

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES
DE QUITINASAS A PARTIR DE RESIDUOS DE CONCHA DE CAMARÓN
CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR**



EDER LEONARDO SASOQUE CALA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAS DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL, AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ D.C
2005**

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES
DE QUITINASAS A PARTIR DE RESIDUOS DE CONCHA DE CAMARÓN
CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR**

EDER LEONARDO SASTOQUE CALA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar el título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL, AGRÍCOLA Y VETERINARIO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL, AGRÍCOLA Y VETERINARIA.

BOGOTÁ D.C

2005

Nota de advertencia

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis, Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contengan

Ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas El anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N.13 de julio de 1946

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES
QUITINASAS A PARTIR DE RESIDUOS DE CONCHA DE CAMARÓN CON
POTENCIAL BIOCONTROLADOR**

EDER LEONARDO SASTOQUE CALA

ANGELA UMAÑA M. phill
Decano Académico

DAVID GÓMEZ
Director de Carrera

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL, AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ
2005**

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo la Biotecnología ha buscado la manera de utilizar materias existentes en la naturaleza para convertirlas en nuevas fuentes que permitan la fabricación de distintos productos y la optimización en los procesos de manejo de materia residual de las diversas industrias, incluyendo la camaronera; ya que en nuestro país, los desechos de este tipo de industrias son vertidos al mar o enterrados afectando gravemente el entorno natural.

La quitina es un componente fundamental de este tipo de residuos y se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en forma de un polisacárido constituido por largas cadenas monoméricas del azúcar N-acetilglucosamina. Éstos monómeros se encuentran unidos de manera covalente por enlaces tipo β 1-4, los cuales juegan un papel importante en su estructura molecular, ya que esta forma auténticos tejidos que le confieren resistencia y soporte a los organismos (San-lang y Sau-Hwa, 2001).

Los residuos de tipo quitinolítico que se desechan dentro de las actividades de la industria camaronera. No son reciclados fácilmente en el ambiente y por lo tanto, requieren de la aplicación de metodologías adecuadas para explotar su potencial; la quitina es un claro ejemplo de ello. Para dar solución a este problema se han implementado proyectos con alguna experiencia extranjera y con la colaboración del gobierno local, que proponen la utilización de microorganismos que directa o indirectamente obtengan quitina a partir de residuos de la industria pesquera. En Colombia existen diferentes entidades que dedican sus esfuerzos a la implementación de tecnologías novedosas en cuanto a la gestión de los residuos sólidos provenientes de la actividad pesquera, un ejemplo de ellas es la Red Panamericana de Manejo Ambiental de Residuos (REPAMAR).

A escala industrial los productos residuales de la industria pesquera, se eliminan en exceso sólo con algunas medidas ambientales, pero no se ha explotado el verdadero potencial de los mismos para el desarrollo de nuevos productos que ayuden no solo en el aspecto ambiental, sino también en el mejoramiento de la calidad de vida de las personas que se ven afectadas por éste problema.

Biológicamente es posible degradar, de manera rápida, éstos residuos ya que su ciclo natural involucra periodos no muy extensos de tiempo y las reacciones que hacen parte de los procesos degradativos mantienen éste elemento en forma disponible para los microorganismos encargados de su procesamiento. Algunas investigaciones (Win, 2001 y Svitil *et al* 1997) reportan que existen géneros bacterianos quitinolíticos como actinomicetes, *Serratia marcencens*, *vibrio sp*, capaces de degradar éste compuesto en moléculas más sencillas de asimilar como monómeros de n-acetilglucosamina en condiciones naturales y haciendo menos agresivos este tipo de residuos con el medio ambiente.

El objetivo de éste trabajo fue el aislamiento y caracterización de microorganismos quitinolíticos de alta eficiencia y calidad, mediante un proceso de selección a partir de residuos de la industria camaronera, a su vez, se determinó la capacidad de éstos microorganismos para producir las enzimas quitinolíticas bajo condiciones óptimas de crecimiento y se establecieron metodologías que permitieron evaluar la efectividad y aplicabilidad de las cepas aisladas en diferentes áreas de la biotecnología, como el control biológico; así como también, su futura aplicabilidad en diferentes campos dentro de la industria camaronera, por ejemplo en la solución de problemas ambientales y su intervención en las etapas tempranas de la cría de camarón, más exactamente en su alimentación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. INDUSTRIA CAMARONERA.

El camarón es un crustáceo invertebrado, el cual está cubierto de un fuerte esqueleto externo (exoesqueleto), que muda periódicamente, conforme el animal engorda. El esqueleto exterior tiene característica de engrosar más que en los otros crustáceos y es de un color grisáceo casi transparente. Los camarones tropicales tienen extravagantes formas y colores. Algunos pueden alcanzar una longitud de hasta 23 cm; nadan hacia adelante gracias a sus filamentos abdominales y también hacia atrás con facilidad, por su cola en forma de abanico. Su esqueleto externo (carapacho) los cubre desde la cabeza hasta el abdomen. (Acuavisión, 1987)

A pesar de que la industria del camarón de cultivo es una actividad relativamente reciente en Colombia estructurada en 1983 en el marco de una política estatal de fomento y promoción de las exportaciones, ha presentado una dinámica creciente. Así en el año 2001 se produjeron 11.493 toneladas, participando la Costa Atlántica con el 97% de la producción y la Costa Pacífica con el resto (Figura 1). El Acuerdo de Competitividad destaca además que Colombia con 3.14 dólares por kilo en el año 2001, obtuvo menores costos de producción frente a grandes productores mundiales que en promedio presentaron 3.33 dólares por kilo (Acuanal, 1998)

Entre las ventajas comparativas del país para la producción de camarones están las condiciones naturales favorables del Atlántico, tales como temperatura, luminosidad y baja incidencia de fenómenos climáticos; el alto grado de integración de los eslabones de la cadena y el estricto control de calidad. La principal desventaja está relacionada con el tamaño pequeño de la camaricultura colombiana, que no permite desarrollar economías de escala. (Amortegui y Fernandez, 2001).

Tabla 1. PRODUCCIÓN NACIONAL DE CRUSTÁCEOS

	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Oc. pacífico	4658	4333	6930	3292	4273	1918	2603	2916	2085	4139	5154	4243
Langosta		13	6	6	15	13	9	6	3	4	7	6
Langostino	1036	1257	1958	920	468	579	549	759	619	1091	1487	1495
Camarón tigre	1917	2607	3795	1702	1426	686	1932	1835	1037	2683	2784	2263
coliflor								59	367	317	559	345
Otros camarones	1705	456	1171	664	2364	640	113	224	2	16	282	122
cangrejos								33	57	28	35	12
Oc. atlántico	2350	2731	2365	2509	6382	3162	1680	1171	1539	916	1984	728
langosta	342	363	327	356	497	524	218	97	449	185	108	319
langostino	2008	2361	1972	2088	5807	2272	1210	992	391	710	1745	377
Camarón varios		7	66	65	78	366	252	17	518			
cangrejos								65	181	21	131	32

Fuente: Boletín estadístico pesquero INPA1999. Ministerio de Agricultura

2.1.1. RESIDUOS INDUSTRIALES DE LAS EMPRESAS CAMARONERAS.

“Por desecho o materias orgánica de peces resultantes del procesamiento del pescado y otros organismos marinos se entenderán los desechos sólidos producidos por el procesamiento industrial de peces en su estado natural o cultivados y otros organismos marinos y están constituidos por peces, partes de peces no procesados como cabezas, colas, aletas, escamas, huesos, pieles, carne, órganos internos, así como partes orgánicas y las conchas quitinosas de otros organismos marinos, como crustáceos, holoturioides, etc, cualquier otro desecho sólido , como los materiales de embalaje, los guantes, tapones para el oído, tiras de caucho y otro equipo utilizado en el procesamiento industrial que se pueden verter juntos con el pescado,

proceso que no se debería realizar y menos verterlos en el mar.” (Cabello *et al* 1988)

Durante el procesamiento de los peces, crustáceos y otros organismos de origen marino, se generan gran volumen de desechos, entre ellos cabezas, colas, entrañas y órganos internos, que pueden representar hasta el 60% del organismo marino antes del procesamiento (según las especies procesadas). Hasta hace poco era una práctica común deshacerse de esos desechos en el mar, con el peligro de producir una sobrecarga en el ecosistema, produciendo efectos nocivos y menoscabando la calidad humana. Estos peligros son particularmente elevados cuando los desechos se vierten en cuencas hidrográficas poco profundas y semicerradas.

Los componentes orgánicos de los desechos tienen una elevada demanda biológica de oxígeno (DBO₅); y se pueden descomponer rápidamente si no se manejan de manera adecuada, generando problemas ecológicos y de salud. Es imperativo tomar en consideración el tiempo transcurrido entre la producción y eliminación definitiva. Debido a la proliferación problemas estéticos y fuertes olores como resultado de la putrefacción sino se almacenan de manera adecuada y se eliminan rápidamente.

Para el tratamiento del desecho con miras a transformarlo en harinas de pescado se ha considerado una solución viable pero el estado del desecho debe ser fresco. También pueden utilizarse procesos de compostaje para la degradación natural de los desechos generando subproductos de interés económico como fertilizantes orgánicos. (Boletín, 1997)

La eliminación de los desechos sólidos procedentes del procesamiento de productos del mar se debe efectuar primordialmente en una instalación de recuperación de productos secundarios. Sino se dispone de dicha instalación, o el volumen de desecho de pescado supera la capacidad de la

instalación de recuperación de productos secundarios y no puede hacerse cargo del desecho sólido, el desecho se podrá descargar en la tierra.

Por otra parte, en la biosfera, son enormes las cantidades de quitina que se sintetizan por los diferentes organismos, y cerca de 10^{11} toneladas métricas se producen anualmente en la biosfera acuática solamente. Sin embargo, no hay acumulación sustancial de quitina en los sedimentos oceánicos, ya que las partículas quitinosas son efectivamente degradadas y catabolizadas por las bacterias marinas tan pronto como llegan al fondo del océano. Estudios realizados por (Yu *et al*, 1991), indicaron que los océanos podrían agotar totalmente su contenido de carbono y nitrógeno en un tiempo relativamente corto si la quitina no fuera devuelta al ecosistema en una forma biológicamente utilizable. Estas observaciones indican que las bacterias marinas juegan un importante papel ecológico en la degradación de quitina en los océanos. (Tsuji *et al*, 1998)

2.2. LEGISLACIÓN

A continuación se describe de manera no textual los decretos que hacen parte del marco jurídico general del sector ambiental, y que son de gran importancia para la industria en mención.

El Decreto 1594 de 1984, se hace relación al manejo y uso del agua y los residuos líquidos, la caracterización fisicoquímica de una fuente hídrica natural, lo cual permite definir su uso según un determinado número de variables (Artículos 38-50). Los usos que allí se consideran tienen que ver con el consumo humano por tratamiento convencional o sólo desinfección, agrícola, pecuario, recreativo y preservación de flora y fauna. Dentro de las consideraciones más relevantes del Decreto encontramos:

- En uso estético no habrá material flotante, espumas provenientes de actividad humana, grasas y aceites y sustancias que produzcan olor (Art. 44).

Con relación a los vertimientos, cabe citar los siguientes artículos:

- La Entidad Encargada del Manejo y Administración del Recurso (EMAR), fijará en cada caso las normas que deben cumplir los vertimientos con base en los usos asignados al recurso (Art. 65 y 66).
- La autoridad Ambiental puede solicitar a cualquier usuario la caracterización de sus residuos líquidos, indicando variables, frecuencia, y demás aspectos que consideren pertinentes. La caracterización del vertimiento debe actualizarse cada año (Art. 100).
- Si la captación y la descarga se realizan en un mismo cuerpo de agua, en las mediciones se descontarán las cargas de los contaminantes existentes en el punto de captación (Art. 67)
- La autoridad ambiental deberá establecer multas o tasas retributivas que estarán relacionadas directamente con la carga del contaminante en el vertimiento y el grado de deterioro e importancia del cuerpo receptor (Art. 142 a 149).

Otras normas de importancia expuestas en otros decretos son:

- Se prohíbe hacer vertimientos sin tratamientos a aguas que puedan contaminar o eutroficar las fuentes naturales, causar daño o poner en peligro la salud humana, impedir el desarrollo normal de flora y fauna o impedir sus usos (D. 1541 de 1978, Art. 165).
- El ejercicio de cualquier actividad que pueda causar contaminación en el mar requiere permiso (D. 2811 de 1974, Art. 165).

Según lo establecido en la Política Nacional para la Gestión de Residuos Sólidos debe establecerse una diferencia entre los conceptos de residuos y

basuras. Residuos son todos aquellos que mediante cualquier forma de aprovechamiento se reincorporan al ciclo económico, mientras que basura es lo que no se aprovecha, no reingresa al ciclo económico y va a disposición final. El concepto de basura es relativo, por que todos los residuos son potencialmente aprovechables dependiendo de la disponibilidad tecnológica y financiera. (Muñoz,1999)

Según el decreto 2106 de 1983 en su artículo 107 del Ministerio del Medio Ambiente, expone que la recuperación de residuos sólidos a partir de basuras tiene dos propósitos. La recuperación de valores económicos y energéticos utilizados en el proceso primario de elaboración de productos y la reducción de la cantidad de basura producida para su disposición sanitaria.

El decreto 1713 de 2002 reglamenta el servicio público de aseo enmarcándolo dentro de la gestión integral de los residuos sólidos ordinarios, solicita a los distritos que elaboren un plan para la gestión integral de residuos sólidos de acuerdo a la política expedida por el ministerio, y da un plazo para la elaboración e iniciación de la ejecución del plan de dos años.

2.3. LA QUITINA

La quitina es el compuesto orgánico que más abunda en el planeta después de la celulosa, y cumple misiones semejantes de protección y resistencia en animales inferiores y hongos. (Herrera, 1993)

Es un polisacárido versátil formado por el azúcar N-acetilglucosamina, unida mediante enlaces β -1.4 tal como se aprecia en la figura 1, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, aunque el lugar donde posiblemente más abunda es el océano, siendo producida por muchos

organismos marinos incluyendo zooplancton y muchas especies de fitoplancton (Cottrell *et al.* 1999). Los quitosanos son polímeros naturales similares a la quitina en los cuales, tal vez solamente el 30% de las moléculas de glucosamina se encuentran acetiladas. Las cadenas de quitina de más de seis o siete monómeros son insolubles; las cadenas pueden comprimir muchos miles de monómeros. Las formas rígidas y extendidas de las moléculas son una consecuencia de los enlaces β -1.4 que generan una disposición en zig-zag entre los puentes de oxígeno vecinos. Las moléculas planas, similares a un listón, empacadas en un orden paralelo, se mantienen juntas mediante puentes de hidrógeno. Los arreglos son altamente cristalinos cuando las moléculas están empacadas apretadamente, y son más amorfas cuando el empaquetado es menos fuerte (Warren, 1996).

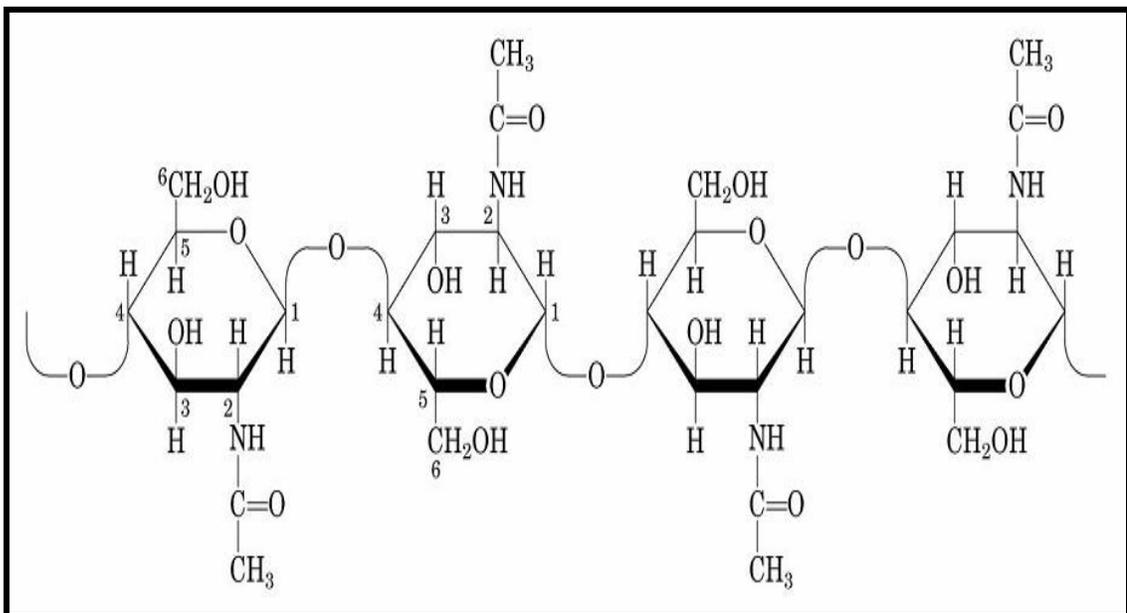


Figura 1. Estructura molecular de la quitina

Fuente: (Sabry, 1992)

La quitina tiene tres formas naturales del polisacárido: alfa, beta, y gamma; las cuales difieren entre si por su estructura cristalina. En la forma alfa, la

mas abundante, las cadenas son antiparalelas, es decir, cada cadena dispuesta en un sentido contrario que se complementan una con la otra de la misma forma que la hélice del ADN. La beta quitina tiene las cadenas paralelas, la gamma quitina, la mas rara de las tres formas, presenta, por cada cadena dispuesta en un sentido, dos que se orientan en sentido opuesto.

No se conocen las razones por las que la quitina se puede cristalizar, en condiciones naturales, en tres formas distintas, pero el fenómeno evidencia varias consecuencias. En primer lugar las tres tienen propiedades distintas que les permiten acometer funciones diferentes: así la forma alfa es la más rígida y cumple funciones esqueléticas, en tanto las otras dos, capaces de hidratarse, desarrollaron propiedades mecánicas semejantes a las del cartílago. Por otro lado, el hecho de que las cadenas de forma alfa sean antiparalelas indica que los procesos de síntesis y ensamblaje de cadenas para crear las microfibrillas no pueden ser simultáneos en el tiempo, sino separados (Herrera-Ruiz, 1993).

La quitina constituye uno de los polisacáridos más insolubles que existen, lo que explica la dificultad que entraña determinar el tamaño de sus cadenas poliméricas. Las bacterias carecen de ella, entre los protozoos, muchos ciliados utilizan la quitina para construir estructuras protectoras (lórigas) a semejanza de los corales: múltiples amebas, todas las parásitas de animales forman quistes de quitina, este polisacárido lo hallamos en las colonias (Herrera-Ruiz, 1993).

Esta presente en algas, como en las diatomeas y los crisoflagelados. En los hongos con excepción de los oomicetos, ese polisacárido se erige en el principal compuesto del armazón de la pared celular. (Herrera-Ruiz, 1990)

Al ser la quitina un polímero tan insoluble, a lo largo de los tiempos se han desarrollado diferentes metodologías para lograr su obtención en materias más pequeñas y fáciles de utilizar por los microorganismos degradadores en el ambiente.



Figura 2. Aspecto físico de la quitina y sus derivados.

Fuente: (Acuavision, 1987)

2.4. MICROORGANISMOS QUITINOLÍTICOS.

Siendo la quitina el segundo compuesto más abundante en la naturaleza, se puede deducir que la tendencia evolutiva de la misma ha dotado a cientos de organismos con la capacidad y maquinaria enzimática para aprovechar de alguna manera ésta fuente de energía. La capacidad de degradar quitina

se encuentra ampliamente diseminada entre varios grupos taxonómicos de procariotas incluyendo bacterias como *Vibrio sp*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio furnissii*, *Photobactrium sp*, enterobacterias, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces lividans*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, clostridios y arqueobacterias. Las bacterias emplean una gran cantidad de proteínas, incluyendo proteínas ligadoras de quitina para degradar este compuesto, pero la hidrólisis mediante quitinasas es el paso clave para la solubilización y mineralización de la quitina (San-lang *et al* 2001).

La capacidad de degradar quitina podría ser un importante atributo de las bacterias marinas dada la alta cantidad de quitina en forma de detritos, que entra al mar. Las bacterias quitinolíticas son detectadas típicamente ya sea por la formación de zonas de aclaramiento en agáres que contienen quitina, o por la hidrólisis de sustratos fluorogénicos análogos de la quitina. El ensayo para las zonas de aclaramiento, sugiere que el 10% de las bacterias cultivables degradan quitina, mientras que la porción de cepas que hidrolizan el sustrato análogo puede llegar a un 90%.

Aún no es claro cual técnica ofrece resultados más precisos, ya que ambas técnicas tienen desventajas; la producción de zonas de aclaramiento requiere de la excreción y difusión de la enzima en el medio circundante, en tanto que, la hidrólisis del sustrato análogo puede simplemente reflejar la capacidad de degradar oligómeros pequeños. Además, ya sea que uno u otro de los métodos basados en cultivo refleje la verdadera proporción de microorganismos degradadores de quitina en comunidades bacterianas naturales, es incierto; ya que sólo una pequeña parte (<1%) de los microorganismos de agua de mar pueden ser cultivados, y aquellas bacterias cultivadas no son representativas de bacterias naturales no cultivadas. (Cottrell *et al.* 1999)

Uno de los microorganismos del cual se conoce más acerca de su maquinaria quitinolítica es ***Serratia marcescens***. Ésta bacteria presente en suelos y en el intestino de las lombrices rojas californianas, produce quitinasas de dos tipos, ChiA y ChiB, las cuales pertenecen a la familia 18. ChiA tiene una longitud de 538 aminoácidos, en tanto que ChiB posee 488. Además, ***S. marcescens***, también produce una quitobiasa de 95 kDa. Otra especie perteneciente a éste género, ***S. liquefaciens***, también produce dos quitinasas y una quitobiasa. (Warren, 1996)

Dentro del grupo de los actinomicetes, varios microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces*, son productores de enzimas quitinolíticas. Por ejemplo, ***S. lividans*** produce por lo menos tres quitinasas. Una de ellas, ChiC, es una proteína modular de 589 aminoácidos, con un dominio N-terminal familia II, ligador de celulosa, conectado a un dominio catalítico C-terminal, de la familia 18. La conexión es mediada por una secuencia fibronectina de tipo III-like. ChiD es probablemente un fragmento proteolítico de ChiC. ***S. plicatus***, produce múltiples quitinasas, ambas endo y exoquitinasas. La endoquitinasa Chi-63 es muy similar a ChiC de ***S. lividans***, con un dominio N-terminal, ligador de quitina, conectado a un dominio catalítico C-terminal de la familia 18, de la misma manera descrita anteriormente. ***S. olivaceoviridis*** también es un productor de múltiples quitinasas, pero algunas de ellas son fragmentos proteolíticos de otras. Una exoquitinasa de 565 aminoácidos tiene un dominio proteinasa N-terminal conectado a un dominio catalítico C-terminal familia 18 mediante una secuencia fibronectina tipo III-like. Muchas cepas de *Streptomyces* sp, son quitinolíticas, aunque muchas más especies deben ser analizadas, y aquellas que han sido encontradas hasta la fecha, deben ser estudiadas con mayor profundidad, ya que la similaridad de los sistemas quitinasas de *Streptomyces* sp. Es impactante, y éstas diferencias podrían llevar a mayor aplicabilidad de las quitinasas. (Warren, 1996)

Otro de los géneros bacterianos que ha sido reportado como productor de enzimas quitinolíticas, corresponde a ***Vibrio sp. Vibrio harveyi*** el cual fue identificado como productor de dos enzimas involucradas en la degradación de quitina. El primer gen secuenciado codifica para una quitobiasa, la cual rompe el enlace que une dos unidades de *N*-acetilglucosamina en la quitobiosa. El otro gen, *ChiA*, codifica una quitinasa, la cual fue descrita como la enzima quitinolítica principal en ***V. harveyi***. Igualmente ***Vibrio furnissii***, demostró que contenía otras dos enzimas de ésta naturaleza, Quitodextrinasa y *N*-acetil- β -glucosaminidasa, las cuales se involucran con la degradación total de la quitina (Svitil *et al.* 1997).

En general son muchos los géneros bacterianos que incorporan la quitina y muchos los modelos que se han propuesto para describir la vía metabólica que interviene en la degradación bacteriana de la quitina. A continuación se describe uno de ellos propuesto por (Yu *et al.* 1991). En éste modelo (figura 3), el microorganismo encuentra la quitina por colisión aleatoria u otro mecanismo. Allí se une a el y por medio de las quitinasas extracelulares lo degrada en oligosacáridos que pueden entrar en la zona periplásmica. Posteriormente estos oligosacáridos son degradados en residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNac). Y estos son llevados luego al citoplasma mediante la vía del fosfoenol-piruvato utilizando el sistema GlcNac fosfotransferasa. A partir de aquí, la GlcNac-6P sufre una conversión en dos pasos, en el primero pierde su grupo acetil y en el segundo se libera amonio, para obtener Fructosa-6P, la cual puede entrar a glicólisis y seguir la vía metabólica ya conocida (Yu *et al.*, 1991).

