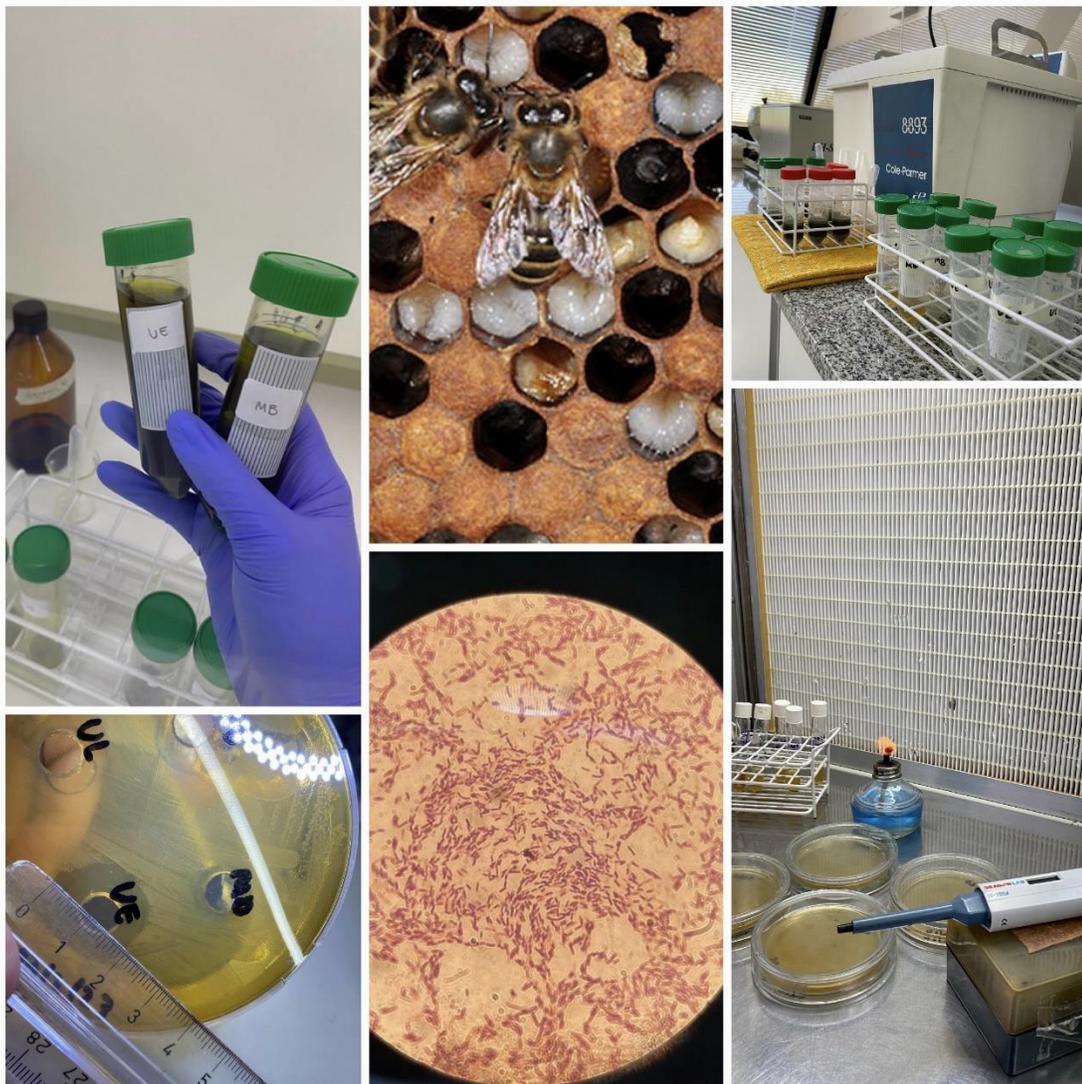




SANIDAD APÍCOLA: EXTRACTOS ALGALES COMO ALTERNATIVA NATURAL PARA EL CONTROL DE LOQUE AMERICANA



Alumna: María Federica Faure

Directora: Dra. Leticia A. Fernández

TESIS DE GRADO DE LA LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



Sanidad apícola: extractos algales como alternativa natural para el control de loque americana

Tesis presentada como requisito para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Bahía Blanca, Argentina

2024

Alumna: María Federica Faure

Directora: Leticia A. Fernández



Firma del Alumno/a

LETICIA A. FERNANDEZ
Docente - Investigadora
UNS - CONICET

Firma del Director/a

AGRADECIMIENTOS

Cuando se siente la satisfacción de haber logrado un propósito, solo queda agradecer.

A Irene Cibanal, por recomendarme ante mi directora de tesis para llevar adelante este proyecto. Su voto de confianza me dio la posibilidad de desarrollar esta temática tan interesante, que resultó en una experiencia muy enriquecedora.

A mi directora, Leticia A. Fernández, por confiar en mí y darme un lugar en su equipo de trabajo. Gracias Leti por ser mi guía y dedicar tu tiempo a mi formación como profesional, aportando para ello no sólo tus conocimientos y experiencia, sino también tu calidad humana.

A mi profesora consejera, Natalia Stefanazzi, por su comprensión y estar siempre que lo necesité.

A Liliana M. Gallez, directora del Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA), gracias por permitirme trabajar allí.

A Carolina Fernández, quien me abrió las puertas de su laboratorio para la elaboración de los extractos algales y fue parte de las determinaciones químicas de los mismos.

A Alejandro Loydi, por su asesoramiento en el análisis estadístico de los datos.

A mis compañeros del LabEA, Soledad C. Villamil, M. Agustina Rodríguez, Luciano Marinozzi y Matías F. Ledesma, que desde el primer día en el laboratorio me hicieron sentir parte y estuvieron siempre dispuestos ante cualquier consulta.

A Juan M. Rodrigo, por ofrecer una lectura atenta del escrito y brindarme su punto de vista.

Al jurado, por tomarse el tiempo para evaluar mi trabajo.

A mi familia, a mis angelitos protectores y especialmente a mi mamá, por ser presencia y apoyo incondicional. Gracias por recordarme mi norte cuando me encontré perdida, tus palabras amorosas me trajeron donde estoy hoy.

A mi gato, Indi “el biólogo”, que me acompaña desde el inicio de la carrera y es mi motorcito de amor en todos los días de estudio compartidos.

A mis amigos y compañeros que me dio la Universidad Nacional del Sur, importantes lazos de mi camino.

Recibo este nuevo ciclo esperanzada por las puertas que se abren, abrazando lo que soy en el presente y confiando en el proceso. Siempre agradecida y orgullosa de pertenecer a esta casa de estudios de excelencia, pública y gratuita, donde tuve la valiosa oportunidad de formarme.

Gracias, gracias, gracias vida maga. El mejor momento es el Ahora.

“... y que lo más preciado es amar, y el resto... llega” ♥

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. <i>Apis mellifera</i> : biología, estructura y organización poblacional	2
1.2. Loque americana: agente causal	2
1.2.1. Transmisión y multiplicación en la colmena	3
1.3. Antecedentes de control de la enfermedad y búsqueda de alternativas naturales.....	4
1.4. Macroalgas marinas	4
1.4.1. Algas pardas: <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Undaria pinnatifida</i>	5
1.5. Técnicas para evaluar la actividad antibacteriana	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Lugar de trabajo	8
3.2. Cepas bacterianas	8
3.3. Material algal	9
3.3.1. Caracterización química de las algas	9
3.3.2. Elaboración de los extractos algales	9
3.4. Actividad antibacteriana de los extractos de <i>M. pyrifera</i> y <i>U. pinnatifida</i> por técnicas cualitativas.....	11
3.4.1. Difusión en disco	11
3.4.2. Difusión en pozo.....	11
3.5. Actividad antibacteriana de los extractos de <i>M. pyrifera</i> y <i>U. pinnatifida</i> por la técnica cuantitativa de dilución en agar	12
3.6. Análisis de los datos	12
4. RESULTADOS	13
4.1. Caracterización química del material algal y de sus extractos.....	13
4.2. Actividad antibacteriana de los extractos de <i>M. pyrifera</i> y <i>U. pinnatifida</i> por técnicas cualitativas.....	14
4.2.1. Difusión en disco	14
4.2.2. Difusión en pozo.....	16
4.3. Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>M. pyrifera</i> y <i>U. pinnatifida</i> por la técnica cuantitativa de concentración inhibitoria mínima (CIM)	18
5. DISCUSIÓN	22
5.1. Caracterización química del material algal.....	22

5.2. Actividad antibacteriana de los extractos de <i>M. pyrifera</i> y <i>U. pinnatifida</i> por técnicas cualitativas.....	23
5.3. Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>M. pyrifera</i> y <i>U. pinnatifida</i> por la técnica cuantitativa de concentración inhibitoria mínima.....	25
5.4. Consideraciones finales	25
6. CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN

La loque americana o enfermedad de larvas de abeja es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* y fue detectada por primera vez en Argentina en el año 1989. Son muy pocos los países en el mundo reconocidos libres de esta enfermedad y escasas las herramientas para su manejo efectivo. Los desarrollos de nuevas estrategias de control son sumamente necesarios para el avance de una apicultura sustentable. En este marco, el objetivo general de la presente tesis de grado fue evaluar y comparar *in vitro* la actividad antibacteriana de extractos acuosos y metanólicos de dos especies de macroalgas pardas (*Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*), en sus porciones basal-distal (MB-MD) y lámina-esporofilo (UL-UE), respectivamente, contra siete cepas de la bacteria causante de loque. Además, se caracterizó el material algal seco por medio de la cuantificación de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Los resultados de las determinaciones químicas mostraron mayor porcentaje de proteínas en UL, y mayor porcentaje de lípidos y carbohidratos en UE. Los dos métodos cualitativos utilizados para estudiar la actividad antibacteriana de los extractos, difusión en disco y pozo en agar, mostraron que los extractos acuosos no presentaban actividad antibacteriana. En cuanto a los extractos metanólicos, se obtuvo mayor diámetro en los halos de inhibición de MB y de UE utilizando la técnica de agar pozo. Se realizaron ensayos cuantitativos con los extractos metanólicos doble concentración (2X) de MB y UE, a fin de determinar su concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a dos de las cepas bacterianas que resultaron más susceptibles (CMM(B)35 y MAR1) en los ensayos cualitativos. Se trabajó con diluciones dobles en un rango de concentración de 1,16 a 18,6 µg/mL para MB y de 1,52 a 24,4 µg/mL para UE. Este último extracto presentó la CIM más baja frente a la cepa CMM(B)35, con un valor de 12,2 µg/mL, y duplicó este valor frente a la cepa MAR1. MB también demostró tener buena actividad frente a las mismas cepas, con valores de CIM de 18,6 µg/mL para ambas. Por último, se registró crecimiento de *P. larvae* en todas las placas control con metanol 80% en el medio de cultivo, descartando así el efecto antibacteriano del solvente de extracción. Estos resultados demostraron que el extracto metanólico UE presentó actividad antibacteriana más potente frente a *P. larvae*, constituyendo así una alternativa natural eficaz para el tratamiento de loque americana.

Palabras clave: *Paenibacillus larvae*, *Apis mellifera*, loque americana, extractos algales, actividad antibacteriana, CIM.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Apis mellifera*: biología, estructura y organización poblacional

La abeja europea (*Apis mellifera*, Linneaus 1758), también conocida como abeja doméstica o abeja melífera, es la especie de abeja con mayor distribución en el mundo, crucial en el mantenimiento de la biodiversidad al polinizar numerosas especies de plantas (Crane, 1990). El ciclo de vida es holometábolo, es decir, existen cuatro etapas de desarrollo diferentes: huevo, larva, pupa y adulto. La larva es el estadio de crecimiento, mientras que la pupa es el estadio de diferenciación y formación de las estructuras de los adultos. Una colonia de abejas está compuesta por tres clases de individuos: la reina (única hembra diploide fértil, ovopositora), millares de obreras (hembras diploides infértiles, que desempeñan diversas funciones en pos del mantenimiento de la colonia) y decenas de zánganos (machos haploides, cuya función es fecundar a las reinas en los vuelos nupciales). Además de las abejas adultas, normalmente cada colonia tiene abejas en diferentes estados de desarrollo: huevos, larvas, pupas, que colectivamente se designan como cría (von Frisch, 1999).

