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) y es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*. La actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de paraíso (*Melia azedarach*) y de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomun zeylanicum*), menta (*Mentha piperita*) y lavanda (*Lavandula officinalis*) fue evaluada contra dicha bacteria. Frutos inmaduros de paraíso triturados fueron tratados mediante extractor Soxhlet, usando etanol como solvente, obteniéndose una solución viscosa, la cual fue diluida posteriormente en agua estéril. Los aceites esenciales fueron extraídos mediante el método de destilación por arrastre con vapor y los destilados fueron conservados a 5°C. La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de dilución seriada, determinándose la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para ello, se utilizaron concentraciones crecientes desde 200 hasta 10.000 ppm para el extracto de paraíso y desde 12,5 hasta 2.000 ppm para los aceites esenciales. Los resultados obtenidos demostraron que el aceite esencial de canela exhibió mayor actividad antimicrobiana contra el patógeno con un valor de CIM entre 25 y 50 µg/mL, mientras que, el extracto de paraíso tuvo la menor actividad antimicrobiana con una CIM de 5.000 µg/mL. Los aceites de menta y lavanda presentaron valores intermedios de concentraciones inhibitorias mínimas. Este trabajo constituye uno de los primeros reportes en donde se investiga el uso comparativo de sustancias naturales como aceites esenciales y extractos vegetales como el de paraíso para el tratamiento de *P. larvae* para ser utilizados como alternativas naturales e inocuas para el tratamiento de colmenas afectadas por Loque Americana.

Palabras clave: *Melia azedarach*, actividad antimicrobiana, *Paenibacillus larvae*, aceites esenciales

Melia azedarach* extract and essential oils of *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha piperita* and *Lavandula officinalis* as a control of *Paenibacillus larvae

ABSTRACT

In honey bees (*Apis mellifera* L.), American foulbrood is caused by the infection of the larvae and pupae with the bacteria *Paenibacillus larvae*. The antimicrobial activities *in vitro* of Chinaberry extract (*Melia azedarach*) and the essential oils of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*), mint (*Mentha piperita*), and lavender (*Lavandula officinalis*) were evaluated against this bacteria. Immature fruits of crushed Chinaberry were treated with ethanol as a solvent with a Soxhlet extractor, being obtained a viscous solution which was posteriorly diluted with sterile

Recibido: 25/10/2007 Aceptado: 16/04/2008

water. The essential oils were extracted using a distillation with steam method and the distilled fluids were preserved at 5°C. The antimicrobial activity was evaluated using the serial dilution methods to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). To do this, it was used increasing concentrations from 200 to 10 000 ppm of Chinaberry extract and from 12.5 to 2 000 ppm of essential oils. The obtained results demonstrated that the essential oil of cinnamon exhibited the greatest antimicrobial activity against the pathogen, with a MIC values from 25 to 50 g/mL, while the Chinaberry extract had low antimicrobial activity with a MIC value of 5 000 g/mL. The essential oils of mint and lavender presented intermediate values of MIC. This work constitutes one of the first reports where the comparative use of natural substances is investigated as essential oils and vegetable extracts as Chinaberry for the treatment of *P. larvae* to be used as natural and innocuous alternative for the treatment of American foulbrood in affected beehives.

Keywords: *Melia azedarach*, antimicrobial activity, *Paenibacillus larvae*, essential oils.

INTRODUCCIÓN

La loque americana es una enfermedad bacteriana que afecta a las abejas (*Apis mellifera* L.), cuyo agente causal es *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006), una bacteria capaz de formar endosporas muy resistentes. Este patógeno afecta a la cría y a nivel de larva individual la infección es fatal, mientras que las abejas adultas no son susceptibles a la enfermedad. Es una de las patologías más graves que afecta a las colonias de abejas produciendo severos daños y en consecuencia, grandes pérdidas económicas en el sector apícola a escala mundial (Shimanuki, 1997). Estos daños económicos pueden evaluarse tanto por la cantidad de colonias con abejas muertas, como por el trabajo adicional que la presencia de la enfermedad produce al apicultor, así como por los costos de las campañas sanitarias que se establecen para mantener una prevalencia aceptable de la patología. Para cada país y para cada período de tiempo esos montos pueden variar, siendo dificultoso realizar un cálculo económico estimativo.