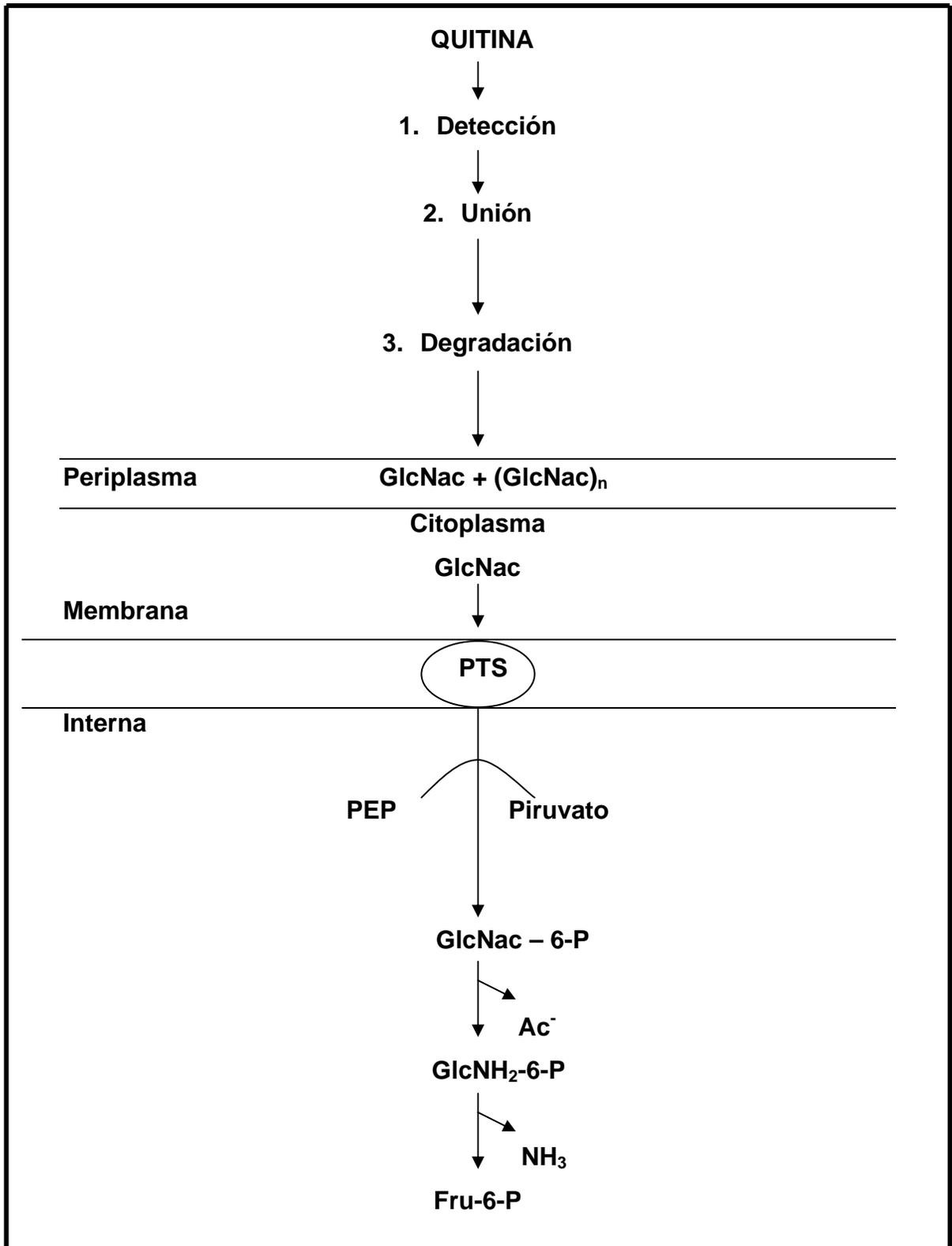


Figura 3. Proceso de reconocimiento y degradación de al quitina por los microorganismos.
Fuente: (Yu *et al*, 1991)

2.5. ENZIMAS QUITINOLITICAS

El interés actual que se ha generado entre la comunidad científica alrededor de las enzimas quitinolíticas, radica en su gran variedad, presencia entre una amplia gama de grupos bacterianos y su gran potencial biotecnológico aplicable a diferentes campos de la investigación, medicina e industrias de varios campos.

Las quitinasas hidrolizan quitina y quitosán. Varían muy ampliamente en tamaño, cubriendo un rango de 350 hasta más de 800 aminoácidos. Muchas de ellas son proteínas modulares, con dominios catalíticos que se encuentran en el rango de cerca de 250 a más de 400 aminoácidos. Los dominios auxiliares, incluyen dominios de unión de quitina (chitin-binding), secuencias de fibronectina tipo III-like, y secuencias de enlace con un rango de 40 a 150 aminoácidos (Warren, 1996).

Las quitinasas son las enzimas capaces de realizar la hidrólisis de los enlaces β 1-4 de la **N-acetilglucosamina** en quitina y quitodextrinas (Felse y Panda, 2000).

Fueron observadas por primera vez por Bernard en 1911 cuando aisló a partir de pulpa de orquídea, una fracción quitinolítica termoestable y difusible. Esto fue posteriormente confirmado por Karrer y Hoffman quienes demostraron la presencia de enzimas quitinolíticas en caracoles (Felse y Panda, 2000)

El proceso de degradación de la quitina y el quitosano se encuentra mediado por un conjunto de enzimas que actúan sobre el sustrato específico de distintas maneras (figura 4). La actividad exoquitinasa se define como la acción progresiva que inicia en los terminales no reductores de la molécula de quitina con la liberación sucesiva de unidades de acetilquitobiosa. La actividad endoquitinasa se define como el clivaje aleatorio en los puntos internos de la cadena de quitina (Felse Y Panda, 2000).

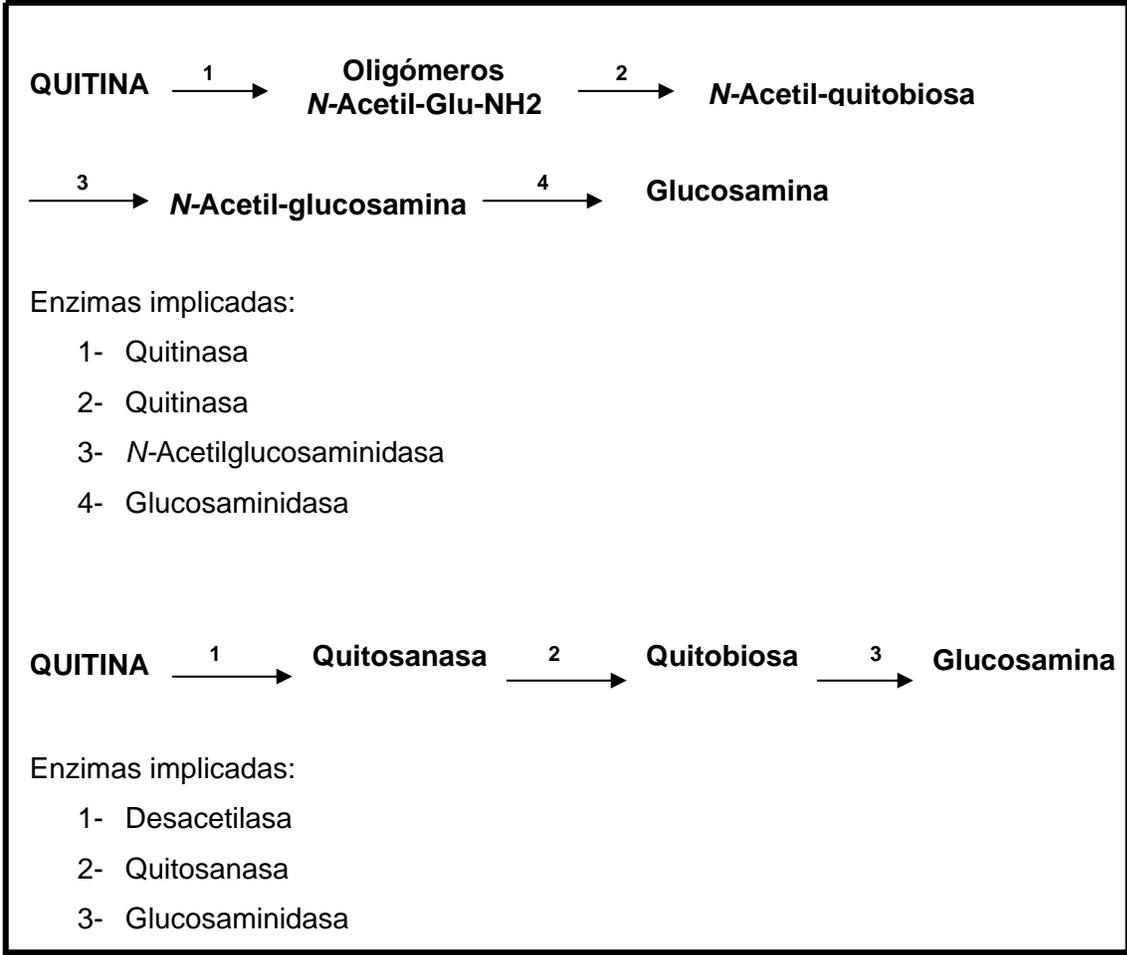


Figura 4. Representación esquemática del proceso de degradación de la quitina y quitosán.
Fuente: Autor

Los microorganismos quitinolíticos, son aquellos que poseen la capacidad de degradar la quitina por sí solos mediante la hidrólisis de los enlaces glicosídicos. Como se mencionó anteriormente, la quitina en la naturaleza se encuentra en diferentes formas, como son α -quitina, β -quitina y γ -quitina. Por ésta razón, existe una gran variedad de quitinasas, cuya variedad radica en el tipo de molécula que se va a degradar, la especie del microorganismo o simplemente la función que cumple dentro de éste complejo enzimático. Presuntivamente, una bacteria produce diferentes clases de quitinasas para hidrolizar eficientemente las distintas formas de quitina presentes en la naturaleza, sin embargo, ésta afirmación aún

requiere de una investigación más profunda en el campo de la genética de los microorganismos quitinolíticos. Se conoce que una sola forma de quitina no es capaz de hidrolizar con igual eficiencia las formas α o β de la quitina (Yoon *et al.* 2000)

Estudios realizados previamente, por (Svitil *et al.* 1997).demostraron que una quitinasa aislada a partir de una cepa de ***Bacillus sp.*** PS-71, degradó más eficientemente la forma β de la quitina que la α , tal vez porque la hidrólisis se dificulta al estar fuertemente empaçadas en cadenas antiparalelas del alfa quitina; esto puede explicar también porque la mayoría de los organismos poseen la forma alfa en lugar de la beta en sus exoesqueletos y sus paredes celulares (Svitil *et al.* 1997).

Otras quitinasas contienen dominios y/o secuencias repetidas de función desconocida. Los dominios catalíticos de las quitinasas microbianas se encuentran en la familia 18 de las glicosil hidrolasas, junto con algunas quitinasas de las plantas; ellas son enzimas retentivas. La familia 19, de estereoquímica indeterminada y con pocos miembros hasta la fecha, contiene enzimas con actividades quitinasa y lisozima. Las quitosanasas hidrolizan quitosán pero no quitina ya que éstas son incapaces de romper los enlaces β -1.4 entre los residuos adyacentes de *N*-acetilglucosamina. Muchas de las enzimas que han sido secuenciadas pertenecen a la familia 46 de las glicosil hidrolasas. Éstas son proteínas de dominio sencillo, compuestas por aproximadamente 250 aminoácidos (Warren, 1996).

Quitinasas han sido clasificados hasta ahora en dos diferentes familias por sus secuencias, familias 18 y 19, por el sistema de clasificación de las glycolsyl hydrolasas, basados en la similitud de la secuencia de aminoácidos y los dominios catalíticos (Davies y Henrissat, 1995). Familia 18 contiene quitinasas de las bacterias, hongos, los virus y animales, y algunas quitinasas plantas (clases III y V) familia 19 contiene quitinasas de las plantas clases I, II y IV recientemente identificadas de *Streptomyces griseus*.

Las quitinasas de las dos familias no comparten similitud en las secuencias de aminoácidos y tienen las estructuras tridimensionales completamente diferentes; se piensa por consiguiente que tienen los orígenes evolutivos diferentes. (Henrissat, 1991)

2.6. USOS Y APLICACIONES DE LA QUITINA Y LAS QUITINASAS

La quitina es uno de los polímeros naturales que mayor importancia está adquiriendo en las últimas décadas, este hecho radica en la gran abundancia que presenta en la naturaleza, y las propiedades únicas que su estructura posee. Las aplicaciones de la quitina y las enzimas encargadas de su degradación, poseen gran variedad de campos en los cuales pueden ser aplicadas. Este panorama sugiere que el diseño de drogas que la reconocen o el uso de microorganismos que la degraden constituyen un método ideal de combate contra los parásitos, por ser altamente específicos dada la composición de sus exoesqueletos.

Hasta el momento se conocen dos familias de antibióticos que constituyen las penicilinas de los hongos las polixinas y las nikomicinas producidas ambas por actinomicetos aislados del suelo inhibiendo la enzima que sintetiza la quitina para ello se valen de un mecanismo competitivo, al presentar estructuras análogas al sustrato sobre el que opera la quitina sintetasa (Takeshi y Kanai, 1999)

Químicamente la quitina puede desacetilarse por tratamiento con álcali, en caliente, la producción mundial de quitina en 1999 fue de 273.256 toneladas aproximadamente de las cuales 67.236 son obtenidas mediante fermentaciones con hongos (proceso biotecnológico) y el resto provienen de residuos de la industria de crustáceos. Tal cantidad ha ido aumentando en los últimos años. Los líderes en su fabricación son en su mayoría sus principales consumidores ya que son ellos quienes iniciaron a trabajar en la obtención de este producto y es por ello que su tecnología e investigación han tenido más espacio para alcanzar un alto nivel y ampliar el espectro de las aplicaciones potenciales de la quitina;

esto unido a su gran poder adquisitivo como países desarrollados (entre ellos Japón y Estados Unidos), ha influenciado su fuerte incursión y sólido posicionamiento en mercado actual (Amortegui y Fernández, 2001)

Por sus características químicas y físicas, la quitina y quitosán pueden sustituir materiales plásticos con la ventaja de que son biodegradables y por consiguiente no contaminan. Se investiga su aplicación como reactivos químicos para el análisis de metales, basándose en su capacidad de intercambiadores iónicos de formar complejos su aprovechamiento en cosmetología por sus propiedades emulsificantes y nula alergicidad y su mayor explotación en la industria alimentaría y otras. Quitina y quitosán se emplean ya en la industria alimentaría como fuente fibra natural en la dieta; para fijar pigmentos artificiales y evitar absorción en el intestino como emulsificantes y para absorber grasas; en forma de película se ha empleado el quitosán para purificar el agua por medio de osmosis revertida y se ha sugerido su uso para proteger alimentos, ya que tolera altas temperaturas y es ella misma comestible (Amortegui y Fernández, 2001)

El quitosán sirve también para concentrar material proteico presente en líquidos de desecho de diversas industrias. Presenta esto una doble ventaja: el material concentrado se puede usar como aditivo en la alimentación animal y en segundo lugar, purifica el líquido que puede verterse al medio ambiente, por su propiedad floculante, el polisacárido puede depurar el agua potable de consumo humano (Reetarani *et al.* 2000).

En resumen la quitina es un compuesto orgánico indispensable para la existencia de un gran número de organismos. Su síntesis e hidrólisis adecuadamente reguladas permiten el crecimiento y desarrollo de estas especies. Así mismo, el conocimiento de los mecanismos subyacentes nos ha de llevar al control de las plagas agrícolas y enfermedades animales y humanas mediante el diseño de drogas y microorganismos que inhiben selectivamente la acción de patógenos. Por ultimo, se encierra en la quitina un poderoso recurso de materia orgánica que

puede aplicarse a diversos usos industriales, en sustitución de compuestos tóxicos o contaminantes no biodegradables. (Ipsita *et al* 2003)

2.7. COLEOPTEROS

Los Coleópteros, representan cerca del 40% de los insectos. Su gran éxito biológico dentro de los insectos se debe a que presentan el cuerpo muy endurecido constituido en su mayor parte por quitina y provisto de un par de alas llamadas élitros. Estas características físicas los hacen sobrevivir en condiciones extremas, tanto de alta como de baja temperatura. Muchos de ellos son especies xilófagas, es decir se alimentan y viven parte de su vida en raíces, ramas o troncos de árboles y arbustos. Otros se desarrollan en la tierra entre muchos de los habitats a los que pertenecen.

Estos insectos, son tremendamente voraces en su etapa larvaria causando la total o parcial destrucción del tejido en el que han depositado sus huevos. Esta plaga es capaz de desintegrar y acabar con una importante parte de los patrimonios culturales como en los museos de cuerpos momificados natural o artificialmente (Coleman, 1996).

2.8. ACAROS (GARRAPATAS)

Las garrapatas son uno de los grupos de ectoparásitos más importantes que existen, no solo por los daños directos que ocasionan al ganado, animales domésticos y silvestres, sino por la gran cantidad de gérmenes patógenos que transmiten, muchos de ellos también son transmitidos al hombre.

Las garrapatas son artrópodos, los cuales se caracterizan por tener apéndices articulados. El cuerpo y los apéndices están cubiertos por una cutícula, la que contiene quitina y esclerotina. Con áreas duras que forman un exoesqueleto, con conexiones flexibles de membranas entre los segmentos, que permiten los movimientos; pertenecen al *subphylum Chelicerata* y a la clase *Arachnida* que se caracteriza por no tener antenas, ni alas, ni ojos compuestos, pero con 4 pares de

patas (en su fase adulta). La mayor parte de las garrapatas tienen un color desde café, en diversas tonalidades, hasta rojizo. (Mehlhorn y Piekarski, 1993)

2.9. MICROORGANISMOS FITOPATOGENOS

2.9.1. *Fusarium oxysporum*

Macroscópicamente *Fusarium oxysporum* se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido en agar papa dextrosa (PDA) a 25°C. Su micelio es generalmente aéreo, abundante, algodonoso y con coloración variable de blanco a rosado durazno. Generalmente un tinte púrpura o violeta más intenso se presenta al dorso de la colonia (Rattink y Aalameer, 2000). Microscópicamente se caracteriza por presentar tres clases de esporas microconidias, macroconidias y clamidosporas (Garcés de Granada *et al*, 1999)

Fusarium oxysporum penetra la epidermis de las raíces, la corteza y endodermis, finalmente entran a los vasos del xilema; colonizando el sistema vascular, en el cual el fitopatógeno produce compuestos complejos que interfirieren con la capacidad de la planta al translocar la toma de agua y nutrientes; ocasionando la degradación de tejidos y la muerte (Ochoa, 1996).

Los síntomas de la enfermedad aparecen de forma unilateral; se acompaña de un amarillamiento parcial de las hojas, a veces se observa una mitad clorótica y la otra verde normal y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma; a su vez se observa enanismo de éstos y disminución en el crecimiento de la planta, los síntomas avanzan lentamente por la planta hacia arriba hasta causar un marchitamiento generalizado y la muerte (Garcés de Granada *et al*, 1999).

2.9.2. *Fusarium roseum*

Fusarium roseum es un hongo de clase Deuteromycetos, orden Moniliales, familia Tuberculariaceae. Es el agente causal de diversas enfermedades como Fusarium de tallo, pudrición de los brotes o marchites rosada. Se puede presentar en

estados iniciales de desarrollo de los esquejes de clavel, en forma de lesiones café rojizas que se van extendiendo a partir de tejidos heridos en la base de la planta; en éste estado inicial no se observa ninguna decoloración vascular puesto que el hongo infecta primariamente el parénquima cortical.

Los síntomas de *Fusarium roseum*, pueden distinguirse de los de *Fusarium oxysporum* en que la decoloración vascular de éste último se presenta en un sector a lo largo del tallo afectado y casi siempre acompañada de fuerte clorosis en las hojas, todo esto en una porción lateral de la planta, mientras que en el primero ocurre sólo en la zona inmediatamente cercana a los tejidos podridos. (Agrios, 2004).

2.9.3. *Sclerotinia sclerotium*

Sclerotinia sclerotium es un hongo causante de enfermedades devastadoras en numerosas plantas, en particular en hortalizas y plantas de flores, así como de algunos arbustos. Afecta a las plantas en cualquiera de las etapas de desarrollo, incluyendo plántulas, plantas maduras y órganos cosechados durante su transporte y almacenamiento. Las enfermedades más comunes producidas por *Sclerotinia* se conocen con el nombre de pudrición algodonosa, moho blanco o pudrición blanda aguanosa.

El principal síntoma es la aparición, sobre la planta infectada, de un micelio veloso y blanco en el que en poco tiempo se desarrollan unas estructuras compactas de resistencia esclerosios. Los esclerocios pueden vivir en el suelo más de 10 años, controlados por la fungistasis del suelo, hasta que se activan como respuesta a factores específicos liberados por las plantas huéspedes (Agrios, 2004).

2.9.4. *Phytophthora sp.*

Phytophthora sp es un hongo que causa muchas varias enfermedades en diferentes tipos de plantas, desde plántulas de hortalizas hasta árboles forestales y frutales completamente desarrollados. La mayoría de las especies de este hongo

producen pudriciones de la raíz, ahogamiento de las plántulas y pudriciones de tubérculos, cormos, base del tallo y otros órganos, enfermedades muy similares a las causadas por *Pythium sp.*

La especie más conocida es *Phytophthora infestans* agente causal de la enfermedad tizón tardío de la papa, es la enfermedad de origen fungoso más perjudicial de la papa en las zonas húmedas y frías en el mundo. Bajo condiciones climáticas favorables para su desarrollo, este hongo provoca grandes pérdidas económicas. La enfermedad debe ser controlada en forma oportuna, para evitar pérdidas hasta el 100 % de la producción.

Las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de este hongo son temperaturas nocturnas entre 10 y 12 °C, temperaturas diurnas de 21°C y una humedad relativa al 90%, rocío fuerte o lluvias frecuentes (Agrios, 2004).

2.9.5. *Pythium sp*

Pythium es la causa más importante del ahogamiento durante las fases de preemergencia de las plántulas. Causa un micelio blanco, ramificado, profusamente ramificado y de rápido crecimiento. El micelio produce esporangios terminales o que pueden ser de forma esférica, filamentosa o de cualquier otra. Los esporangios germinan directamente y producen de uno a varios tubos germinales, o bien forman una hifa corta en el extremo de la cual se forma una vesícula. El protoplasma se difunde desde el esporangio hacia la vesícula y ahí forma más de cien zoosporas. Cuando las zoosporas son liberadas, permanecen en el agua por algún tiempo, entran en reposo, se enquistan al envolverse en una cubierta protectora y germinan al producir un tubo germinal. Este tubo germinal penetra en los tejidos del hospedante y producen una nueva infección (Agrios, 2004).

Las especies de *Pythium* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y el agua. Viven como organismos saprófitos sobre los restos de plantas y animales muertos, o bien como parásitos benignos atacando las raíces fibrosas de las plantas. Las condiciones de suelo húmedo, hacen que *Pythium* ataque todo tipo de semillas o plántulas (Agrios, 2004).

2.10. Actinomycetes

Los Actinomycetes son bacterias Gram positivas, cuyo diámetro varia entre 0.5-2.0 μm (generalmente son menores de 1 μm); Se caracterizan principalmente por producir filamentos delgados ramificados, que se desarrollan en un micelio en todos los suelos excepto el genero *Actinomyces*. Este micelio presenta pseudohifas, las cuales pueden ser fragmentadas o no; las hifas o filamentos individuales se asemejan morfológicamente a los filamentos fúngicos pero son más delgados, generalmente de 0.5-1 μm de diámetro (Ensign, 1992.)

Los actinomycetes se clasifican como microorganismos procariotas (bacterias) debido a que no presentan organelos bien diferenciados; su pared celular está formada por peptidoglicano, lipoproteínas, lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, ácido N-acetil murámico, entre otros. A pesar de tal similitud se diferencian seis tipos de pared entre sí, debido a la presencia de azúcares, aminoácidos y la clase de ácido diamino-pimélico que posean (si lo tienen). Así mismo son sensibles a la lisozima, que degrada los polisacáridos que constituyen el peptidoglicano y a sustancias antibacteriales pero no a antifúngicas. También poseen flagelos típicos de bacterias flageladas en algunas especies que muestran movilidad (Sylvia, 1998 y Rippan, 1990).

Son un grupo fisiológicamente diverso de bacterias, esta diversidad se observa en la producción de enzimas extracelulares y en los casi mil diferentes tipos de metabolitos que sintetizan y excretan; muchos de estos antibióticos son capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias, hongos, virus y protozoarios

(Gibewonyo y Wong, 1983) citado por Rojas & Valencia 2000, Erazo y Congote 2000, Molano, 2000)

Se encuentran ampliamente distribuidos, no solamente en el suelo, sino en una variedad de hábitats incluyendo estiércol, fango de los ríos y el fondo de los lagos. Se encuentran en la zona aeróbica del suelo ya que son microorganismos oxigénicos. En esta zona viven saprofitamente a expensas de una gran variedad de sustancias orgánicas (Ensing, 1992).

Clasificación

Se encuentran clasificados según sus características morfológicas y fisiológicas en el capítulo IV del manual de Bergey's.

Tabla 2. Clasificación de los Actinomycetes

Sección	Algunos Géneros
Sección 26 Actinomycetes Nocardiformes	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Faenia</i> , <i>Actinopolyspora</i> entre otros.
Sección 27 Actinomycetes con esporangio multilocular	<i>Geodermatophilus</i> , <i>Dermatophilus</i> y <i>Frankia</i>
Sección 28 Actinoplanetes	<i>Actinoplanes</i> , <i>Ampullariella</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Dactylosporangium</i> y <i>Micromonospora</i>
Sección 29 Streptomycetes y géneros relacionados	<i>Streptomyces</i> <i>Kineosporia</i> <i>Soprichtya</i> . y, <i>Streptoverticillium</i>
Sección 30 Maduromycetes	<i>Actinomadura</i> , <i>Planobispora</i> <i>Microbispora</i> , <i>Spirillospora</i> <i>Microtetraspera</i> , <i>Planomonospora</i> , y <i>Streptosporangium</i>
Sección 31 Thermomonospora y géneros relacionados	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Nocardiopsis</i> y <i>Strptoalloteichus</i>
Sección 32 Thermoactinomycetes	<i>Thermoactinomyces</i>
Sección 33 Otros géneros	<i>Glycomyces</i> , <i>Saccharotrix</i> <i>Kitasatosporia</i> y, <i>Kibdelosporangium</i> ,

Fuente: Goodfellow, 1989

2.10.1 *Streptomyces* sp.