1.2. Loque americana: agente causal

Las colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) son amenazadas por numerosos patógenos que incluyen virus, hongos, bacterias y protozoos. Una de las patologías más graves que afecta a las crías de abejas es la loque americana (American Foulbrood). Dicha enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, sobre todo en regiones templadas y subtropicales produciendo severos daños y, en consecuencia, grandes pérdidas económicas en el sector apícola (Crane, 1990). Los brotes de la enfermedad pueden presentarse en cualquier época del año en que existan crías en las colmenas, pero es más frecuente durante las lluvias. Es una enfermedad endémica que no supone amenaza para la salud humana. Generalmente se encuentra presente en las colmenas, pudiendo permanecer por varios años sin manifestar síntomas (de la Sota & Bacci, 2005).

El agente causal es *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Se trata de un bacilo aerobio Gram positivo que presenta dos formas de vida: una vegetativa (de crecimiento y multiplicación) y otra esporular (de resistencia), ambas microscópicas. La forma vegetativa de la bacteria posee flagelos peritricos que le permiten moverse en el cuerpo infectado de la larva. También produce exotoxinas que se cree son las responsables de la muerte de las crías infectadas (Genersch, 2010). La formación de esporas elipsoidales (centrales o terminales) ocurre fuera del cuerpo de la larva en presencia de oxígeno. Estas pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo (35 años o más) y sobrevivir a condiciones adversas tales como desecación, altas temperaturas y la acción de ciertos desinfectantes químicos (de la Sota & Bacci, 2005).

P. larvae puede ser cultivado y estudiado bajo condiciones *in vitro*. Al tratarse de un agente patógeno altamente especializado de la larva de abeja, las esporas solo pueden germinar y desarrollar formas vegetativas mediante el empleo de medios de cultivo sólidos o líquidos muy ricos en elementos nutritivos. El medio de cultivo MYPGP debe su nombre a la abreviatura inglesa que refiere a sus constituyentes: caldo Mueller-Hinton, extracto de levadura, fosfato potásico, glucosa y piruvato de sodio (Reynaldi & Alippi, 2006). En el agar MYPGP, las colonias de *P. larvae* son pequeñas, regulares, casi siempre rugosas, planas o elevadas y de un color entre blanquecino y beige. Entre las pruebas bioquímicas, es importante la prueba de catalasa para una diferenciación preliminar rápida de *P. larvae* de otras especies de *Bacillus* presentes en la colmena. Los bacilos formadores de esporas que pueden estar presentes en la colmena son catalasa positivo, en tanto el agente causal de loque americana es el único bacilo catalasa negativo (OIE, 2018).

1.2.1. Transmisión y multiplicación en la colmena

Las esporas de *P. larvae* ingresan en la colmena por medio de abejas obreras: pecoreadoras que las transportan en sus buches melarios y pilladoras desde colmenas infectadas. También pueden ingresar a través de herramientas del apicultor o por la introducción de panales infectados, alimentación con miel contaminada y cualquier intercambio de material proveniente de colmenas enfermas. Una vez dentro de la colmena, las esporas son llevadas a la cría por medio de las abejas nodrizas que las depositan junto con el alimento (miel, polen y jalea real) en las celdillas (de la Sota & Bacci, 2005). De esta forma, las larvas adquieren la infección al ingerir las esporas con el alimento contaminado. Éstas germinan un día después y la forma vegetativa de *P. larvae* se reproduce en el intestino de la larva debido al pH y tenor de oxígeno adecuados, pasando luego a la hemolinfa y a diferentes tejidos del cuerpo. Allí continúa su reproducción y se generan millones de células patógenas que liberan proteasas matando a la larva pocos días después, generalmente cuando ésta ha iniciado su etapa de pupa (cría operculada), aunque en algunos casos muere aun siendo larva. A partir de su muerte, la cría comienza a cambiar su coloración a negro parduzco y desecarse paulatinamente, hasta que en aproximadamente 30 días toma aspecto de una costra o “escama” adherida a la pared inferior de la celdilla (Crane, 1990). La misma es de difícil extracción, tanto para las abejas como para el apicultor, de modo que al intentar extraerla generalmente se suele romper. Esta “escama” es un cultivo puro de billones de esporas y constituye la principal fuente de infección (Genersch, 2010).

La susceptibilidad de las larvas a la loque americana disminuye cuando aumenta la edad: larvas de menos de 24 horas solo necesitan seis esporas para infectarse, mientras que una larva de tres días necesita ingerir millones de esporas para ser infectada; pasado este período difícilmente se infecten (de la Sota & Bacci, 2005). Cuando la infección es severa, la población de obreras de la colonia disminuye drásticamente, llegando incluso a la pérdida total de la colonia. Es importante mencionar que esta enfermedad es altamente contagiosa, debido a la gran resistencia que tienen las esporas (Martínez-Pérez de Ayala *et al.*, 2017).

1.3. Antecedentes de control de la enfermedad y búsqueda de alternativas naturales

Una vez que se ha detectado loque americana en una región, es muy difícil erradicarla por completo. No obstante, es posible controlarla, por lo que resulta prioritario evitar su diseminación. El control de la enfermedad se realiza con técnicas preventivas de manejo, como por ejemplo, la quema de cuadros infectados, que es el método más antiguo y efectivo. También existe tratamiento quimioterápico como el empleo de antibióticos, siendo en nuestro país los productos más utilizados la tilosina, el sulfatiazol sódico o el clorhidrato de oxitetraciclina. El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) prohibió la utilización de este último desde el 2016, por ser peligroso para el ambiente, la salud humana y animal (Arribillaga, 2021). Sin embargo, su uso indiscriminado y los tratamientos incompletos provocaron la aparición de cepas bacterianas resistentes. Entre otros efectos negativos, cabe mencionar que los antibióticos sintéticos actúan solamente sobre la parte vegetativa de la bacteria, y pueden dejar residuos en la miel y otros productos de la colmena (Eguaras *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006; González, 2011).

En este contexto, se han comenzado a estudiar nuevas estrategias de control de patógenos microbianos. La utilización de alternativas naturales de control de loque americana resulta necesaria para el desarrollo de una apicultura sustentable. Algunas de ellas incluyen la aplicación de aceites esenciales (Gende *et al.*, 2008 y 2014), extractos de plantas (Flesar *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2014), así como extractos de propóleos (Bastos *et al.*, 2008) y control biológico a través de bacterias antagónicas (González, 2011; Alonso-Salces *et al.*, 2017). Generalmente, los compuestos producidos de forma natural, si se comparan con los antibióticos, tienen un mejor potencial, menos efectos secundarios y una toxicidad mínima (Saeed *et al.*, 2020).

Existe evidencia sobre el uso de extractos de microalgas como *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890), con efecto antimicrobiano significativo contra las células vegetativas y las esporas de siete cepas de *P. larvae*: CCM 4483, CCM 4484, CCM 4485, CCM 4486, CCM 4487, CCM 4488 y CCM 5680, obtenidas de una colección de la República Checa. Las microalgas representan una rica fuente natural de compuestos biológicamente activos que pueden mostrar actividad antiviral, antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante. Esto las posiciona como un suplemento alimenticio y profiláctico interesante para las abejas (Dostálsková *et al.*, 2021). Sin embargo, no se registra información relacionada a la aplicación de extractos de macroalgas para combatir el agente causal de loque americana.

1.4. Macroalgas marinas

Las macroalgas son organismos eucariotas pluricelulares fotosintéticos que se desarrollan en multitud de hábitats, distribuyéndose a nivel mundial en todas las zonas climáticas, desde las aguas cálidas tropicales hasta las regiones polares heladas (Lee, 1980).

En cuanto a su morfología, el cuerpo vegetativo (en el que no se diferencian raíz, tallo u hojas) se denomina talo. El mismo se adhiere al sustrato a través de distintas estructuras: rizoides, un pequeño disco

basal o un conjunto de prolongaciones cilíndricas, bifurcadas y entrelazadas que forman un pequeño grampón. Algunas especies de macroalgas necesitan un determinado sustrato, mientras que otras no presentan preferencias. La mayoría de las especies crecen sobre fondos duros, sólidos, y/o sobre piedras o rocas (Mendoza, 1999).

Debido a las condiciones extremas del ambiente al que están expuestas, las algas marinas han desarrollado distintas estrategias de defensa que incluyen compuestos químicos estructuralmente diversos y complejos, sintetizados a partir de diferentes rutas metabólicas (Sánchez González, 2020). Estos compuestos incluyen enzimas protectoras y moléculas antioxidantes (alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, florotaninos, terpenoides, pigmentos, glucósidos y esteroides) que poseen potentes propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antivirales, antifúngicas y anticancerígenas (Lezcano *et al.*, 2018; Haq *et al.*, 2019).

Es importante tener en cuenta que factores bióticos, como el estado reproductivo y la edad del talo, y factores abióticos, como la estacionalidad y la ubicación geográfica, tienen influencia en la bioactividad de los extractos de macroalgas. Además, existen discrepancias relacionadas a los procedimientos de extracción y los microorganismos diana utilizados en los bioensayos (Goecke *et al.*, 2012). Debido a las diferentes naturalezas químicas de los posibles compuestos antimicrobianos, las condiciones de extracción y recuperación deben optimizarse para cada caso particular. La mayoría de los estudios antibacterianos con algas se refieren a extractos crudos, con diferentes componentes que pueden actuar por separado o sinérgicamente para ejercer la actividad biológica (Sánchez González, 2020).

1.4.1. Algas pardas: *Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*

De acuerdo con sus características, las diversas especies de macroalgas se agrupan bajo el rango taxonómico de Phylum. Caracteres citológicos (niveles de organización), bioquímicos (pigmentos, composición de la pared celular) y reproductivos (ciclos y estructuras reproductivas) son algunas de las características en las que se basan los criterios para la agrupación de éstas. Sin embargo, la presencia de fitopigmentos distintos de la clorofila se usa de manera más común para clasificar a las algas en las siguientes familias: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas pardas) y *Rhodophyceae* (algas rojas). Las especies *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, 1820 y *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 utilizadas en la presente tesis de grado, se agrupan dentro de las algas pardas. El color marrón verdoso de *Phaeophyceae* se atribuye a la presencia de xantófilas y a clorofilas a y c (Lee, 1980).

M. pyrifera y *U. pinnatifida* pertenecen al orden Laminariales, por lo tanto, comparten ciertas características. Tienen un ciclo de vida con alternancia de generaciones heteromórficas, siendo el esporofito la forma macroscópica (donde se diferencian rizoides de fijación, estípite y láminas) y los gametofitos masculino y femenino, microscópicos (Lee, 1980). Ambas especies forman densas poblaciones en las costas argentinas y su valor comercial no se halla suficientemente explotado. Los grandes bosques de *M. pyrifera*

se encuentran desde los 42°S hasta el canal de Beagle (Mendoza, 1999). Por su parte, *U. pinnatifida* (conocida vulgarmente como “wakame”) es una especie invasora originaria de las costas de Japón, Corea y China, que ocupa más de 1000 km de costas patagónicas y continúa dispersándose. Resulta de gran interés por el impacto que tiene sobre las macroalgas nativas y sobre otros componentes de las comunidades costeras. Esto la convierte en un ejemplar especialmente atractivo al momento de buscar posibles aplicaciones para su biomasa (Dellatorre *et al.*, 2012).

1.5. Técnicas para evaluar la actividad antibacteriana

Las distintas especies y cepas de microorganismos presentan diferentes grados de sensibilidad frente a un agente antimicrobiano. El principal propósito de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos es orientar en la elección del agente apropiado para un tratamiento determinado. Con lo cual, la susceptibilidad puede informarse de forma cualitativa al categorizar a la bacteria como susceptible, intermedia o resistente, y de forma cuantitativa en términos de concentración del agente que inhibe el crecimiento del microorganismo (Balouiri *et al.*, 2016).