La mayoría de los tratamientos empleados para la prevención y el control de esta enfermedad radica fundamentalmente en el uso de antibióticos de amplio espectro, los cuales en la mayoría de los casos han sido aplicados por los productores en forma continua y desmedida, incrementando el riesgo de aparición de cepas resistentes (Miyagi *et al.*, 2000), y generando residuos en la miel y otros productos y sub-productos de la colmena, lo cual afecta la calidad y la comercialización de los mismos (Bogdanov, 2006).

Los pesticidas naturales representan un método alternativo para repeler insectos, proteger los cultivos y controlar diferentes plagas, utilizados de un modo u otro para proteger los alimentos. En este sentido,

el control de parásitos y patógenos de las abejas melíferas con sustancias naturales es de fundamental importancia, ya que la miel es el principal producto de la colmena y debería ser natural y libre de cualquier contaminante (Eguaras *et al.*, 2005). Los aceites esenciales y compuestos naturales exhiben comparativamente baja toxicidad, tanto en mamíferos como en las abejas, poseen menos efectos nocivos al medio ambiente y reciben gran aceptación por parte del público (Isman, 2001). Por este motivo, los productos botánicos para el manejo de plagas tienen gran importancia en la actualidad. Así, del árbol de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) se extraen diversos compuestos secundarios, siendo la azadiractina el de mayor importancia, actuando como repelente, antialimentario y retardando el crecimiento de los insectos (Mordue y Blackwell, 1993). Las sustancias contenidas en el nim han sido utilizadas para el control del ácaro *Varroa destructor*, no observándose mortalidad tanto en el ácaro como en abejas en las pruebas de toxicidad aguda, mientras que el extracto crudo presentó repelencia frente a varroa (González-Gómez *et al.*, 2006). Diversas investigaciones se han realizado recientemente (Bailac *et al.*, 2006; Fuselli *et al.*, 2006a; Gende *et al.*, 2008), orientadas a prevenir y controlar patógenos como *P. larvae* y *Ascosphaera apis* en colonias de abejas, abocadas a reducir el uso de compuestos químicos que aparte de ser ineficientes, contaminan los productos generados en la colmena como la miel, la cera, la jalea real, el polen y el propóleos.

Los aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas como tomillo (*Thymus vulgaris*), pasto limón (*Cymbopogon citratus*), orégano (*Origanum vulgare* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), albahaca (*Ocimum*

basilicum L.), entre otros (Alippi *et al.*, 1996; Albo *et al.*, 2001, 2003), juegan un rol relevante para el control del agente etiológico de la loque americana, arrojando resultados satisfactorios, tendientes a reducir los niveles de resistencia de la bacteria en la colonia de abejas. Es por ello que la incorporación de productos naturales alternativos, a través de un programa de manejo integrado conjuntamente al uso de sustancias químicas, podría contribuir a disminuir la contaminación de los productos de la colmena. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de paraíso (*Melia azedarach*) y de los aceites esenciales derivados de canela (*C. zeylanicum*), menta (*M. piperita*) y lavanda (*L. officinalis*) contra *Paenibacillus larvae*, patógeno causante de la loque americana en *Apis mellifera* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas bacterianas de *P. larvae* fueron aisladas de cuadros de cría de *Apis mellifera* con síntomas clínicos de loque americana correspondientes a tres localidades de la provincia de Buenos Aires, Argentina: La Plata (34°55'S y 57°57'O), Cobo (37°48'S y 57°38'O) y Sierra de los Padres (37°0'S y 57°0'O). Los aislamientos fueron realizados en agar MYPGP (Mueller Hinton, extracto de levadura-glucosa-piruvato de sodio-fosfato ácido de potasio) y para inhibir el crecimiento de *P. alvei* el medio fue suplementado con 9 µg/mL de ácido nalidíxico. Las placas se incubaron en microerofilia (5-10% de CO₂). Estas cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas según Gordon *et al.* (1973) y Alippi (1991, 1992), a través del uso de API kits (Api System, BioMérieux S.A., Marcy l'Étoile, FR), así como por PCR de un fragmento de 700 pb del gen que codifica para el ARNr 16S del bacilo. Se conservaron en agar MYPGP y se almacenaron con glicerol al 20% v/v hasta su utilización en el ensayo.