Los estreptomicetos son bacterias filamentosas, aerobias, ácido alcohol no resistentes, quimioorganótrofos, presenta un metabolismo oxidativo, son catalasa positiva, con un único ciclo de vida involucrando varios estados de diferenciación incluyendo la esporulación, crecimiento óptimo entre 25-35°C y pH de 6.5-8.0. (Korn-Wendisch & Kutzner, 1992).

Filamentos vegetativos con un diámetro de 0.5-2.0µm, producen un extenso micelio ramificado que raramente se fragmenta, el micelio aéreo en su madurez forma cadenas de tres o más conidias. Inicialmente las colonias son de superficie lisa, posteriormente presenta textura pulverulenta, granulosa, flucosa, vellosa o aterciopelada, su capacidad de producir una gran variedad de pigmentos es la responsable del color que exhibe el micelio vegetativo y aéreo; también se puede observar un pigmento difusible en el medio (Locci, 1989)

Se caracterizan por ser microorganismos altamente competidores en el suelo, por su capacidad de degradar residuos complejos de plantas y animales incluyendo polisacáridos (eje. almidón, pectina, quitina), proteínas (queratina, elastina) y de igual forma compuestos lignocelulosos y aromáticos, por utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno y no requieren vitaminas o factores de crecimiento; porque su ciclo de crecimiento (esporas-micelio-esporas) le permite adaptarse a las diferentes condiciones físicas del suelo, y finalmente porque producen esporas (artrosporas, conidias) aunque no cumplen con la función de resistencia de las endosporas en las bacterias contribuyen a la supervivencia de estos en condiciones de sequía, bajas temperaturas, presión hidrostática y condiciones anaerobias causadas por la saturación del agua (Korn-Wendisch & Kutzner, 1992).

Numerosos estudios han demostrado que este género presenta actividad antifúngica convirtiéndose en una alternativa para el control de fitopatógenos (Tabla 3).

Tabla 3. Interacciones antagónicas entre *Streptomyces* y Fitopatógenos

Efecto	Mecanismo
Control de Fitopatógenos	a. Lisis enzimática (ej. quitinasas). b. Inhibición por una toxina desconocida. c. Sustancias antifúngicas. d. Inhibición por una toxina noespecifica.
Autólisis de las hifas de fitopatógenos	e. Inducida por competencia de nutrientes f. Como (e) más antibióticos. g. Inducido por toxinas
Inhibición de la germinación de las esporas de fitopatógenos	h. Inhibidores volátiles

Fuente: Korn-Wendisch & Kutzner, 1992

2.10.2 CONTROL BIOLÓGICO CON ACTINOMYCETES

Los Actinomycetes son microorganismos capaces de producir un amplio espectro de antibióticos como metabolitos secundarios y una variedad de enzimas degradadoras de la pared de los hongos, tales como: celulasas, hemicelulasas, quitinasas, amilasas, glucanasas, entre otras (Yuan & Crawford, 1995).

Lahdemperã (1987), en Francia, demostró la variada actividad antagónica de diversas especies y aislamientos de *Streptomyces* en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, ya que estas bacterias se caracterizan por la producción de antibióticos y un largo espectro de sustancias fungistáticas; la especie antagonista más efectiva, de acuerdo con este estudio, fue el aislamiento de *Streptomyces griseoviridis*, la cual actualmente se comercializa con el nombre de Mycostop® dando resultados satisfactorios en el control del marchitamiento vascular del clavel en cultivos comerciales en varios países de

Europa con una incidencia de la enfermedad del 10% comparado con un 30-40% en plantas no tratadas. En Colombia el estudio realizado por Gómez & Ortega, (1993), en el cual se evaluó el efecto controlador de Mycostop[®], se emplearon dos variedades de clavel (susceptible y resistente a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*), sin embargo los resultados de éste no fueron satisfactorios en el control de la enfermedad, puesto que se encontró que el organismo es dependiente de las condiciones de pH del medio, desarrollándose solamente a partir de un pH 6.4 y obteniéndose un óptimo crecimiento a pH 7.0.

Yuan & Crawford (1995) determinaron la actividad *in vitro* de *Streptomyces lydicus* WYEC108 sobre diferentes fitopatógenos tales como *Pythium ultimum*, *Aphanomyces aubei*, *F. oxysporum*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Rhizoctonia solani* y *Phymatotrichum omnivorum*, por medio de la acción de un metabolito extracelular, a su vez observaron la acción protectora que ejercía WYEC108 sobre las semillas de maíz, en contra *Pythium ultimum*

Así mismo, se ha identificado el efecto antagónico de *Nocardia garndneri* sobre el control de *F. oxysporum* f.sp *dianthi* impidiendo el desarrollo de la enfermedad; la sustancia producida (Actinomicina) por esta bacteria no solo presenta actividad fungistática sino que a su vez actúa como factor de crecimiento y de recubrimiento al reforzar las paredes del tejido vascular (Molano, 2000); de igual forma Franco, (1999) observó la actividad antifúngica con aislamientos de *Pseudonocardia* sp y *Streptomyces* sp sobre *F. oxysporum* f.sp *dianthi* y la estimulación del crecimiento vegetal por estos microorganismos.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la industria pesquera colombiana se ha logrado ubicar en una posición prestigiosa dentro de los diferentes países productores de alimentos de origen marino en América. Este acontecimiento indica que ha habido un aumento en la producción de dichos alimentos, especialmente en el área de la producción camaronera. Por consiguiente el incremento en la producción conlleva a un aumento en el volumen de los desperdicios provenientes del proceso de limpieza del camarón, desperdicios con alto contenido de quitina.

La quitina es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa; hace parte principalmente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos y es el principal componente de la pared celular de los hongos. Este polímero es de difícil biodegradación debido al tipo de enlace que contiene y por la especificidad que requiere en cuanto al tipo de enzimas que intervienen en el proceso biodegradativo, generando un impacto ambiental cuando se acumula en tierra o es arrojado a cuerpos de agua. Este polímero, a diferencia de muchos otros, requiere de microorganismos especializados que contengan la información necesaria para expresar el complejo enzimático requerido para su degradación a compuestos menos complejos, los cuales puedan ser utilizados por otros microorganismos que carezcan de dichas enzimas

El uso de este complejo enzimático tiene una tentativa aplicabilidad en procesos de biorremediación y biocontrol. En procesos industriales, en donde los principales residuos generados poseen una alta concentración de quitina, las estrategias de biorremediación generan una alternativa al desarrollo de la gestión ambiental enfocada a la solución en fuente, reduciendo de esta forma el impacto ambiental que se produciría si el control de dichos residuos se realizara a final de tubo. De igual manera, al ser la quitina componente principal de la pared celular de hongos, la degradación de esta en fitopatógenos, resulta una alternativa interesante en los

procesos de biocontrol, lo que permitiría una mejora en la calidad de los cultivos en Colombia.

Para aumentar el rendimiento de dichos procesos puede resultar más eficiente el uso directo del complejo enzimático, al cuál se le pueden dar diferentes condiciones de funcionalidad (temperatura, pH, etc.), que se ven limitadas cuando la aplicación de la enzima se hace por medio del microorganismo, debido a la alteración de sus procesos fisiológicos que interrumpirán la producción de la enzima de interés.

De acuerdo con las tendencias actuales en biotecnología de enzimas, el desarrollo de productos de doble propósito es una de las líneas fuertes de investigación ya que se busca obtener biopreparados que puedan ser aplicados en varios procesos y que a la vez se puedan producir a partir de subproductos de algunas industrias que actuarían como inductores por sustrato, convirtiéndose en una interesante opción para hacer ciclaje de todos los componentes incluidos en una línea de proceso.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Aislar e identificar microorganismos con actividad quitinolítica de residuos de conchas de crustáceos, y evaluar la biodegradación de compuestos quitinolíticos y el biocontrol de hongos fitopatógenos e insectos.

4.2. Objetivos Específicos:

Aislar microorganismos quitinolíticos en medios a base de residuo de concha y a base de quitina coloidal.

Seleccionar las mejores cepas para realizar fermentaciones a escala de laboratorio para determinar las condiciones más favorables para la producción de quitinasas.

Evaluar actividad biocontroladora sobre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Sclerotinia sclerotium*, *Phytophthora sp* y *Pythium sp* por los microorganismos quitinolíticos aislados y sus enzimas.

Evaluar efectos biodegradativos sobre el exoesqueleto de crustáceos coleópteros y ácaros (garrapatas) que poseen quitina mediante el uso de microorganismos productores de quitinasas.

Evaluar el efecto del pH y la temperatura del extracto enzimático, así como la estabilidad térmica y al pH.

5. METODOLOGÍA

5.1. RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

A partir de residuos de empresas camaroneras ubicadas en Cartagena, las muestras recolectadas se llevaron a una temperatura de 4°C al Laboratorio de Biotecnología aplicada de la Universidad Javeriana, donde las muestras fueron pesadas y clasificadas en cinco muestras cuyas denominaciones fueron Muestra A, B, C, D, E, correspondientemente. Una vez codificadas, las muestras se almacenaron a temperatura de congelación (0°C) en bolsas plásticas autosellables.

5.2 HOMOGENIZACIÓN DE MUESTRAS Y ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

En primera instancia, las muestras obtenidas fueron clasificadas y seleccionadas con el fin de eliminar otros residuos de tipo biológico e inerte que pudieran interferir en el proceso de aislamiento de los microorganismos de interés.

Luego de obtener las conchas de camarón, éstas fueron molidas mecánicamente, mezcladas, y pulverizadas, obteniendo un macerado homogéneo de las conchas, con el fin de tener mayor aleatoriedad en el momento de realizar la toma de las muestras para su procesamiento.

A continuación, se tomaron 10 g del polvo de conchas y se mezclaron con 90 ml de agua peptonada al 0.1% P/V con 6% P/V de cloruro de sodio. Ésta mezcla se agitó a baja velocidad durante 1 minuto. Este procedimiento se realizó previo al procesamiento de las muestras con la intención de determinar el pH del material obtenido; el valor de pH obtenido en la caracterización primaria se considero como valor referente para todo el estudio. (Franco-Monsreal *et al.* 2001, Rao *et al.* 2000).

Se tomaron 10 g del polvo de conchas para ser transferidos a un vaso estéril que contenía 90 ml de agua peptonada (0.1% P/V) con 6% P/V de cloruro de sodio, con

un pH determinado por el paso anterior. Ésta suspensión fue mezclada a baja velocidad durante 1 minuto con el objeto de obtener una mezcla homogénea. A partir de la suspensión obtenida, se tomaron alícuotas de 1 ml que fueron transferidas a tubos de ensayo de 13 x 100 mm con 9 ml de agua peptonada con 6 % p/v cloruro de sodio, con el objeto de hacer diluciones seriadas de la muestra. (Franco-Monsreal *et al.* 2001).

5.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la elaboración del extracto de camarón se emplearon 50g de la muestra de conchas trituradas, en una concentración del 1/2 en agua destilada. La anterior suspensión fue tratada con calor a 120°C durante 30 min. Con el fin de eliminar el exceso de proteínas debido al alto contenido que contiene este tipo de residuos y otros posibles minerales que pudieran interferir con el aislamiento y la actividad específica quitinasa. Luego del primer tratamiento con calor, se extrajo el líquido sobrenadante y se sometió el precipitado a un nuevo tratamiento calórico a 120°C durante 30 min para eliminar aún más carga proteica no deseada. A continuación se tomó la fracción líquida y se centrifugó a 8000 g. por 30 minutos con el fin de precipitar partículas de mayor tamaño. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto de camarón para ser añadido al medio de cultivo. (Felse y panda, 2000)

5.4. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUITINOLÍTICOS

Los aislamientos primarios fueron realizados a partir de las suspensiones previamente preparadas. Para ello se utilizaron agares que contenían quitina coloidal comercial obtenida a partir concha de cangrejo, con una concentración de 1.5% P/V, la cual actuó como el sustrato inductor de la actividad quitinasa (Priest 1984, Felse y Panda 2000). El pH del medio se ajustó de acuerdo con lo reportado por la muestra en el numeral anterior. A partir de las diluciones se tomaron alícuotas de 0.1 ml que fueron inoculadas por triplicado, en superficie, en **Medio quitina Coloidal** (Sakai *et al.* 1998) (Anexo 1). Se utilizó extracto de camarón

para ser añadido al medio de cultivo. Las cajas fueron incubadas a 25-30°C durante 3 a 4 días, examinando el crecimiento diariamente (Cottrell *et al.* 2000). El pH del medio fue ajustado según el reporte de la zona de muestreo y el porcentaje de NaCl se mantuvo al 6% p/v como criterio de selección dado que la muestra era de origen marino. (Franco-Monsreal *et al* 2000)

Se tomaron colonias de microorganismos que puedan utilizar presuntivamente la quitina como su única fuente de carbono, diferenciando cada una de las colonias obtenidas por su morfología y crecimiento. Las colonias seleccionadas se purificaron por pases sucesivos en medio quitina coloidal se llevaron a incubación en Medio Quitina Coloidal /extracto de camarón (Anexo 1), el cual fue incubado a una temperatura de 30°C durante 3 o 4 días (Sakai *et al.* 1998). Para las posteriores determinaciones se tuvo en cuenta las colonias que mostraron la capacidad de utilizar la quitina como única fuente de carbono y las que muestren diferencias morfológicas macroscópicas entre sí. La purificación de las cepas se realizó mediante pases sucesivos en éste mismo medio (Priest, 1984). La determinación de características macroscópicas y microscópicas fue realizada mediante la técnica de coloración de Gram modificada para microorganismos halófilos (Gonzales y Peña, 2002).

5.5 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS POR SU POSIBLES PATOGENICIDAD EN CAMARÓN.

Para la detección de posibles patógenos del camarón, se desarrolló una metodología que consistió en la utilización de medios específicos para patógenos reportados en el camarón. Esto se realizó con base en las características morfológicas (macro y micro) de las colonias obtenidas en las etapas de aislamiento de acuerdo a la metodología propuesta por Carrascal 2003. Las cepas presuntivamente patógenas se sembraron en medios de cultivos diferenciales tales como Cromocult para enterobacterias, TCBS para *Vibrio sp*, Manitol y Baird Parker para *Staphylococcus aureus*, y XLD para *Salmonella sp*,

(Anexo 1) correspondientes a cada uno de los géneros bacterianos reportados como patógenos del camarón. Para la observación morfológica de las colonias, a partir de las colonias se realizó coloración de Gram, pruebas bioquímicas Prueba de la oxidasa como prueba presuntiva. y catalasa y fermentación de carbohidratos. Las colonias que resultaron positivas para los géneros **Salmonella sp. Vibrio sp, Staphylococcus sp.** Y coliformes, géneros reportados como patógenos del camarón, fueron descartadas del estudio (Figueroa, 2000).

5.6. PRUEBAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD QUITINOLITICA MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE TIPO REDUCTOR EN FERMENTACION DISCONTINUA

Con base en las cepas obtenidas y para poder determinar la capacidad quitinolítica de los aislamientos obtenidos, se realizaron curvas para medir la cantidad de azúcares reductores como N-acetilglucosamina liberados al medio y cambios de pH con el fin de observar si las cepas poseen la capacidad de utilizar la quitina como única fuente de carbono.

Cada una de las cepas se cultivaron en erlenmeyers de 250 ml utilizando 45 ml de medio líquido MQC quitina/extracto de camarón, y con 5 ml de la suspensión microbiana de cada cepa como inóculo (relación geométrica 1/5). Para la elaboración de este inóculo se sembraron cajas masivamente y se incubaron a una temperatura de 30°C durante un período de 15 días (Sakai *et al.* 1998, Felse y Panda 2000). A partir de éstas cajas se realizaron suspensiones en solución salina 0.85% p/v, con una concentración de 9×10^8 cel/ml. según el tubo número dos del nefelómetro de Mc. Farland, la cual se verificó mediante recuento.

Las condiciones agitación, aireación, y tiempo de fermentación fueron determinadas de acuerdo a la morfología del cada uno de los microorganismos aislados anteriormente. La temperatura se mantuvo en 30°C durante todo el proceso.

Para la determinación de la liberación de azúcares reductores y cambios de pH, se realizaron muestreos de no más de 3 ml con el fin de no exceder el 10% del volumen efectivo de trabajo del erlenmeyer, con una frecuencia que fue determinada, como se dijo anteriormente, por el tipo de microorganismo seleccionado como productor de la enzima de interés. Las células fueron removidas del medio gastado mediante centrifugación a 8,000 g, durante 15 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar las mediciones pertinentes. (Sakai *et al.* 1998). Las condiciones de cultivo descritas anteriormente, tales como volúmenes de inóculo, volúmenes de medio, agitación, temperatura, muestreo y volumen de muestreo, fueron utilizadas a lo largo de todo el estudio para las diferentes pruebas que se describen posteriormente.

● **Análisis estadístico:**

De acuerdo con los datos obtenidos por las 11 cepas seleccionadas para las pruebas preliminares de actividad quitinolítica mediante la cuantificación de productos de la hidrólisis de tipo reductor en fermentación discontinua se realizó un análisis estadístico descriptivo. Para esto se utilizó el programa "Statistics", realizando una prueba T Student para establecer las diferencias significativas a lo largo del proceso.

Se presentaron las siguientes hipótesis:

Ho: La cepa A9 (actinomicete) presenta mayor liberación de azúcares reductores que las 9 cepas restantes

Hi: La liberación de azúcares reductores fue mayor por las 9 cepas restantes que por la cepa A9 (Actinomicete).

5.6.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES LIBRES

Con los sobrenadantes obtenidos de cada muestreo de la curva de crecimiento, se realizaron las determinaciones de azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3.5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1958) para esto, se realizó una curva patrón con N-acetilglucosamina (Sigma). Luego se cuantificó la concentración de N-acetilglucosamina liberada en cada etapa de la fermentación (Howard *et al.* 2003 y Vladimir *et al.* 2002)

5.6.2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINA

La determinación de N-acetilglucosamina fue realizada a partir de una curva de calibración de una solución concentrada de N-acetilglucosamina de 2 g/l disuelta en agua destilada. A partir de esta se prepararon soluciones con diferentes concentraciones desde 0.2 hasta 2 g/L (Anexo 2). La curva se realizó con cinco repeticiones. (Reissig *et al* 1955)

5.7. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS DE FERMENTACIÓN DISCONTINUA.

Con base en los resultados de la prueba anterior y utilizando las mejores cepas, se determinaron las condiciones adecuadas de fermentación. Se realizaron ensayos con las variables del medio tales como concentración de sustrato, contenido de extracto de camarón o sin él; permitiendo encontrar la adecuada composición del medio, en el cual se observó un crecimiento óptimo y la producción de la enzima con base en la medición de azúcares reductores liberados al medio. A partir de los datos obtenidos se aumentaron los volúmenes de fermentación permitiendo tener un control acerca del tiempo máximo de la misma, el pH y los cambios efectuados sobre la quitina.

● **Análisis estadístico:**

Con el fin de seleccionar la concentración adecuada de quitina coloidal para la estandarización de las condiciones adecuadas de fermentación discontinua para la cepa seleccionada. Se tomó como parámetro de comparación los datos obtenidos de los tratamientos que se realizaron con quitina 1.5%, con y sin extracto camarón y quitina al 1% con y sin extracto de camarón. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba T student del programa Statistix computarizado, donde:

Cepa A9 con extracto de camarón

Ho: Medio quitina coloidal al 1% – Medio quitina coloidal al 1.5% ≥ 0

Hi: Medio quitina coloidal al 1%– Medio quitina coloidal al 1.5% < 0

Para la Cepa A9 sin extracto de camarón

Ho: Medio quitina coloidal al 1% – Medio quitina coloidal al 1.5% ≥ 0

Hi: Medio quitina coloidal al 1% – Medio quitina coloidal al 1.5% < 0

5.8. CURVA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO PARA LAS CEPAS SELECCIONADAS EN EL MEDIO ESTANDAR.

Se realizaron curvas por triplicado de crecimiento y consumo de sustrato, para determinar la viabilidad y capacidad quitinolítica de la cepa seleccionada en los pasos anteriores. Esta curva se realizó durante un periodo de 32 días con el fin de observar el aumento en la biomasa y a su vez el comportamiento de la cepa con relación a la producción de quitinasas a través del tiempo en la fermentación.

5.9. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN DEL RESIDUO DE CONCHA DE CAMARÓN

Para evidenciar el prueba en campo real se utilizó un medio de fermentación que contenía 0.5% p/v de peptona y 1% p/v NaCl y 1% p/v de residuos de concha de camarón, pH 9,2 el cual fue inoculado con el microorganismo seleccionado e incubados en un agitador rotatorio a 150 rpm, por 36 días a una temperatura de 30°C, donde se determinó el potencial quitinolítico y la expresión enzimática por parte del microorganismo aislado. Mediante la determinación de la liberación de azúcares reductores y cambios de pH, se realizaron muestreos de 3 ml con el fin de no exceder el 10% del volumen efectivo del cultivo, con una frecuencia que fue determinada, como se dijo anteriormente, por el tipo de microorganismo seleccionado como productor de la enzima de interés. Las células fueron removidas del medio mediante centrifugación a 8000 g, durante 15 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar las mediciones pertinentes teniendo especial atención en la medición del tiempo cero (Sakai *et al.* 1998).

5.10. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ACTINOMYCETE.

Para determinar la concentración mínima en la que se presentó la actividad colonizadora de actinomicetes frente a los fitopatógenos y/o la presencia de halos de inhibición observando la sensibilidad del patógeno frente a los metabolitos secundarios producidos, se realizó la prueba de Gauze (Howard, 1997).

A partir de un medio sólido Avena con crecimiento masivo de actinomicete (cepa A9), se realizó el desprendimiento de conidios adicionando un volumen de agua destilada estéril y perlas de vidrio, de cada suspensión se realizó el recuento en cámara de Neubauer para establecer la concentración de conidias (Astudillo *et al.*, 1999).

A partir de cada suspensión se preparó una concentración de los fitopatógenos de 10^5 conidios/ml y de el microorganismo controlador concentraciones de 10^2 a 10^7 conidias/ml (Howard, 1997)

Para determinar la CMI del actinomicete inicialmente se realizó la inoculación (100 μ l) masiva del patógeno de una suspensión de 10^5 conidios/ml. en el agar (PDA), posteriormente se introdujeron los pitillos, los cuales se inocularon con 50 μ l de cada una de las concentraciones (10^2 a 10^7 conidias/ml) y se llevaron a incubar a 28°C y se observaron a los 8 días.

5.11. EFECTO QUITINOLITICO DE LOS EXTRACTOS DE LA FERMENTACION Y EL ACTINOMYCETE SOBRE MICROORGANISMOS FITOPATOGENOS.

Las cepas seleccionadas se enfrentaron a los diversos fitopatógenos como *Fusarium roseum*, *Sclerotinia sclerotium*, *Phytophthora sp*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium sp* que atacan los principales cultivos en Colombia, los cuales fueron obtenidos el Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (CIAA). Se enfrentaron en un ensayo de Gauze utilizando el extracto enzimático en el tiempo de mayor producción y el actinomicete aislado (A9). El extracto enzimático fue obtenido mediante filtración del medio cultivado, en una membrana de poro de 0.45 μ m. Se utilizó el extracto con la concentración más alta obtenida. Se preparó un inóculo de cada uno de los patógenos con anterioridad en caldo PDA en una concentración de 10^5 conidios/ml para cada uno, verificando la concentración mediante recuento cámara de Neubauer y se sembró masivamente sobre la superficie del agar PDA, se colocaron 4 pitillos estériles sobre la superficie del agar adicionando 50 μ l del extracto enzimático en dos de los pozos, los dos pozos restantes fueron utilizados como control negativo donde se utilizó agua estéril y control positivo con nistatina. Esta prueba se realizó para cada uno de los fitopatógenos seis veces de acuerdo a la NTC para productos de insumos agrícolas. El pH del medio fue de 6.0. Se llevó a incubar a una temperatura de 30°C durante 6 días. Posteriormente se

midieron las zonas donde el crecimiento del fitopatógeno fue inhibido (Melent'ev *et al.* 2001).

● **Análisis estadístico:**

Con el fin determinar si la cepa de Actinomycetes y extracto enzimático presentaban diferencias de la actividad antifúngica frente a los diferentes fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Sclerotinia sclerotium*, *phytophthora sp* y *Pythium*) Se tomó como parámetro de comparación los datos obtenidos de los tratamientos que se realizaron sobre efecto quitinolítico de los extractos de la fermentación y el actinomicete sobre microorganismos fitopatógenos. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba no paramétrica de test del signo de Wilcoxon del programa Statistix computarizado, donde:

Ho: El promedio del halo de inhibición micelial de Actinomicete Vs fitopatógeno - extracto enzimático Vs fitopatógeno ≤ 0

Hi: El promedio del halo de inhibición micelial de Actinomicete Vs fitopatógeno - extracto enzimático Vs fitopatógeno > 0

5.12. IDENTIFICACIÓN DEL ACTINOMYCETE

De acuerdo con los parámetros de selección establecidos, se realizó la caracterización macroscópica (textura, color, pigmentación, etc.), microscópica y bioquímica de la cepa con mejor actividad quitinasa (cepa A9) las características morfológicas del actinomicete se evidenciaron con tinción de Gram. Adicionalmente la identificación se realizó mediante pruebas de fermentación de azúcares y aminoácidos (Molano, 2000).

5.13. DEGRADACIÓN DE LA QUITINA PRESENTE EN INSECTOS DE LOS ÓRDENES COLEÓPTERA Y ACARI.

En primera instancia, se tomó una cantidad considerable de coleópteros (cucarrones) los cuales fueron clasificados y seleccionados con el fin de eliminar aquellos que presentarán algún tipo de enfermedad o daño en su exoesqueleto, a su vez se eliminaron residuos de tipo biológico e inerte. De la misma manera se llevo a cabo esta clasificación con las larvas de garrapata, pero debido a su tamaño no se desarrolló un proceso de molienda.