Las técnicas cualitativas más ampliamente difundidas son el ensayo de difusión en disco y pozo en agar. Están basadas en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, (método de Kirby-Bauer), fueron estandarizadas y son actualmente recomendadas por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) de Estados Unidos, anteriormente conocido como el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) (Ramirez & Castaño, 2009). Las mismas ofrecen muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo, capacidad de probar enorme número de microorganismos y agentes antimicrobianos, y facilidad para interpretar los resultados. Por su parte, dentro de las técnicas cuantitativas, los métodos de dilución son los más apropiados. Estos sirven para la determinación de los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM), ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano probado en el agar (dilución de agar) o caldo (macrodilución o microdilución). El valor CIM registrado se define como el valor más bajo de concentración del agente antimicrobiano ensayado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo probado, y por lo general es expresado en mg/mL o µg/mL (Balouiri *et al.*, 2016).

Las mencionadas técnicas han sido utilizadas en el área de la sanidad apícola, obteniéndose muy buenos resultados (Reynaldi & Alippi, 2006; Bastos *et al.*, 2008; Gende *et al.*, 2008; Damiani *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2019).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el marco de los antecedentes previamente expuestos, la hipótesis que se propuso para la presente tesis de grado fue la siguiente:

“Extractos de las macroalgas pardas *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* poseen actividad antibacteriana frente a *P. larvae*, agente causal de loque americana.”

Se planteó como objetivo general, evaluar y comparar *in vitro* la actividad antibacteriana de extractos acuosos y metanólicos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* contra distintas cepas de la bacteria causante de la enfermedad de la cría de abeja.

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar químicamente el material algal seco y determinar la concentración de los extractos preparados a partir de ellos.
- Evaluar y comparar *in vitro* la actividad antibacteriana de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida*, mediante técnicas cualitativas y cuantitativas.
- Comparar el efecto de los solventes de extracción (agua y metanol 80%) utilizados en la preparación de los extractos algales sobre la actividad antimicrobiana contra *P. larvae*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de trabajo

La presente tesis de grado se realizó en el área de Microbiología Apícola del Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA), que pertenece a la red de centros de I+D de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Este laboratorio se ubica en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Los extractos algales fueron preparados en el Laboratorio de Ficología del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB, CONICET-UNS), con la colaboración de la Dra. Carolina Fernández.

3.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron siete cepas de *P. larvae*. Tres de ellas, Cobo, Sierra y Típica, fueron obtenidas de la colección del Centro de Investigación en Abejas Sociales (CIAS) de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Otras tres, CMM(B)15, CMM(B)23 y CMM(B)35, pertenecen al cepario de Micología Médica de la Universidad Nacional de La Plata y fueron donadas por el Dr. Francisco J. Reynaldi. Finalmente, la cepa MAR1 fue aislada de colmenas ubicadas en un establecimiento de la Estación Napostá, por la Lic. M. Agustina Rodríguez, estudiante doctoral del LabEA.

Para germinar las esporas, se tomó una alícuota del cultivo puro, se diseminó en superficie en una placa con medio MYPGP, y se incubó durante una semana en microaerofilia a 37°C. Posteriormente, se repicó una colonia individual a una nueva placa con MYPGP, se realizó aislamiento en estrías y se llevó a incubación durante 48 h en aerobiosis a 37°C. Una vez obtenidas las colonias, se hicieron crecer en medio MYPGP líquido durante 48 h en aerobiosis a la misma temperatura, con el fin de obtener un cultivo líquido puro (OIE, 2018). Para confirmar la pureza, se realizó la tinción de Gram (Fig. 1) y la prueba de catalasa (Gerhardt, 1981). El cultivo puro fue utilizado para las pruebas de capacidad antibacteriana de los extractos algales que serán descriptas a continuación.



Figura 1. Tinción de Gram.

3.3. Material algal

Se trabajó con dos macroalgas marinas: *M. pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820 y *U. pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 (Fig. 2). El material algal fue colectado por el grupo de trabajo de la Dra. Carolina Fernández durante septiembre de 2021 en dos localidades de la Provincia de Chubut: *M. pyrifera* en las costas de Bahía Camarones y *U. pinnatifida* en las costas de Puerto Madryn.

Las determinaciones que se describen a continuación se realizaron en diferentes partes del talo: en *M. pyrifera* en sus porciones basales (MB) y distales (MD) y en *U. pinnatifida* en láminas (UL) y esporofilos (UE).

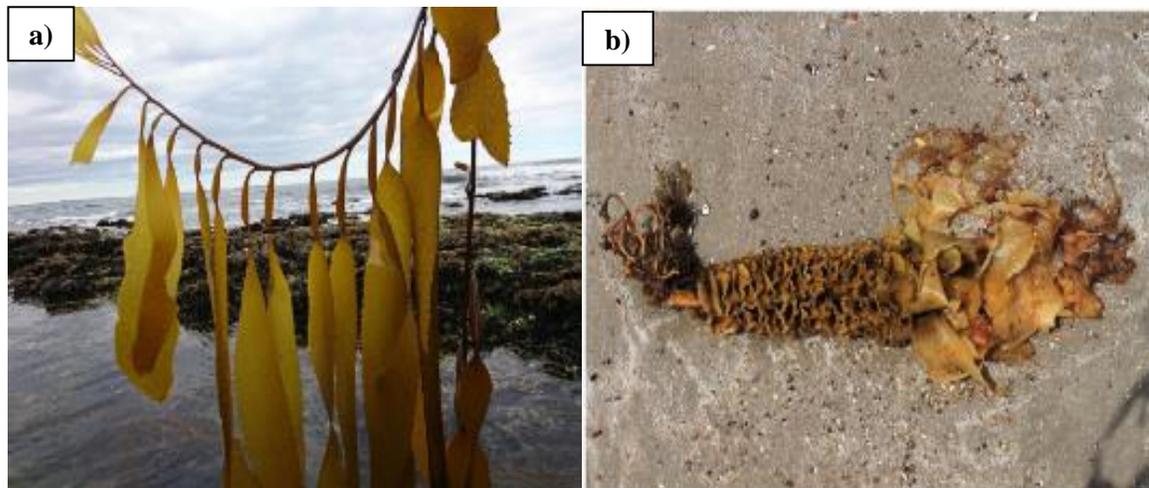


Figura 2. Material algal. **a)** *Macrocyctis pyrifera*. **b)** *Undaria pinnatifida*.

3.3.1. Caracterización química de las algas

Con el fin de caracterizar el material algal, se determinaron las propiedades químicas que se describen a continuación. A partir del método de Kjeldahl se determinó el nitrógeno total de las muestras, que luego fue multiplicado por el factor de conversión 5 (Angell *et al.*, 2016). Esta determinación fue realizada en el Laboratorio de Servicios Analíticos de suelos, plantas y ambiente (LABSPA-CONICET), ubicado en el Departamento de Agronomía de la UNS. Por su parte, los carbohidratos totales fueron cuantificados mediante la técnica de Dubois (1956), y los lípidos, con el protocolo de Folch *et al.* (1957) con algunas modificaciones (Song *et al.*, 2013). Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra. Carolina Fernández.

3.3.2. Elaboración de los extractos algales

Se prepararon dos extractos de cada porción de material algal utilizando dos solventes: metanol 80% (80 metanol:20 agua) y agua destilada (Fig. 3). Para ello, se pesó 1 g de material algal liofilizado y se mezcló con 15 mL de solvente. Se incubó durante 170 minutos a temperatura ambiente en agitador orbital a 300 rpm. Transcurrido ese tiempo, se sonicó durante 10 minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante 15

minutos, para luego separar el sobrenadante. El precipitado fue extraído dos veces más empleando 5 mL de solvente en cada re-extracción y siguiendo la misma metodología. Todos los extractos se realizaron por triplicado.

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos por técnicas cuantitativas, se utilizaron extractos metanólicos doble concentración (2X). Para ello, se trabajó a partir de 2 g de material algal liofilizado y se realizó el procedimiento descrito previamente.



Figura 3. Elaboración de los extractos algales.

3.3.2.1. Determinación de la concentración de los extractos algales

Para la determinación del extracto seco, se siguió el protocolo tomado de Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2, parte 2, para extractos de propóleos (Bedascarrasbure *et al.*, 2006). Se colocaron 5 mL de los extractos acuosos y metanólicos (MB, MD, UL, UE) y para el caso de los extractos metanólicos 2X (MB y UE), se colocó 1 mL en un vaso de precipitado de 50 mL de capacidad que fue previamente pesado (m_0). Los vasos se llevaron a estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 h. Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron (m_1). Finalmente, se calculó el extracto seco por diferencia de peso con la siguiente fórmula:

$$\text{ES \%} = \frac{m_1 - m_0}{m_2} * 100$$

Donde

ES es el extracto seco en gramos por 100 gramos

m_0 es la masa del vaso de precipitado

m_1 es la masa del vaso de precipitado más el residuo seco en gramos

m_2 es la masa de la muestra en gramos (se obtiene de la diferencia entre el peso del vaso con los mL del extracto incorporados al inicio de la determinación, menos m_0).

3.4. Actividad antibacteriana de los extractos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* por técnicas cualitativas

3.4.1. Difusión en disco

Se obtuvo un cultivo líquido puro de *P. larvae* en 5 mL de caldo MYPGP de la incubación durante 48 h a 37°C. Se colocaron 100 µL del mencionado patógeno (equivalente al tubo 3 de la escala de McFarland) sobre la superficie de la placa de Petri con medio MYPGP y se distribuyeron con un hisopo estéril. Sobre cada caja sembrada, se colocaron 4 discos de papel de filtro estériles de 7 mm de diámetro embebidos con 45 µL de los extractos algales acuosos, por un lado, y metanólicos por otro, de MB, MD, UL y UE, con las concentraciones que se informan en los resultados. Se realizaron controles de la técnica con cuatro discos estériles embebidos con 45 µL de los solventes de extracción (agua y metanol 80%, según el extracto evaluado). Las placas se incubaron a 37°C por 48 h en aerobiosis. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada extracto y para cada cepa de *P. larvae* (de Graaf *et al.*, 2013).

Luego de la incubación, se tomaron fotografías de cada caja y se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando el software Image J 1.53f (2023), restando el diámetro de los discos de filtro. Se establecieron diferentes categorías de inhibición en base al halo promedio generado según una escala elaborada por Rodríguez *et al.* (2023), con algunas modificaciones, y para una mejor visualización se les asignaron colores según Schmidt (2018) (Tabla 1).

Tabla 1. Rangos de capacidad inhibitoria de los extractos algales metanólicos de *Macrocystis pyrifera* basal y distal y *Undaria pinnatifida* lámina y esporofilo.

Inhibición promedio (mm)	Capacidad inhibitoria
0 a 1	Nula
> 1 a 4	Baja
> 4 a 7	Media
> 7 a 10	Buena
> 10 a 16	Muy buena

3.4.2. Difusión en pozo

Se trabajó de la misma manera descripta para la técnica cualitativa de difusión en disco. Con tips estériles, se hicieron pocillos de 8 mm de diámetro y aproximadamente 8 mm de profundidad en el medio de cultivo. En ellos se colocaron 80 µL de los extractos algales acuosos, por un lado, y metanólicos por otro, de MB, MD, UL y UE, con las concentraciones que se informan en los resultados. Se realizaron controles de la técnica con cuatro pocillos con 80 µL de los solventes de extracción (agua y metanol 80%, según el extracto evaluado). Las placas se incubaron a 37°C por 48 h en aerobiosis. Luego de la incubación,

se examinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento bacteriano y los resultados se registraron de la misma forma descrita previamente para la técnica de difusión en disco, restando el diámetro del pozo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada extracto y para cada cepa de *P. larvae* (de Graaf *et al.*, 2013).

3.5. Actividad antibacteriana de los extractos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* por la técnica cuantitativa de dilución en agar

Para esta técnica se emplearon los extractos metanólicos de MB y UE, que exhibieron mayor actividad antibacteriana en las determinaciones cualitativas descritas previamente. Asimismo, estos extractos se estudiaron contra las cepas de *P. larvae* CMM(B)35 y MAR1, que resultaron más susceptibles en los mencionados ensayos.