Preparación del inóculo del microorganismo

Las células vegetativas de *P. larvae* previamente cultivadas en agar MYPGP durante 48 h a 35°C ± 0,5 fueron suspendidas en agua bidestilada estéril, ajustando la concentración hasta una escala 0,5 de Mac Farland (10⁷-10⁸ cel/mL) (FDA, 1998).

Pruebas de inhibición por dilución en caldo

Diluciones seriadas del extracto de paraíso y de los aceites esenciales fueron realizadas en

caldo MYT (Mueller-Hinton-extracto de levadura-tiamina) desde 200 a 10.000 ppm y 12,5 a 2.000 ppm, respectivamente. Posteriormente, la suspensión bacteriana estandarizada fue agregada e incubada a 35°C ± 0,5, durante 48 h. Todos los tubos fueron examinados a fin de determinar la menor concentración del agente antimicrobiano, que produjo inhibición del crecimiento microbiano, detectada por la falta de turbidez considerada como concentración inhibitoria mínima (CIM) (Lennette *et al.*, 1987).

Pruebas de inhibición en placa

La prueba de inhibición en placa fue realizada para confirmar los datos obtenidos mediante dilución seriada en tubo para el caso del extracto de paraíso debido a que los tubos de mayor concentración mostraban turbidez propia del extracto, aún en ausencia de suspensión bacteriana no permitiendo determinar con nitidez la CIM. Cada cepa bacteriana fue sembrada sobre la superficie del medio de cultivo (sólido y con el extracto de paraíso incorporado en concentraciones desde 1.250 a 10.000 ppm), las placas fueron incubadas en posición invertida a 35°C ± 0,5. Después de 48 h de incubación se observó ausencia o presencia del crecimiento microbiano mediante el desarrollo de colonias en placa.

Pruebas de inhibición para los controles

En el ensayo se realizaron controles positivos y negativos del caldo MYT, del agar MYPGP y del emulsionante. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada cepa y para cada tratamiento.

Los datos colectados de la CIM fueron analizados estadísticamente usando el PROC GENMOD (SAS, 2000), a fin de determinar las diferencias en las proporciones de inhibición entre los aceites.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos autores (Alonso, 1998; Wagner *et al.*, 1996) han demostrado que los aceites esenciales están constituidos principalmente por compuestos terpenicos y fenólicos, siendo estos últimos los responsables de las propiedades antimicrobianas (Sari *et al.*, 2006) por su capacidad de afectar la permeabilidad de la membrana bacteriana, la cual restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de su cobertura lipopolisacárida. Por tal motivo, la elección de los aceites esenciales utilizados en esta investigación y

su posterior comparación con el extracto de paraíso estuvo basada en la composición química de los mismos, de modo de abarcar aquellos constituidos mayoritariamente por compuestos terpénicos como la menta y la lavanda (Alippi *et al.*, 1996, Alonso, 1998) y compararlo con un aceite con alto porcentaje de compuestos con núcleo bencénico, como es el caso de la canela (Floris *et al.*, 1996).

El análisis fitoquímico del extracto etanólico de paraíso utilizado en este trabajo reveló ausencia de alcaloides, pero si se observaron flavonoides, lignanos y triterpenos. En su composición están presentes vainillin, 4-hidroxi-3-metoxicinanaldehído, (\pm)-pinosresinol, escopoletina y meliartenina, siendo este último el más efectivo contra los insectos (Carpinella *et al.*, 2002, 2003, 2005). Por su parte, el análisis cromatográfico de los ácidos grasos de la fracción menos polar del extracto mostró que los compuestos mayoritarios fueron los ácidos linoléico y oléico, mientras que en las fracciones volátiles del mismo los componentes principales fueron éter etil butírico, 1,1 dietoxibutano, vainillina y espathulenol (Carpinella *et al.*, 1999).