Luego de obtener las conchas de cucarrón, éstas fueron molidas, mezcladas, y pulverizadas, para de ésta manera obtener un macerado homogéneo que sería utilizado en la fabricación del medio.

Para evidenciar la capacidad del microorganismo de degradar diferentes tipos de quitina se utilizó un medio de fermentación que contenía 1% p/v NaCl y 1.5 % p/v de concha de cucarrón molida el cual fue inoculado con el microorganismos seleccionados e incubados en un agitador rotatorio por 34 días a una temperatura de 30°C a 150 rpm, donde se determino el potencial quitinolítico y la expresión enzimática por parte del microorganismo aislado.

Mediante la determinación de la liberación de azúcares reductores y cambios de pH, se realizaron muestreos de no más de 3 ml con el fin de no exceder el 10% del volumen efectivo de trabajo del erlenmeyer, con una frecuencia que fue determinada, como se dijo anteriormente, por el tipo de microorganismo seleccionado como productor de la enzima de interés. Las células fueron removidas del medio gastado mediante centrifugación a 8000 g, durante 15 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar las mediciones pertinentes teniendo especial atención en la medición del tiempo cero (Sakai *et al.* 1998).

En un medio de fermentación que contenía 1% p/v NaCl y larvas de garrapata en un concentración de 1.5% p/v, se realizó una curva de 32 días de duración, a una temperatura de 30 °C a 150 rpm se evaluó la actividad de el extracto enzimático realizando muestreos periódicos cada 8 días midiendo el pH, la liberación de azúcares reductores y la capacidad del microorganismos de degradar el tipo de quitina presente en este tipo de fuente y el potencial del microorganismo en biocontrol de insectos parásitos de importancia veterinaria el ensayo se realizó por duplicado.

5.14. EFECTO DEL pH Y TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El estudio del efecto del pH, se realizó evaluando la actividad enzimática a diferentes valores de pH para determinar el intervalo óptimo en el cual la enzima presentó una mayor actividad.

Para la determinación del pH se puso a reaccionar 1ml de medio quitina al 1.5% preparado en buffer fosfato ajustado a diferentes valores (2,5,6,7,8,9,10) con 1 ml de extracto enzimático, se dejó durante 30min a 30°C. Luego se centrifugó a 8000g por 5 min. Posteriormente se determinaron la unidades quitinolíticas (UQ) definidas como μmol de N-Acetilglucosamina liberadas por minuto, por la técnica de DNS (Miller, 1958).

Teniendo en cuenta el pH óptimo se realizó la determinación de la temperatura óptima. Se utilizó 1 ml de buffer fosfato a pH óptimo con una concentración de quitina al 1.5% con 1 ml de extracto enzimático, la reacción se llevó a cabo a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C) durante 30 minutos y se frenó la reacción poniendo en hielo durante 5 minutos. Se llevó a centrifugar a 8000 g y posteriormente se determinaron la unidades quitinolíticas (UQ) definidas como

μmol de N-Acetilglucosamina liberadas por minuto, por la técnica de DNS (Miller, 1958).

5.15. ESTABILIDAD TÉRMICA Y AL pH DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Para la determinación de la estabilidad al pH se tomó 1ml de buffer fosfato ajustado a diferentes valores (2,5,6,7,8,9,10) al cual se le adicionó 1 ml de extracto enzimático, se dejó durante 60 min a 30°C. Luego de este tiempo, todas las muestras se ajustaron a pH de 7 con NaOH 0.1N. Se llevó a cabo la reacción con 1 ml de muestra y 1 ml de medio quitina 1.5%, a la temperatura y pH óptimo determinadas anteriormente durante 30 minutos. Se centrifugó a 8000 g por 5 minutos y se realizó la cuantificación de azúcares reductores para determinar las Unidades Quitinolíticas residuales luego del tratamiento al pH.

La estabilidad de la temperatura se realizó sometiendo el extracto enzimático a diferentes temperaturas (20 30 40 50 60 70 °C) durante 60 min y se frenó la reacción con hielo por 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la reacción con 1 ml de muestra y 1 ml de medio quitina 1.5%, a la temperatura y pH óptimo determinadas anteriormente durante 30 minutos. Se centrifugó a 8000 g por 5 minutos y se realizó la cuantificación de azúcares reductores para determinar las Unidades Quitinolíticas residuales luego del tratamiento térmico.

5.16. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

La cepa pura obtenida, fue conservada en viales con glicerol al 30% v/v , los cuales se almacenaron a una temperatura de -70°C . Para la cepa aislada se elaboraron bancos de 50 viales. La pureza y población inicial del banco (N) fueron determinadas previo a la conservación mediante el uso de diluciones decimales y siembra en placa sobre el sustrato específico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 AISLAMIENTO PRIMARIO

6.1.1 PREPARACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE MUESTRAS

Las características iniciales del residuo, dificultaron la manipulación. Debido a la dimensión del residuo (concha residual del camarón) se realizó la disminución del tamaño de partícula moliendo mecánicamente cada una de las muestras catalogadas anteriormente en condiciones húmedas. El término condiciones húmedas hace referencia al proceso de descongelar la muestra que produjo un aumento en el porcentaje de agua, provocando una mayor fragmentación del residuo y por tanto un tamaño de partícula más homogéneo facilitando la manipulación y mezcla con el fin de obtener mayor aleatoriedad en el momento de realizar su procesamiento.

Al realizar la medición de pH se obtuvo como valor promedio 9.2 el cual se utilizó como valor base para la preparación de los diferentes medios de cultivo referencia en el estudio debido a que da una idea de las condiciones naturales a la que están expuestos los microorganismos que se quieren aislar y proporcionar un entorno adecuado que permita la proliferación y el éxito de las pruebas. El análisis desarrollado en diversos estudios de las aguas donde se lleva a cabo la crianza del camarón, reveló que existe en su mayoría contaminación de tipo cáustico que aumenta el pH y alcalinidad del agua. A la vez existe la posibilidad de que la dureza del agua se deba a la presencia de un contaminante rico en calcio y magnesio. Estos resultados podrían estar aportando una evidencia de que la fuente de dicha contaminación fuera la cal que se utiliza en las piscinas de camarón y por tanto los residuos tienden a la alcalinidad (INPA, 1999).

6.1.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para el aislamiento de los microorganismos quitinolíticos se empleó el medio reportado por *Sakai et al.* (1998), medio quitina coloidal (anexo 1). Este medio de

cultivo fue utilizado debido a que en el océano este polisacárido insoluble es utilizado como fuente de carbono por las bacterias quitinolíticas las cuales son muy abundantes y extensamente distribuidas (Felse y Panda, 1999). La utilización de quitina por las bacterias marinas se resume en una serie de procesos complejos que son regulados por la disponibilidad del sustrato y las condiciones del medio.

El estudio realizado por Felse y Panda, (1999) y (Sakai et al 1998), quienes aislaron microorganismos quitinolíticos a partir de pilas de compost utilizando quitina coloidal se tomaron como artículos base para llevar a cabo la búsqueda de microorganismo productores de quitinasas. Sin embargo los protocolos de aislamiento fueron modificados para hacerlos aplicables al estudio, obteniendo un extracto de camarón por medio de un proceso de extracción térmico para simular las condiciones nutricionales presentes en los residuos a partir de los cuales se realizó el muestreo.

Debido a la discrepancia con el extracto que contenía el medio de (**Sakai et al.** 1998), se desarrolló una modificación basada en que este componente del medio cultivo anteriormente nombrado no se fabricó a partir de compost, sino de residuos de conchas de camarón que procede de la misma fuente de recolección. Que permitió evitar un déficit nutricional en los microorganismos simulando las condiciones iniciales de la cual fueron aislados y por tanto impedir una inhibición en el crecimiento.

6.1.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUITINOLITICOS

Las cajas fueron incubadas durante un máximo de seis días según la velocidad de aparición de colonias en el medio a una temperatura de 30°C. Tomando en cuenta los reportes bibliográficos (Rao et al, 2000) y que al parecer los microorganismos encontrados eran mesófilos. Con la aparición de colonias se procedió posteriormente a seleccionar y diferenciar por morfología macroscópica cada una de las cepas que desarrollaban un buen crecimiento expresado en términos del

diámetro de la colonia. De cada una de las muestras anteriormente codificadas se obtuvo las siguientes cepas que fueron clasificadas de la siguiente manera: muestra A (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 y A9) muestra B (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 y B9) de la muestra C (C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C7) de la muestra D (D1, D2, D3, D4 y D5) y de la muestra E (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7). La totalidad de las colonias tenía un diámetro promedio de 0.44 cm. que fue utilizado como criterio de selección preliminar.

El medio de cultivo permitió un buen criterio de selectividad dada su limitación en la fuente de carbono, en éste caso quitina coloidal particulada como única fuente de carbono, y el valor de pH 9.2 que fue utilizado con base en la medición realizada a la muestra. Esta última variable, induce las condiciones alcalinas que favorecen el desarrollo de estos microorganismos limitando solo a ciertas poblaciones capaces de adaptarse a este tipo de condiciones para su crecimiento.

Los mecanismos por medio de los cuales los microorganismos toleran, o incluso necesitan, un pH extremo para su crecimiento es que su pared celular y la membrana celular de dichos microorganismos necesitan adaptarse para que su integridad se conserve a esos valores de pH extremos, para que mantenga el interior de la célula cercano a la neutralidad y para realizar síntesis quimiosmótica de ATP en esas condiciones poco frecuentes.

Las adaptaciones estructurales y bioquímicas se refieren principalmente a la pared celular y el peptidoglicano, los alcalófilos cuentan con ciertos ácidos como el glutámico, galacturónico, glucónico, aspártico y fosfórico con cargas (-) estos ácidos permite que la célula absorba Na^+ e H^+ y repele los OH^- . El peptidoglicano se caracteriza por un exceso de exoaminas y aminoácidos en las paredes celulares, grandes cantidades de glucosamina, ácido murámico, mesodiaminpirélico y ácido acético.

La presencia de iones Na^+ es esencial en el ambiente para el transporte efectivo de solutos a través de la membrana. Aunque las adaptaciones exactas siguen sin ser suficientemente conocidas. (Atlas, 2002; Nieshaus *et al* 1999)

Frente a lo reportado por otras investigaciones el criterio del pH varía dependiendo del lugar donde se extrajeron los microorganismos pero el rango de los microorganismos capaces de inducir las enzimas quitinolíticas fluctúa entre 5.5 y 9.0 con un valor óptimo de pH 7.65 y una temperatura de 28°C. (Felse y panda, 1999).

Se obtuvo un total de 23 colonias con diferente morfología macroscópica, colonias de colores amarillo, naranja, blanco, café, rosado, marrón y texturas cremosas, rugosas, de apariencia pulverulenta, redondeadas y puntiformes, Estas colonias fueron presuntivamente capaces de degradar quitina y utilizarla como única fuente de carbono para su crecimiento. A su vez, con el fin de lograr una identificación morfológica más acertada se procedió a realizar coloración de Gram para los diferentes microorganismos aislados. Las figuras 5 muestran los porcentajes de recuperación para cada muestra según la morfología encontrada.

Las coloraciones elaboradas permitieron determinar que los microorganismos con mayor predominancia fueron los de tipo Gram positivo 68% en contraste con los de tipo Gram negativo 32%. Así mismo, la técnica de Gram permitió determinar la morfología microscópica para cada uno de los aislamientos, entre los que se encontraron bacilos, cocos, cocobacilos, micrococos y bacterias filamentosas. Se hace referencia al término de cocobacilos debido a que la alta concentración NaCl en el medio, provocó un estrés en los microorganismos aislados y produjo disminución del tamaño, y por tanto un reporte de este tipo. Por otra parte, es necesario decir que la morfología presentada puede estar asociada con el hecho de que algunas células presentan formas elongadas, como de bacilos, durante la fase exponencial o de crecimiento, que durante la fase estacionaria se fragmentan en varas pequeñas o células cocoides. (Latzko y Hampel, 1995).

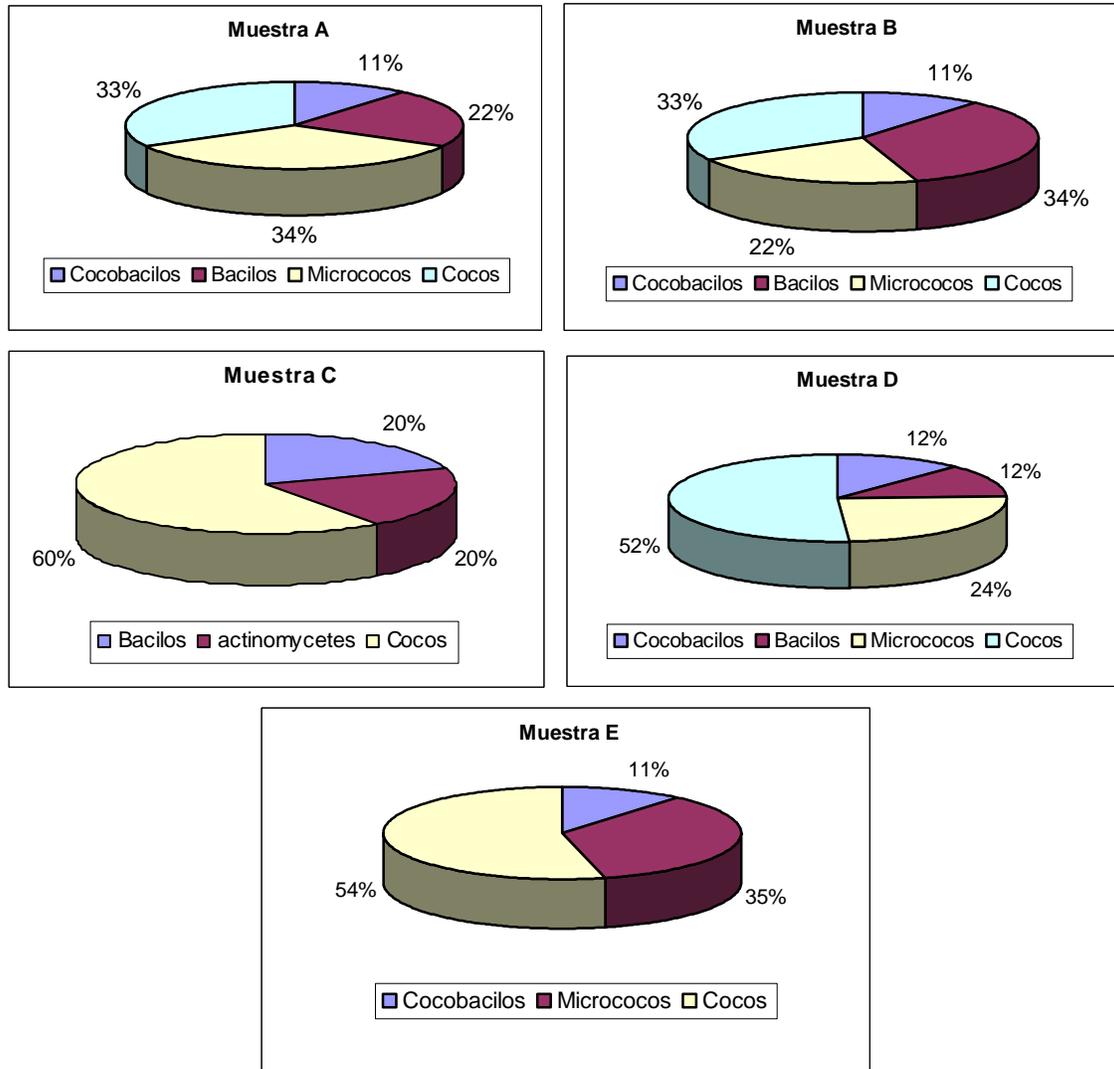


Figura 5. Porcentajes de recuperación de acuerdo a la morfología, para cada una de las muestras de residuos de concha de camarón sembradas en medio quitina coloidal con extracto de camaron y NaCl (6% p/v) T 30°C, 6 días, pH 9.2
Fuente: autor.

La elevada presencia de cocos puede explicarse debido a que la alta prevalencia de este tipo de morfología es reportada como uno de los principales patógenos del camarón ya que estos microorganismos atacan principalmente la cutícula. En el caso de los bacilos existen reportes de patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, los cuales son abundantes como el género *Vibrio* del cual se resalta su actividad quitinolítica, sin embargo por bibliografía se ha reportado un alto porcentaje de bacilos no patógenos capaces de degradar la quitina como el

género *Serratia marcescens*. Por otro lado, la familia de los actinomicetos se pueden encontrar en diferentes ambientes, no solo en habitats terrestre sino también en el lecho marino, diversos estudios han encontrado que este tipo de bacterias filamentosas expresan los genes de la actividad quitinasa. (Felse y Panda, 2000 y Franco-Monsreal *et al.* 2001)

De este modo, para garantizar una mejor tasa de crecimiento, se procedió a la manipulación de variables en el medio de cultivo, para ello se ajustaron variables como la temperatura que se estableció en 30°C y la concentración de NaCl (6% p/v) el cual hacía parte de los componentes del medio utilizado como referencia, además debido a que la muestra provenía de un ambiente marino donde la concentración de NaCl es alta (Tsujiyo, 1998 y Ace *et al.* 2000).

Hay que aclarar que este porcentaje de NaCl (6%) fue utilizado únicamente como criterio de selección al inicio del estudio, ya que solo crecieron cepas capaces de resistir dicha concentración, que provocó una disminución del diámetro de las colonias. Esta concentración fue reducida al 1% p/v, lo que generó un incremento en el diámetro de las colonias (Figura 6) favoreciendo claramente la tasa del crecimiento de los microorganismos y a su vez el tamaño de las colonias en las cajas del medio quitina coloidal, permitiendo un avance para el aislamiento y purificación de cada una de las 23 cepas aisladas hasta esta instancia.

La necesidad de una concentración NaCl 1% se fundamenta en que los microorganismos que habitan ambientes salinos ya sea el mar o estanques de cultivo, donde la concentración de NaCl es alta (5 molar), no crecerán en las concentraciones de NaCl menores de 1.5 molar. Requieren también concentraciones altas de magnesio para sobrevivir y algunos géneros no sólo son halofílicos, sino también alcalófilos. Estas bacterias organotróficas requieren iones Na⁺ para estabilizar su pared celular como se reporta por varios investigadores para el aislamiento de microorganismos marinos (Aguilar y Ingemansson, 1998).

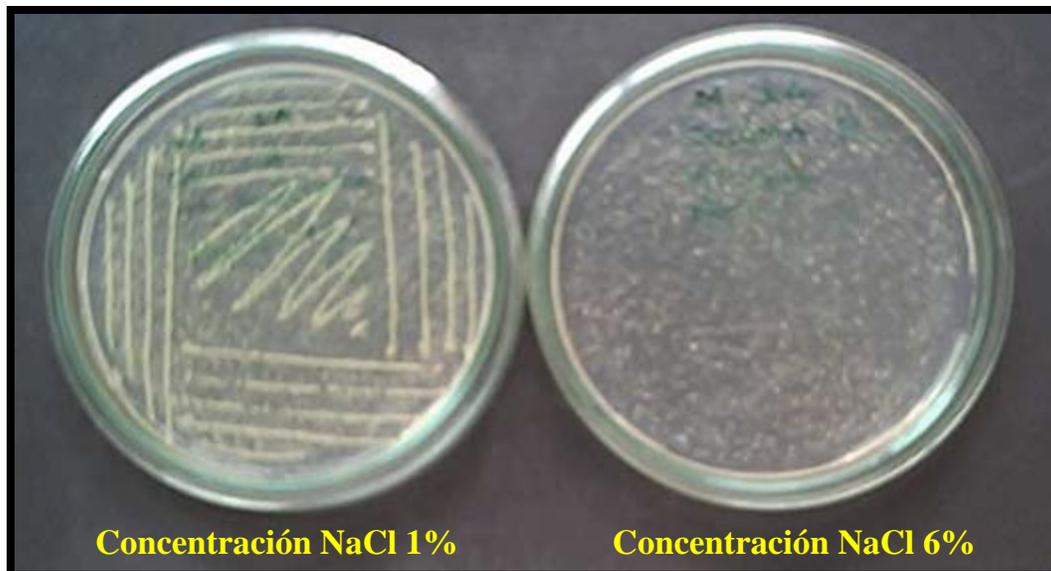


Figura 6. Diferencia en el diámetro de colonia y crecimiento con respecto a la concentración de NaCl.

Fuente: autor.

Los halófilos requieren obligatoriamente NaCl para su desarrollo, debido a que sus estructuras como pared, ribosomas y enzimas mantienen altas concentraciones de sal que son equivalentes a las concentraciones externas de sal actuando como un sistema isotónico que se regula por medio de solutos compatibles. (González y Peña, 2002 ;Ace *et al* 2000).

6.2. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS POR SU POSIBLE PATOGENICIDAD EN CAMARÓN

Los crustáceos que incluyen gambas, camarones y animales análogos que poseen un exoesqueleto quitinoso son muy ricos en proteínas y pobres en carbohidratos, por esta razón son un excelente sustrato para bacterias heterótrofas, en consecuencia aunque la población bacteriana del camarón sea bastante consistente y compuesta principalmente por especies saprofitas como *Vibrio*, el nivel de contaminación del camarón con bacterias de interés en salud pública es alto. Por esta razón se desarrolló esta prueba que descartará este tipo de microorganismo del estudio, dada su alta prevalencia en este tipo de organismos, la cual está ligada a diferentes factores como la inadecuada

alimentación, la elevada densidad poblacional, la inmunosupresión, la deficiente calidad del agua y los factores climáticos (Franco-Monsreal *et al*, 2001).

Los patógenos que presentan los mayores problemas patológicos se han identificado bacilos como *Carnobacterium piscicola*, *Brochotrix sp*, *Vibrio sp*, y los cocos como *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* (Figuroa, 2000)

Después de realizar las pruebas en los medios selectivos XLD (*Salmonella sp*), CHROMOCULT (enterobacterias), TCBS (*Vibrio sp*) y MANITOL SALADO (*Staphylococcus aureus*) y las pruebas bioquímicas confirmatorias (Carrascal, 2003), fueron descartadas del estudio aquellas que resultaron positivas dando un resultado de 10 cepas no patógenas. Como se observa en la Figura 7 y Tabla 4.

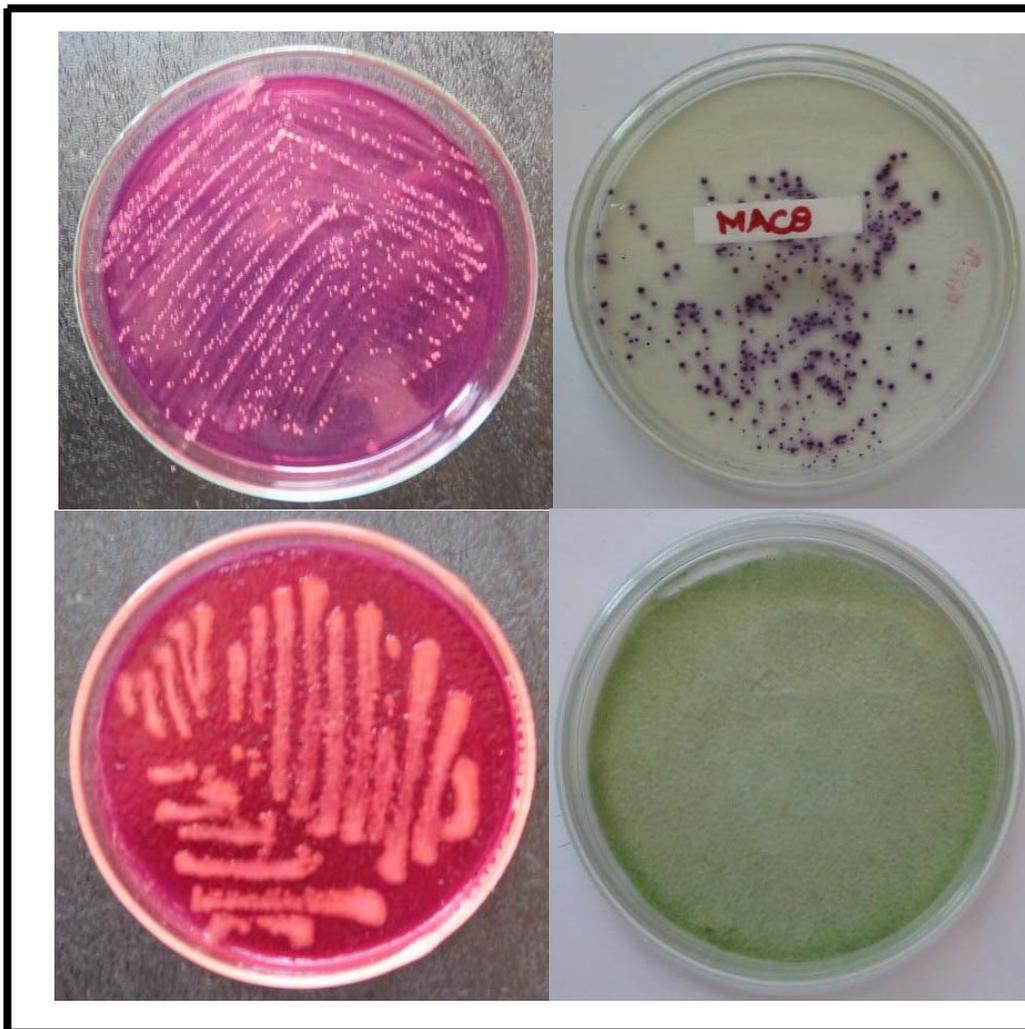


Figura 7. Microorganismos patógenos del camarón en los diferentes medios selectivos.
Fuente: autor.