Se trabajó por triplicado con la técnica cuantitativa de dilución en agar para determinación de la CIM. Para ello se adaptó el protocolo de Fernández *et al.* (2019). En cada placa se volcó agar MYPGP fundido con 1 mL de las diluciones de los extractos algales metanólicos. Se prepararon cinco diluciones con agua destilada, en un rango de concentraciones que varió entre 18,6 y 1,16 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto MB y entre 24,4 y 1,52 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto UE. Estas cantidades se obtuvieron luego de realizar cálculos sobre las concentraciones de los extractos secos utilizadas en los ensayos cualitativos. Las placas se agitaron suavemente hasta lograr una mezcla homogénea y se dejaron secar dentro de la cabina de flujo laminar. Luego, con un hisopo estéril se diseminaron uniformemente 100 μL de cada cepa bacteriana a los cuales se les determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) por la técnica de drop plate (Herigstad *et al.*, 2001). Cuando el inóculo fue absorbido, se llevaron las placas a incubación a 37°C durante 48 h, en aerobiosis. Finalmente, se observó la presencia/ausencia de crecimiento del patógeno y se determinó como la CIM a aquella concentración más baja de extracto algal que mostró inhibición, es decir, ausencia del patógeno. Como control de la técnica se mezcló agar MYPGP con 1 mL de metanol 80%. Además, se agregó un control sin extracto (control positivo).

3.6. Análisis de los datos

Los datos se expresaron como la media \pm desvío estándar (DE). Las características químicas se analizaron por ANOVA simple. Por su parte, el efecto de los extractos algales se estudió con un ANOVA en bloque simple para cada cepa y cada metodología, por separado, donde cada placa de Petri es un bloque (tres bloques, o repeticiones, por cepa) y hay cuatro tratamientos. Para comparar la inhibición entre cepas, se realizó un ANOVA simple para cada uno de los extractos algales y metodología. Todos los datos fueron transformados al $\ln(x+1)$ para que cumplan con los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante gráficos Q-Q plot normal y la prueba de Bartlett y Levene, respectivamente. Las diferencias entre las medias se analizaron por la prueba de Bonferroni ($p < 0,05$). Para todos los análisis se utilizó el software Excel.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización química del material algal y de sus extractos

Los resultados obtenidos de la caracterización química del material algal se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización química del material algal seco.

Algas	Muestra	Proteínas (%) ¹	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
<i>M. pyrifera</i>	Basal	12,07 ² ± 0,08 ³ (a) ⁴	1,84 ± 0,18 (b)	1,90 ± 0,23 (a)
	Distal	12,60 ± 0,15 (a)	0,79 ± 0,27 (a)	2,09 ± 0,19 (a)
<i>U. pinnatifida</i>	Lámina	16,52 ± 0,13 (c)	1,36 ± 0,07 (b)	2,94 ± 0,16 (b)
	Esporofilo	14,65 ± 0,44 (b)	6,40 ± 0,37 (c)	4,59 ± 0,11 (c)

¹ Porcentaje (%) significa g/100 g (p/ps). ² Valor promedio de 3 repeticiones. ³ Desvío estándar. ⁴ Valores con letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05), por la prueba de Bonferroni.

La concentración de proteínas osciló entre 12,07 ± 0,08% y 16,52 ± 0,13%. Mientras que para los lípidos y carbohidratos se registraron valores menores, entre 0,79 ± 0,27% y 6,40 ± 0,37%, y 1,90 ± 0,23% y 4,59 ± 0,11%, respectivamente. Los resultados demostraron que no hay diferencias significativas en el contenido de proteínas, como así tampoco en el de carbohidratos para las distintas partes del talo en *M. pyrifera*, mientras que para *U. pinnatifida* hay diferencias en la caracterización para los tres parámetros analizados en lámina y esporofilo.

Los resultados de la concentración de los extractos algales se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de los extractos algales secos.

Alga	Muestra	Concentración extracto seco (%) ¹	
		Acuoso	Metanólico
<i>M. pyrifera</i>	Basal	1,65 ² ± 0,66 ³	1,55 ± 0,03 (ab) ⁴
	Distal	1,77 ± 0,57	1,85 ± 0,17 (b)
<i>U. pinnatifida</i>	Lámina	2,04 ± 0,11	1,43 ± 0,06 (a)
	Esporofilo	1,97 ± 0,21	1,34 ± 0,11 (a)

¹ Porcentaje (%) significa g/100 g (p/ps). ² Valor promedio de 3 repeticiones. ³ Desvío estándar. ⁴ Valores con letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05), por la prueba de Bonferroni.

Todas las concentraciones variaron entre $1,34 \pm 0,11\%$ y $2,04 \pm 0,11\%$, para ambos extractantes. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los extractos acuosos. Para el caso de los extractos metanólicos, MD mostró mayor concentración con respecto a los extractos de *U. pinnatifida*. Cuando se compararon ambos extractantes, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas que se describen a continuación, se seleccionaron las muestras MB y UE para realizar los extractos metanólicos 2X utilizados en la determinación cuantitativa. Los resultados obtenidos en el cálculo de la concentración mostraron diferencias significativas entre dichos extractos: $1,86 \pm 0,70\%$ para MB y $2,44 \pm 0,18\%$ para UE.

4.2. Actividad antibacteriana de los extractos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* por técnicas cualitativas

4.2.1. Difusión en disco

Ninguna de las siete cepas estudiadas de *P. larvae* fue inhibida por los extractos algales acuosos probados. Sin embargo, los extractos metanólicos lograron inhibir el crecimiento bacteriano (Fig. 4).

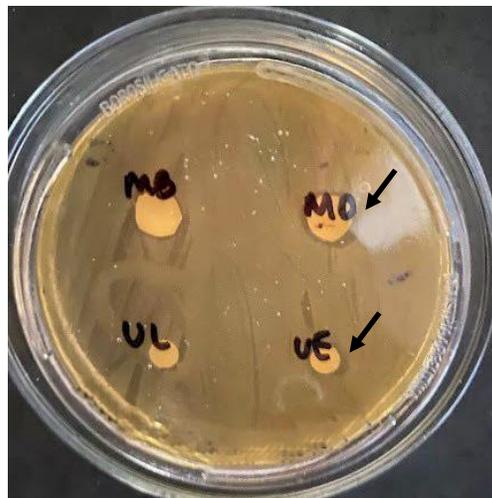


Figura 4. Halos de inhibición del crecimiento de la cepa Tipica, frente a los extractos algales metanólicos de *Macrocystis pyrifera* basal (MB) y distal (MD) y *Undaria pinnatifida* lámina (UL) y esporofilo (UE).

La tabla 4 presenta los resultados obtenidos midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las siete cepas de *P. larvae* estudiadas frente a MB, MD, UL y UE, luego de 48 h de incubación.

Tabla 4. Actividad antibacteriana de los extractos algales metanólicos de *Macrocyctis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*, por la técnica de difusión en disco.

Cepas de <i>P. larvae</i>	Extracto algal metanólico			
	MB	MD	UL	UE
CMM(B)15	2,7 ¹ ± 1,2 ²	1,3 ± 2,3	2,7 ± 1,2	3,3 ± 1,2
CMM(B)23	0,7 ± 1,2	1,3 ± 1,2	1,7 ± 1,5	3,3 ± 1,2
CMM(B)35	0,7 ± 1,2 (a) ³	1,3 ± 1,2 (ab)	6,0 ± 3,5 (b)	6,0 ± 3,5 (b)
Cobo	3,3 ± 2,3 (b)	0 (a)	1,3 ± 1,2 (ab)	5,3 ± 2,3 (b)
MAR1	2,0 ± 0 (ab)	0,7 ± 1,2 (a)	0,7 ± 1,2 (a)	4,0 ± 0 (b)
Sierra	0,7 ± 1,2	0	2,0 ± 0	0,7 ± 1,2
Típica	1,3 ± 1,2	1,3 ± 2,3	2,0 ± 2,0	2,0 ± 0

MB: *M. pyrifera* basal; MD: *M. pyrifera* distal; UL: *U. pinnatifida* lámina; UE: *U. pinnatifida* esporofilo. En blanco: inhibición nula. En celeste: inhibición baja. En verde: inhibición media.

¹Promedio del diámetro de los halos de inhibición expresado en milímetros. ²Desvío estándar.

³Valores con letras distintas en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), por la prueba de Bonferroni.

Para todos los extractos, así como para todas las cepas, el grado de inhibición en general fue bajo/nulo: solo en tres casos se observó capacidad inhibitoria media. Por otro lado, el estudio del comportamiento de cada cepa frente a los cuatro extractos mostró que solo CMM(B)35, Cobo y MAR1 presentaron diferencias significativas en los grados de inhibición de acuerdo con el extracto algal estudiado ($p < 0,05$). Para el resto de las cepas, los extractos tuvieron el mismo efecto antibacteriano sobre ellas.

Por su parte, al analizar los extractos individualmente frente a cada cepa, se observó que UE mostró diferencias significativas de inhibición entre cepas ($p < 0,05$). En contraste, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la inhibición de los demás extractos: todas las cepas mostraron el mismo grado de susceptibilidad (Fig. 5).

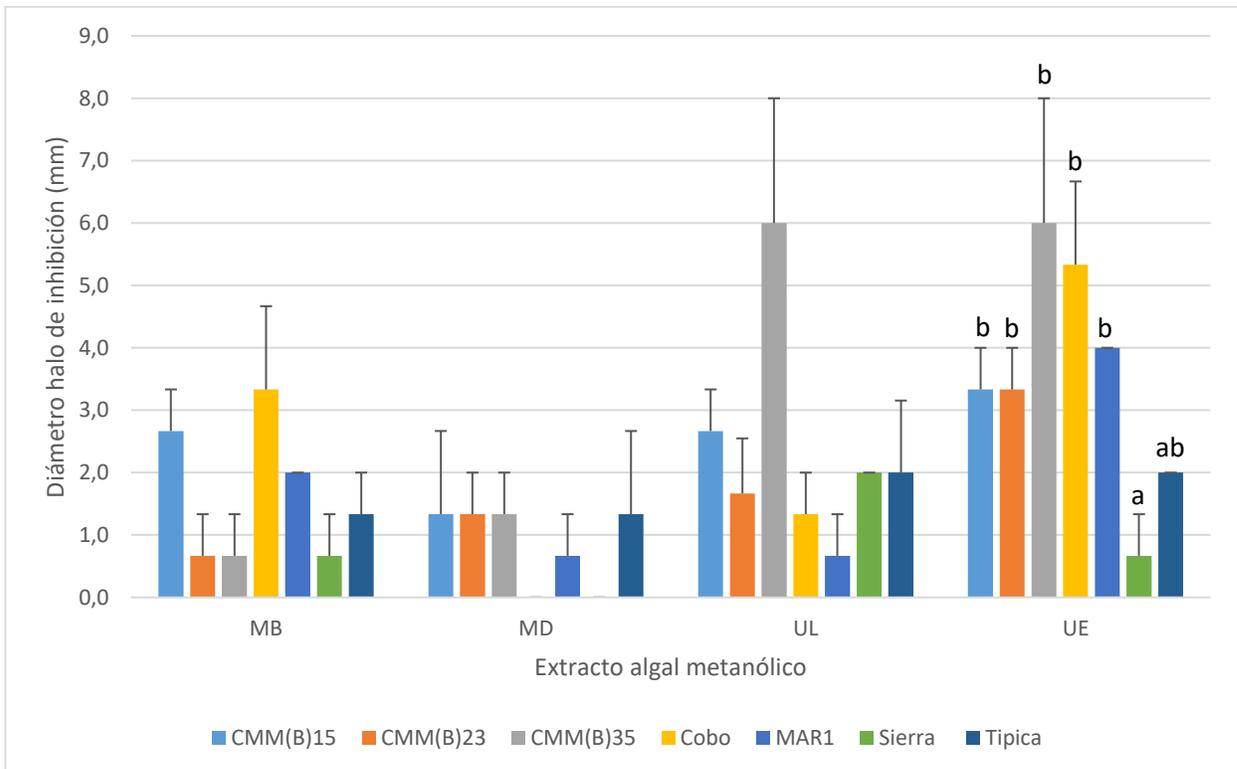


Figura 5. Actividad antibacteriana por la técnica de difusión en disco de los extractos algales metanólicos de *Macrocyctis pyrifera* en su porción basal (MB) y distal (MD), y de láminas (UL) y esporofilos (UE) de *Undaria pinnatifida*. Las letras sobre las barras corresponden a los resultados de la prueba de Bonferroni.

