

**Instituto Tecnológico de Costa Rica**  
**Vicerrectoría de Investigación y Extensión**  
**Dirección de Proyectos**

**ESCUELA DE QUIMICA-ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**Informe Final**

**“Evaluación de organismos quitinolíticos degradadores  
de sustratos de quitina-quitosano para biocontrol y  
biodegradación”**

**INVESTIGADORES:**

M.Sc. Vladimir Villalba Velásquez

M.Sc. Andrés Sánchez Kopper (Coordinador)

Estudiante José Pablo Cruz (Ing. en Biotecnología)

**15-03-2011**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS QUITANASAS.....	8
ORGANISMOS QUITINOLÍTICOS .....	9
APLICACIONES EN CONTROL BIOLÓGICO.....	9
APLICACIONES PARA BIODEGRADACIÓN .....	10
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>12</b>
EXTRACCIÓN DE QUITINA:.....	12
RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	12
AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS QUITINOLÍTICOS.....	13
DESARROLLO DE SUSPENSIONES .....	13
PRUEBAS PRELIMINARES DE BIOCONTROL .....	14
PREPARACIÓN DE MEMBRANAS DE QUITOSANO PARA LA EVALUACIÓN DE DEGRADACIÓN .....	15
EVALUACIÓN COMO DEGRADADORES DE SUSTRATOS .....	15
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>16</b>
EXTRACCIÓN, RECOLECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	16
DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES .....	17
PRUEBAS PRELIMINARES DE BIOCONTROL SOBRE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	18
EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE MEMBRANAS.....	20
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>23</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>24</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>25</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS</b> .....	<b>26</b>

**“Evaluación de organismos quitinolíticos degradadores de sustratos de quitina-  
quitosano para biocontrol y biodegradación”**

Participantes:

Investigadores	Escuela-Centro de Investigación	Jornada asignada al proyecto (h/semana)
MSc. Andrés Sánchez Kopper (Coordinador)	Química-CEQIATEC	5
MSc. Vladimir Villalba Velásquez	Biología-CIB	8
Estudiante José Pablo Cruz	Ingeniería en Biotecnología	10

## Resumen

Los biomateriales son sustancias generadas por diversos mecanismos en la naturaleza, entre ellas están la celulosa, la lignina y la quitina. Se han hecho numerosos estudios para utilizar los organismos quitinolíticos como Biocontroladores por ser degradadores de la quitina; sin embargo, existe poca investigación al respecto y la evidencia de la utilidad de ciertas quitinasas en la degradación de exoesqueletos y hongos (Dahiya *et al* 2006). El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de evaluar la acción de organismos quitinolíticos aislados de varios tipos de suelos que pueden ser utilizados en el Biocontrol o como degradadores de sustratos a base de quitina-chitosano. Se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biocontroladores del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) y en el Centro de Investigación de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQUIATEC) del ITCR en Cartago. Para el aislamiento de los microorganismos se emplearon muestras de suelo recolectadas en el año 2007 en cinco provincias de Costa Rica: Alajuela, Limón, Guanacaste, San José y Cartago tomadas a dos profundidades 0-10 cm y de 10-20 cm con 19 submuestras para la obtención de 2 Kg de suelo/profundidad muestreada. A partir de las muestras colectadas, se obtuvo el aislamiento de cuatro bacterias con potencial quitinolítico, se identificaron tres de las bacterias aisladas como: *Stenotrophomas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter* y *Tsukamurella inchonensis*, la cuarta se logró caracterizar como un bacilo Gram positivo esporulado móvil (BGP). Dos de los cuatro cultivos, *T. inchonensis* y BGP, iniciaron rápidamente el crecimiento exponencial, sin presentar una marcada fase de latencia, es posible que se acorte cuando las bacterias están en un cultivo rico en nutrientes y que suple los requerimientos básicos. El cultivo de *T. inchonensis* fue el que logró una mayor crecimiento bacteriano con 1.7000.000 células/ml de suspensión, seguido de BGP con 1.400.000 células/ml, luego *S. maltophilia* con 500.000 células/ml, por último *R. radiobacter* con 300.000 células/ml. En las pruebas preliminares de Biocontrol sobre *Spodoptera frugiperda* se observó que *S. maltophilia* demostró un potencial que coincide con lo citado por Zhang *et al* 2001. Para la especie *T. inchonensis* no se reportan estudios preliminares en los que se haya evaluado su capacidad productora de quitinasas que puedan potencializarlo como un posible microorganismo biocontrolador de insectos. Se observó que la cepa de *R. radiobacter* fue la que presentó la mayor actividad quitinolítica seguida por *S. maltophili*; esto debido a que para el día cuarto después de la inoculación, tres mariposas ya habían emergido del sustrato, y para el día siete, la totalidad de las pupas asperjadas habían eclosionado, por lo que el porcentaje de emergencias se vio favorecido por la acción quitinolítica de las bacterias. Finalmente se observó que al comparar la degradación de las membranas se puede decir que entre menos viscosidad de la mezcla, menor será el peso molecular promedio del quitosano entrecruzado; por lo tanto al producirse una disminución mayor de la viscosidad de la disolución de la membrana la degradación llevada a cabo por el microorganismo será mayor. No fue posible realizar la determinación del peso molecular promedio de las membranas, ya que el entrecruzamiento no permitió la formación de un hidrogel homogéneo, debido a su baja solubilidad, por lo que la medición de viscosidad no se pudo manejar como dato cuantitativo y solo se discutieron sus tendencias. Bajo las condiciones de cultivo en que se llevó a cabo el experimento se puede observar que *T. inchonensis* fue el microorganismo que realizó la mayor degradación, seguida por BGP y *S. maltophilia*. Mientras que de forma contraria a lo que se observó en las pruebas preliminares de Biocontrol *R. radiobacter* fue la que realizó la menor degradación. Este comportamiento corresponde a la tasa de crecimiento observada para las bacterias estudiadas. La mayor tasa de crecimiento la obtuvo *T. inchonensis* y la menor *R. radiobacter* lo que podría explicar el orden en la magnitud de la degradación.

Palabras clave: Organismo quitinolíticos, Biocontrol, Bioremediación.

## Summary

Biomaterials are substances produced by different mechanisms in nature, which include cellulose, lignin and chitin. There have been numerous studies using chitinolytic organisms as biocontrol agents due to their degrading chitin characteristics, but there is little research and evidence about the usefulness of certain chitinases in the exoskeletons and fungal degradation (Dahiya *et al* 2006). This research was conducted in order to evaluate the action of chitinolytic organisms isolated from various soil types that can be used in the Biocontrol or substrates degrading chitin-chitosan base. The research was conducted on the premises of the Biotechnology Research Center (BRC) and the Research Center of Chemical and Microbiological Services (CEQUIATEC) ITCR in Cartago. The isolation of microorganisms were carried out using soil samples collected in 2007 in five provinces of Costa Rica: Alajuela, Limón, Guanacaste, San José and Cartago taken at two depths 0-10 cm and 10-20 cm with 19 sub-