Tabla 4. Detección de microorganismos patógenos en medios selectivos y bioquímicas

MEDIOS							
CEPAS muestra	XLD	CHROMOCULT	MANITOL	TCBS	CATALASA	OXIDASA	PATÓGENO
A							
A1	(-)	(-)	(+)		(+)		<i>Staphylococcus sp</i>
A2	(-)	(-)	(-)	(-)			
A3	(-)	(-)	(-)	(-)			
A4	(-)	(-)	(-)	(-)			
A5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)		<i>Staphylococcus sp</i>
A6	(-)	(+)	(-)	(-)			<i>Escherichia coli</i>
A7	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)		<i>Staphylococcus sp</i>
A8	(-)	(+)	(-)	(-)			<i>Escherichia coli</i>
A9	(-)	(-)	(-)	(-)			
MUESTRA B							
B1	(-)	(-)	(-)	(-)			
B9 (AB)	(-)	(-)	(-)	(-)			
MUESTRA C							
C1	(-)	(-)	(-)	(+)		(+)	<i>Vibrio sp</i>
C2	(-)	(-)	(-)	(+)		(+)	<i>Vibrio sp</i>
C3	(-)	(-)	(-)	(-)			
C4	(-)	(-)	(-)	(-)			
C5	(+)	(-)	(-)	(-)			<i>Salmonella sp</i>
C6	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)		<i>Staphylococcus sp</i>
C7	(-)	(-)	(-)	(-)			
MUESTRA D							
D1	(-)	(-)	(-)	(-)			
MUESTRA E							
E1	(-)	(+)	(-)	(-)			<i>Escherichia coli</i>
E2	(-)	(+)	(-)	(-)			<i>Escherichia coli</i>
E3	(-)	(+)	(-)	(-)			<i>Escherichia coli</i>
E4	(-)	(+)	(-)	(-)			<i>Escherichia coli</i>

Fuente: autor.

6.3. PRUEBAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD QUITINOLITICA MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE TIPO REDUCTOR EN FERMENTACIÓN DISCONTINUA.

La quitina es un polisacárido versátil formado por el azúcar N-acetilglucosamina, unida mediante enlaces β -1.4, el producto final de su hidrólisis son monómeros del mismo azúcar y al compartir característica de poseer un grupo aldehído

altamente reactivo al igual que la glucosa permitió aplicar la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico para la detección de la liberación de azúcares reductores en el medio de cultivo durante la fermentación. La liberación de azúcares al medio fue determinada por medio de espectrofotometría 540nm, y fue usado como criterio de selección ya que las cepas que presentaron mayor actividad fueron llevadas a fermentaciones de mayor escala para evaluar los parámetros cinéticos de biomasa y producto (Howard *et al*, 2003).

6.3.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINA

La *N*-acetilglucosamina, es un homopolímero de la glucosa que posee un grupo aldehído altamente reactivo, de esta manera se puede concluir que es un azúcar reductor ya que contiene un grupo aldehídico o cetónico libre en forma de hemiacetal que se oxida con facilidad a ácidos carboxílicos en disolución alcalina. Presenta un esqueleto carbonado con grupos alcohol o hidroxilo y es portadora del grupo aldehído (aldosas) o cetónico que le dan carácter reductor (ceden electrones y se oxidan ante la presencia de compuestos como iones cúpricos Cu^{++} que pasan a cuprosos Cu^{+}). (Tiezt, 1972).

Por las razones anteriores se realizó la técnica de DNS y la curva se muestra en la figura 8 y los resultados en el Anexo 2.

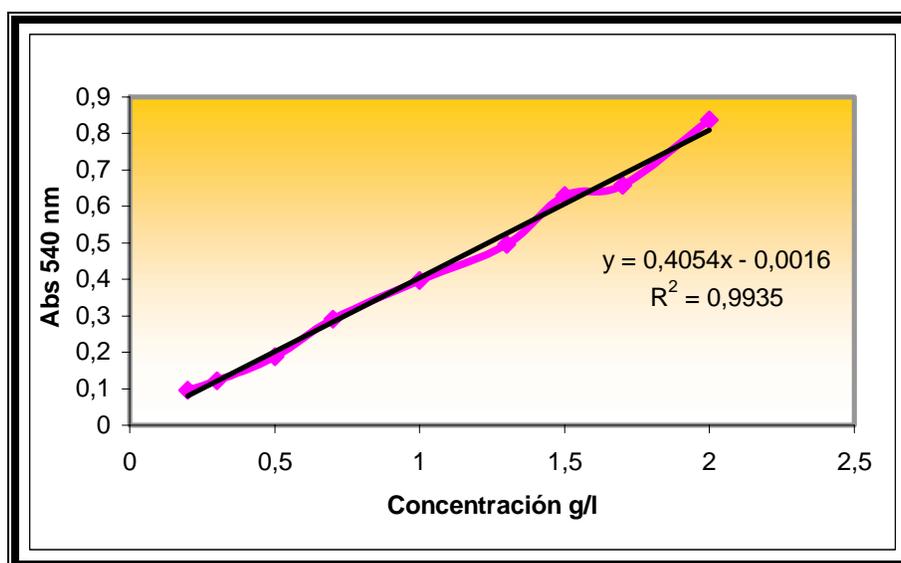


Figura 8. Curva patrón de N-acetilglucosamina.

Como anteriormente se menciona, esta técnica de óxido reducción se basa en la oxidación de la glucosa, pero al ser la *N*-acetilglucosamina, un homopolímero de la glucosa sufre un comportamiento similar debido a que en solución acuosa se encuentra en su forma cíclica que es muy estable y por lo tanto no reacciona. Por esta razón es necesario calentar la muestra para que el anillo se abra dejando expuesto el aldehído, que da lugar a una reacción de oxidación (Routh y Eyman, 1990)

6.3.2 DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES LIBRES

Las 10 cepas resultantes de las pruebas patogenicidad en camarón fueron evaluadas en su actividad, por duplicado denominadas como muestra A (A2, A3, A4, A9) muestra B (B1, B9) de la muestra C (C3, C4, C7) de la muestra D (D1) y de la muestra E (ninguna). Las cuales se dividieron en grupos morfológicos cocos, bacilos y actinomicetos para evitar la contaminación y comparaciones mas exactas.

La prueba de recuento en placa muestra resultados óptimos frente a la prueba de viabilidad en este tipo de bacterias con recuentos de 21×10^9 ufc/ml como se observa en la (figura 9). En los recuentos de actinomicetes se tuvo en cuenta un rango más amplio frente a los de cocos y bacilos, debido a que este tipo de bacterias se comportan como hongos en su crecimiento (Crawford *et al.* 1993), lo que se busca con el uso de inculo es la disminución de la fase de adaptación teniendo en cuenta el lento crecimiento por la complejidad de la molécula de quitina.

Las curvas de fermentación permitieron determinar cuantitativamente la presencia de actividad quitinolítica de cada uno de los microorganismos aislados. Inicialmente los muestreos se realizaron durante los 4 primeros días pensando en las características morfológicas de los microorganismos, sin embargo, debido al bajo incremento en las lectura de las absorbancias por la complejidad del

polímero, los productos de la hidrólisis no se detectaron en los primeros días, por ese motivo se optó por realizar mediciones cada 3 días para poder descartar del estudio las cepas que no presentaran resultados satisfactorios (figura 10).

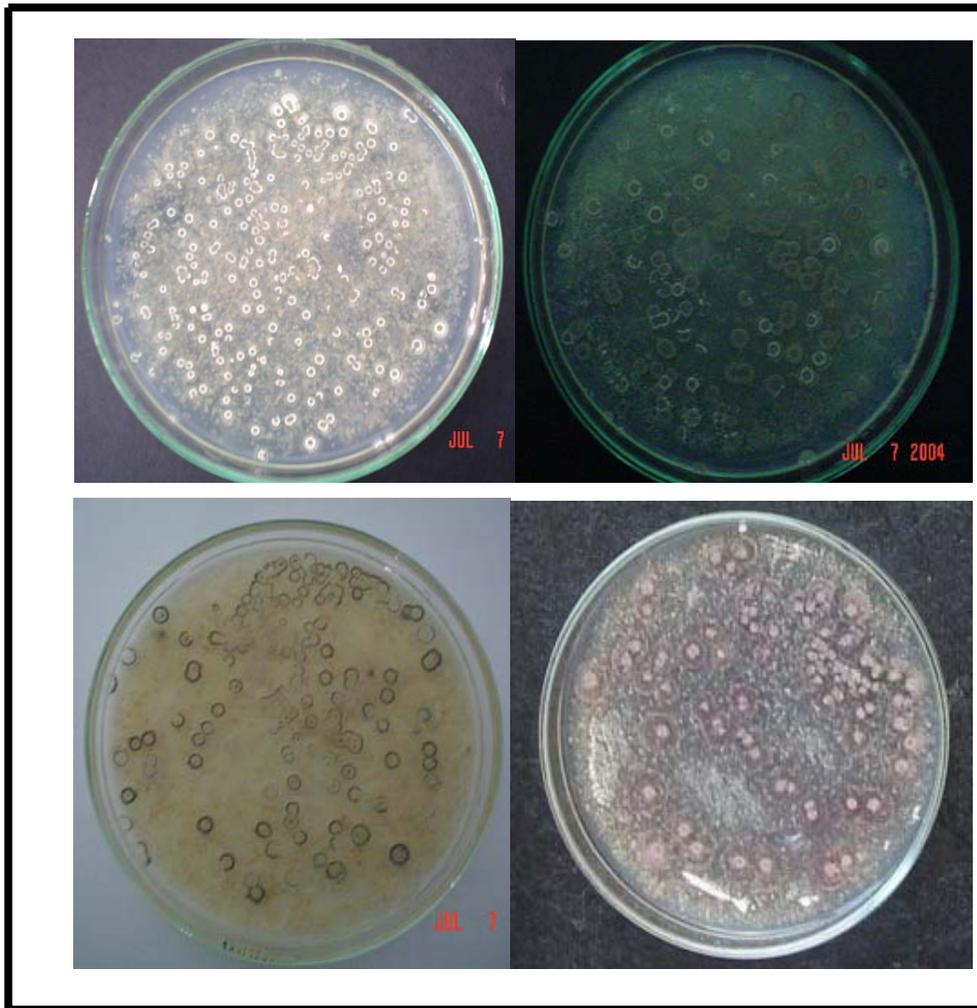


Figura 9. Aspecto macroscópico de cepa de actinomicetos en siembra en placa en medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, E.C 1%, pH 9.2.
Fuente: Autor

Las anexos 3, 4 y 5 y figuras (11,12, 13) se presentan los datos de las curvas de bacilos, actinomycetes y cocos realizadas para la detección de actividad quitinolítica. En primer lugar se realizó una curva con el medio anteriormente descrito, sin embargo, ésta permitió dilucidar la necesidad de la optimización del medio de cultivo para favorecer la producción de biomasa microbiana y a su vez la

producción de enzimas quitinolíticas. Las concentraciones de azúcares reductores totales arrojadas por las cepas estudiadas no fueron considerables en primera instancia, se pensó que el tiempo de producción de las enzimas oscilaría en un rango 3 y 4 días, pero debido a la complejidad de la estructura del polímero las absorbancias parecían aumentar hasta el día 16



Figura 10. Fermentación de los aislamientos obtenidos para determinar de manera presuntiva la capacidad quitinolítica en medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, E.C 1%, pH 9.2. Fuente: Autor

Un inconveniente importante de los primeros ensayos basados en la determinación de N-acetilglucosamina liberada, era la imposibilidad de adaptarlos a sistemas continuos de medición. Las severas condiciones de alcalinidad requerida y la falta técnicas para la determinación colorimétrica del N-acetilglucosamina liberada provocaban que las lecturas no fueran de modo considerable ya que concentración de azúcares reductores oscilaban en un rango de 0.043 a 0.068 g/l alrededor del cuarto día. Pero en lo reportado por literatura se observa una tendencia a rangos bajos de modo que el curso de la reacción no podía seguirse por análisis puntual.

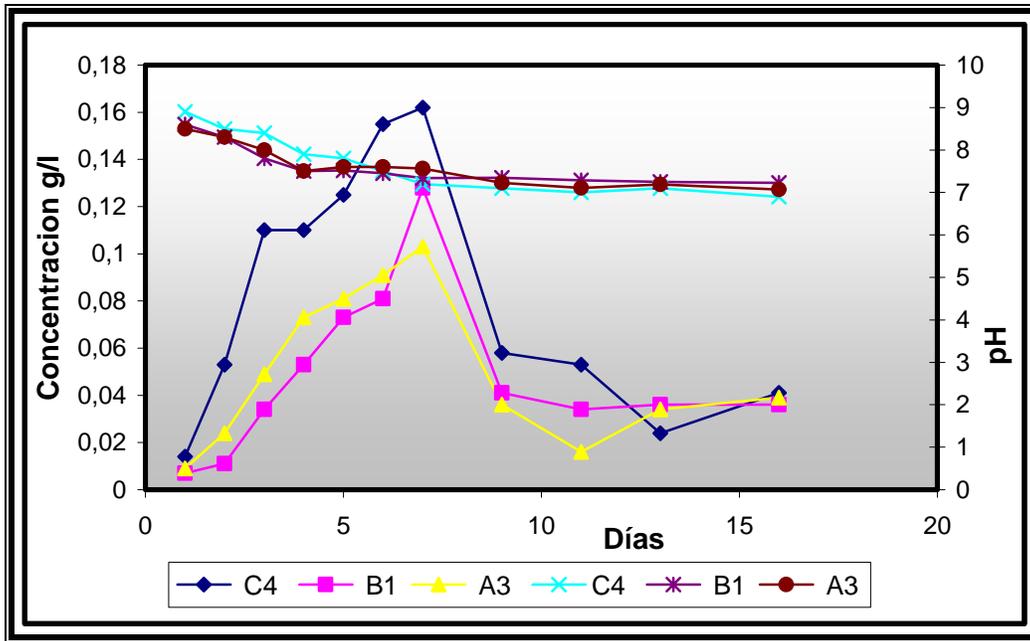


Figura 11. Concentración N-acetilglucosamina liberada en medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, EC 1%, pH 9.2 y cepas aisladas (bacilos C4, B1, A3)

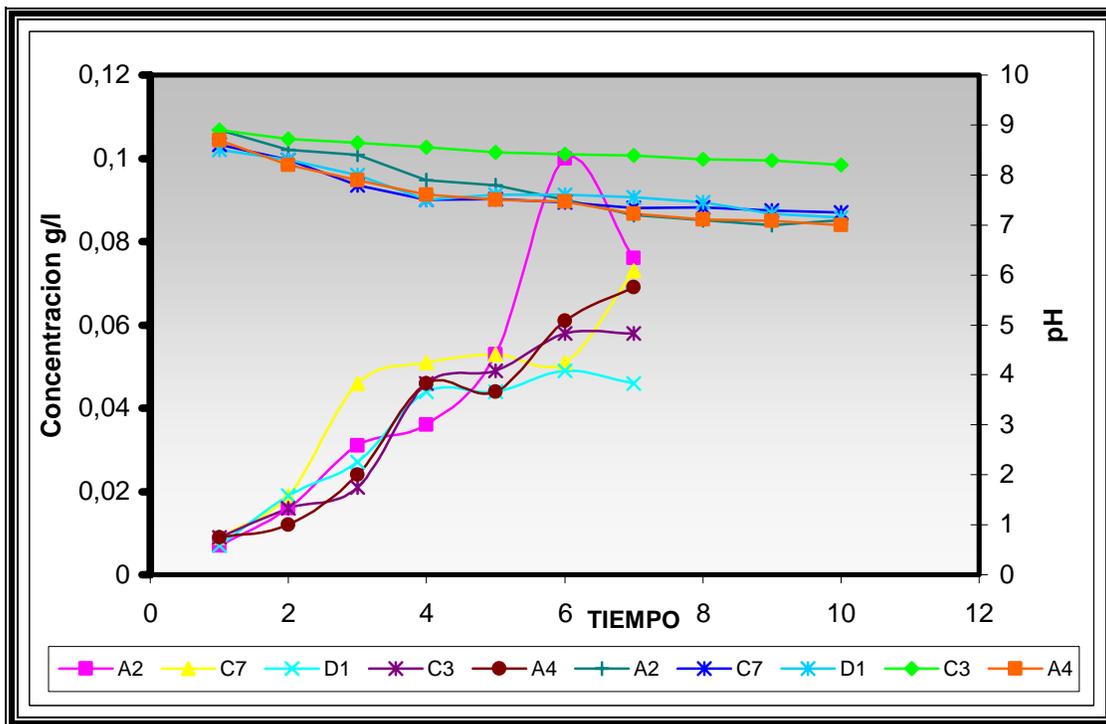


Figura 12. Concentración N-acetilglucosamina liberada medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, E.C 1%, pH 9.2 y cepas aisladas (Cocos A2, C7, D1, C3, A4).

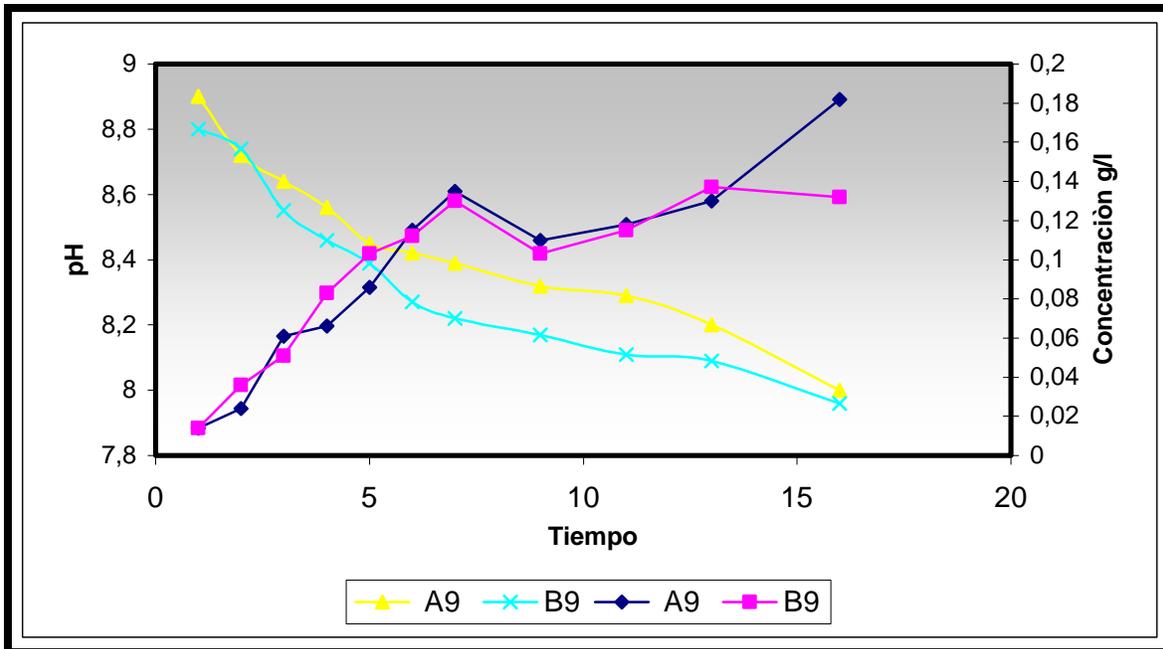


Figura 13. Concentración N-acetilglucosamina liberada medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, E.C 1%, Ph 9.2 y cepas aisladas (actinomycetes A9 Y B9).

Análisis Estadístico de datos

Para determinar si existen diferencias en la liberación de azúcares reductores entre las 10 cepas seleccionadas para las pruebas preliminares de actividad quitinolítica mediante la cuantificación de productos de la hidrólisis de tipo reductor en fermentación discontinua se realizó la prueba T student del programa Statistix computarizado.

Conforme con los resultados arrojados por el programa statistix, se observó que existe diferencia significativa entre la cepas A9 actinomycete y las 9 cepas restantes, los resultados obtenidos permitieron seleccionar la cepa A9 como la de mayor producción de azúcares reductores (g/L) con respecto a los 10 cepas seleccionadas por características morfológicas y por antagonismo.

Frente a los resultados arrojados en este ensayo se pudo evidenciar un cambio de aspecto del color del medio cultivo, de la misma forma el cambio físico de la quitina da una pauta indicando que puede estar siendo atacada enzimáticamente y

que las bajas concentraciones de azúcares reductores totales obtenidas por los microorganismos aislados pueden estar asociados a la incorporación del producto de la degradación debido a que la única fuente de carbono que proporciona el medio es la quitina coloidal un polímero de difícil degradación. Los resultados arrojados en la prueba determinaron que la mayoría de microorganismos utilizados en el estudio podían crecer en el medio de cultivo, pero no parecían liberar azúcares reductores totales considerables y en otros casos no presentaban cambios considerables a excepción de las cepas A9 y B9, las cuales tendían a incrementarse a medida que los tiempos de fermentación aumentaban aproximadamente hacia el día 7 (figura 13, 14). Este parámetro fue considerado para la eliminación de cepas que al parecer no tenían la capacidad de degradar el polímero muy eficientemente y por consiguiente no estaban liberando azúcares reductores totales, el cual era el objetivo planteado en este estudio preliminar.

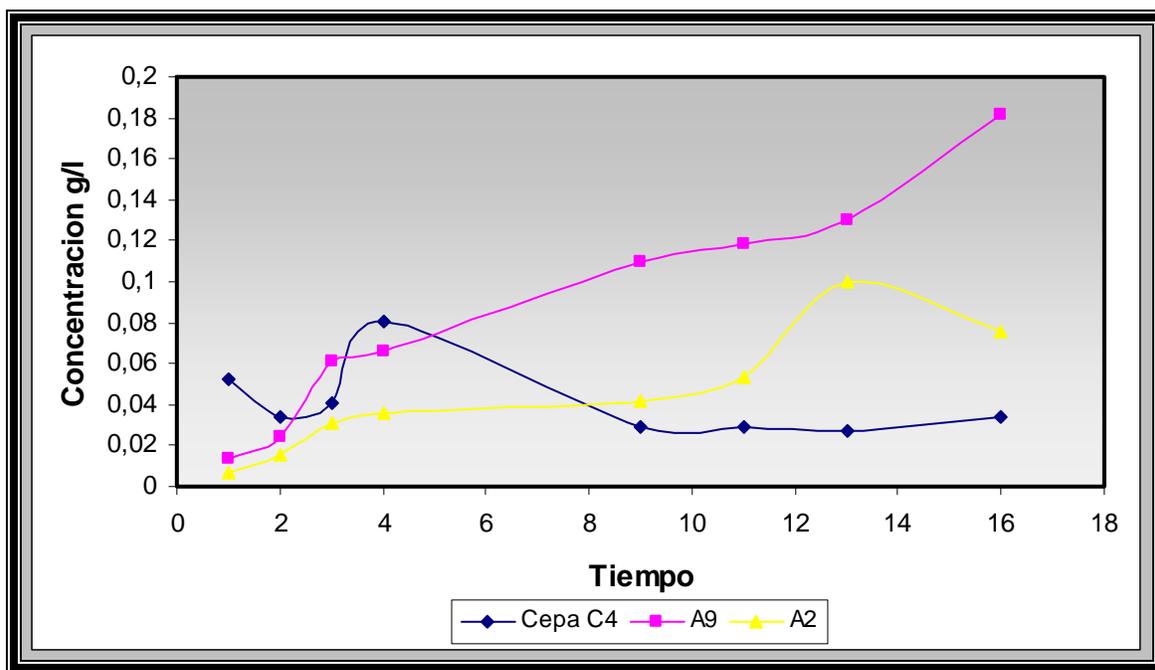


Figura 14. Comparación de la concentración de N-acetilglucosamina liberada curva inicial entre actinomicetes A9, coco A2 y bacilo C4 en medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, E.C 1%, pH 9.2.

De este ensayo se concluye que es importante optimizar el medio u otras variables debido a los prolongados tiempos de fermentación, donde el día máximo de producción para las cepas bacilos y cocos fue el día 7 pero con tendencia disminuirlas. Además una de la cepas, en este caso un el actinomicete presenta las mas altas concentraciones con tendencia a incrementarlas pero se pensó que un componente dentro del medio si podía estar afectando o favoreciendo la expresión de la actividad quitinolítica.

Por esta razón se desarrollo una metodología que estudiara el comportamiento respecto a la concentración de sustrato o si el extracto de camarón, una solución rica en proteína afecta o no la producción de la enzima haciéndole seguimiento a una nueva curva que determinaría dos variables; el efecto del extracto de camarón y la cantidad de sustrato en la actividad quitinolítica Tabla 5.

Se seleccionó la cepa correspondiente al actinomicete que recibe el código A9 Y B9, que morfológicamente y microscópicamente es la misma cepa y la cual presento el mejor comportamiento en las pruebas anteriores los resultados pueden apreciarse más claramente en el anexo 3 y figura 14 ,15.



Figura 15. Aspecto macroscópico cepa A9 (izquierda de la imagen) y B9 (derecha de la imagen) en medio Quitina coloidal 1%, NaCl 1%, E.C 1%, pH 9.2.
Fuente: Autor

Tabla 5. Variación en la concentración de quitina coloidal en el medio y la presencia del extracto de camarón.

Concentración de quitina	Con y sin extracto de camarón	Concentración de NaCl	pH
1.5%	Con extracto	1%	9.2
1.5%	Sin extracto	1%	9.2
1.0%	Con extracto	1%	9.2
1.0%	Sin extracto	1%	9.2

Fuente: Autor

Un paso importante en este proceso es la adherencia de bacterias marinas a la quitina contenida en partículas. Se inspeccionaron las especies aisladas de los residuos por su habilidad para ligarse a este tipo de fuente carbono y degradarla como lo realizado por la cepa A9.

El microorganismo encuentra la quitina por colisión aleatoria u otro mecanismo. Allí se une a el y por medio de las quitinasas extracelulares degradándolo en oligosacáridos que pueden entrar en la zona periplásmica. Posteriormente estos oligosacáridos son degradados en residuos de *N*- acetilglucosamina (GlcNac). Éstos son llevados al citoplasma mediante la vía del Fosfoenol-piruvato utilizando el sistema GlcNac fosfotransferasa. A partir de aquí, la GlcNac-6P sufre una conversión en dos pasos, en el primero pierde su grupo acetyl y en el segundo se libera amonio, para obtener Fructosa-6P, la cual puede entrar a glicólisis y seguir la vía metabólica ya conocida. (Yu *et al*, 1991; wu *et al*, 2001).