4.2.2. Difusión en pozo

Ninguna de las siete cepas estudiadas de *P. larvae* fue inhibida por los extractos algales acuosos probados. Sin embargo, los extractos metanólicos mostraron inhibición del crecimiento bacteriano en distintos grados (Fig. 6).

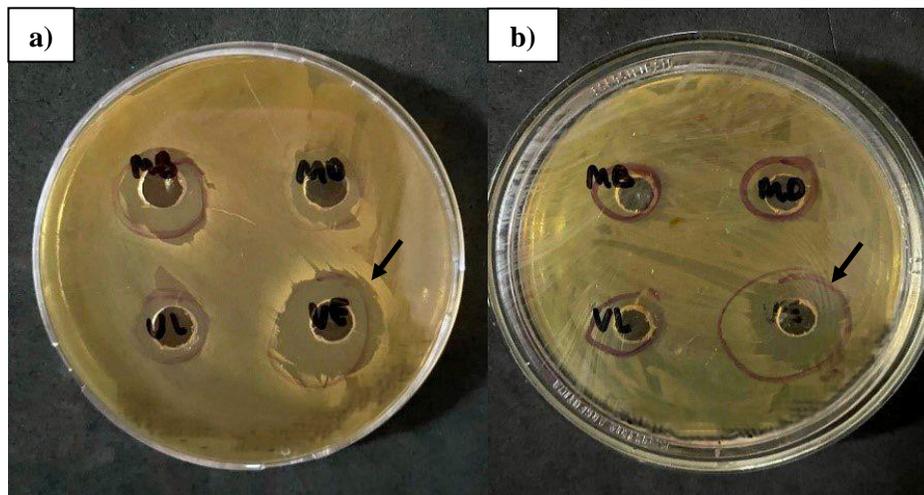


Figura 6. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano frente a los extractos algales metanólicos de *Macrocyctis pyrifera* basal (MB) y distal (MD) y *Undaria pinnatifida* lámina (UL) y esporofilo (UE). **a)** Cepa CMM(B)35. **b)** Cepa MAR1.

La tabla 5 presenta los resultados obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las siete cepas de *P. larvae* estudiadas frente a MB, MD, UL y UE, luego de 48 h de incubación. Se observó que los resultados de inhibición en esta técnica fueron mayores que en la técnica de difusión en disco.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos algales metanólicos de *Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*, por la técnica de difusión en pozo.

Cepas de <i>P. larvae</i>	Extracto algal metanólico			
	MB	MD	UL	UE
CMM(B)15	7,7 ¹ ± 1,5 ² (ab) ³	7,7 ± 3,2 (a)	6,7 ± 1,2 (a)	14,7 ± 0,6 (b)
CMM(B)23	6,0 ± 0	6,0 ± 0	4,5 ± 3,5	16,0 ± 2,8
CMM(B)35	10,3 ± 0,6 (ab)	8,0 ± 1,7 (a)	6,7 ± 1,2 (a)	14,7 ± 1,5 (b)
Cobo	7,0 ± 1,0 (bc)	5,7 ± 1,5 (ab)	3,3 ± 1,2 (a)	12,7 ± 1,2 (c)
MARI	6,7 ± 3,1 (a)	5,3 ± 1,2 (a)	6,0 ± 0 (a)	14,3 ± 5,1 (b)
Sierra	2,0 ± 0 (a)	7,3 ± 2,3 (bc)	3,3 ± 1,2 (ab)	11,3 ± 1,2 (c)
Típica	8,0 ± 0 (c)	6,0 ± 0 (b)	4,0 ± 0 (a)	7,3 ± 1,2 (bc)

MB: *M. pyrifera* basal; MD: *M. pyrifera* distal; UL: *U. pinnatifida* lámina; UE: *U. pinnatifida* esporofilo. En celeste: inhibición baja. En verde: inhibición media. En amarillo: inhibición buena. En rojo: inhibición muy buena.

¹Promedio del diámetro de los halos de inhibición, expresado en milímetros. ²Desvío estándar.

³Valores con letras distintas en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), por la prueba de Bonferroni.

Para los extractos MD y UL, la capacidad inhibitoria fue en general media/buena: ningún halo de inhibición superó los 8 mm. El extracto MB presentó mayor tamaño en los halos de inhibición que los mencionados previamente. UE logró los halos de inhibición de mayor diámetro, con valores entre $7,3 \pm 1,2$ mm y $16,0 \pm 2,8$ mm. Por otro lado, el estudio del comportamiento de cada cepa frente a los cuatro extractos mostró que todas las cepas presentaron diferencias significativas en los grados de inhibición de acuerdo con el extracto algal estudiado, a excepción de CMM(B)23. Debido a un problema de contaminación solo se trabajó con dos repeticiones para esta cepa, lo cual, muy probablemente, fue la causa de la falta de diferencias estadísticas.

Por su parte, al analizar los extractos individualmente frente a cada cepa se observó que tanto MB como UE mostraron diferencias significativas de inhibición entre cepas ($p < 0,05$). En contraste, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la inhibición de los demás extractos: todas las cepas mostraron el mismo grado de susceptibilidad (Fig. 7).

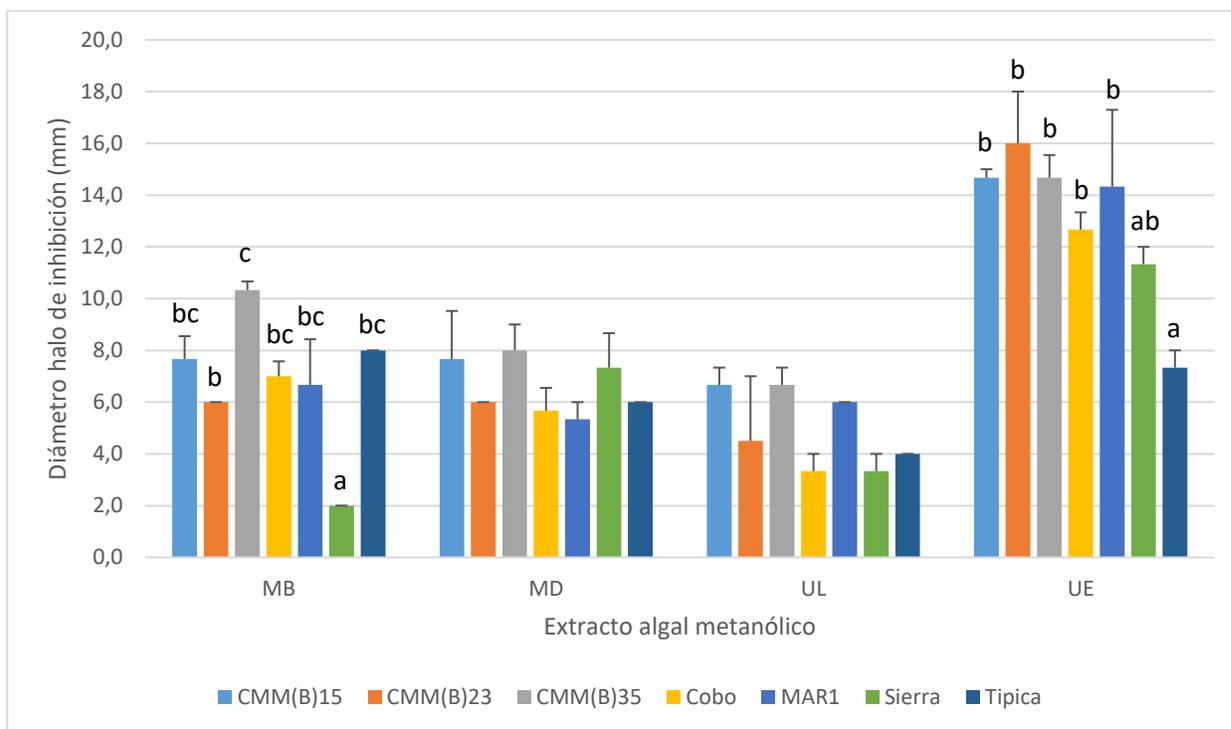


Figura 7. Actividad antibacteriana por la técnica de difusión en pozo de los extractos algales metanólicos de *Macrocyctis pyrifera* en su porción basal (MB) y distal (MD), y de láminas (UL) y esporofilos (UE) de *Undaria pinnatifida*. Las letras sobre las barras corresponden a los resultados de la prueba de Bonferroni.

4.3. Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* por la técnica cuantitativa de concentración inhibitoria mínima (CIM)

De acuerdo con los análisis estadísticos realizados en las pruebas cualitativas de difusión en disco y pozo, los extractos MB y UE fueron los que mostraron mayor grado de inhibición en ambos casos. De las cepas bacterianas que fueron más susceptibles a los mencionados extractos, se seleccionaron CMM(B)35 y MAR1.

Al inicio de la técnica CIM, se diseminaron 100 μL de inóculo en cada placa, que correspondieron a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL de la cepa CMM(B)35 y $1,1 \times 10^8$ UFC/mL de MAR1 (Fig. 8). Se observó que el extracto metanólico 2X de UE mostró la CIM más baja frente a la cepa CMM(B)35, con un valor de 12,2 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, duplicó el valor de CIM frente a la cepa MAR1, con un valor de 24,4 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 9). El extracto metanólico 2X de MB también demostró tener buena actividad antibacteriana con respecto a los valores de CIM mencionados anteriormente, registrando un valor de 18,6 $\mu\text{g/mL}$ para ambas cepas (Fig. 10). Por un problema de contaminación, no se incluyó en las fotografías la repetición 3 de la dilución 2 frente a MAR1.

Por último, se observó crecimiento de ambas cepas en todas las placas control con metanol 80% (control de la técnica) en el medio de cultivo, indicando que el metanol no es el agente inhibitor de la bacteria patógena en cuestión (Fig. 11). A su vez, ambas cepas crecieron en los controles positivos.

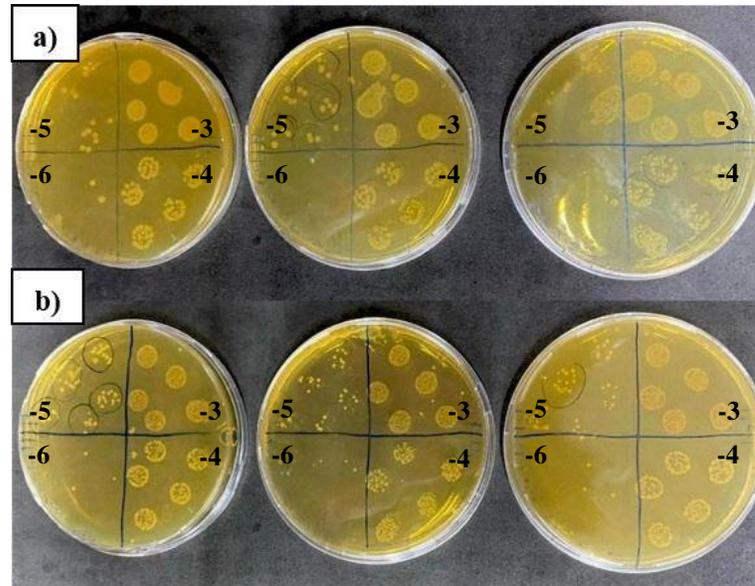
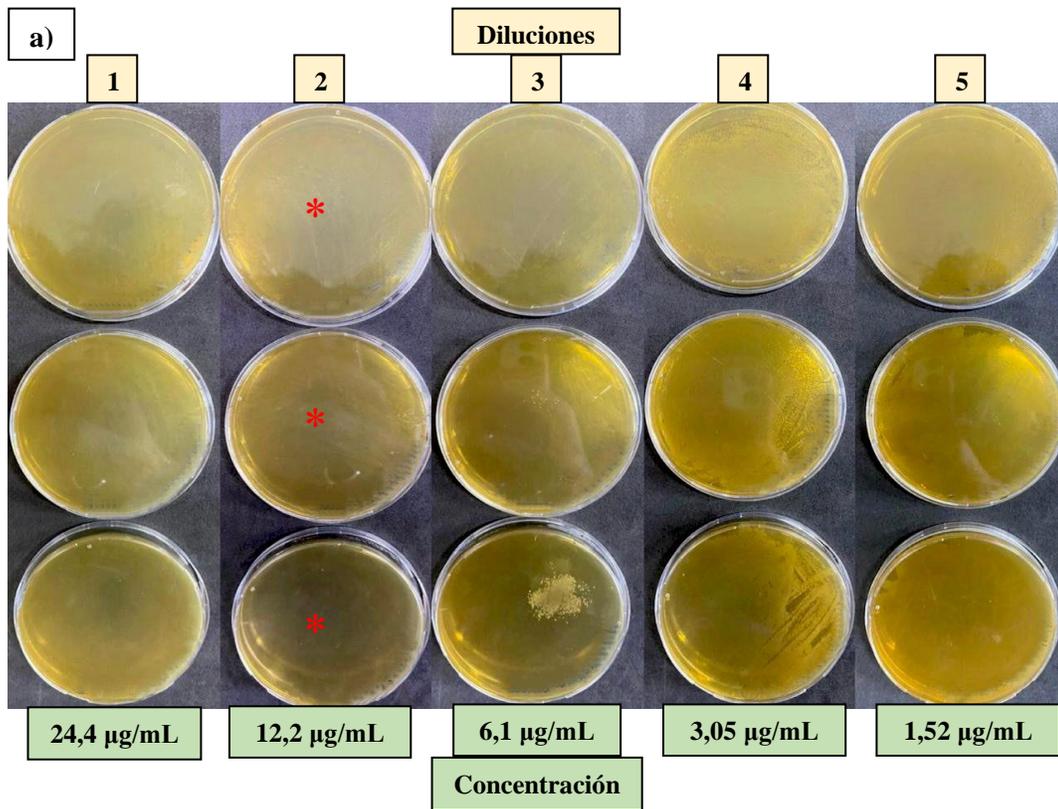


Figura 8. Técnica de drop plate agar: diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .

a) Cepa CMM(B)35. b) Cepa MAR1.