sampling to obtain 2 kg of soil / depth sampled. From the collected samples, we obtained the isolation of four potential chitinolytic bacteria, identified three of the isolated bacteria as *Stenotrophomas maltophilia*, *Tsukamurella inchonensis* and *Rhizombium radiobacter*, the fourth was characterized as a Gram positive sporulated Mobile (BGP). Two of the four cultures, *T. inchonensis* and BGP, quickly began growing exponentially, without showing a marked latency phase, it is possible to shorten when the bacteria are in a culture rich in nutrients that supply the basic requirements. The cultivation of *T. inchonensis* was the one who achieved a greater bacterial growth with 1.7000.000 cells / ml suspension, followed by com BGP 1,400,000 cells / ml, then *S. maltophilia* with 500,000 cells / ml, last *R. radiobacter* with 300,000 cells / ml. In preliminary tests on *Spodoptera frugiperda* Biocontrol found that *S. maltophilia* showed a potential that coincides with that found by Zhang et al 2001. For the species *T. inchonensis* there was not reported any preliminary studies that have evaluated its capacity to produce chitinases that may place it as a possible bio-controller microorganisms. It was noted that the strain of *R. radiobacter* was the one that showed the highest chitinolytic activity followed by *S. maltophilia*, this because for the fourth day after inoculation, three butterflies had emerged from the substrate, and by day seven, all sprayed pupae had hatched, so that the percentage of emergency was favored by the chitinolytic bacterial action. Finally it was noted that when comparing the degradation of the membranes, it can be said that the less viscosity of the mixture, the lower the average molecular weight of cross-linked chitosan. Therefore, a further decrease in the dissolution viscosity, it will be higher the membrane degradation carried out by the organism. It was not possible to determine the average molecular weight of the membranes, and that interbreeding did not allow the formation of a homogeneous hydro-gel due to its low solubility, so the viscosity measurement could not be handled as quantitative data and only discussed trends was done. Under the conditions in which the experiment was conducted it was noted that *T. inchonensis* was the organism that made the most degradation, followed by BGP and *S. maltophilia*. On the other hand, it was observed that *R. radiobacter* was the one which made the least degradation. This behavior corresponds to the growth rate observed for the bacteria studied. The highest growth rate was obtained by *T. inchonensis* and the lowest *R. radiobacter* which could explain the order in the magnitude of degradation.

## Introducción

El control biológico se emplea como una técnica donde se manipulan una serie de enemigos naturales de las especies consideradas plagas, con el objetivo de reducir, o incluso llegar a combatir por completo, parásitos que afecten una plantación determinada mediante la disminución de sus niveles poblacionales en campo, con esto se pretende controlar las plagas a través de enemigos naturales que son depredadores de la plaga e inofensivos a la plantación (Carballo *et al* 2004).

Se han hecho numerosos estudios para utilizar los organismos quitinolíticos como controladores naturales de hongos patógenos y nematodos; no obstante, estos estudios han procurado identificar el efecto de las quitinasas sobre la estructura de los estadios larvales en insectos y en hongos. Por ejemplo, desde 1963 Mitchell y Alexander observaron que todas las bacterias micolíticas producían quitinasa, lo cual podía degradar la pared celular del hongo que contenía quitina, como uno de sus principales componentes (Okumoto *et al* 2001). También se han reportado para el control de mosquitos, los cuales son portadores de enfermedades tales como “fiebre amarilla” y “dengue”, entre otros potenciales organismos plagas (Carballo *et al* 2004).

El método de control biológico puede ser eficaz sobre los estados larvarios de los insectos de crecimiento en los suelos, es razonable que la acción de enzimas que degraden su estructura física afectaría de manera considerable la capacidad de gestación y proliferación de los organismos capaces de generar una plaga. Estos organismos degradadores de quitina, han sido definidos como aquellos capaces de degradar quitina por hidrólisis o bandas glucosídicas (False & Panda, 2000) y han sido utilizados como Bioplaguicidas; sin embargo, existe poca investigación al respecto, a pesar de que existe evidencia de la utilidad de ciertas quitinasas en la degradación de exoesqueletos y hongos (Dahiya *et al* 2006).

Por lo anteriormente expuesto, la investigación de estos organismos sobre las etapas larvarias de los insectos que pueden ser plagas para los cultivos de la región, presentan una ventaja sobre la alternativa sintética dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP), debido a la especificidad del ataque. Considerando además su uso potencial sobre sustratos constituidos de quitina y quitosano, de gran aplicación en muchos campos tales como: farmacia, medicina, alimentación y tratamiento de aguas entre otros, que posterior a su uso puede acelerarse su degradación por la acción de este tipo de microorganismo.

Los biomateriales son sustancias generadas por diversos organismos en la naturaleza en grandes cantidades, entre ellas están la celulosa, la lignina y la quitina. Estas sustancias cumplen diversas funciones biológicas tanto de soporte como para alimentación. La quitina es un polímero de N-acetil D-glucosamina unido por enlaces  $\beta(1,4)$  y está presente en la naturaleza en el exoesqueleto de artrópodos, en la pared celular de hongos, como polisacárido estructural, en hongos filamentosos, donde constituye el 16% de su masa seca, en la pared celular de levaduras y también en conchas de crustáceos y nemátodos (Metcalf *et al* 2002).

La quitina tiene propiedades antimicrobianas, anticolesterol y antitumorales, además de ser usadas para tratamiento de aguas y como fibra dietética (Dahiya *et al* 2006). Estudios con rayos X demostraron que existen tres tipos de polimorfismos de quitina,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -quitina, que difieren en la distribución espacial de las cadenas del polímero. En la  $\alpha$ - quitina la distribución

de las cadenas es antiparalela, esta es la forma más abundante encontrada en la naturaleza; en la  $\beta$ -quitina las cadenas están distribuidas paralelamente y en la  $\gamma$ -quitina están mixtas (Felse & Panda 2000).

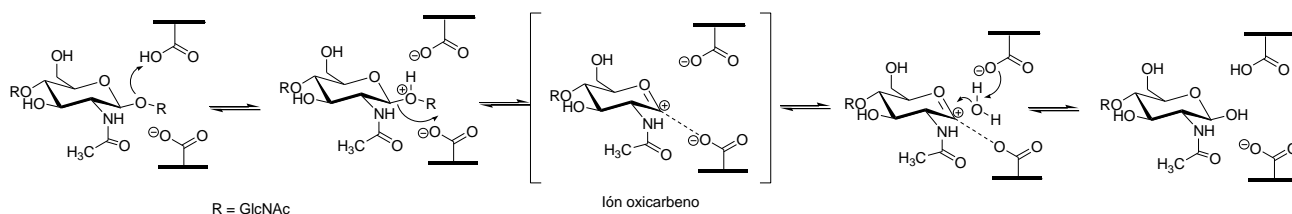
Por su parte las quitinasas, que son enzimas degradadoras de quitina, se encuentran en microorganismos como: virus, bacterias, hongos, insectos, plantas y animales (De Boer *et al.* 1999). La presencia de quitinasas tienen diversos usos, entre ellos patogenicidad (virus), roles morfogénicos y de nutrición (hongos) y parasitismo (bacterias) (Dahiya *et al.* 2006). El aislamiento de éstos organismos mediante la inoculación en un medio rico en quitina es exitoso porque se enriquece en número a aquellos microorganismos capaces de degradar el polímero y parasitar a los organismos que contienen gran cantidad de quitina en sus estructuras (Felse & Panda 2000).

Existen dos grandes grupos de quitinasas: las endoquitinasas y las exoquitinasas, aunque para algunos autores las clasifican en tres. Están las endoquitinasas degradan sitios internos aleatorios generando pequeñas masas moleculares de N-acetil D-glucosamina. Las exoquitinasas tiene una actividad progresiva que inicia en los extremos no reductores de la quitina liberando así unidades de diacetil quitobiosas (Felse & Panda 2000). Las quitobiosas (tercera clasificación para algunos autores) hidrolizan quitobiosa a N-acetil-D-glucosamina. Existen tres tipos de familias de quitinasas (18,19 y 20), las cuales entre ellas difieren en estructura 3D, secuencia aminoacídica y mecanismos moleculares (Dahiya *et al.* 2006).