Las células que se adhieren en este caso al substrato análogo quitina coloidal, produjeron una variedad considerable y esta fue observada en la misma proporción de células en medio de cultivo líquido (figura 16). La primera descendencia de células adherentes que se ligaban a las partículas de substrato fueron adaptándose gradualmente a las nuevas condiciones, pero la población

cambió gradualmente, como un proceso necesario para la colonización. Ya que se requiere energía metabólica para la adherencia, y el desarrollo de las adaptaciones debido a las condiciones extremas del medio, como el pH y la concentración de NaCl.



Figura 16. Cambios en el color del medio y procesos de adhesión a las partículas del sustrato. Fuente autor.

La adherencia ocurrió en los medios de cultivo de crecimiento con concentraciones bajas del sustrato, sin embargo, los resultados no fueron los esperados, este fenómeno se explica por los cambios observados en el medio, la viabilidad y liberación de azúcares reductores obtenidas demostraron que se requiere reconocimiento rápido con el sustrato en forma continua para apoyar el aumento del número de células de modo suficiente e iniciar la degradación del polímero.

La adhesión / desorción del aparato celular se usa para supervisar el estado del nutriente en el ambiente continuamente, al parecer en otras investigaciones funcionan como sensores para el reconocimiento sustrato. En el medio con concentraciones bajas de sustrato, puede producirse una desadhesión de las células, probablemente al buscar un ambiente más favorable. (Yu et al,1991 y Gómez *et al.* 2000)

Las velocidades de reacción de los procesos anteriormente enunciados dependen en gran medida de variables para expresión de la enzima, el tipo de microorganismo que la produce, el tipo de sustrato y la temperatura de incubación. Debido a que la quitina es degradada muy lentamente por la complejidad del polímero en consecuencia se demostró que en un rango de 27°C a 33°C y un aumento en la concentración de quitina 1.5% tiene su mayor actividad para los ensayos biotecnológicos realizados. Como se observa en la Figura 17 y 18, Anexo 6.

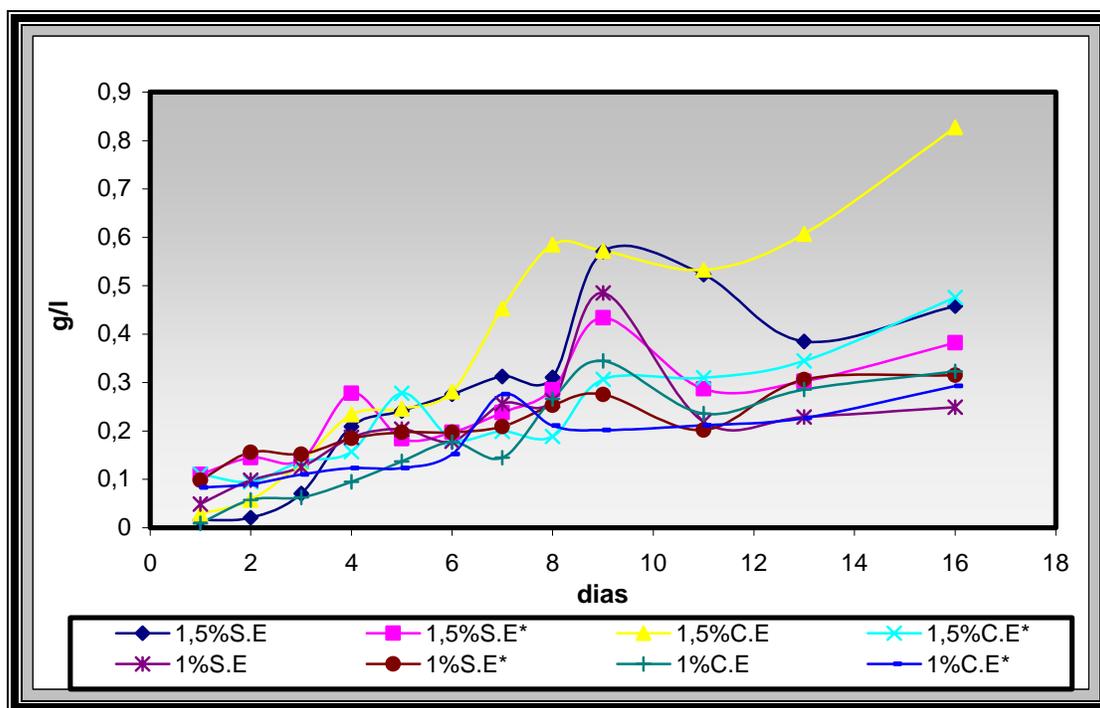


Figura 17. Comparación de liberación de N-acetilglucosamina a diferentes concentraciones de quitina coloidal con y sin extracto de camarón con la cepa de mayor actividad curva anterior (A9) NaCl 1%, pH 9.2, 30°C. * indica replica

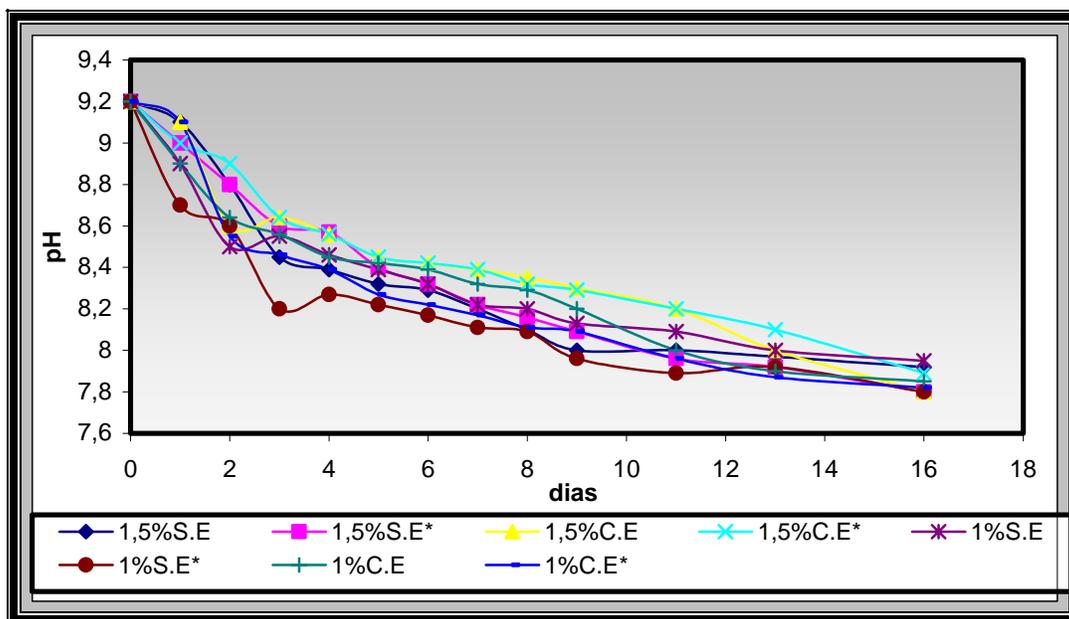


Figura 18. Comportamiento del pH a diferentes concentraciones de quitina coloidal con y sin extracto de camarón con la cepa A9, NaCl 1%, pH 9.2, 30°C. * indica replica

El problema principal es que la actividad catalizadora es fuertemente dependiente del tipo de sustrato. Así, los productos intermedios más cortos nunca pueden aumentar en cantidades significativas con respecto a los más complejos porque ellos son degradados y posiblemente están siendo incorporados más rápidamente para la síntesis de biomasa.

El análisis cuidadoso de actividad catalizadora hacia un número de sustratos combinado con la estructura y la producción de enzimas quitinolíticas en las bacterias es normalmente inducida por la presencia de quitina en el medio de cultivo. Desde que la quitina sea insoluble, los microorganismos son incapaces de utilizarla a menos que haya sido hidrolizada a oligómeros solubles.

De tal manera la expresión de los genes son el signo para la inducción de síntesis de la quitina que podrían ser el resultado del contacto físico entre la célula y el sustrato insoluble. Sin embargo, se ha demostrado que la producción de las enzimas quitinolíticas podrían inducirse agregando (GlcNAc)₂ o (GlcNAc)₃₋₄ al

medio de cultivo, pero no se ha realizado pruebas con este tipo de metodología reportada por diversos autores. (Felse y Panda, 2000)

La actividad quitinasa se haya regulada por la disponibilidad del sustrato en el medio, razón por la cual la actividad enzimática se vio gravemente afectada cuando las concentraciones de quitina en el medio no eran mayores de 1.5%. Al realizar los experimentos aumentando la concentración de sustrato, apareció un incremento considerable en la actividad quitinasa (figura 19). Es muy probable, que ésta haya sido inducida por la adición, sin embargo aún no se ha encontrado la relación que existe entre la actividad quitinasa y aumento de sustrato. Por otra parte, existe la probabilidad de que el cambio en la coloración de los medios y la formación de agregados de aspecto compacto, sea un subproducto de la actividad de la enzima sobre el sustrato, pero esto está por esclarecerse mejor.

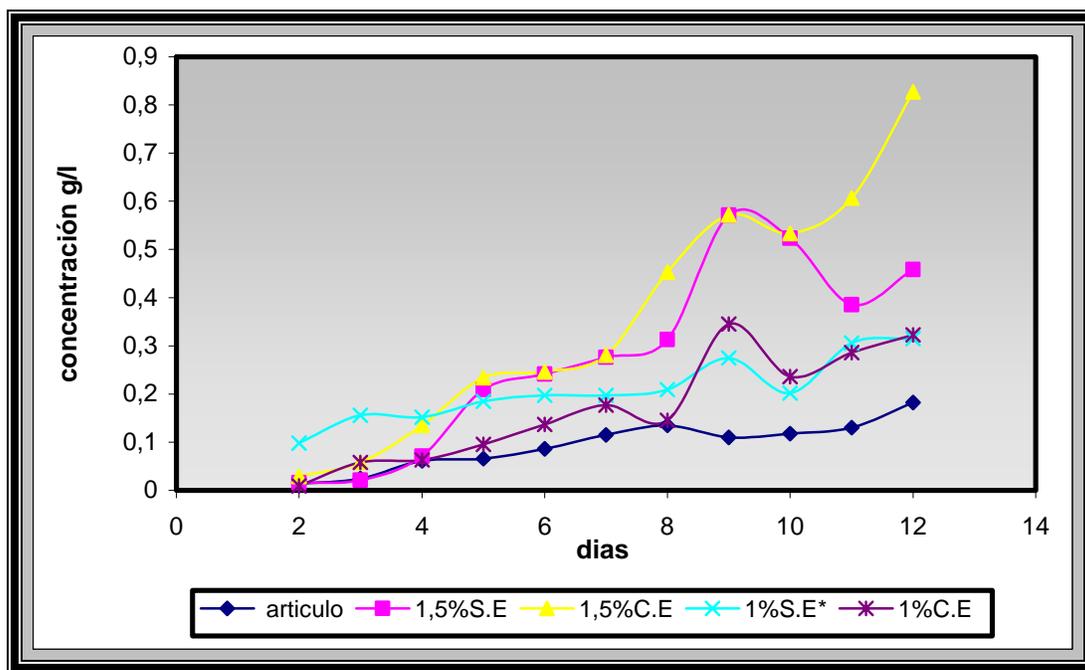


Figura 19. Comparación de liberación de N-acetilglucosamina frente a concentración de quitina con y sin extracto de camarón frente al medio referencia, con la cepa de mayor actividad curva anterior A9. NaCl 1%, pH 9.2, 30°C.

6.3.3. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS DE FERMENTACIÓN DISCONTINUA.

Con los datos obtenidos en las curvas anteriores se determinó que para poder obtener mejores resultados es importante adicionar una concentración de quitina coloidal del 1.5%, extracto de camarón 1%, NaCl del 1%, pH 9.2 y una temperatura de 30° C. A partir de esto se realizó una fermentación con mayor tiempo en la que se midió biomasa la concentración de azúcar reductores totales liberados para poder determinar los tiempos de caída de la actividad quitinasa. En el medio estéril la concentración de azúcares reductores es de 0.008 g/L y de proteínas totales era de 2.9 g/L datos que sirven como criterio de corrección de la concentraciones medidas a lo largo de la fermentación.



Figura 20. Curva de estandarización de condiciones adecuadas de fermentación cepa seleccionadas A9 en medio Quitina coloidal 1.5 %, NaCl 1%, E.C 1%, pH 9.2.
Fuente: autor.

A partir de la estandarización y modificación de variables en el medio de cultivo, se desarrolló una nueva curva conservando la homogeneidad de los procesos metodológicos anteriormente descritos, debido a la necesidad de puntos comparación que permitan el desarrollo de resultados satisfactorios, que accedan a encontrar respuestas a las incógnitas planteadas, basadas en un soporte

experimental con respecto a los aumentos considerables de las concentraciones de azúcares reductores obtenidos durante las últimas fermentaciones.

El tiempo de fermentación óptimo osciló entre 26 y 32 días debido a la cantidad de sustrato disponible en el medio. Los cambios en la quitina se evidencian de manera importante en los precipitados que se forman en el fondo de los erlenmeyer durante la fermentación, al parecer en este caso la cepa catalogada (A9) transforma totalmente la estructura de la quitina sin producir malos olores pero si cambios de color y textura. Como se observa en la figura 20 y 21.



Figura 21. Aspecto físico de la quitina coloidal antes y después de la fermentación
Fuente: Autor

En cuanto al día de mayor producción y su pH según los resultados de los últimos ensayos, fluctúa entre los 16 y 26 días, sin embargo este rango es dependiente de la cantidad de sustrato y el comportamiento en este caso del actinomicete (la cepa referencia A9). Aparentemente el sustrato tiene funciones fisiológicas y bioquímicas no anticipadas ó funciones de mantenimiento que no permiten que se liberen los subproductos sino que a su vez sean utilizados por el microorganismo; mientras que ante el pH se nota una relación directa con el aumento de actividad quitinolítica y la disminución de sustrato aunque no es de manera considerable y

falta determinar hasta donde puede disminuir y su efecto sobre la actividad enzimática.

Frente a esto se puede concluir que el tipo de sustrato usado puede aumentar la velocidad de reacción actuando como única fuente de carbono para el microorganismo donde no solo se puede observar la liberación de azúcar reductor, en este caso el N-acetilglucosamina mediante técnicas colorimétricas, sino, que al determinar la cantidad liberada se pudo evidenciar un proceso de aumento de actividad quitinolítica con una mayor concentración que respecto con el medio referencia aproximadamente en un 300%, aumentando casi 5 veces lo producido durante los primeros ensayos, demostrando que la actividad quitinolítica esta directamente ligada a la cantidad de sustrato en el medio y los factores anteriormente nombrados. En comparación, la adición de N-acetilglucosamina como inductor no fue necesaria. Como se observa en la figura 22.

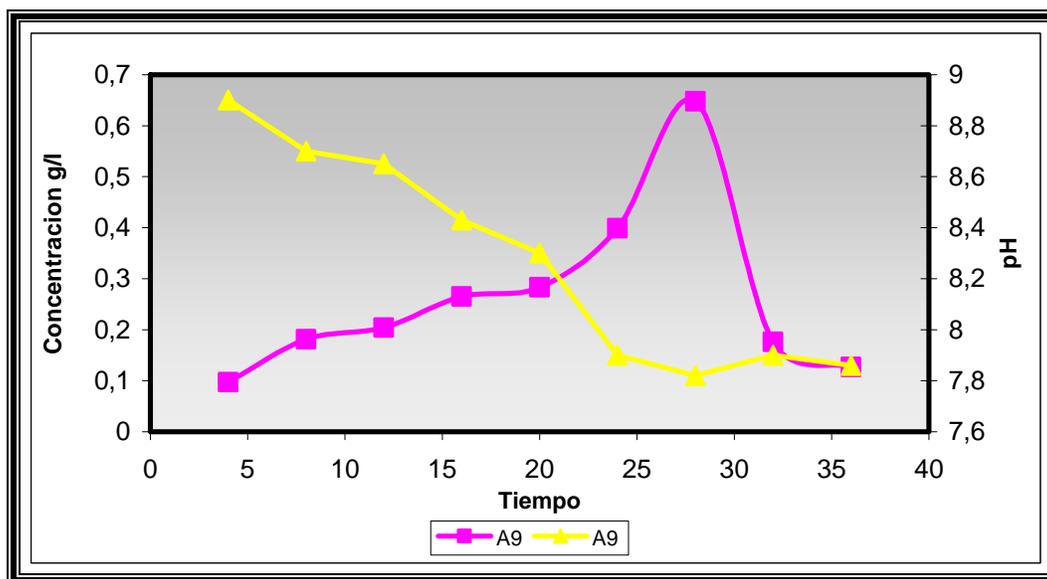


Figura 22. Liberación de N-acetilglucosamina medio modificado Q.C 1.5%, C.E, pH 9.2 Cepa seleccionada (A9).Evaluación de los cambios en el pH durante la fermentación discontinua.

Por otro lado es necesario aclarar que la degradación de la quitina produce poca N-acetilglucosamina y predominan los oligómeros (quitobiosa, quitotriosa). Los

oligómeros son convertidos en monómero por la β -N-acetil-glucosaminidasa. De ahí pueden radicar los bajos valores de las concentraciones ó actividad reportadas tanto por bibliografía como por las obtenidas en el estudio (May *et al.* 2000).

Análisis Estadístico de los Datos

El parámetro de comparación para los resultados anteriormente expuestos fueron los datos obtenidos de los tratamientos que se realizaron quitina 1.5%, con y sin extracto camarón y quitina al 1% con y sin extracto de camarón.

Conforme con los resultados arrojados por el programa statistix computarizado.

Cepa A9 con extracto de camarón

Se concluye que se rechaza H_0 . Existe evidencia estadísticamente significativa para decir que el promedio de producción de azúcares reductores en g/L es mayor en el medio con extracto de camarón al 1,5% de quitina con respecto al de 1%. $p = 0.00001$ IC95% (-0.4861, -0.4774)

Para la Cepa A9 sin extracto de camarón

Se concluye que se rechaza H_0 . Existe evidencia estadísticamente significativa para decir que el promedio de producción de azúcares reductores en g/L es mayor en el medio sin extracto de camarón al 1,5% de quitina con respecto al de 1%. $p = 0.00001$ IC95% (-0.1911, -0.1872)

A partir de los resultados arrojados, se aceptó la H_a , en la cual la concentración quitina coloidal al 1.5%, con extracto de camarón, es la que presentaba los valores de producción de azúcares reductores en g/L significativos en actividad enzimática (quitinasa,) y para la estandarización de las condiciones adecuadas de fermentación discontinua para cepa A9. Por lo cual esta concentración y el uso del extracto de camarón fueron utilizados para los posteriores procesos de fermentación. (Anexo 11).

6.4. CURVA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO PARA CEPAS SELECCIONADAS EN EL MEDIO ESTÁNDAR

A partir de las modificaciones realizadas al medio de cultivo se selecciono la actinomyce catalogada como A9 la cual libero la mayor cantidad de N-acetilglucosamina 1.2 g/L^{-1} durante día 24 de la fermentación y presento un mayor potencial de actividad quitinolítica, con una alta adaptación a las condiciones del medio de cultivo, los cambios considerables dentro del mismo y al sustrato con óptimos resultados, además de una continuidad en los datos arrojados y en los procesos de producción demostrando una adaptación ideal a las condiciones extremas para su desarrollo que posee el medio como el porcentaje de NaCl 1%, el pH y demás variables, que fueron modificadas para evidenciar la actividad quitinolítica reportada en estos géneros (Figura 23,24) y (anexo 7).

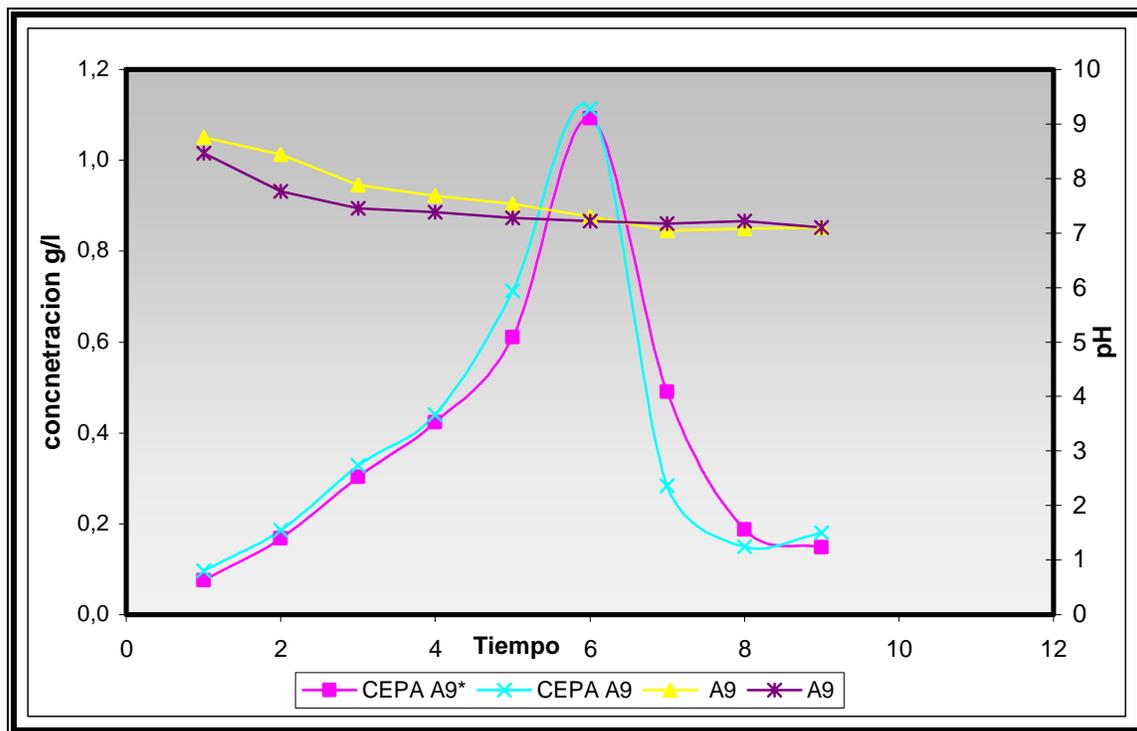


Figura 23. Promedio de Liberación de N-acetilglucosamina y comportamiento del pH durante la fermentación medio modificado Q.C 1.5%, C.E 1%, NaCl 1% Cepa seleccionada (actino A9) * indica replica.

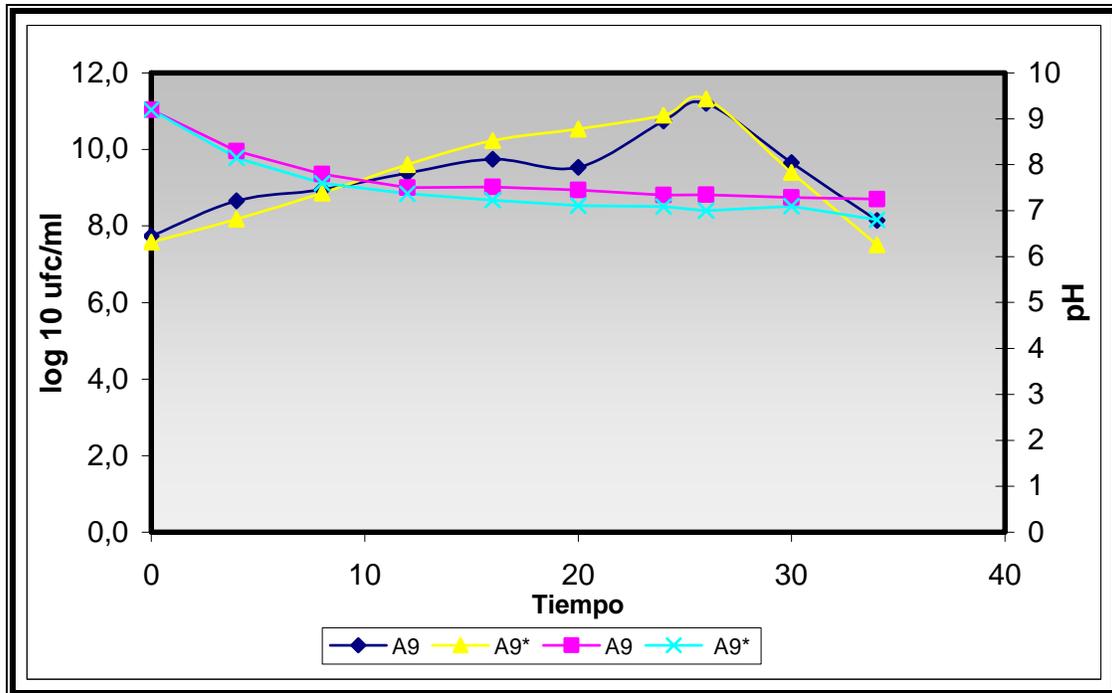


Figura 24. Comportamiento de la viabilidad y pH de las cepas A9 durante fermentación. Medio Q.C 1.5% C.E 1%, NaCl 1%. * indica replica.