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos con relación a la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paraíso y de los aceites esenciales de canela, lavanda y menta frente a tres cepas de *P. larvae*, donde se observo que el aceite de canela exhibió la mayor actividad antimicrobiana contra la bacteria *P. larvae*, con valores entre 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, observándose la menor actividad antimicrobiana con el extracto etanólico de paraíso.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Fuselli *et al.* (2006b) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana individual de los aceites esenciales de canela y tomillo y el principal componente de esta última especie, el timol, así como el efecto sinérgico de la mezcla, frente a la bacteria *P. larvae*, reportando valores de CIM para canela, tomillo (*T. vulgaris*) y timol de 75, 216 y 133,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mientras que para la mezcla se obtuvo una CIM promedio de 67,5 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando un efecto sinérgico de la misma. En esta misma vertiente, Alippi *et al.* (1996) y Albo *et al.* (2003) evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales con relación a este microorganismo, reportando valores entre 50 y 100 ppm para el aceite de pasto limón (*Cymbopogon citratus*), mientras que la actividad inhibitoria observada para el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) fue superior a las 700 ppm, demostrando que aceites esenciales con diferente composición química varían en relación a su grado de inhibición (Gende *et al.*, 2006). En este estudio, los aceites constituidos principalmente por compuestos terpénicos exhibieron una menor actividad antimicrobiana en relación a aquellos que tienen alto porcentaje en compuestos fenólicos. De igual manera, los aceites esenciales presentaron valores más bajos de concentración inhibitoria mínima comparados con el extracto de Paraíso.

Los extractos alcohólicos impiden la disolución de sustancias gomosas y pépticas y al mismo tiempo facilitan la disolución de alcaloides y esencias (Alonso, 1998), lo que podría explicar la baja acción antimicrobiana de los extractos con relación a los aceites esenciales, adicionalmente a la volatilidad

Cuadro 1. Concentración inhibitoria mínima de aceites esenciales de canela, lavanda, menta piperita y del extracto etanólico de paraíso contra tres cepas de *Paenibacillus larvae*

Especies vegetales	Cepas		
	Mar del Plata	Cobo	Sierra de los Padres
	----- $\mu\text{g/mL}$ -----		
Canela (<i>C. zeylanicum</i>)	38a†	50b	38a
Lavanda (<i>L. officinalis</i>)	374ab	400b	350ab
Menta piperita (<i>M. piperita</i>)	650b	650b	700b
Extracto de paraíso (<i>M. azederach</i>)	5.000a	5.000a	5.000a

† No se observaron diferencias significativas ($P > 0,5763$) en las proporciones de inhibición entre las tres cepas para un mismo aceite o extracto. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,001$) de promedios entre aceites o extracto para una misma cepa.

de éstos últimos (Inouye *et al.*, 2006). Por su parte, Nanasombat y Lohasupthawee (2005) en estudios realizados con extractos vegetales y aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas determinaron que, en general, la actividad inhibitoria de los aceites fue superior a la de los respectivos extractos etanólicos. Este trabajo constituye el primer reporte en este país relacionado con el uso comparativo de aceites esenciales y extracto etanólico de paraíso para controlar la bacteria *P. larvae*.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el aceite de canela exhibió mayor actividad antimicrobiana frente a la bacteria *P. larvae*, con un valor de CIM entre 25 y 50 µg/mL, mientras que el extracto etanólico de paraíso (*M. azedarach*) demostró tener menor actividad antimicrobiana, con un valor de CIM de 5.000 µg/m. Los aceites de menta (*M. piperita*) y lavanda (*L. officinalis*) presentaron valores intermedios de concentraciones inhibitorias mínimas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su profunda gratitud a las Lic. Claudia Faverin y Adriana Cano por la realización de los análisis estadísticos. Un especial agradecimiento a SECYT-MEC por el financiamiento otorgado y al Instituto Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, por la realización de los análisis mediante PCR para la identificación genotípica de los aislamientos usados en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Albo G.N., E. Cerimele, M.S. Re, M. De Giusti y A. Alippi. 2001. Ensayos de campo para evaluar la efectividad de algunos aceites esenciales. *Vida Apícola*, 108: 41-46.
- Albo G., C. Henning, J. Ringuelet, F. Reynaldi, M. Giust y A. Alippi. 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*, 34: 417-437.
- Aldicara J.R. 1976. Essential oils. *En McKetta J.J. y W.A. Cunningham (Eds). Encyclopedia of Chemical Processing and Design.* Marcel Dekker, NY. pp. 262-275.
- Alippi A.M. 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera* in Argentina. *J. Apic. Res.*, 30: 75-80.
- Alippi A.M. 1992. Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM*, 8: 115-118.
- Alippi A.M, J.A. Ringuelet, E.L. Cerimele, M.S. Re y C.P. Henning. 1996. Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. *J. Herb. Spices Med. Plants*, 4: 9-16.
- Alonso J. 1998. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. ISIS Ediciones. Buenos Aires, Argentina.
- Bailac P.N., L.B. Gende, A. Gascón, R. Fritz, M.I. Ponzi y M. Eguaras. 2006. Control of *Ascosphaera apis* and *Paenibacillus larvae* by the use of essential oils for obtaining beehive products without toxic residues. *Mol. Med. Chem.*, 11: 1-2.
- Bogdanov S. 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37: 1-18.
- Carpinella M.C., G.W. Herrero, R.A. Alonso y S.M. Palacios. 1999. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extracts. *Fitoterapia*, 70: 296-298.
- Carpinella M.C, C. Ferrayoli, G. Valladares, M. Defago y S.M. Palacios. 2002. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Bio. Biotech. Biochem.*, 66: 1731-1736.
- Carpinella M.C., L.M. Giorda y S.M. Palacios. 2003. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2506-2511.
- Carpinella M.C., C.G. Ferrayoli y S.M. Palacios. 2005. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 2922-2927.
- Eguaras M., S. Fuselli, L. Gende, R. Fritz, S. Ruffinengo, G. Clemente, A. Gonzalez, P. Bailac y M. Ponzi. 2005. An in vitro evaluation