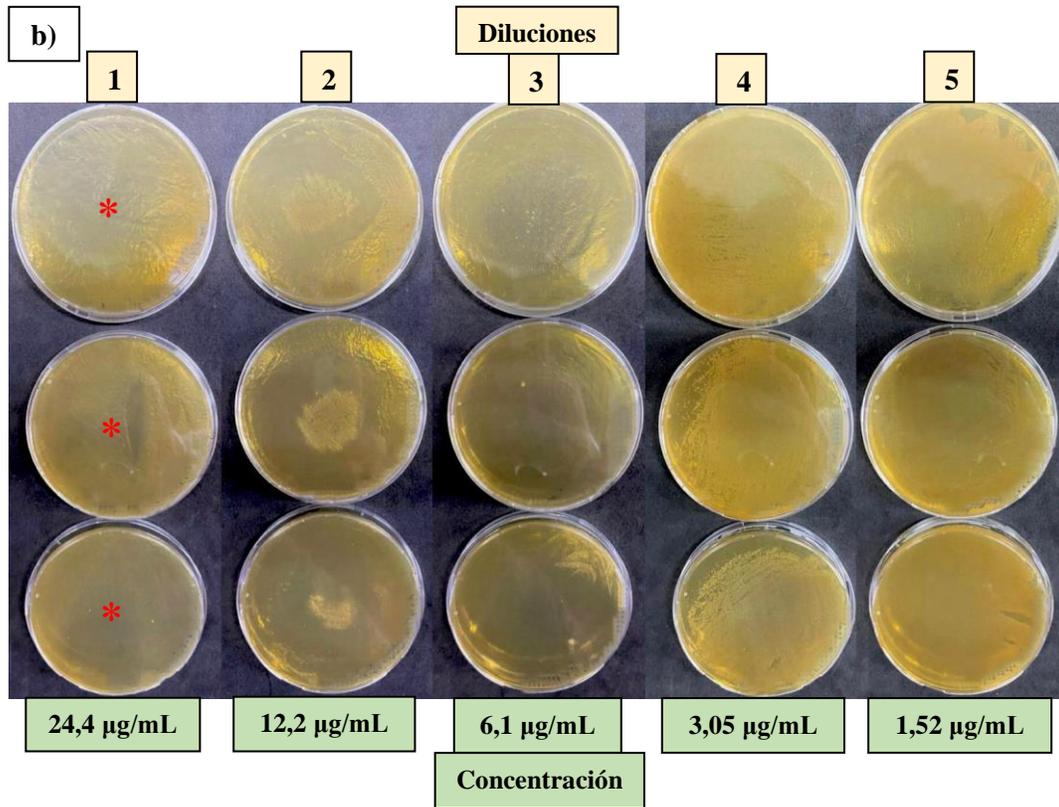
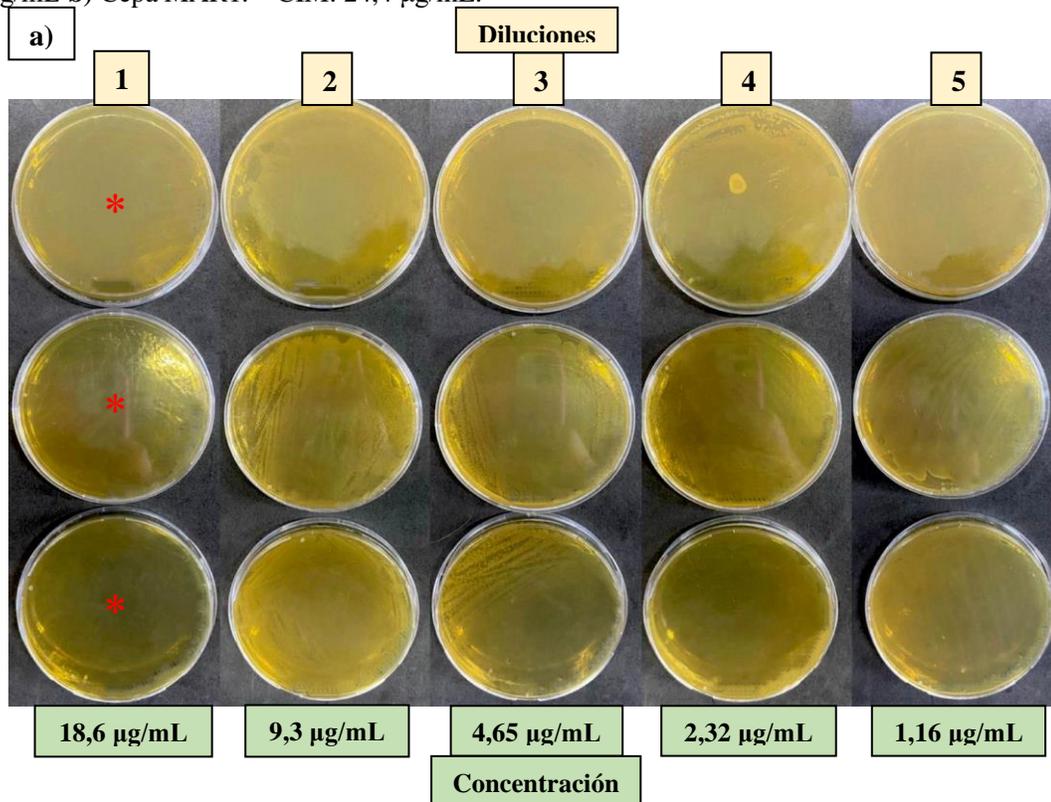


Figura 9. Prueba cuantitativa de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto metanólico 2X al 80% de *Undaria pinnatifida* en su porción esporofilo (UE). Las tres placas corresponden a repeticiones de la misma dilución. **a)** Cepa CMM(B)35. * CIM: 12,2 µg/mL **b)** Cepa MAR1. * CIM: 24,4 µg/mL.



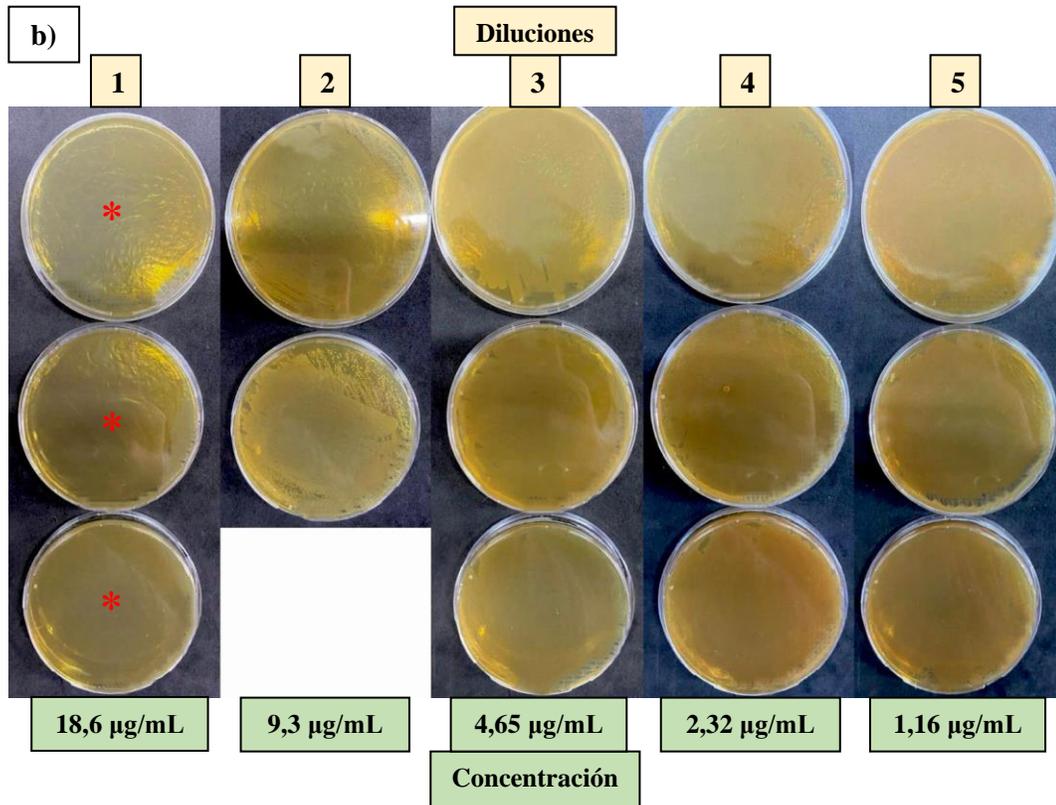


Figura 10. Prueba cuantitativa de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto metanólico 2X al 80% de *Macrocystis pyrifera* en su porción basal (MB). Las tres placas corresponden a repeticiones de la misma dilución. **a)** Cepa CMM(B)35. * CIM: 18,6 µg/mL **b)** Cepa MAR1. * CIM: 18,6 µg/mL.



Figura 11. Placas control con metanol 80%, donde se obtuvo crecimiento bacteriano. **a)** Cepa CMM(B)35. **b)** Cepa MAR1.

5. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los efectos negativos de *P. larvae* sobre las colonias de abejas melíferas y los inconvenientes de los tratamientos tradicionales, resulta primordial el desarrollo de alternativas naturales eficaces para su control. El empleo de productos de origen natural para el tratamiento de microorganismos patógenos evitaría el uso indiscriminado de antibióticos convencionales, con la consecuente aparición de cepas resistentes, de residuos en los productos apícolas y la contaminación del ambiente causada por metales pesados.

En el presente estudio, se evaluaron extractos de las macroalgas pardas *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* como una alternativa novedosa contra el agente causal de loque americana. Algunos investigadores se han concentrado en el estudio de la actividad antibacteriana que poseen *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* frente a bacterias patógenas de humanos como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* (Patra *et al.*, 2017; Qiu, 2020), *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* (Martelli *et al.*, 2020), *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* (Park *et al.*, 2005), entre otras. Sin embargo, como ya se ha comentado, este es el primer trabajo que estudia las mencionadas macroalgas marinas frente al patógeno de larvas de abejas.

5.1. Caracterización química del material algal

Con relación a la caracterización química sobre el material algal seco, se evidenció mayor porcentaje de proteínas en UL, con un valor promedio de $16,52 \pm 0,13\%$ p/ps. Estos resultados coinciden con Solana (2022), quien estudió el contenido proteico de la lámina de *U. pinnatifida* ($15,82 \pm 0,40\%$ p/ps), también recolectada en Puerto Madryn, en el mismo periodo del año. En general, las proteínas representan entre un 5-15% p/ps (g/100 g de alga seca) en algas pardas (Darcy-Vrillon, 1993) y son ricas en los aminoácidos glicina, arginina, alanina y ácido glutámico (Quitral *et al.*, 2012).