6.5. PRUEBA DE DEGRADACIÓN DEL RESIDUO DE CONCHA DE CAMARÓN

En los artrópodos, la quitina es el mayor componente de la cutícula o dermatoesqueleto. La biosíntesis de quitina se ha estudiado en una variedad de sistemas fúngicos, pero no hay disponibles investigaciones que generen datos acerca de la biosíntesis realizada por este artrópodo debido principalmente a las dificultades de ensayos in vitro. La biosíntesis de quitina en los artrópodos es un evento temporal bajo el mando hormonal estricto; según el tamaño del organismo una porción de la cáscara inicia la secreción de un nuevo dermatoesqueleto debajo de la cutícula vieja; en este momento, la síntesis de quitina es máxima, hasta obtener la nueva cáscara que cubra de superficie del crustáceo. (Horst, 1981)

Las muestras del estudio obtenidas a partir de residuos del concha residual de camarón, pudieron ser degradadas usando la cepa A9 que provenían de la

misma fuente de recolección por medio de un ensayo in vitro. Se utilizó el medio camarón reportado por (Sabry, 1992) cuya composición es 1% p/v de residuos de concha de camarón triturados, 0.5% p/v de peptona y 1% p/v NaCl, pH 9,2 en erlenmeyers de 250ml con 45ml del medio y 5 ml de la suspensión microbiana de la cepa A9 el inóculo tenía una concentración de 9×10^7 cel/ml. A partir de una fermentación se estudio la viabilidad, el pH y la concentración de azúcares reductores a lo largo de 32 días debido a los resultados obtenidos durante los anteriores ensayos (Figura 25).



Figura 25. Aspecto del medio camarón izquierda y concha de camarón utilizada en la fabricación del medio.
Fuente: autor.

El cáscara residual de camarón está principalmente compuesta de quitina, proteínas y en menor proporción lípidos y sales de minerales. Las sales minerales son principalmente el carbonato del calcio con cantidades menores de magnesio, fosfato, sílice, y azufre componentes que pueden ser utilizados por el microorganismo para su metabolismo y crecimiento (Cabello, 1988; Ensor *et al.* 1999).

Las condiciones del medio permitieron que durante los primeros días el microorganismo pudiera utilizar las proteínas, pero una medición al contenido de

las mismas en el medio estéril determina que la concentración era 1.8 g/L^{-1} que no afecta la degradación en este caso del polímero en estudio quitina, ya que se obtuvo concentraciones considerables que indican que si se estaba llevando cabo la expresión de las enzimas y por tanto la liberación de azúcares reductores.

Aunque la concentración nunca superó los valores obtenidos en los ensayos anteriores, es de explicarse debido a que el sustrato, en este caso quitina no se encontraba puro y la concentración del mismo en el medio no era equiparada con la del medio referencia. Además el microorganismo tendió a utilizar las fuentes de carbono con estructuras menos complejas y a medida que estas disminuían en el medio de cultivo era obligado a expresar las enzimas quitinolicas para utilizar la quitina presente en los residuos como fuente carbono. (Figura 26) y anexo 8.

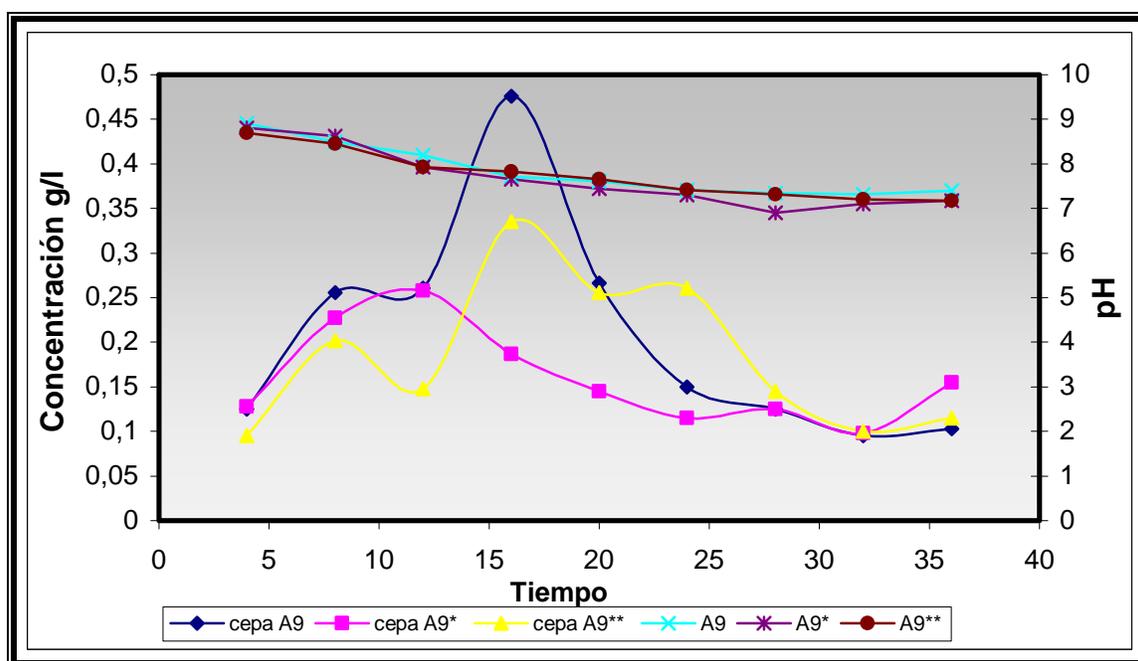


Figura 26. Liberación de N-acetilglucosamina y comportamiento del pH durante la fermentación medio concha de camarón NaCl 1% Cepa seleccionada (actino A9), pH 9.2, T 30°C. * indica replica

Las diferencias presentadas con las concentraciones de azúcares reductores liberados pueden ser explicadas, pues a pesar de que la concentraciones concentración de residuos en cada una de las replicas fue homogénea no se

determino de manera exacta el porcentaje de quitina presente en los residuos, por tanto la liberación de azúcares pueden variar, ya que los procesos de degradación y liberación anteriormente nombrados están directamente relacionados con la producción de las enzimas y por tanto el incremento de concentraciones de azúcares reductores totales.

El comportamiento con respecto a la viabilidad tiene leves caídas que pueden ser explicadas debido a que durante los primeros días la disponibilidad de nutrientes era alta, pero a medida que la fermentación sigue su curso los sustratos eran cada vez más complejos, y depende de la rapidez de adaptación del microorganismo a estas condiciones y la capacidad para expresar las enzimas necesarias para la degradación de sustratos específicos debido a la competencia por los mismos. Como se observa en la (Figura 27) y (anexo 8).

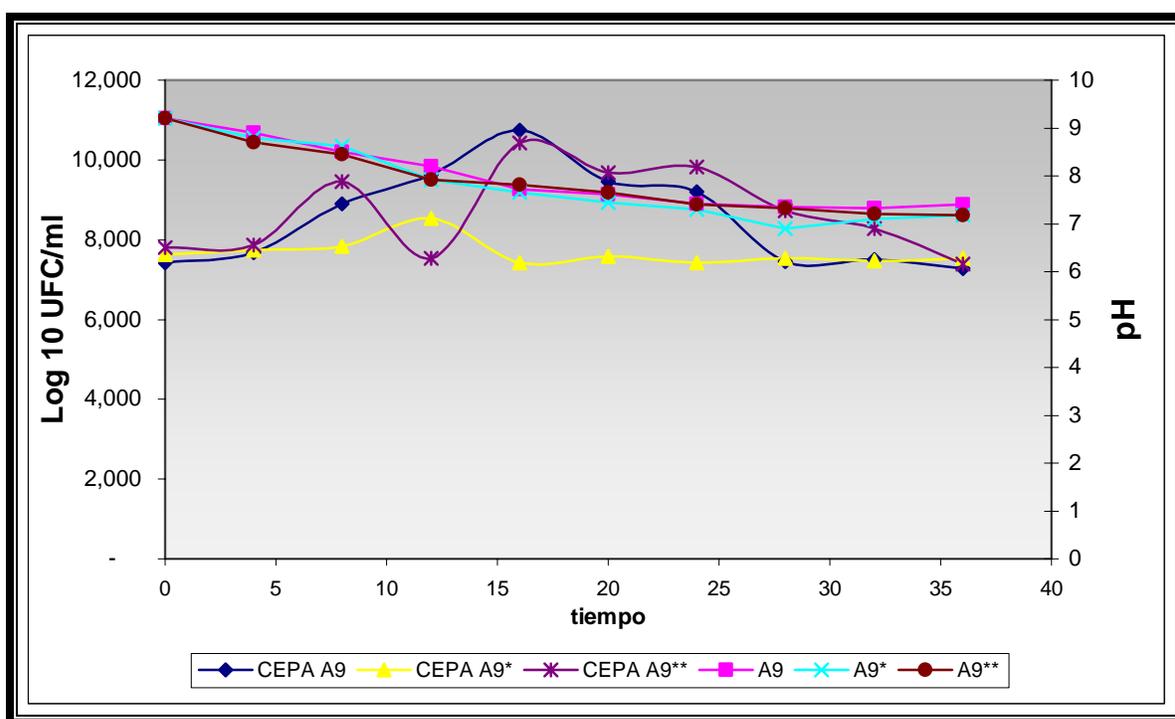


Figura 27. Comportamiento de la viabilidad y pH de la cepa A9 durante fermentación. Medio de residuos de camarón, T 30°C. * indica replica

Frente a las conclusiones derivadas a partir de la prueba de degradación de las conchas de camarón se puede decir que se observa un rápido aumento de

numero de células debido a la cantidad de sustrato presente aunque se evaluaron tiempos extensos de fermentación, de aproximadamente 32 días, al igual que las anteriores pruebas sustentado en los resultados obtenidos de los procesos de degradación de la quitina durante las anteriores fermentaciones. Probablemente la similitud en los tiempos, sucedió por que en el medio de cultivo que estaba compuesto por un tipo quitina en la forma alfa, la mas abundante, con cadenas antiparalelas, es decir, cada cadena dispuesta en un sentido contrario que se complementan una con la otra de la misma forma que la hélice del ADN.

La forma alfa es la más rígida y cumple funciones esqueléticas. Por otro lado, el hecho de las cadenas de forma alfa sean antiparalelas indica que los procesos de síntesis y ensamblaje de cadenas para crear las microfibrillas no pueden ser simultáneos en el tiempo, sino separados (Herrera-Ruiz, 1993).

Las bacterias pueden expresar diferentes quitinasas quizás dependientes de la composición del tipo de molécula atacada ya que es reflejado en las variaciones presentadas cuando las células eran cultivadas en quitina coloidal y otros tipos de quitina, posiblemente por el grado de desacetilación y solubilidad, la presencia probablemente de componentes covalentes que se unieron de una manera u otra N-acetylglucosamina.

El tipo de respuesta depende de la forma de contacto con la quitina, ya que se reporta por literatura que los microorganismos quitinolíticos pueden distinguir y expresar diferentes tipos de quitinasas dependiendo del tipo de quitina. Por esta razón es necesario entender la regulación en la degradación de la quitina de la cepa A9 y otras bacterias en presencia de diferentes formas y estructuras de este tipo de sustrato (Vladimir *et al*, 1998).

A demás en los procesos de traslado enzimático de la quitina puede producirse procesos de inhibición posiblemente por la incorporación o presencia de otras

fuentes de carbono provocando que algunos microorganismos cambien la senda bioquímica que lleva a la degradación de la quitina presente en la cutícula.

6.6. CMI DEL ACTINOMYCETE A9

En la determinación de la concentración mínima inhibitoria del Actinomycete se empleó la cepa A9, ya que esta cepa presentó la mayor degradación de quitina y una zona clara de inhibición alrededor del fitopatógeno. Como se puede observar en la tabla 6 y figura 28 la concentración mínima inhibitoria sobre patógeno es de 10^2 conidias/ml, no se observó la formación de micelio aéreo, sino un crecimiento de tipo pionotal es decir un pigmento púrpura en el medio que, de acuerdo con Nelson, (1981) citado por Arbeláez, (1993), se caracteriza, por la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidas.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria del Actinomycete (A9) promedio 5 repeticiones.

Concentración	Halo (mm)
10^2 Conidias/ml	11
10^3 Conidias/ml	13
10^4 Conidias/ml	16
10^5 Conidias/ml	18
10^6 Conidias/ml	20
10^7 Conidias/ml	22

Los datos de la tabla 6 hacen referencia al promedio de cinco repeticiones, enfrentando al Actinomycete A9 frente a *Fusarium oxysporum*, determinándose que a mayor concentración de conidias se presenta un mayor halo de inhibición debido a los mecanismos de antagonismo microbiano que según Garcés de Granada *et al* (1999) se define como el daño directo que un microorganismo causa por su intervención en los procesos de la vida del patógeno, se encuentran relacionados con antibiosis, competencia o hiperparasitismo.

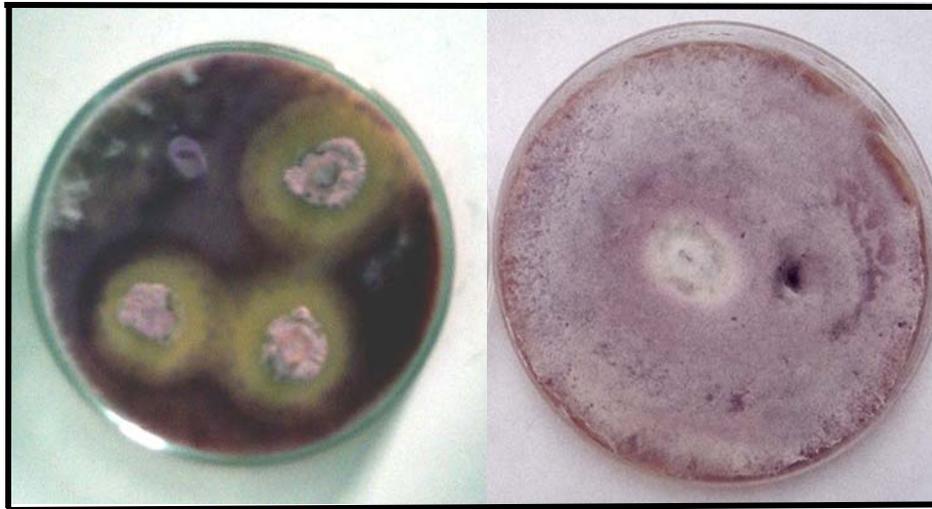


Figura 28. CMI del Actinomicete sobre *F. oxysporum* f .sp *dianthi* (Derecha), izquierda cepa pura. Fuente: autor

6.7. EFECTO QUITINOLITICO DE LOS EXTRACTOS DE FERMENTACIÓN Y EL ACTINOMYCETE SOBRE *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Sclerotinia sclerotium*, *phytophthora sp* y *Pythium* IN VITRO.

La idea de utilizar el control biológico tiene como objetivo reducir las posibilidades de que los individuos sanos entren en contacto con microorganismos causantes de enfermedades (Sampson, 1998).

Se han utilizado diversas bacterias que producen enzimas y metabolitos microbianos como *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma harzianum* (Arbeláez, 1993, Ellas *et al*, 1993, Ochoa, 1996) para controlar patógenos fúngicos, por esta razón se desarrollo una prueba para evaluar la capacidad de control de los extractos producidos a través de una serie de procesos de fermentación en medios con quitina como única fuente de carbono. Se emplearon como patógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Sclerotinia sclerotium*, *Phytophthora sp* y *Pythium sp*, microorganismos altamente perjudiciales para diferentes cultivos como el clavel, lulo, papa, tomate, fresas, alstroemeria y tabaco entre otros (CIAA, 2005).

En la determinación de la concentración a la cual se ocasiona un mayor efecto de las enzimas quitinolíticas producidas sobre la pared del hongo sembrado masivamente, se estableció 1.3g/l^{-1} durante el tiempo de la prueba preliminar de biocontrol. (Figura 29) y (anexo 9).

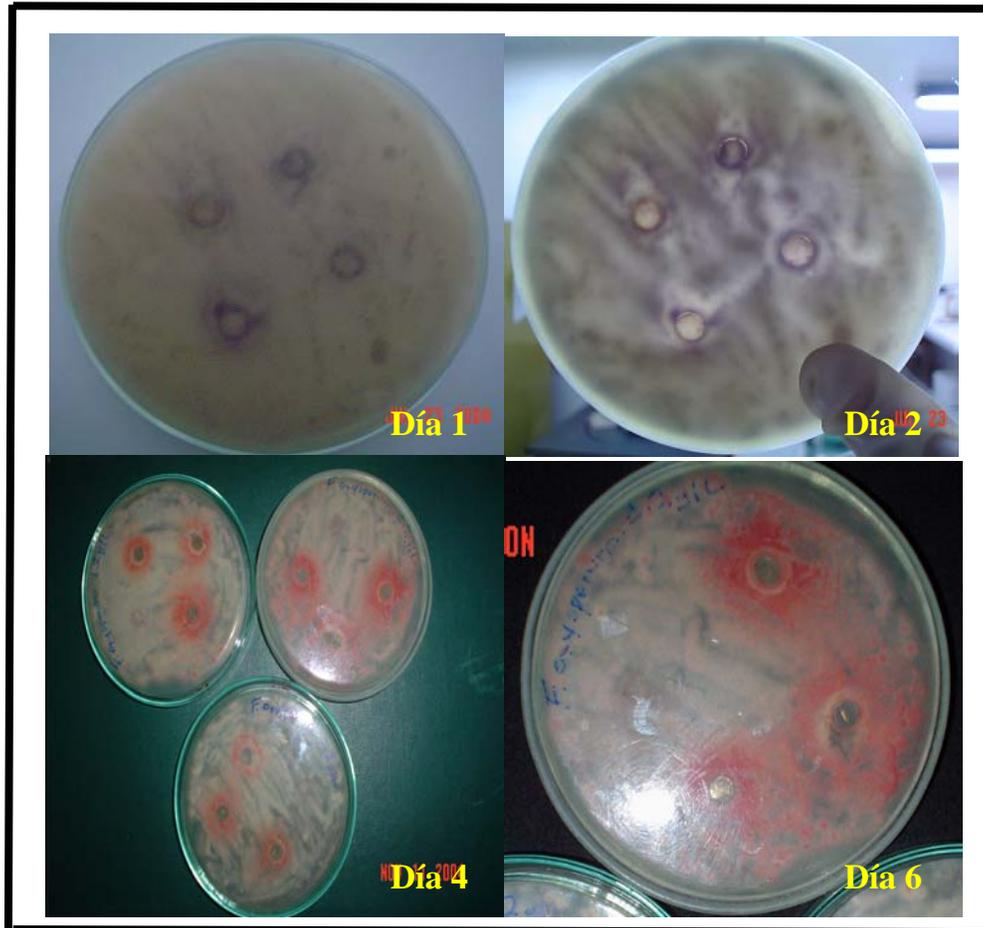
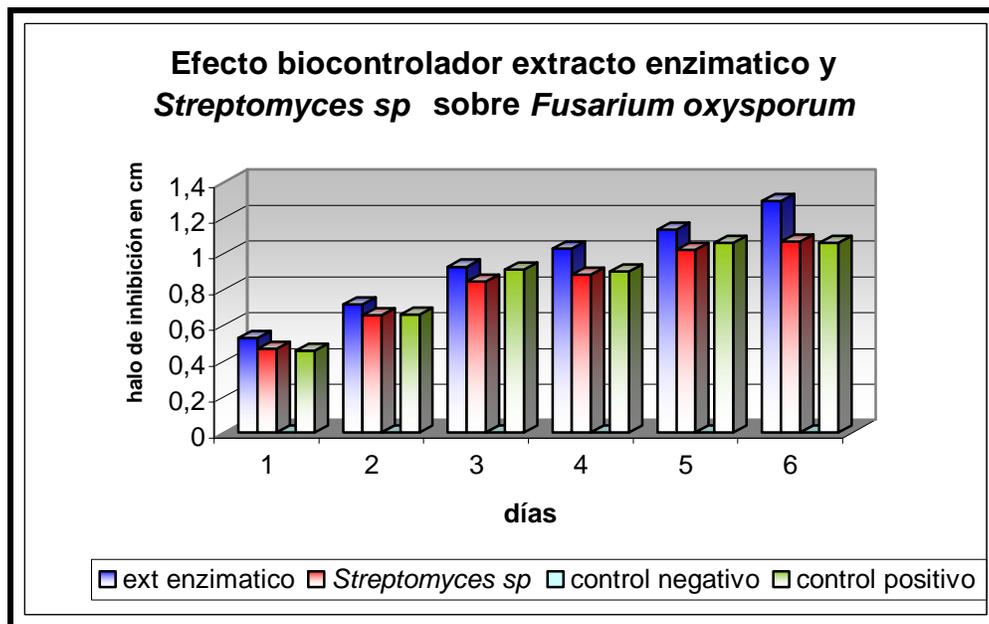
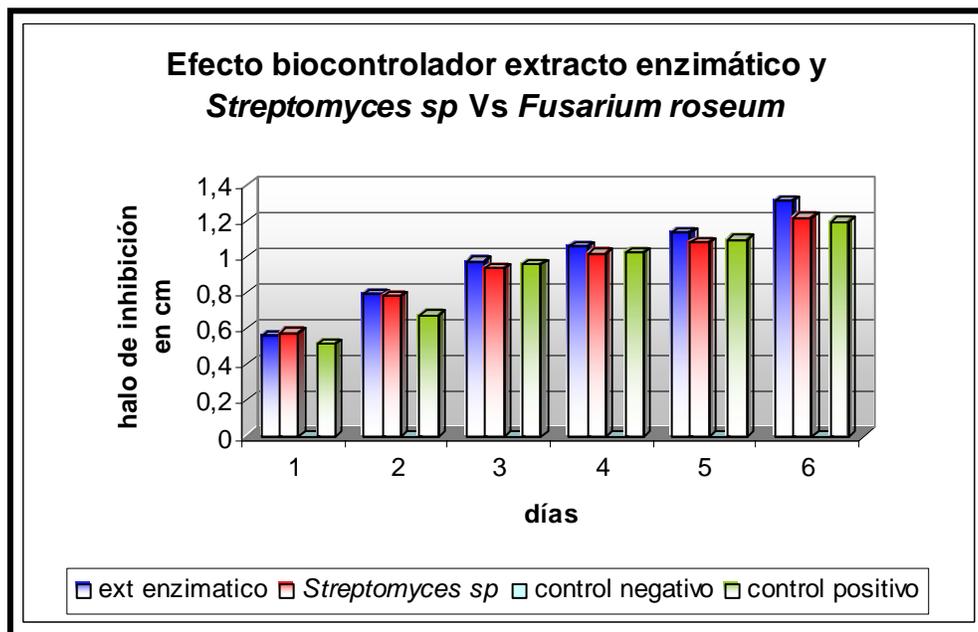


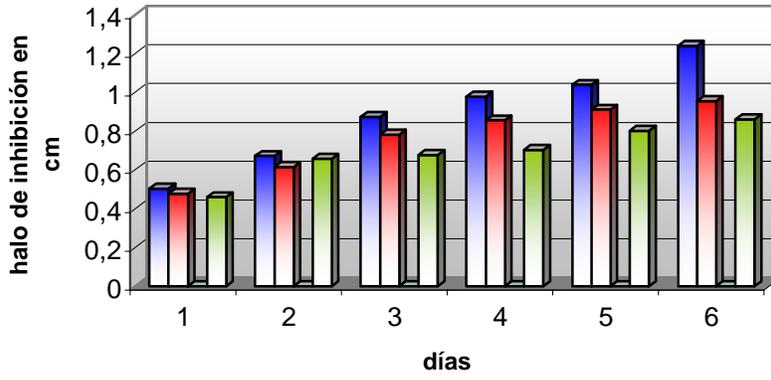
Figura 29. Efecto biocontrolador del extracto enzimático en una concentración de 1.3g/L^{-1} sobre el patógeno *Fusarium oxysporum* durante 6 días.
Fuente: autor

De acuerdo a los resultados obtenidos, se evidenció un efecto biocontrolador el cual no fue constante en las concentraciones bajas, ya que la caja se encontraba colonizada en su totalidad por el microorganismo patógeno en el día 4, la concentración de 1.3g/L^{-1} se evidencia no solo halos, sino también en la parte inferior de caja pigmentaciones alrededor del halo, que posiblemente indican que se estaba llevando un proceso de degradación de la quitina fúngica por parte de

las enzimas quitinolíticas. Debido a que las bajas concentraciones no fueron efectivas para realizar esta prueba, se utilizó la concentración más alta obtenida (1.3g/L) para realizar el estudio con los diferentes fitopatógenos.

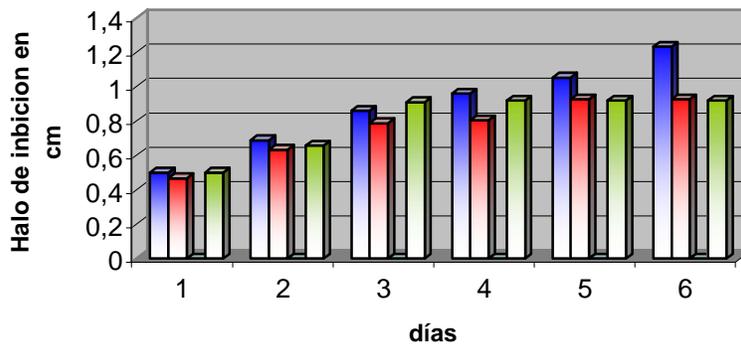


Efecto biocontrolador extracto enzimatico y *Streptomyces sp* sobre *Pythium sp*



■ ext enzimatico ■ *Streptomyces sp* □ control negativo ■ control positivo

Efecto biocontrolador extracto enzimatico y *Streptomyces sp* Vs *Phytophthora sp*



■ ext enzimatico ■ *Streptomyces sp* □ control negativo ■ control positivo

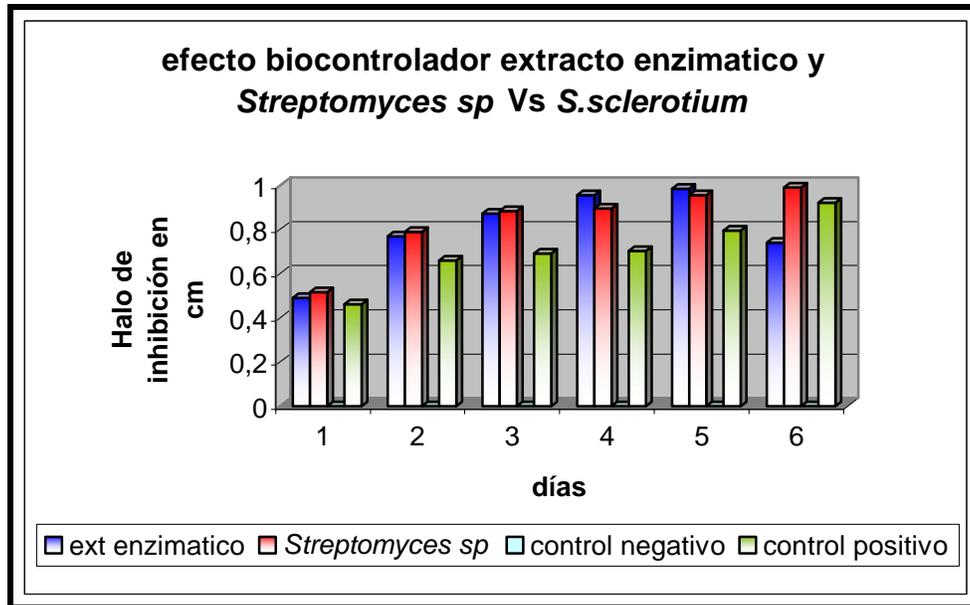


Figura 30, 31, 32, 33 y 34. Datos Halos de inhibición extracto enzimático y *Streptomyces sp* frente a *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Phytium sp*, *Phytophthora sp*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Análisis Estadístico de los Datos

Los datos obtenidos experimentalmente de los tratamientos se analizaron estadísticamente para determinar si existían diferencias significativas entre la cepa de Actinomyces y extracto enzimático frente a la actividad antifúngica frente a los diferentes fitopatógenos.