## Mecanismos de acción de las quitinasas

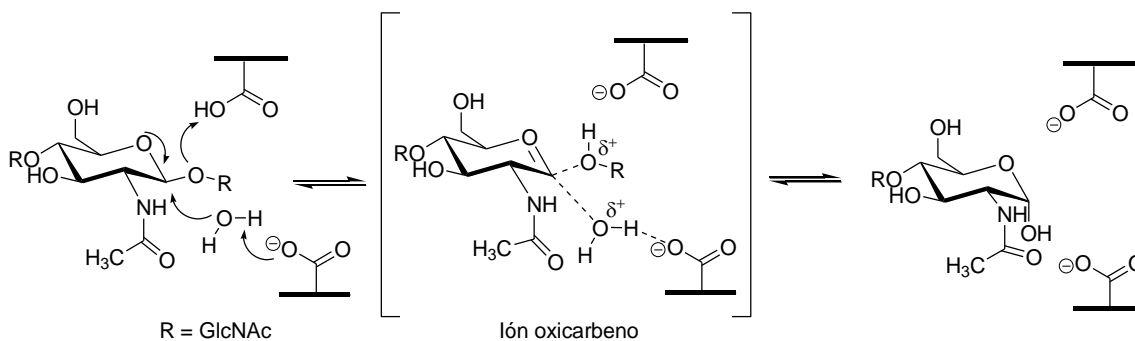
Según Dahiya *et al*, 2006, existen dos rutas metabólicas para la degradación de quitina basadas en glucosil hidrólisis ácido-catalizada:

1. Retención de la estereoquímica del oxígeno anomérico en el C<sub>1</sub> relativa con la configuración inicial: el oxígeno β(1,4)-glucosídico es protonado, provocando un intermediario de oxcarbeno que se estabiliza por un carboxilato y posteriormente el ataque nucleofílico del agua produce la hidrólisis del polímero.



**Figura 1. Mecanismo de retención de estereoquímica mediante desplazamiento.**  
(tomado de Dahiya *et al* 2006)

2. Inversión de la estereoquímica: Dos residuos ácidos son necesarios en el sitio activo, lo que provoca una hidrólisis con la inversión de la configuración.



**Figura 2. Mecanismo de inversión mediante desplazamiento.**  
(tomado de Dahiya *et al* 2006)



## **Organismos Quitinolíticos**

Un organismo quitinolítico se define como aquel capaz de degradar quitina por hidrólisis o bandas glucosídicas de la quitina utilizando quitinasas (Felse & Panda 2000). Diversas especies de bacterias, estreptomicetes, actinomicetos, hongos y plantas producen enzimas quitinolíticas. Ejemplos de lo mismo son las bacterias del género *Aeromonas* y *Serratia*; y hongos del género *Gliocladium* y *Trichoderma* que han demostrado tener potencial de controladores biológicos de diversos hongos fitopatógenos (Chernin *et al* 1995). Además de la estimulación de organismos mucolíticos, la liberación de NH<sub>3</sub> durante el proceso de la degradación de quitina también contribuye a la reducción en la población de hongos fitopatógenos (De Boer *et al* 1999, Felse & Panda, 2000).

Existen evidencias de bacterias productoras de quitinasas que no afectan a los hongos, esto indica que la susceptibilidad del hongo está relacionada con la producción de diversos antibióticos (De Boer *et al* 1999). La biosíntesis de quitina aparece como un carácter bioquímico primitivo de la células animales vegetales inferiores; con respecto a la evolución, se pudo observar como un organismo quitinófago intensificó la biosíntesis de enzimas especializadas para su degradación a la que se le dio el nombre de quitinasa; a través del tiempo se ha visto un punto de especificidad que en artrópodos y vertebrados la quitinasa únicamente se encuentra en organismos insectívoros y frugívoros (Crusafont, sf)

Se recomienda el uso de agar más quitina para la prueba de actividad quitinolítica debido a la mayor detección de las cepas quitinolíticas a corto plazo. También, este medio de cultivo es útil para la conservación de la característica quitinolítica del microorganismo aislado (Okumoto *et al* 2001). La habilidad de producir quitinasa en los medio Agar Quitina (AQ) y Agar Nutrientes Quitina (ANQ), es clave para asegurar la capacidad del microorganismo de sobrevivir en medios con mucha o poca cantidad de nutrientes; condiciones similares a las que se presentan en la naturaleza (González *et al* 1996).

## **Aplicaciones en Control Biológico**

Los organismos quitinolíticos se han utilizado también como bioplaguicidas; aunque no existen muchos estudios que lo evidencien, se ha demostrado la utilidad de ciertas quitinasas en la degradación de exoesqueletos y hongos del suelo, incluso, se reporta un estudio realizado con Allosamidin, un inhibidor de quitinasa, para el control del ácaro *Tetranychus urticae* y del insecto *Musca domestica* una vez ingeridos por éstos (Dahiya *et al* 2006).

Con respecto a los hongos, que ha sido el área más estudiada, se busca disminuir la cantidad de fungicida aplicado en campos de cultivo para sustituirlo con microorganismos quitinolíticos aislados desde las plantaciones con la problemática. La aplicación de quitina sobre las plantas provoca el crecimiento de hongos actinomicetos y bacterias quitinolíticas. Este aumento poblacional está correlacionado con la disminución de nemátodos y hongos, disminuyendo así enfermedades y daños en las plantaciones y en las cosechas (Ramírez 1996).

Existe evidencia que la presencia de organismos quitinolíticos puede controlar a *Fusarium* (Ramírez 1996). En *S. plymuthica* C48 su actividad quitinolítica inhibe la germinación de la espora y la elongación del tubo germinativo en *Botrytis cinerea*. La habilidad de producir

quitina extracelular es considerada crucial para *Serratia marcescens* para actuar como antagonista sobre *Sclerotium rolfsii*, y para *Paenibacillus* sp y *Streptomyces* sp para suprimir *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Compant *et al* 2005). Sigatoka Negra es el hongo más agresivo y de mayor importancia que ataca el cultivo de banano. Al ser *Mycosphaerella fijiensis* un hongo Ascomycete, sus miscelios poseen paredes de quitina muy gruesa; por tal razón existe mucha investigación realizada en Costa Rica con respecto al control biológico de este hongo tan agresivo utilizando microorganismos quitinolíticos antagonistas al patógeno (González *et al* 1996).

La adición de quitina al suelo infestado por *Fusarium oxysporium* sp. *cubense*, estimuló a bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales controlaron al patógeno debido a la digestión de las paredes del hongo, que también contiene quitina. Los organismos quitinolíticos afectan a los hongos debido a la digestión de la quitina presente en la pared de las hifas (González 1995). Un ejemplo de bacteria quitinolítica utilizada para control biológico es *Enterobacter cloacae* porque sirve como biocontrolador de diferentes hongos de suelo que atacan a cultivos como: frijol, algodón y chayote; como lo son: *Pythium* spp., *Fusarium* sp y otras enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

La competencia por nutrientes en la rizosfera fue considerado como estrategia de colonización así como también la producción de metabolitos secundarios, los cuales resultaron ser parecidos a antibióticos y metabolitos volátiles antifúngicos. Otro mecanismo supresor de hongos en *Enterobacter* spp es la actividad quitinolítica que presentan algunas cepas de *E. cloacae* (Chernin *et al* 1995). Diversos estudios indican que la mayor actividad quitinolítica se encuentra en los géneros *Aeromonas*, *Bacillus* y *Vibrio*. Esto se determinó mediante la medida del radio de la zona lítica donde crecieron las colonias en las placas de Petri (Felse & Panda 2000).