Respecto a lípidos, UE presentó mayores porcentajes. El contenido total lipídico registró un promedio de $6,40 \pm 0,37\%$ p/ps, similar a Solana (2022) ($6,36 \pm 0,81\%$ p/ps). La fracción lipídica en macroalgas representa entre un 1-5% p/ps (Jensen, 1993). Corresponden a esta fracción una mezcla de diferentes compuestos como aceites, pigmentos, vitaminas liposolubles, esteroides y otros componentes no polares. Los lípidos de algas tienen una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados que las plantas terrestres. Estos son componentes de los lípidos de la membrana estructural y resultan esenciales para la alimentación animal y humana (Sánchez González, 2020).

Finalmente, entre los carbohidratos de algas pardas se destacan los polisacáridos que forman la pared celular, compuesta principalmente de fucoidan, alginato, laminarina y sus derivados (Balboa *et al.*, 2013). UE también presentó los mayores porcentajes en el contenido de estos compuestos orgánicos: un promedio de $4,59 \pm 0,11\%$ p/ps. Sin embargo, Quitral *et al.* (2012) mencionan que las algas contienen una alta concentración de carbohidratos, como polisacáridos estructurales, de almacenamiento y funcionales, con valores de 20 a 70% p/ps. También, Darcy-Vrillon (1993) describió mayor contenido de carbohidratos

en algas: hasta un 50% del peso seco. Con lo cual, los valores obtenidos en la presente tesis se encuentran muy por debajo de lo señalado por estos autores.

Las diferencias entre los resultados obtenidos en la caracterización química y los valores de otros trabajos científicos pueden responder a múltiples factores, como, por ejemplo, el clima, la geografía, las etapas de crecimiento del alga, su distribución marina, entre otros, así como al método de extracción utilizado (Ortiz Viedma, 2011).

5.2. Actividad antibacteriana de los extractos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* por técnicas cualitativas

La elección del solvente es crítica y determinante en los rendimientos de extracción y el subsiguiente efecto inhibitor del crecimiento bacteriano, debido a la influencia de este en la solubilización de compuestos bioactivos con diferentes estructuras químicas y polaridades. Sin embargo, aún no está claro qué tipo de solvente es el más efectivo y adecuado en la extracción de compuestos bioactivos de macroalgas marinas (Saeed *et al.*, 2020). Una extracción empleando solventes orgánicos, logra la separación de compuestos lipofílicos, como esteroides y otros compuestos orgánicos importantes, mientras que, por extracción acuosa, se logra la obtención de ficocoloides tales como agar, carragenanos y alginatos (Silva-Beltrán *et al.*, 2015).

En esta tesis de grado se emplearon dos tipos de solventes para la extracción de compuestos algales bioactivos con potencial actividad antibacteriana: agua y metanol 80%. Si bien los extractos acuosos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus concentraciones respecto a los metanólicos, los primeros no mostraron actividad antibacteriana. Estas observaciones son similares a las de Dostálsková *et al.* (2021). Estos autores probaron tres extractos de la microalga *C. vulgaris* (acuoso, metanólico 70% y acetónico) contra *P. larvae*. La mayor actividad fue registrada para extractos acetónicos y metanólicos, con diámetros de la zona de inhibición de $23,8 \pm 7,5$ mm y $22,0 \pm 7,1$ mm, respectivamente. Estos autores observaron que el empleo de agua como solvente de extracción mostró la actividad de inhibición más baja, con un promedio del diámetro de la zona de inhibición de $8,1 \pm 0,9$ mm.

Respecto a las técnicas cualitativas probadas, los halos de inhibición de mayor diámetro se detectaron mediante la técnica de difusión en pozo, en contraste a la difusión en disco. En esta última técnica, los halos no superaron los 6 mm de diámetro. Sin embargo, se observaron halos de hasta 16 mm de diámetro con el método de pozo en agar. Estas diferencias se pueden atribuir al menor volumen de extractos algales inoculados en la técnica de difusión en disco, a la capacidad de absorción y difusión de estos y, en consecuencia, menor exposición de las cepas bacterianas a los compuestos bioactivos. Según Ramirez & Castaño (2009), la técnica empleando discos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatman. Este presenta celulosa con numerosos grupos hidroxilos libres haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica. Así, algunos compuestos catiónicos de los productos naturales son

adsorbidos en su superficie, y la difusión en el agar se ve alterada. Los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente.

En la técnica de difusión en disco, UE resultó más efectivo, aun resultando el extracto algal con menor concentración ($1,34 \pm 0,11\%$). Se obtuvieron mayores diámetros en los halos de inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas CMM(B)35, Cobo y MAR1, con valores de $6,0 \pm 3,5$ mm, $5,3 \pm 2,3$ y $4,0 \pm 0$ mm, respectivamente. Estos son valores bajos considerando investigaciones que probaron otros compuestos naturales contra *P. larvae*, aplicando la misma metodología. Antúnez *et al.* (2008), probaron un extracto etanólico de propóleos, siendo la medida del halo de inhibición mayor a 20 mm en todos los casos. Por su parte, Heredia Martin (2015), evaluó la actividad antibacteriana de cuatro fracciones (hexano, benceno, éter etílico y acetato de etilo) de un extracto hidroalcohólico de marcela (*Achyrocline satureioides*). En dicho trabajo, la fracción hexano tuvo mayores halos de inhibición, con un promedio de 25 mm. Finalmente, Chaimanee *et al.* (2017) probaron 37 extractos etanólicos de diferentes plantas obtenidas del norte y sur de Tailandia. Todas presentaron distinto grado de inhibición en un rango entre 11,33 y 29,67 mm. El extracto de albahquilla (*Chromolaena odorata*) resultó ser el más efectivo, con halos de inhibición entre 18,67 y 29,67 mm de diámetro.

Mediante la técnica de difusión en pozo, también se observó que UE resultó más efectivo en cuanto a actividad antibacteriana, obteniéndose mayores diámetros en los halos de inhibición del crecimiento de las siete cepas bacterianas. El valor máximo se evidenció frente a CMM(B)23, con un promedio de $16,0 \pm 2,8$ mm. Se registraron valores similares en investigaciones que probaron otros compuestos naturales contra *P. larvae*, aplicando la misma metodología. Isidorov *et al.* (2018) probaron extractos (n-hexano, éter dietílico y metanol) de yemas y ramas jóvenes de plantas resinosas. Los extractos de yemas de abedul común (*Betula pendula*) y álamo negro (*Populus nigra*) lograron mayores halos de inhibición, de 19,2 a 22,5 mm y desde 17,7 a 22,2 mm, respectivamente. Entre los extractos de ramas de abedul, la mayor actividad se observó para los extractos de hexano de abedul pubescente (*B. pubescens*) con zonas de inhibición de 15 a 22,4 mm, y extractos de hexano de las ramas de *B. pendula*, con zonas de inhibición de 20 a 22,8 mm. Por su parte, González (2011) probó la actividad antibacteriana de diferentes extractos (hexano, benceno, éter etílico y acetato de etilo) y el aceite esencial de marcela (*A. satureioides*) y menta peperina (*Minthostachys vericillata*) sobre 11 cepas de *P. larvae*, siendo los extractos de hexano de ambas especies los que lograron mayor inhibición del crecimiento, con valores máximos de $31,0 \pm 1,4$ mm y $21,7 \pm 1,5$ mm, respectivamente. Por último, Mărghitaş *et al.* (2011) trabajaron con extractos de albahaca (*Ocimum basilicum*), ortiga (*Urtica dioica*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y milenrama (*Achillea millefolium*), registrando mayor actividad antibacteriana en el extracto de ortiga, con halos de inhibición de 21 mm.

5.3. Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de *M. pyrifer* y *U. pinnatifida* por la técnica cuantitativa de concentración inhibitoria mínima

A partir de la técnica cuantitativa, se observó que el extracto metanólico 2X de UE mostró el valor de CIM más bajo frente a la cepa CMM(B)35, con un valor de 12,2 µg/mL. Por su parte, duplicó el valor de CIM frente a la cepa MAR1, con un valor de 24,4 µg/mL. El extracto metanólico 2X de MB también demostró tener buena actividad antibacteriana a una concentración intermedia respecto a los valores de CIM mencionados anteriormente, registrando un valor de 18,6 µg/mL para ambas cepas. Los resultados son alentadores teniendo en cuenta los valores de CIM de otros compuestos naturales probados para el control del agente causal de loque americana. Por ejemplo, Antúnez *et al.* (2008) evaluaron un extracto etanólico de propóleos, y la CIM promedio fue de 54 µg/mL. Con relación a extractos de plantas, Damiani *et al.* (2014) probaron extractos etanólicos (etanol 80%) y aceites esenciales de hojas de laurel (*Laurus nobilis*). Estos autores registraron valores de CIM en un rango de 208 a 416 µg/mL y de 600 a 1200 µg/mL, respectivamente. Por su parte, Gende *et al.* (2009 y 2014) trabajaron con aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y obtuvieron una CIM de 50 µg/mL, y con aceites esenciales de *Mentha* spp., obteniendo las concentraciones más bajas en un rango de 600 a 700 µg/mL para el aceite esencial de un híbrido salvaje.

5.4. Consideraciones finales

Por lo expresado anteriormente, podría haber relación entre la eficacia antibacteriana del extracto UE y sus características químicas, en especial si se considera su mayor contenido total de lípidos y carbohidratos. Con el mencionado extracto, se obtuvieron mayores diámetros en los halos de inhibición, diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su efecto entre las siete cepas bacterianas puestas a prueba, y se logró la menor concentración inhibitoria frente a la cepa CMM(B)35. Esta hipotética asociación eficacia antibacteriana-contenido total de lípidos puede sustentarse con los resultados de Dostálkova *et al.* (2021), donde se identificaron los compuestos con actividad antibacteriana de microalgas marinas como lípidos: monoacilgliceroles y ácidos grasos libres o metil ésteres de ácidos grasos. Además, se podría explicar la mayor actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico (metanol 80%) por la presencia de algunos compuestos fenólicos, como los flavonoides, ya que este tipo de solvente polar resulta óptimo para la extracción de los mismos. Se ha informado que los compuestos fenólicos inhiben la síntesis de peptidoglicano, dañan la estructura de la membrana microbiana, modifican su hidrofobicidad y modulan el quorum sensing. Existe la hipótesis de que la presencia de un sistema de electrones deslocalizados es responsable de la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos (Fernández *et al.*, 2019).

Finalmente, cabe destacar que se registró crecimiento de las cepas bacterianas en todas las placas control con metanol 80% en el medio de cultivo, tanto en las pruebas cualitativas como cuantitativas. Esto indica que el solvente de extracción no fue el responsable del efecto antibacteriano. Otros investigadores

utilizaron el mismo extractante en sus investigaciones y tampoco observaron efectos inhibitorios por parte del solvente (Dostálkova *et al.*, 2021).

Con la información obtenida en la presente tesis de grado, se puede afirmar que *U. pinnatifida* en su porción esporofilo presenta la actividad antibacteriana más potente frente a *P. larvae*. Los esporofilos de las algas marinas son frondes que se desarrollan en época fértil en la base del estípite, especializados para llevar esporangios (Lee, 1980; Dellatorre *et al.*, 2012). Cada esporangio contiene esporas en su interior, por lo cual la extracción de su biomasa contribuiría a la reducción de la dispersión de esta especie exótica invasora y a su vez, se lograría el control de la loque con una alternativa natural.