- of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J. Essent. Oil Res.*, 17: 336-340.
- Floris I., C. Carta, y M.D. Moretti. 1996. Activites in vitro de plusieurs huiles essentielles sur *Bacillus larvae* White et essai au rucher. *Apidologie*, 27(2): 111-119.
- Fuselli S.R., S.B. Garcia de la Rosa, L.B. Gende, M.J. Eguaras y R. Fritz. 2006a. Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood. *J. Apicu. Res. Bee World*, 45(1): 2-7.
- Fuselli S.R. S.B. García de la Rosa, L.B. Gende, M.J. Eguaras y R. Fritz. 2006b. Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. *Rev. Arg. Microbiol.*, 38: 89-92.
- FDA (Food and Drug Administration). 1998. *Bacteriological Analytical Manual*. 8^{va} ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Gende L.B., R. Fritz y M.J. Eguaras. 2006. Principales componentes del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) con actividad antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Proc. X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 1er Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina. Vol. 1. Tomo V. pp. 1699-1705.*
- Gende L.B., I. Floris, R. Fritz y M.J. Eguaras. 2008. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. *Bull. Insectology*, 61(1). (En prensa).
- Genersch E., E. Forsgren, J. Pentikainen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski e I. Fries. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 501-511.
- González-Gómez R., G. Otero-Colina, A. Villanueva-Jiménez, J.A. Pérez-Amaro y R.M. Soto-Hernández. 2006. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Agrociencia*, 40: 741-751.
- Gordon R.E., W.C. Haynes y H.N. Pang. 1973. The genus *Bacillus*. *Agricultural Handbook No. 427*, USDA, Agricultural Research Service, Washington, DC.
- Inouye S., K. Uchida, N. Maruyama, H. Yamaguchi y A. Abe. 2006. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Japan J. Med. Mycol.*, 47: 91-98.
- Isman M. 2001. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.*, 19: 603-608.
- Lennette S., R. Balows, L. Hansler y E. Shadony. 1987. *Manual de Microbiología Clínica*. 4^{ta} ed, Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Miyagi T., C.Y. Peng, R.Y. Chuang, E.C. Mussen, M.S. Spivak y R.H. Doi. 2000. Verification of oxytetracycline-resistant American Foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invert. Pathol.*, 75: 95-96.
- Mordue A. J. y A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.*, 39: 903-924.
- Nanasombat S. y P. Lohasupthawee. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. *KMITL Sci. Tech. J.* 5(3): 462-469.
- Sari M., D.M. Biondi, K. Mohamed, G. Mandalari, M. D'Arrigo, G. Bisignano, A. Saija, C. Daquino y G. Ruberto. 2006. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum*. *Desf. Flavour Fragr. J.*, 21: 890-898.
- SAS. 2000. *SAS User's guide. Version 8.2*, SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Shimanuki H. 1997. *Bacteria. En Morse R.A. y K. Flottum (Eds). Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. 3^{ra} ed. A.I. Root Company, Medina, OH. pp 351-362.*
- Wagner H., S. Bladt y E. M. Zgainski. 1996. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography. Atlas 2^a ed.*