### **Aplicaciones para biodegradación**

La quitina es de los polisacáridos naturales más abundantes en la naturaleza. En las últimas décadas la quitina y el quitosano han sido objeto de múltiples estudios enfocados a la producción de nuevos materiales con gran variedad de usos y aplicaciones, ya sea en forma natural como con modificaciones químicas. Se utilizan en fotografía, cosméticos, oftalmología, fabricación de papel, farmacia y en el tratamiento y purificación de agua (Ravi Kumar 2000).

Este proyecto de investigación pretendió evaluar la posibilidad de generar membranas de quitosano que puedan ser utilizadas en sistemas de purificación de aguas mediante la absorción de metales pesados. Basados en lo anteriormente expuesto, una de las posibles aplicaciones para la biodegradación de materiales elaborados a base de quitosano, es el uso de bacterias degradadoras para la eliminación de membranas contaminadas con éstos metales.

**Objetivo General:** Evaluar la acción de organismos quitinolíticos extraídos de suelos que puedan ser utilizados en el Biocontrol o como degradadores de sustratos a base de quitina-quitosano.

**Objetivos Específicos:**

1. Colectar en cinco localidades del país y en suelos con vocación agrícola muestras a dos profundidades de muestreo para ser llevadas al laboratorio para su análisis.
2. Aislar en medios de cultivos selectivos los posibles microorganismos quitinolíticos presentes en las muestras de suelo colectadas.
3. Identificar taxonómicamente los organismos quitinolíticos aislados de las muestras de suelo en medios de cultivo selectivo.
4. Evaluar a nivel de invernadero el potencial Biocontrolador de los organismos identificados sobre pupas de suelo.
5. Evaluar en membranas de quitosano y floculados de quitosano la degradación de los organismos seleccionados en el objetivo 4.

## **Metodología**

### **Extracción de Quitina:**

Para el desarrollo de los medios de cultivo se extrajo quitina de conchas de camarón jumbo comercial utilizando una adaptación del procedimiento establecido por Okumoto (1992), donde la quitina fue completamente secada en una estufa a 60°C, para utilizarse pura y no en suspensión coloidal.

### **Recolección y preparación de muestras**

Se emplearon muestras de tierra recolectadas en el año 2007 en 5 diferentes zonas de Costa Rica: Alajuela, Limón, Guanacaste, San José y Cartago. El muestreo de suelo se realizó en forma de zig-zag con barreno de “rabo de chanco” en la que se tomaron dos profundidades determinadas según los suelos muestreados, los muestreos en cada punto de colecta se realizó de la siguiente manera: el primero se hizo entre los 0-10 cm de profundidad y el segundo entre los 10-20 cm de profundidad sobre el primer punto muestreado; cada muestreo fue colocado en envases de plástico de 20 litros de capacidad debidamente rotulados con la profundidad muestreada, en total se realizaron 19 submuestreos por profundidad los cuales y con ayuda de la mano se mezclaron buscando la homogeneidad de la muestra que permitiera la obtención de unos 2 kilos de tierra por profundidad. Las muestras de suelo fueron trasladadas al invernadero de docencia de la Escuela de Biología, ITCR, Cartago.

En maceteros plásticos de color negro y de unos 8 litros de capacidad se fueron colocando capas consecutivas de los suelos muestreados intercalados con cáscaras de camarón previamente trituradas manteniendo de forma aleatoria las capas en cada macetero. Estas macetas fueron colocadas en el Invernadero de Docencia del ITCR durante un año y sembradas con plantas de tomate, chile dulce, maíz y plantas espontáneas que se desarrollaron en cada una de las macetas sembradas. En el año 2008 se eliminó todo el material vegetal que sobre ellas se había desarrollado y sobre un plástico grueso de color negro se volteó cada maceta y se mezcló muy cuidadosamente con las manos y la ayuda de palas de jardín para tomar un kilo de la muestra de cada maceta. Esta muestra se mezcló sobre el mesón de trabajo hasta lograr su homogenización, y de ella y en balanza analítica se pesaron 100 g de la muestra de suelos los cuales fueron transferidos a vasos de precipitado de 1 L a 1,5 L de capacidad y llevados al laboratorio de Biocontrol del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB). En el laboratorio a cada muestra de suelo se le añadieron 900 ml de agua destilada y se agitó cada muestra por espacio de 5 minutos cada una. Seguidamente se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 en tubos de ensayo de aproximadamente 15 ml de capacidad, colocando 9 ml de agua destilada estéril y 1 ml de la solución madre para obtener la dilución 1:10, seguidamente se agitó y se tomó 1 ml de ésta solución 1:10 y fue transferido a un tubo de ensayo de 15 ml en donde previamente se había colocado 9 ml de agua destilada estéril para obtener la dilución 1:100 y por último se tomó 1

ml de la solución 1:100 y fue transferido a otro tubo de ensayo de 15 ml en donde previamente se había colocado 9 ml de agua destilada y estéril para obtener la dilución 1:1000. Se agitaron las tres diluciones hasta homogenizarlas.

### **Aislamiento, purificación e identificación de los microorganismos quitinolíticos.**

Con la ayuda de una micropipeta se procedió a sembrar 100 µl de cada una de las diluciones de las muestras de suelo sobre placas de Petri con medio agar-quitina; preparado con 9,5% de agar y 0,2% de quitina pura a pH de 6,0. Seguidamente se guardaron por 96 horas, en posición invertida en cámara climática oscura con temperaturas entre 28 – 32 °C realizándose observaciones a las 24, 72 y 96 horas (Figura 3). Se aislaron y subcultivaron exclusivamente las colonias bacterianas que se desarrollaron exitosamente en el medio agar-quitina, ignorando y descartando el desarrollo de hongos y levaduras. Una vez aisladas y establecidas en cultivo axénico, se enviaron muestras de las bacterias al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Costa Rica donde fueron identificadas mediante el sistema de identificación Biolog.



**Figura 3.- Aislamiento y purificación de los organismos quitinolíticos mantenidos entre 28-32°C en el laboratorio de Biocontrol del CIB**

### **Desarrollo de suspensiones**

Se tomó una colonia de cada bacteria quitinolítica aislada e identificada y a partir de cada una de ellas se establecieron suspensiones en 25 ml de caldo nutritivo a base de peptona y extracto de carne (CN). Las suspensiones se desarrollaron a 35°C en erlenmeyers de 100ml en agitación a 100 rpm. A partir del momento de inoculación se realizaron conteos directos al

microscopio con el uso de una cámara de Neubauer cada 3 horas durante 15 horas para un análisis de crecimiento microbiano. Para ello se realizó una tinción con safranina mezclando iguales proporciones del colorante y de cada suspensión en tubos de eppendorf; se agitó suavemente y se observó al microscopio con un aumento de 100x empleando aceite de inmersión. A partir de cada conteo se calculó el número de bacterias por ml de suspensión para elaborar una curva de crecimiento de cada bacteria, en función del tiempo.