Como perspectivas a futuro, las investigaciones se deberían centrar en el estudio del efecto del extracto metanólico UE en ensayos a campo en apiarios, para determinar su eficacia real así como la ausencia de toxicidad y/o efectos adversos para las abejas y para los productos de la colmena. Además, se deberían realizar estudios *in vitro* sobre las propiedades esporicidas de dicho extracto, a fin de destruir las esporas de *P. larvae* y utilizarlo como tratamiento preventivo contra loque americana.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se corrobora la hipótesis planteada en la presente tesis de grado, ya que los extractos metanólicos de las macroalgas pardas *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* presentan actividad antibacteriana frente a *P. larvae*. Sin embargo, los extractos acuosos no muestran el mismo efecto.
- ✓ El material algal seco de *U. pinnatifida* contiene mayor porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos, en contraste con *M. pyrifera*. UL tiene mayor porcentaje de proteínas, mientras que UE tiene mayor porcentaje de lípidos y carbohidratos.
- ✓ La técnica de difusión en pozo resulta más efectiva en contraste con la de difusión en disco, ya que se observan mayores halos de inhibición del crecimiento del patógeno en cuestión, empleando extractos algales metanólicos.
- ✓ Los extractos metanólicos de MB y UE tienen mayor capacidad inhibitoria frente a las siete cepas de *P. larvae* en las técnicas de difusión en pozo y difusión en disco.
- ✓ El valor de CIM más bajo es para el extracto metanólico 2X de UE frente a CMM(B)35. De esta manera, resulta ser el extracto con actividad antibacteriana más potente contra *P. larvae* y, por lo tanto, CMM(B)35 la cepa más susceptible.
- ✓ Los solventes de extracción por sí solos no inhiben el crecimiento bacteriano, lo que confirma que la inhibición procede de los compuestos bioactivos presentes en los extractos algales.
- ✓ Los extractos metanólicos de las macroalgas pardas *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* presentan actividad antibacteriana contra *P. larvae*, constituyendo así una alternativa natural para el potencial control de la loque americana.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Salces, R. M., Cugnata, N. M., Guaspari, E., Pellegrini, M. C., Aubone, I., De Piano, F. G., Antúnez, K., & Fuselli, S. R. (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie*, *48*, 387-400.
- Angell, A. R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N. A. (2016). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of applied Phycology*, *28*, 511-524.
- Antúnez, K., Harriet, J., & Zunino, P. (2008). Propóleos como alternativa natural para el tratamiento de colmenas infectadas con esporas de *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana. *Veterinaria (Montevideo)*, *43*(171), 9-14.
- Arribillaga, M. (2021). *Manejo de la loque americana en Argentina, desde su introducción a la actualidad*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina]. Servicio de Difusión de la Creación Intelectual (SEDICI), repositorio Institucional - Universidad Nacional de La Plata.
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food chemistry*, *138* (2–3), 1764–1785.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, *6*(2), 71-79.
- Bastos, E. M. A., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E., & Spivak, M. (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *97*(3), 273-281.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Fierro Morales, W., & Álvarez, A. (2006). Propóleos: Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades. *INTA, Ediciones Magna, Tucumán*, 137-170.
- Chaimanee, V., Thongtue, U., Sornmai, N., Songsri, S., & Pettis, J. S. (2017). Antimicrobial activity of plant extracts against the honeybee pathogens, *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* and their topical toxicity to *Apis mellifera* adults. *Journal of applied microbiology*, *123*(5), 1160-1167.
- Crane, E. (1990). *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. Editorial Heinemann Newnes.
- Damiani, N., Fernández, N. J., Porrini, M. P., Gende, L. B., Álvarez, E., Buffa, F., Brasesco, C., Maggi, M. D., Marcangeli, J. A., & Eguaras, M. J. (2014). Laurel leaf extracts for honey bee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitology Research*, *113*, 701–709.
- Darcy-Vrillon, B. (1993). Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. *44*(1):23-35.
- De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D. W., Evans, J. D., Foster, L. J., Funfhaus, A., García-González, E., Gregorc, A.,

- Human, H., Murray, K. D., Nguyen, B. K.; Poppinga, L., Spivak, M.; Vanengelsdorp, D.,... Genersch, E. (2013). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28.
- De La Sota, M. & Bacci, M. (2005). *Enfermedades de las abejas. Manual de procedimientos del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*. Recuperado de http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/ABEJAS/PROD_PRI MARIA/SANID_APICOLA/EES/INFLUENZA/manual_de_enfermedades_de_las_abejas_2005.pdf
- Dellatorre, F. G., Amoroso, R. O., & Baron, P. J. (2012). *El alga exótica Undaria pinnatifida en Argentina: biología, distribución y potenciales impactos*. Editorial Académica Española. pp. 16-33.
- Dostálsková, S., Urajová, P., Činčárová, D., Vránová, T., Hrouzek, P., Petřivalský, M., Lukeš, M., Čapková Frydrychová, R., & Danihlák, J. (2021). Fatty acids and their derivatives from *Chlorella vulgaris* extracts exhibit in vitro antimicrobial activity against the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research*, 1-13.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Eguaras, M. J., Fuselli, S., Gende, L., Fritz, R., Ruffinengo, S. R., Clemente, G., Gonzalez, A., Bailac, P. N., & Ponzi, M. I. (2005). An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascospaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *Journal of essential oil Research*, 17(3), 336-340.
- Fernández, N. J., Damiani, N., Podaza, E. A., Martucci, J. F., Fasce, D., Quiroz, F., Meretta, P. E., Quintana, S., Eguaras, M. J., & Gende, L. B. (2019). *Laurus nobilis* L. extracts against *Paenibacillus larvae*: antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5), 906-912.
- Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, P., Rada, V., Titera, D., Bednar, M., Stropnický, M., & Kokoska, L. (2010). In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*, 145(1-2), 129-133.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Gende, L. B., Principal, J., Maggi, M. D., Palacios, S. M., Fritz, R., & Eguaras, M. J. (2008). Extracto de *Melia azedarach* y aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha piperita* y *Lavandula officinalis* como control de *Paenibacillus larvae*. *Zootecnia Tropical*, 26(2), 151-156.

- Gende, L. B., Maggi, M. D., Damiani, N., Fritz, R., Eguaras, M. J., & Floris, I. (2009). Advances in the apary control of the honeybee American foulbrood with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. *Bulletin of Insectology*, 62(1), 93-97.
- Gende, L., Mendiara, S., Fernández, N. J., Van Baren, C., Di Leo Lira, A., Bandoni, A. Fritz, R., Floris, I., & Eguaras, M. J. (2014). Essentials oils of some *Mentha spp.* and their relation with antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees, by using the bioautography technique. *Bulletin of Insectology*, 67(1), 13-20.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., & Fries, I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 501-511.
- Genersch, E. (2010). American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S10–S19.
- Gerhardt, P. (1981). *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2012). Dualidad en el efecto de extractos macroalgales del mar Báltico occidental sobre el crecimiento bacteriano. *Revista de biología marina y oceanografía*, 47(1), 75-86.
- González, M. J. (2011). *Caracterización de algunos productos naturales con actividad antimicrobiana contra Paenibacillus larvae, agente causal de Loque Americana*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina].
- Haq, S. H., Al-Ruwaished, G., Al-Mutlaq, M. A., Naji, S. A., Al-Mogren, M., Al-Rashed, S., Ain, Q. T., Al-Amor, A. A., & Al-Mussallam, A. (2019). Antioxidant, anticancer activity and phytochemical analysis of green algae, *Chaetomorpha* collected from the Arabian Gulf. *Scientific Reports*, 9(1), 18906.
- Heredia Martin, J. P. (2015). *Extractos de Achyrocline satureioides (marcela) como alternativa natural para el control de Pseudomonas syringae, fitopatógena de soja y Paenebacillus larvae, agente causal de Loque Americana en Apis melífera*. [Trabajo final para optar al título de Magister en Biotecnología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina].
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*, 44(2), 121-129.
- Isidorov, V. A., Buczek, K., Segiet, A., Zambrowski, G., & Swiecicka, I. (2018). Activity of selected plant extracts against honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*, 49, 687–704.
- Jensen A. (1993). Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia* 260/261, 15-23.

- Lee, R. E. (1980). *Phycology*. Cambridge University Press.
- Lezcano, V., Fernández, C., Parodi, E. R., & Morelli, S. (2018). Antitumor and antioxidant activity of the freshwater macroalga *Cladophora surera*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 2913-2921.
- Mărghitaș, L., Dezmirean, D., Chirilă, F., Fiț, N., & Bobiș, O. (2011). Antibacterial activity of different plant extracts and phenolic phytochemicals tested on *Paenibacillus larvae* bacteria. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 94-94.
- Martelli, F., Cirlini, M., Lazzi, C., Neviani, E., & Bernini, V. (2020). Edible seaweeds and spirulina extracts for food application: in vitro and in situ evaluation of antimicrobial activity towards foodborne pathogenic bacteria. *Foods*, 9(10), 1442.
- Martínez-Pérez de Ayala, L. R., Martínez-Puc, J. F., & Cetzal-Ix, W. R. (2017). *Apicultura: Manejo, Nutrición, Sanidad y Flora Apícola*, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche. 112 p.
- Mendoza, M. L. (1999). Las macroalgas marinas bentónicas de la Argentina. *Ciencia Hoy*, 9(50).
- OIE- World Organization for Animal Health (2018). *Loque Americana de las abejas melíferas*. En: *OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Capítulo 2.2.2, 719-735.
- Ortiz Viedma, J. (2011). *Composición nutricional y funcional de algas pardas chilenas: Macrocyctis pyrifera y Durvillaea antártica*. [Monografía, Universidad de Chile].
- Park, S. Y., Jung, Y. H., Shin, M. O., Jung, B. M., & Bae, S. J. (2005). Effects of antimicrobial and cytotoxicity of *Undaria pinnatifida* sporophyll fractions. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 34(6), 765-770.
- Patra, J. K., Lee, S. W., Park, J. G., & Baek, K. H. (2017). Antioxidant and antibacterial properties of essential oil extracted from an edible seaweed *Undaria pinnatifida*. *Journal of food biochemistry*, 41(1), e12278.
- Qiu, S. (2020). *Evaluating the antimicrobial and antibiofilm activity of a lipid extract from the giant kelp Macrocyctis pyrifera*. [Doctoral dissertation, University of Otago].
- Quitral, V. R., Morales, C. G., Sepúlveda, M. L., & Schwartz, M. M. (2012). Nutritional health properties of seaweeds and its potential as a functional ingredient. *Revista chilena de nutrición*, 39(4), 196-202.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 15(42), 263-268.
- Reynaldi, F. J. & Alippi A. M. (2006). Optimización del desarrollo de *Paenibacillus larvae* en medios semiselectivos. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(2), 69-72.
- Rodríguez, M. A., Fernández, L. A., Díaz, M. L., Pérez, M., Corona, M., & Reynaldi, F. J. (2023). Microbiological and chemical characterization of water kefir: an innovative source of potential probiotics for bee nutrition. *Revista argentina de Microbiología*, 55(2), 176-180.

- Saeed, A. M., Abotaleb, S. I., Alam, N. G., ELMehalawy, A. A., & Gheda, S. F. (2020). In vitro assessment of antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of some marine macroalgae. *Egyptian Journal of Botany*, 60(1), 81-96.
- Sánchez González, G. (2020). *Estudio quimiométrico de la actividad antibacteriana de los extractos de Egregia menziesii*. [Tesis de postgrado. Universidad Veracruzana, México]. Repositorio Institucional - Universidad Veracruzana.
- Schmidt, S. E. (2018). *Impacto de la harina de chía e hidroxitirosol en la ecobiota intestinal de pollos parrilleros. Capacidad inhibitoria in vitro del hidroxitirosol sobre bacterias causantes de ETAs*. [Trabajo de intensificación para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional del Sur, Argentina].
- Silva-Beltrán, N. P., Ruiz-Cruz, S., Ríos, E. M., de J Ornelas-Paz, J., Cira-Chavez, L. A., & Gassos-Ortega, L. E. (2015). Efecto de solventes de extracción en la actividad biológica de extractos de subproductos de la papa (*Solanum tuberosum*). *Biotecnia*, 17(2), 20-25.
- Solana, V. P. (2022). *Caracterización fisicoquímica y nutricional del alga invasora Undaria pinnatifida (Phaeophyceae, Laminariales) y estudio de parámetros de procesamiento y almacenamiento para su utilización en la producción de wakame*. [Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata, Argentina].
- Song, M., Pei, H., Hu, W., & Ma, G. (2013). Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 141, 245–251.
- Von Frisch, K. (1999). *La vida de las abejas*. Editorial Hemisferio Sur.