### **Pruebas preliminares de biocontrol**

Se colocó un sustrato universal estéril comercial “Blumenerd<sup>®</sup>” a base de suelo y material orgánico en 5 recipientes plásticos redondos de 15 cm de diámetro por 8 cm de altura. En cada recipiente se colocaron 5 pupas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de la cría artificial mantenida en el laboratorio de biocontroladores del CIB (figura 4A). Posteriormente se cubrieron las pupas con una capa de 0,5 cm de sustrato y en cada uno de los recipientes plásticos se asperjaron 25 ml de cada suspensión bacteriana identificada a una concentración de:  $5,02 \times 10^5$  células/ml,  $2,96 \times 10^5$  células/ml,  $1,74 \times 10^6$  células/ml y  $1,38 \times 10^6$  células/ml. El último recipiente se utilizó como testigo, aplicando 25 ml de agua destilada estéril. Cada recipiente se llevó al invernadero de Biocontrol y se colocó en una jaula fabricada con un cilindro de acetato de 50 cm de altura y 18 cm de diámetro con dos tapas plásticas una en la parte superior del cilindro a la que previamente se le había removido el fondo y se le colocó una tela fina de organza que permitía la libre circulación del aire en el interior de la jaula y otra en la parte inferior que impedía la entrada y salida de insectos de cada recipiente plástico (figura 4B). Se realizaron evaluaciones diarias de emergencia de polillas adultas del lepidóptero en cada tratamiento.



**Figura 4A.- Envase plástico con las cinco pupas seleccionadas para la prueba preliminar de Biocontrol. B.- Jaula cilíndrica plástica que permitió visualizar los adultos emergidos.**

## **Preparación de membranas de quitosano entrecruzadas para la evaluación de degradación**

Para la preparación de las membranas de quitosano entrecruzadas se utilizaron quitosano marca Sigma-Aldrich de peso molecular intermedio. Se preparó una disolución de 5% m/m de quitosano en ácido acético al 1,5%. Porciones de 5 g se colocaron en placas de Petri y estas se colocaron bajo atmósfera de amonio durante la noche. Las membranas se secaron a 40°C durante 1 día y posteriormente se pusieron en contacto con una disolución 0,25 % m/m de glutaraldehído durante 5 minutos. Seguidamente las membranas se lavaron con agua desionizada y se procedió a realizar nuevamente el secado.

## **Evaluación como degradadores de sustratos**

Se inocularon, por triplicado, membranas de quitosano entrecruzado con cada una de las cuatro bacterias identificadas a razón de 1ml de solución bacteriana madre/placa Petri; donde el inóculo quedó en contacto directo con las membranas de quitosano entrecruzadas. Se colocaron en incubadora llevando un control visual de la degradación durante 15 días.

Un vez transcurrido los 15 días los restos de membranas degradadas fueron lavados y secados en estufa a 30°C durante una noche. Con cada una de las membranas degradadas se prepararon, dejando en agitación durante 3 días, mezcladas al 1% m/m (membrana/ácido acético 1%) obteniéndose un gel para cada una de las membranas tratadas; seguidamente a estos geles se les determinó la viscosidad utilizando un viscosímetro Brookfield DV-11+Pro con usillos (“spindles”) 62, 63 y 64 ajustando a un porcentaje de torque mayor al 20%.

## Resultados y Discusión

### Extracción, recolección, aislamiento e identificación de las muestras

La extracción realizada a partir de los suelos intercalados con las cáscaras de camarón permitió obtener el aislamiento de bacterias quitinolíticas sobre los medios selectivos de AQ y ANQ. Este protocolo de extracción, desarrollado por Okumoto (1992), se basa en la degradación de los compuestos constituyentes de la cáscara del camarón mediante reacciones continuas con un ácido fuerte (HCl) y una base fuerte (NaOH) a altas concentraciones. La gran estabilidad de los residuos de N-acetil D-glucosamina que componen la quitina le permite resistir estos cambios extremos de pH sin que su estructura molecular sea alterada (Zang *et al*, 2001).

El aislamiento realizado a partir de las muestras recolectadas y preparadas de suelo, que fueron inoculadas sobre medio selectivo AQ, permitió el aislamiento de cuatro bacterias con potencial quitinolítico. Se identificaron tres de las bacterias aisladas como: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter* y *Tsukamurella inchonensis*, la cuarta bacteria no pudo ser identificada por Biolog, pero sí logró ser caracterizarla como un bacilo Gram positivo esporulado móvil (referido en este estudio como BGP) (Figuras 5 A, B, C y D).

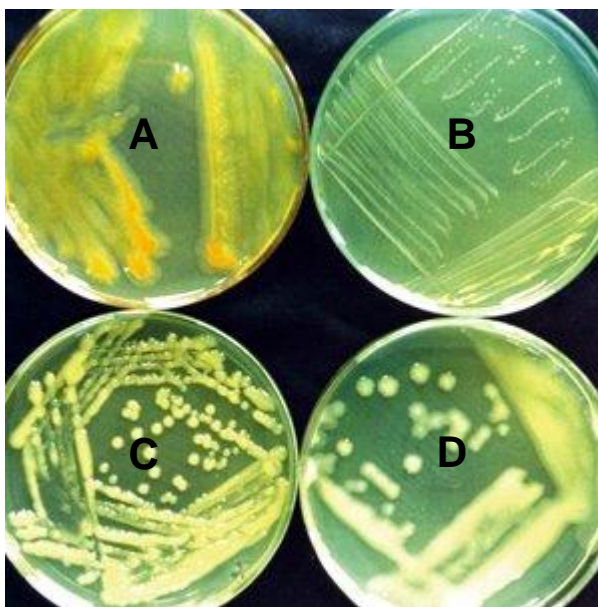


Figura 5A.- *Stenotrophomonas maltophilia*. B.- *Rhizobium radiobacter*. C.- *Tsukamurella inchonensis*. D.- bacilo Gram positivo esporulado móvil (referido en este estudio como BGP).



## Desarrollo y crecimiento de las suspensiones celulares

En la figura 6 es posible observar que dos de los cuatro cultivos, *T. inchonensis* y BGP, iniciaron rápidamente la fase exponencial sin presentar una marcada fase de latencia; es posible que la fase de latencia se acorte de esta manera cuando las bacterias en estudio provienen de un cultivo no tan rico en nutrientes y son inoculadas en un medio que supla en abundancia todos los requerimientos que estas necesitan (Madigan *et al.*, 2009). En este caso las bacterias quitínolíticas se encontraban en un medio AQ, el cual cubría las necesidades nutricionales básicas de éstas; cuando fueron inoculadas en CN, se promovió rápidamente la división celular y por consiguiente el aumento en el número de individuos en la colonia de *T. inchonensis* y BGP. Lo anteriormente escrito no se observó en los cultivos de *S. maltophilia* y *R. radiobacter* bien sea por aleatoriedad de las condiciones del medio de crecimiento o porque el metabolismo de estos microorganismos difiere significativamente de las otras dos especies y por consiguiente requieren una etapa de adaptación mayor al ser transferidas del AQ a otro medio de cultivo diferente. Por otra parte a las nueve horas de incubación, a 37°C y en agitación, el crecimiento bacteriano de todos los cultivos había llegado a su fase estacionaria.

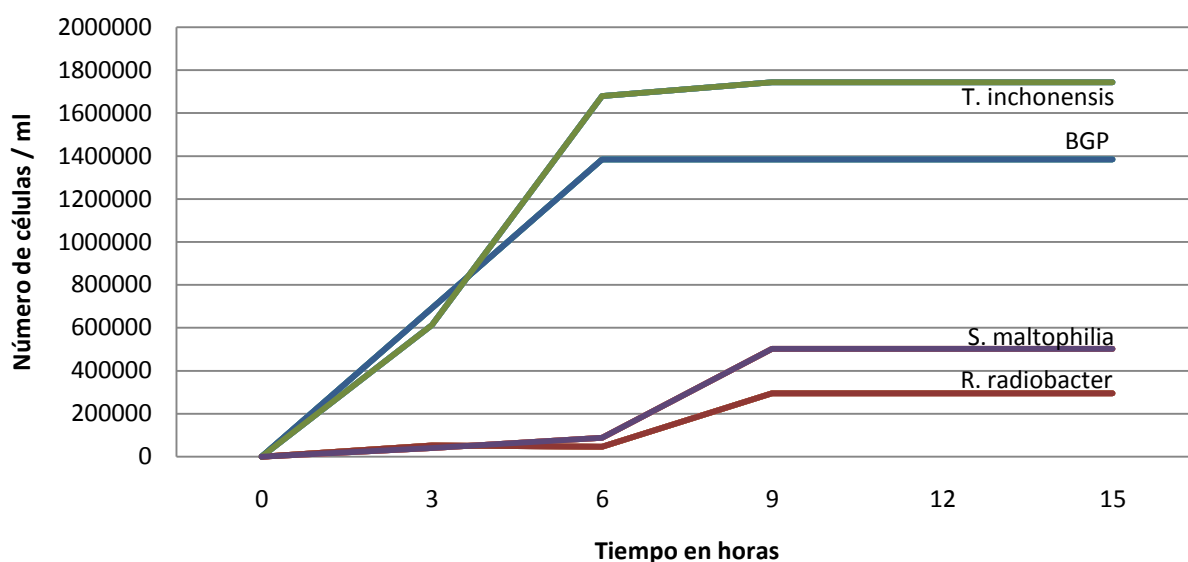


Figura 6. Curva de crecimiento de bacterias quitínolíticas

En un medio de cultivo el crecimiento bacteriano se ve directamente relacionado con la disponibilidad o agotamiento de los nutrientes, por consiguiente presenta cuatro fases a saber: inicia con la fase lag o de latencia que consiste en un crecimiento individual dado por el aumento del tamaño y el peso de las células; ésta fase se observa fácilmente en *S. maltophilia* y *R. radiobacter*, no así en *T. inchoensis* y en BGP. Posterior a esta sigue la fase de crecimiento exponencial, etapa en la cual se da la división celular por fisión binaria generando en cada división dos células hijas idénticas a la célula madre que le dio origen; de esta manera, el crecimiento poblacional de la fase exponencial se basa en éste concepto que genera el tiempo de duplicación, el cual se conoce como aquel que tarda una población en duplicar su número (Felse *et al*, 2000; Metcalfe *et al*, 2002; Benintende *et al*, 2010).

Una vez que se agota un nutriente esencial, este se convierte en una limitante del crecimiento, así mismo, si en el medio se acumulan algunos desechos del metabolismo estos pueden llegar a convertirse en inhibidores del crecimiento bacteriano y en consecuencia se llega a una tercera fase conocida como estacionaria, en la cual, no hay aumento ni descenso neto en el número de células de la población. Se puede observar en la figura 6 que tres de las bacterias muestran el inicio de esta fase alrededor de las nueve horas de cultivo en suspensión, mientras que BGP muestra el inicio de la fase estacionaria más temprano, alrededor de las seis horas a partir de la inoculación en el medio CN. Finalmente, si continúa la incubación, las células mueren por lo que la población bacteriana llega a disminuir, tal y como también lo reportan Madigan *et al.*, 2009.

Al analizar la figura 6 y después de contabilizar el número de células/ml presentes en la fase estacionaria se tiene que de las cuatro bacterias analizadas se determinó que el cultivo de *T.inchonensis* fue el que logró un mayor crecimiento bacteriano, ya que su crecimiento exponencial se dio desde el inicio del cultivo hasta las nueve horas siguientes, contabilizándose en ésta fase la cantidad de 1.700.000 células/ ml de suspensión para esta especie, seguidamente está el cultivo de BGP, el cual a pesar de ser el único que entró en fase estacionaria a las seis horas, su crecimiento exponencial fue tal que presentó cerca de 1.400.000 células/ml; el siguiente y en orden decreciente fue el cultivo de *S. maltophilia*, quien presentó una fase estacionaria con un aproximado de 500.000 células/ml. Por último, el cultivo de *R. radiobacter* fue el que presentó menor crecimiento, logrando producir aproximadamente 300.000 células/ml durante su fase estacionaria.

### **Pruebas preliminares de Biocontrol sobre *Spodoptera frugiperda***

Tras la realización de las pruebas preliminares de control biológico sobre pupas de *Spodoptera frugiperda*, en el cuadro 1 se muestran los porcentajes de adultos emergentes a partir del cuarto día, debido a que los primeros 3 días no se observó ninguna actividad de los adultos.

Con respecto al potencial quitinolítico de *S.maltophilia* como biocontrolador, Zhang *et al.* 2001 confirmaron la capacidad de esta bacteria para producir quitinasas y observaron su función en el combate de *Bipolaris sorokiniana*, un hongo fitopatógeno capaz de producir importantes enfermedades foliares en cultivos de importancia económica. Así mismo, en su estudio determinaron que los aislados de la bacteria preinducidos en medio con quitina mostraban un mejor control de la enfermedad que aquellos cultivados en medios con glucosa como fuente de carbono. En el caso de *R. radiobacter* no se reportan estudios previos acerca del potencial biocontrolador específico de esta bacteria para degradar quitina. En una investigación realizada por Mutluru y Mallaiah en el año 2008 se aislaron 26 cepas de *Rhizobium* sp. con actividad quitinolítica; en dicho estudio la cepa con mayor actividad quitinolítica fue identificada como *Rhizobium* sp., la cual a su vez presentó un alto grado de similitud con *R. radiobacter*, en este caso la máxima actividad se presentó luego de 36 horas de incubación a pH neutro. Para la especie *T. inchonensis* no se reportan estudios preliminares en los que se haya evaluado su capacidad productora de quitinasas que puedan potencializarlo como un posible microorganismo biocontrolador de insectos.

**Cuadro 1. Porcentaje de adultos emergentes de pupas de *S. frugiperda* bajo acción biocontroladora de cuatro bacterias quitinolíticas**

CEPA	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7
<i>S. maltophilia</i>	60%	80%	80%	100%
<i>R. radiobacter</i>	60%	80%	100%	100%
<i>T. inchonensis</i>	20%	60%	60%	60%
BGP	0%	60%	60%	60%
Control	20%	20%	40%	60%

Teóricamente al inocular las pupas de *Spodoptera frugiperda* en presencia de un sustrato cargado de estos microorganismos, la viabilidad de estas se vería reducida y no sería posible el nacimiento de los adultos, ya que las bacterias degradarían la quitina que las conforma, causando su muerte. No obstante, los resultados anteriormente expuestos contradicen esta hipótesis, ya que los porcentajes de emergencia de adultos más bien fueron

promovidos en presencia de la acción quitinolítica de las bacterias posiblemente debido a que al encontrarse las pupas en un estadio avanzado de desarrollo la actividad degradadora de quitina llevada a cabo por las bacterias favoreció la emergencia del insecto adulto; coincidentalmente Yuan, 2006 reporta que al encontrarse las pupas en un estado avanzado de maduración, las estructuras anatómicas del adulto están completamente formadas y muy cercanas a la emergencia del capullo, por lo que probablemente les restaba solamente abrirlo. En un caso como este, la acción degradadora de la cubierta de quitina se mostraría más bien como un estímulo para la liberación del adulto completamente formado por lo que la acción degradativa de las bacterias estimuló su emergencia en lugar de causar algún daño sobre su fisiología.

Esta no es la única explicación considerada, ya que cabe destacar la posibilidad de que la actividad quitinolítica de las bacterias surja solamente mediante el establecimiento sinérgico de estas cuatro especies, como un proceso de biodegradación alcanzado por la complementación de las rutas metabólicas de cada microorganismo individual; porque en estos procesos metabólicos desarrollados por las comunidades, una bacteria puede actuar sobre el producto de otra, o trabajar a partir de compuestos liberados por un microorganismo previo siempre y cuando no existan metabolitos tóxicos que perjudiquen a la población (Rivera, W. 2010). En cualesquiera de los panoramas expuestos, la acción de los microorganismos con capacidad quitinolítica es degradar los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de las unidades de N-acetil-glucosamina que componen la quitina, gracias a la acción de quitinasas, como sucede con los géneros *Mucor* y *Aspergillus* (Madigan *et al.*, 2009).

En el cuadro 1 se puede observar que la cepa de *R. radiobacter* fue la que presentó la mayor actividad quitinolítica sobre las pupas de *Spodoptera frugiperda*, seguida por *S. maltophili*, esto, debido a que para el día cuatro después de la inoculación, tres mariposas ya habían emergido del sustrato, y para el día siete, la totalidad de las pupas asperjadas con estas bacterias habían eclosionado. En contraposición, la cepa BGP tuvo la menor actividad debido a la tardanza en la eclosión de solo tres de las cinco pupas sembradas. Finalmente, en cuanto a *T. inchonensis* la actividad quitinolítica fue intermedia, en comparación con las demás especies evaluadas. Es importante hacer énfasis en que el análisis del porcentaje de emergencia de adultos para las pruebas preliminares de biocontrol se pudo observar que los resultados sobre la acción de las cepas de interés como biocontroladoras, dependió por completo del estado de desarrollo biológico y fisiológico de las pupas, lo cual se encuentra directamente relacionado con la afectación positiva o negativa que éstas pueden enfrentar al inocularse con las bacterias en estudio.

### **Evaluación de la degradación de membranas**

La comparación de la degradación de las membranas con las cuatro bacterias aisladas se realizó mediante las mediciones de viscosidad de disoluciones preparadas con éstas y que ya

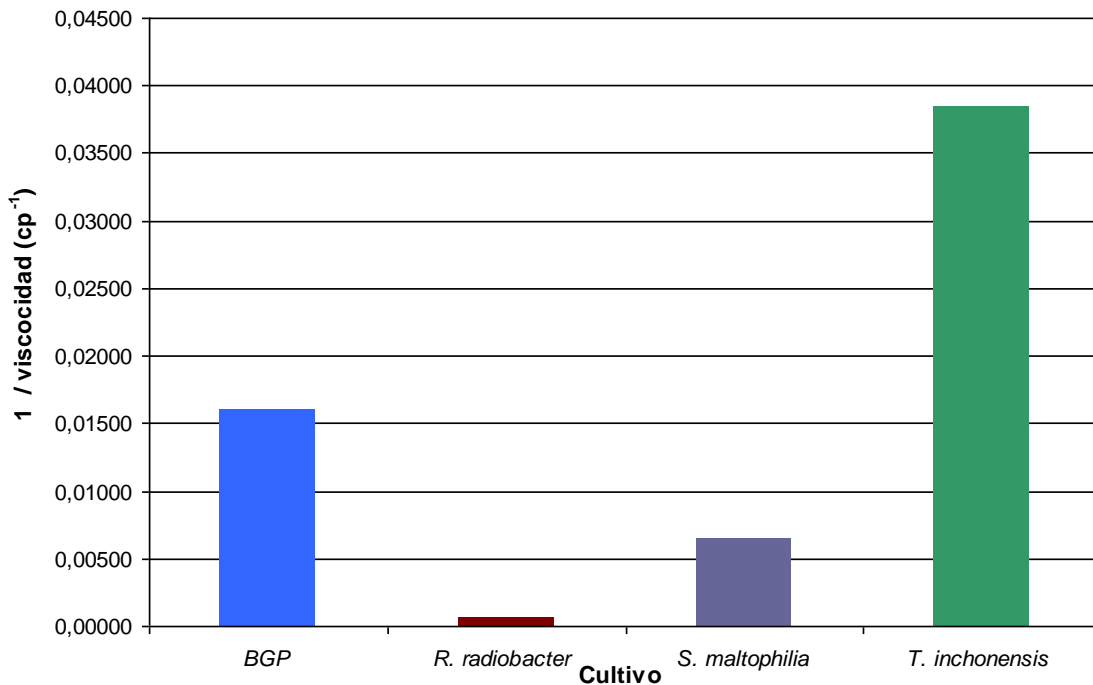
habían pasado por el proceso de degradación. Al ser la viscosidad ( $\eta$ ), de una disolución de composición conocida de membrana, una medida relacionada con el peso molecular promedio del polímero ( $M$ ) según la ecuación de Mark-Howink-Sakura (Ravi Kumar *et al* 2000) es la siguiente:

$$[\eta] = K M^a \quad (1)$$

Se puede decir que entre menor viscosidad de la mezcla, menor será el peso molecular promedio del quitosano entrecruzado. Por lo tanto al producirse una disminución mayor de la viscosidad de la disolución de la membrana la degradación llevada a cabo por el microorganismo será mayor. (Brandrup, J.1999).

Al realizar la medición de la viscosidad promedio de las mezclas 1% m/m (membrana degradada/1% ácido acético) se pudo obtener una visión cualitativa de la degradación llevada a cabo por los microorganismos. No fue posible realizar la determinación del peso molecular promedio de las membranas de quitosano entrecruzadas, con lo que se obtendría un dato de mayor fidelidad, ya que el entrecruzamiento no permitió la formación de un hidrogel homogéneo debido a su baja solubilidad, por lo que la medición de viscosidad no se pudo manejar como dato cuantitativo y solo se discuten tendencias.

Graficando el inverso de las viscosidades promedio de las disoluciones de las membranas de quitosano entrecruzadas degradadas por las cuatro especies bacterianas aisladas e identificadas se obtuvo lo que muestra en la figura 7.



**Figura 7. Comparación de la viscosidad promedio como indicador de degradación, con diferentes cultivos bacterianos, de membranas de quitosano entrecruzadas.**

Bajo las condiciones de cultivo en que se realizó el experimento se puede observar que *T. inchoensis* fue el microorganismo que realizó la mayor degradación, continuando con BGP y *S. maltophilia*. Mientras que de forma contraria a lo que se observó en las pruebas preliminares de biocontrol *R. radiobacter* fue la que realizó la menor degradación. Este comportamiento corresponde a la tasa de crecimiento observada para las bacterias estudiadas. La mayor tasa de crecimiento la obtuvo *T. inchoensis* y la menor *R. radiobacter*. Lo que podría explicar el orden en la magnitud de la degradación.

En cuanto a la metodología empleada, aún cuando resultó una medición cualitativa interesante, es necesario optimizar la formación de la disolución de membrana de quitosano entrecruzada buscando diferentes solventes, o realizar pruebas con membranas de quitosano sin entrecruzar; esto con el fin de obtener una metodología que permita determinar el grado de degradación cuantitativamente y realizar la cinética de degradación de las membranas para poder estimar tiempos de degradación total.

No fue posible realizar la evaluación de degradación de membranas contaminadas con metales pesados ya que la preparación de estas dependía del desarrollo de otro proyecto de investigación, y no fue posible obtenerlas.

## Conclusiones

- En medio agar-quitina se aislaron cuatro especies de bacterias con acción quitinolítica provenientes de dos diferentes profundidades en suelos muestreados en: Alajuela, Limón, Guanacaste, San José y Cartago. Fueron identificadas como: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter* y *Tsukamurella inchonensis*, la cuarta bacteria solo pudo ser identificada como un bacilo Gram +, esporulado y móvil (BGP).
- La evaluación del crecimiento de las cuatro bacterias colectadas y aisladas demostró, que bajo las condiciones de cultivo desarrolladas, la mayor tasa de crecimiento se observó en el *T. inchonensis*, seguida del crecimiento de BGP la cual precedió la tasa de crecimiento del cultivo de *S. maltophilia* y el menor crecimiento poblacional se obtuvo en el cultivo de *R. radiobacter*.
- El análisis de los resultados preliminares basados en el porcentaje de emergencia de los adultos de pupas de *Spodoptera frugiperda* sobre la acción de las cepas aisladas como biocontroladoras, se obtuvo que la cepa de *R. radiobacter* fue la que presentó la mayor actividad quitinolítica seguida por *S. maltophili* y por *T. inchonensis*; la cepa BGP tuvo la menor actividad quitinolítica sobre las pupas de *S. frugiperda*.
- No se cuenta con estudios científicos reportados en la literatura que sea referidos a la evaluación de la capacidad quitinolítica de *S. maltophilia*, *T. inchonensis* y *R. radiobacter*, por lo que la presente investigación posee gran importancia para el posible uso de estas bacterias como biocontroladoras de insectos plagas en investigaciones futuras.
- Sobre la capacidad degradadora de membranas de quitosano entrecruzadas se pudo observar de forma cualitativa que la cepa que realizó la mayor degradación fue la *T. inchonensis* seguida de BGP, posteriormente la *S. maltophilia* y por último *R. radiobacter*, orden que corresponde al seguido por la evaluación del crecimiento de las bacterias evaluadas.

## Recomendaciones

- En primera instancia, se recomienda la aplicación de la combinación de las cepas sobre las pupas de *Spodoptera frugiperda* lo que permitiría corroborar la acción conjunta de estos microorganismos y compararla con su acción individual, con el fin de evidenciar posibles establecimientos sinérgicos dentro de esta comunidad.
- Realizar una curva de desarrollo de las pupas de *Spodoptera frugiperda* que permita establecer el nivel de estadio más adecuado para su inoculación con el sustrato y las bacterias, y así comprobar el potencial de degradación que éstas poseen. O también pensar en otro insecto de suelo como el género *Phyllophaga* que tanto daño causa a las plantas cultivadas.
- Emplear cultivos control con los géneros *Mucor* y *Aspergillus* como inóculo bacteriano, debido a que se conoce su capacidad degradadora de quitina que permitan compararlos con la actividad quitinolítica de las bacterias experimentales aisladas.
- Recurrir a centros de investigación con mayor nivel de especialización a nivel taxonómico que permita la identificación de la cuarta bacteria aislada y la cual se clasificó como un bacilo Gram +, esporulado y móvil (BGP).
- Realizar nuevamente el procedimiento en la evaluación de la capacidad degradadora de las cepas bacterianas aisladas pero utilizando diferentes disolventes o membranas de quitina o quitosano sin entrecruzar porque así se podría disolver después de la degradación y con eso se podría tener un resultado experimental más cuantitativo y obtener el análisis cinético que permita calcular estimados de tiempo de degradación total.
- Realizar el análisis de biodegradación con membranas que hayan sido utilizadas para la remoción de metales pesados en agua.



## **Agradecimientos**

- Expresamos nuestro agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo económico facilitado para la culminación de este proyecto.
- Al estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología José Pablo Cruz por su colaboración como asistente técnico del proyecto.

## Referencias Bibliográficas citadas

- Brandrup, J. Immergut, E. H. Grulke, E. A. Polymer Handbook. 4 ed. Wiley-Interscience. EEUU. 1999. p 747.
- Benintende, S; Sánchez, C. 2010. Crecimiento bacteriano. Universidad Nacional de Entre Ríos. Extraído de <[http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf)> (31 Octubre, 2010)
- Chaves, N. Monge, C. y Murillo, C. 2010. Pruebas de actividad quitinolítica de cuatro cepas bacterianas aisladas y su potencial como controladores biológicos de *Meloidogyne sp.* Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Chernin, L. Ismailov, Z. Haran, S. Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Applied and environmental microbiology, Vol. 61, No. 5 p. 1720–1726.
- Compant, S. Duffy, B. Nowak, J. Clement, C. Barka, E. 2005. MINIREVIEW: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Applied and environmental microbiology. p. 4951–4959 Vol. 71, No. 9.
- Dahiya, N. Tewari, R. Singh, G. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Application of Microbiological Biotechnology 71: 773–782.
- De Boer, W. Gerards, S. Klein Gunnewiek, P. Modderman, R. 1999. Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. Biol Fertil Soils 29 :170–177.
- De Boer, W. Gunnewiek, P. Lafeber, P. Janse, J. Spit, B. Woldendorp, J. 1997. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. Soil Biology and Biochemistry. 30(2): 193-203.
- Felse, P. Panda, T. 2000. Production of microbial chitinases- A review. Bioprocess Engineering. 23:127-134.
- González, R. Bustamante, E. Shannon, P. Ruiz, C. 1996. Avances en el Control Biológico de Sigatoka Negra. X Congreso Nacional Agronómico, CATIE, Costa Rica.
- González, R. 1995. Efecto de Microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka Negra en banano. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 94pp.
- Metcalf, A. Krsek, M. Gooday, G. Prosser, J. Wellington, E. 2002. Molecular Analysis of a Bacterial Chitinolytic Community in an upland pasture. Applied and environmental microbiology, Vol. 68, No. 10 p. 5042–5050.
- Mutluru, S; Mallalah, K. 2008. Factors effecting chitinase activity of Rhizobium sp. from Sesbania sesban. Biología. Vol.63;no.3; pp307-312.
- Okumoto, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R, CATIE.
- Okumoto, S. Bustamante, E. Gamboa, A. 2001. Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* in Vitro. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 59 p. 58 - 62.
- Ramírez, C. 1996. Efecto de las prácticas agrícolas sobre la microflora del suelo: Oportunidades en la fotoprotección. X Congreso Nacional Agronómico, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.
- Ravi Kumar, M. N. V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46 (1), 1-27.
- Sastoque, E. 2005. Aislamiento y Selección de Microorganismos Productores de Quitinasas a partir de Residuos de Concha de Camarón con Potencial Biocontrolador. Tesis para optar al grado de Microbiólogo Industrial, Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Sastoque, L. Mercado, M. Martínez, M. Quevedo, B. y Pedroza, A. 2007. Producción de Quitinasas

extracelulares con una cepa Alcalófila Halotolerante de *Streptomyces sp.* aislada de residuos de camarón. Rev. Mexicana de Ingeniería Química. año/vol.6, número 002. pp137-146

W. De Boer, W. Gerards, S. Klein Gunnewiek, P. Modderman, R. 1999. Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. Biol Fertil Soils 29 :170–177.

Yuan, K. 2006. Microbial Biotechnology principles and applications. Segunda Edición. World Scientific Publishing.

Zhang, Z; et al. 2001. Chitinases from plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Phytopathology. Vol.91; no.2; pp204-211

Zenner, I. Arévalo, H. Mejía, R. 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas Vol 1 N° 1 103-113 pp.