Todos los datos que fueron sometidos a una prueba de Shapiro Wilk no se distribuyeron normalmente, por lo tanto se utilizó la prueba no paramétrica de test del signo de Wilcoxon (Anexo 12). Para establecer si al menos uno de los tratamientos presentan diferencias significativas, la cual confirmo que al menos 3 de los tratamientos (***Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sp* y *Pythium***) son diferentes; donde se concluye que se rechaza H_0 . Existe evidencia estadísticamente significativa para decir que el promedio del halo de inhibición micelial es mayor con el extracto enzimático Vs fitopatógeno que Actinomyces Vs fitopatógeno. Teniendo como resultado que el extracto enzimático presenta

mayor efecto biocontrolador contra estos fitopatógenos que el uso del actinomicete.

Teniendo en cuenta los resultados del extracto enzimático y *Streptomyces sp* frente a *Fusarium roseum* y *Fusarium oxysporum* se observa que durante los primeros 5 días hubo una pequeña diferencia en el diámetro del halo de inhibición, la cual se incremento en el día 6 esto probablemente debido a que el extracto no solo contenía las quitinasas, sino también metabolitos secundarios como los antibióticos que potencializaron el efecto biocontrolador como se observa figura 29 a 34 y 35. Cabe resaltar que hubo un mayor halo de inhibición y cambios físicos como pigmentaciones en el estudio realizado con *F. roseum* y de manera mas leve en *F. oxysporum*. A demás se comprobó que el extracto enzimático logra inhibir microorganismos de rápido crecimiento de manera parcial. En cuanto al control positivo en este trabajo inicial surgirio el antibiótico poliénico **nistatina**, producidos por *Streptomyces noursei* y *Streptomyces nodosus*. Estos fármacos se unen de forma selectiva al ergosterol de la membrana, esta unión favorece la formación de poros en la membrana, de forma que a través de estos poros escapan sustancias celulares: iones, aminoácidos, glucosa y provoca un efecto letal a la célula (Rodríguez, 2002). Los antibióticos polienicos son compuestos fungicidas y de amplio espectro por poseer gran cantidad de dobles enlaces en su estructura. Se trata de una molécula con dos partes diferenciadas (hidrofílica y hidrofóbica), que es la base de su mecanismo de acción.

El efecto biocontrolador del antibiótico presento un comportamiento similar al del extracto enzimático y el *Streptomyces sp*, probablemente por que la nistatina no es un antibiótico altamente efectivo frente a estas especies como se observa figura 30 a 34 (Rodríguez, 2002)

De igual manera, el extracto enzimático presentó el mismo efecto sobre *Pythium sp* y *Phytophthora*, aunque vale la pena resaltar que la mayor inhibición tanto por el extracto como por *Streptomyces* en *F. roseum* y *F. oxysporum* como se observa

en la figura 29 y 36 (anexo 9). A diferencia de estos estudios en la prueba con *Sclerotinia sclerotiorum*, *Streptomyces sp.* Presento un mayor halo de inhibición, posiblemente debido al lento crecimiento del fitopatógeno, permitiendo una ventaja en el desarrollo del microorganismo antagónico. Sin embargo, el diámetro de los halos sobre cada uno de los fitopatógenos no fue superior a 2 cm. Posiblemente si la concentración del extracto enzimático hubiera sido superior a 1.3 g/L (Máximo valor obtenido durante la fermentación en medio quitina coloidal), el efecto antagónico sería potencializado. No obstante cabe resaltar que la concentración de 1.3 g/L del extracto enzimático produjo efecto inhibitorio sobre cada uno de los microorganismos evaluados.

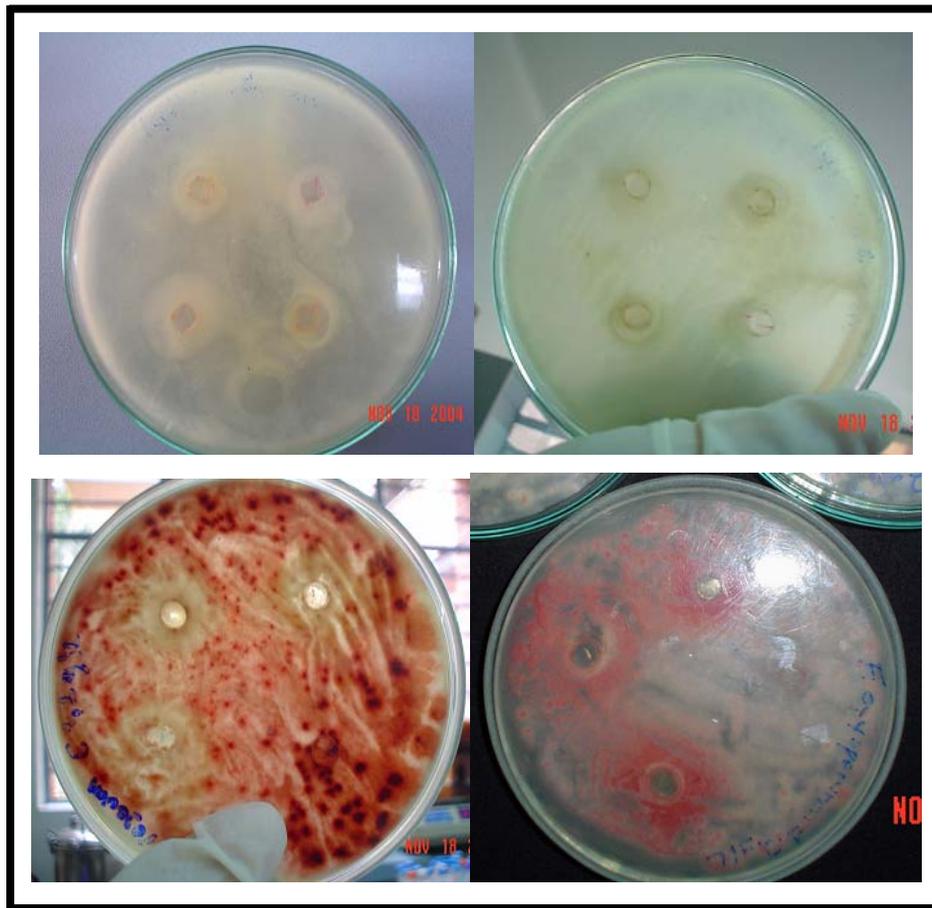


Figura 35 Efecto biocontrolador del extracto enzimático sobre el patógeno *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Phytium sp*, *Phytophthora sp*.
Fuente: autor

Además es necesario tener en cuenta que el pH 5 del medio no era el óptimo para la enzima ya que estas tienden a ser más eficientes en rangos entre la neutralidad y la alcalinidad, debido a que el pH puede desnaturalizar algunas enzimas de forma irreversible y afectar la disociación de grupos funcionales carboxilo y amino en la cadena de moléculas proteicas; para llevar a cabo su actividad catalítica las enzimas deben encontrarse en un estado particular de disociación. (Atlas, 2002).

El pH de un medio afecta directamente a microorganismos y enzimas e influye también en la disociación y en la solubilidad de muchas moléculas que, de manera indirecta ejercen alguna influencia (Atlas, 2002).

Los actinomicetes especialmente *Streptomyces sp*, puede ser usados para controlar varias enfermedades como la podredumbre del tallo y la raíz de la caña de azúcar por *Pythium sp*; *Fusarium vasifectum*, el agente causal del marchitamiento del algodón; *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxisporum*, patógenos de *Lens culinaris*. En adición del control por introducción de actinomicetes artificialmente, un número de estos experimentos tienen una estimulación de la población natural de actinomicetes por enmiendas apropiadas y después acompañado por una reducción de la enfermedad. Estas observaciones sugieren que este grupo de organismos pueden ser muy efectivos cuando son usados contra patógenos siendo estos competitivos (Rodríguez, 2002). Es importante el rol de los actinomicetes como productores de antibióticos y ectoenzimas micolóticas, siendo muy importante en el control biológico (Krupa y Drommergues, 1981).

Uno de los mecanismos de acción biocontroladora del *Streptomyces* es la lisis que involucra la digestión de las paredes celulares de especies filamentosas o susceptibles por medio de las enzimas extracelulares excretadas; el organismo con la pared debilitada o digerida, es incapaz de mantener la integridad estructural y su viabilidad (figura 36).



Figura 36 Efecto biocontrolador del extracto enzimático (izquierda imagen) y *Streptomyces sp* (derecha) sobre el patógeno *Fusarium roseum*.
Fuente: autor.

Los antibióticos u otros inhibidores secretados por una población antagonista pueden ser la causa de la autólisis de una segunda población. En algunos casos la sustancia responsable de la autólisis puede ser un metabolito que impida la biosíntesis de la pared celular realizada por las células susceptibles; un organismo que continúe su crecimiento mientras sea incapaz de elaborar su pared, pronto dejara de ser viable (Rodríguez, 2002).

Una diversidad de hongos esta sujeta a la heterólisis por las enzimas excretadas por actinomicetes, sin duda, algunos de los actinomicetes crecen en las hifas que pudieron haber sucumbido por otras razones, pero es probable que muchos de los

organismos sean responsables de su degradación. No solo las estructuras vegetativas pueden ser destruidas, sino también las conidias y espoangiosporas, aunque a una velocidad baja. También son atacados aunque muy lentamente las clamidiosporas y los esclerotes.

Actualmente la heterólisis enzimática involucra generalmente la liberación de enzimas por los heterótrofos líticos, que despolimerizan componentes de la pared del organismo susceptible, los cuales son esenciales para mantener la integridad de la célula o filamento, aunque la lista de macromoléculas que son digeridas de esta forma durante la lisis es sin duda incompleta, parece ser que los constituyentes principales son los siguientes: Celulosa y otros polisacáridos, quitina u otros polisacáridos que contienen N- acetilglucosamina en una gama de hongos (Rodríguez, 2002).

Pero para explicar mejor estos resultados es necesario tener en cuenta otros factores, como el tipo de quitina que está utilizando el microorganismo como sustrato durante las fermentaciones de la cuales fueron obtenidas los extractos, ya que no es similar a la que hace parte de la pared de los hongos y por esta razón es necesario determinar los proceso de síntesis quitina y como está dispuesta.

La estructura de la quitina con uniones tipo beta implica que la orientación de las moléculas de azúcar en el espacio sea alterna. Para simplificarlo: los radicales N-acetilo que están unidos al átomo de carbono 2 del azúcar deben hallarse orientados en direcciones opuestas en unidades vecinas del azúcar. Dicho de otro modo, se necesitan dos sitios activos para la unión del sustrato a la enzima o bien dos polipéptidos distintos que cooperen en la unión de dos moléculas de azúcar simultáneamente. Así podría iniciarse la síntesis de la cadena (Herrera- Ruiz, 1990).

La biosíntesis de quitina constituye un ejemplo de una reacción de transglicosilación, en la cual un donador de grupos glicosilo transfiere un glicosilo

aún aceptor, el aceptor es la cadena de quitina, que se incrementa en una unidad, y el donador es un nucleótido, el sustrato sobre el que opera la enzima quitina sintetasa para producir el polisacárido es la uridina-difosfatoacetilglucosamina, abreviadamente UPDGLcNAc (Yu et al, 1991; Escott *et al* 1998).

La quitina sintetasa es una enzima que muestra cooperatividad la unión de una molécula de sustrato facilita la unión de la segunda. La cooperatividad de esta enzima depende de la unión UPDGLcNAc a los sitios alostericos, que, al ser ocupados, alteraran la estructura de la enzima y facilitan el acceso de las moléculas de sustrato a los sitios catalíticos, o activos. Para llevar a cabo su función, la quitina sintetasa requiere de un ión metálico divalente como el Mg^{2+} , el Mn^{2+} y el Co^{2+} . (Herrera *et al.* 1992)

El lugar donde ocurre la síntesis de quitina es muy importante, porque el producto, una vez cristalizado, resulta altamente insoluble de ahí que se le confine fuera de la membrana citoplasmática.

Posiblemente una célula puede determinar la estructura física directamente de la quitina. Un ejemplo de este mecanismo viene del trabajo de ***Streptomyces olivaceoviridis***. La bacteria produce un lectina como proteína que liga específicamente al cristalino quitina, como las proteínas sensoriales, podría reconocer directamente la membrana exterior, o las células pueden responder a los derivados durante la degradación de los componentes quitinolíticos; además las bacterias pueden producir quitinasas que contiene adicionalmente un dominio enzimático y por separado producir proteasas; explicando que para la utilización eficaz de quitina probablemente requiere varias enzimas además de las quitinasas.

En muchas especies de plantas, la invasión local de los patógenos induce producción de quitinasas extracelulares, las cuales hacen parte de la respuesta de defensa inicial de la planta que son inducidas en los órganos vegetativos por la infección, pero también están presentes en algunos tipos de semillas. La función

de estas enzimas es bloquear el crecimiento de las hifas de los fitopatógenos mediante la invasión del espacio extracelular mientras enzimas intracelulares actúan después de que la célula ha sido infectada (Amy *et al.* 1998 y Boer 2001).

En la mayoría de estas quitinasas no están explicados totalmente sus mecanismos ni su contribución en la propia defensa de la planta. La mayoría de las quitinasas se adhieren preferencialmente a los sustratos acetilados y la actividad disminuye con la disminución en el grado de acetilación. Por consiguiente, el aumento en los niveles de desacetilación en la superficie de hifas puede ser útil para aumentar en el hongo la resistencia a las quitinasas producidas por la planta. La actividad desacetilasa de la quitina durante la formación de estructuras de infección apoya esta hipótesis. (Wang *et al.* 2002).

Las quitinasas son consideradas en la actualidad uno de los factores determinantes de la capacidad antagonista de un microorganismo a tal grado que se han llevado a cabo investigaciones sobre modificaciones genéticas de plantas con genes que codifican para quitinasas vegetales, con el fin de conferirle resistencia control fitopatógenos (Bing *et al.* 2003, Rachel y Chet, 1998).

Se sabe que la actividad quitinolítica de un hongo entomopatógeno es importante para el proceso de infección y se ha comprobado que la actividad quitinolítica en algunos hongos entomopatógenos está relacionada con su virulencia y también se tiene claro que intervienen otras enzimas como las proteasas, en el incremento de la capacidad de infección (Schirmbock *et al.*, 1994).

Existen un gran número de bacterias que produce las enzimas quitinolíticas. Las quitinasas de origen bacteriano frente a la actividad antifúngica presentan enzimas con alta especificidad. Según investigadores Rodríguez, 2002, las quitinasas de las plantas actúan como las endoquitinasas inhibiendo el alargamiento de las hifas de los hongos; en contraste las quitinasas de origen bacteriano de *Serratia marcescens*, *Streptomyces griseus* y *Pseudomonas sp* actúan como las exo-enzimas y no

presentan un efecto en la extensión del hifas de los hongos como se reporta en ensayos frente a *T. reesei* y *Rizoctonia solani*.

La actividad antagónica se atribuye a la producción de enzimas como las quitinasas, glucanasas antifúngicas que ejercen su efecto a través de la degradación de componentes primarios de la pared celular del hongo. Varias especies de hongos son agentes del biocontrol muy potentes de otros hongos patógenos de plantas e insectos. Hongos micoparasiticos y entomopatógenos producen quitinasas para la invasión. (Schirmbock *et al.* 1994)

La hidrólisis de la quitina se produce mediante un complejo de enzimas, teniendo como resultado final la separación de los monómeros de n-acetilglucosamina donde intervienen tres tipos de enzimas las endo, exo y las n-acetilglucosaminidasas, conocidas como las quitinasas las cuales hidrolizan el polímero formando oligosacaridos. La actividad involucra el clivaje aleatorio de la cadena de quitina mientras que la actividad de exo-quitinasas se presenta al atacar los extremos no reductores de manera progresiva, liberando unidades de diacetilquitobiosa luego la n-acetilglucosaminidasa hidroliza diacetilquitobiosa con lo que se liberan los monómeros de n-acetilglucosamina.

Se ha demostrado in vitro, que la producción de quitinasas es estimulado por productos de la degradación de la quitina, especialmente n-acetilglucosamina, cuando aumenta la tasa de liberación de esta sustancia, se inhibe la producción de estas enzimas. La producción puede inhibirse por la producción de otras fuentes de carbono y lípidos en el medio. A su vez se ha encontrado que la actividad quitinolítica inhibitoria sobre el hongo patógeno es proporcional al nivel de quitina en las paredes (Mahadevan and Crawford ,1997).

La quitina, un polímero del N-acetil-glucosamina, es un componente de la pared de célula de la mayoría de hongos Sietsma y Wessels (1977) determinaron la ocurrencia de la quitina en la pared de célula fungica encontraron la quitina era

aproximadamente de un 10% (como poly-N-acetylglucosamine-N-acetylglucosamine) sobre una base del peso seco en la porción insoluble en agua de la pared hifa. Johnson y Chen (1983) estudiaron la ocurrencia y el contenido de la quitina en 13 hongos comunes. Divulgaron el contenido de la quitina que se extendía a partir del 6.55% del peso seco (Kent y Bjurman, 1998).

Con cualquier método para la determinación de la biomasa que emplea el análisis de un componente del organismo, es esencial definir el factor de la conversión, es decir, la relación entre la cantidad del componente y el peso total del organismo. Aunque el análisis de la quitina se ha criticado para la gran variación en el factor de la conversión (Sharma *et al.* 1977), el contenido de la quitina por el peso seco de la unidad del micelio se relaciona probablemente más con la biomasa total, incluyendo micelio vivo y muerto

Martin *et al.* (1990) demandaron que el ergosterol se podría utilizar conjuntamente con análisis del glucosamine para rendir cocientes de la masa fungicida viva y muerta. Aunque el contenido de la quitina también se ha divulgado puede variar en lo referente a diversas condiciones del crecimiento, en medios de cultivo y tiempos de incubación y tensiones por fungicidas edad del cultivo, el aumento en contenido de la quitina depende probablemente de una disminución del cociente de C/N. (Sharma *et al.* 1977), la quitina se considera ser más refractaria, ya que persiste aun después de la muerte microorganismo (Sharma *et al.* 1977), y por esta razón los métodos analíticos pueden ser el indicador más conveniente. (Kent y Bjurman, 1998)

Como fue precisado previamente, la exactitud de las técnicas del análisis de la quitina para la determinación de la biomasa fungicida depende de un factor confiable de la constante o de la conversión que relaciona el contenido del glucosamine con el peso seco de la unidad del micelio (Kent y Bjurman, 1998).

En la presente investigación, en las pruebas antagónicas se usaron extractos crudos, con diferentes concentraciones que no excluyen sustancias de bajo peso

molecular como los antibióticos. En este caso, el antagonismo podría explicarse bien por las sustancias poliméricas como las enzimas, mientras probablemente están actuando en sinergismo junto con los antibióticos en la lisis de la pared fúngica de la célula.

Para el uso de preparaciones de quitinasas crudas es necesario considerar el efecto de otras enzimas hidrolíticas y el peso de las sustancias antibióticas que probablemente pueden estar presentes en tales preparaciones. (Manucharova *et al.* 2004 y Horsch *et al.* 1997)

La actividad antifúngica de las quitinasas se puede evidenciar por el proceso enzimático de destrucción de la pared celular, la pérdida y debilitamiento del micelio después de ser tratado con las quitinasas. Los fenómenos antagónicos contra los hongos pueden ser explicados por varios mecanismos, incluso de antibiosis y parasitismo. En este último caso, las enzimas hidrolíticas como las quitinasas y glucanasas o proteasas, puede actuar contra pared fúngica de la célula, siendo ayudadas por la producción antibiótica que también probablemente este involucra (Aktuganov *et al.*, 2003).

La idea de usar microorganismos quitinolíticos en el biocontrol de hongos fitopatógenos no es nueva, de hecho pensar que las enzimas extracelular degradantes de la pared celular como el mecanismo principal involucrado en el mando biológico de hongos del fitopatógenos a sido bien estudiada en agentes bicontroladores como *T. harzianum*. Además, se ha demostrado que los actinomicetes, y especialmente los *Streptomyces sp* son eficaces en la protección de las plantas contra patógenos fúngicos (Crawford *et al.* 1993). En el presente estudio, las cepas seleccionadas de *Streptomyces*, han demostrado ser eficaces en su actividad endoquitinolítica. También se ha demostrado una actividad muy pronunciada contra los hongos fitopatógenos, y la posibilidad de pensar en el potencial como agentes de biocontrol.

6.8 IDENTIFICACIÓN DEL ACTINOMYCETE (A9)

La identificación de la cepa actinomicete aislada se realizó mediante la observación de sus características macroscópicas en agar avena, presentando micelio aéreo extensivo y esporulado inicialmente blanco, convirtiéndose al madurar a un color rosa-café, con colonias pequeñas irregulares y firmes de aspecto pulverulento, reverso de la colonia café, y pigmento difusible en el medio de color amarillo-café. Microscópicamente se caracteriza por presentar reacción positiva en la coloración de gram, presentar micelio aéreo de filamentos en espiral abiertos y conidios ovoides. Las características morfológicas permitieron identificar la cepa 9A como presuntiva de género *Streptomyces sp.*, lo que se confirmó por medio de pruebas bioquímicas de utilización de carbohidratos y fuentes de Nitrógeno Tabla 7 y figura 37.

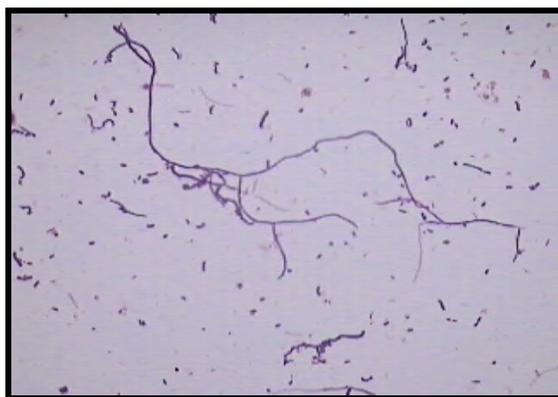


Figura 37. Imagen microscópica de *Streptomyces sp* en coloración de gram

Fuente: autor.

Además se presentó el característico olor terroso de los suelos, el cual se debe a la producción de una serie de metabolitos de los *Streptomyces* llamados geosminas (trans1,10-dimetil-trans-9-decalol) compuestos sesquiterpenoides, compuestos anillados no saturados de carbono, oxígeno e hidrógeno. Producción de pigmentos melanoideos de pardos a negros (Sylvia, 1998 y Cross, 1989).

Tabla 7. Resultado de las Reacciones Bioquímicas para al Identificación del Actinomycete

Prueba		Prueba		Prueba	
Galactosa	+	Urea	+	Triptofano	+
Fructosa	+	Manitol	-	Fenilalanina	+
Gelatina	+	Glicerol	-		
Nitratos	+	Xelobiosa	-		
Catalasa	+	Esculina	+		
Sucrosa	-	Maltotriosa	-		
Arabinosa	-				
Rafinosa	-				
Xilosa	-				

Fuente: autor.

6.9. DEGRADACIÓN DE LA QUITINA PRESENTE EN INSECTOS DE LOS ÓRDENES COLEÓPTERA Y ACARI.

El exoesqueleto de los insectos está compuesto de una mezcla de proteínas y cadenas de moléculas conocidas como acetilglucosamina; componentes de la quitina. Esta combinación es resistente, liviana y dura (Figura 38). El esquema básico de la cutícula de un insecto muestra una construcción multilaminar, que es el producto de la secreción de una única capa de células epidérmicas. (Zhicheng y Marcelo, 1999).

Debido a que el exoesqueleto de los insectos está compuesto de una mezcla muy interesante de proteínas estas pudieron ser usadas como fuente carbono durante los primeros días en los medios cucarrón y garrapata por el microorganismo, ya que eran las fuentes de energía de fácil degradación, pero una medición al contenido de las mismas en el medio estéril determina que la concentración era

1.2 g/L⁻¹ que no afecta la degradación de quitina, ya que se obtuvieron concentraciones de azúcares reductores libres (N-acetilglucosamina) que indican que si se estaba llevando cabo la expresión de las enzimas. En medio sin inocular (control), se determinaron concentraciones de 0.002 g/L de N-acetilglucosamina ya que la quitina y las proteínas eran las únicas fuentes de carbono presentes en el medio.



Figura 38. Aspecto físico de la cutícula de cucarrón molida utilizada en medios de cultivo.

Fuente: autor.

El hecho de utilizar estos órdenes de insectos se fundamenta en el grado de daño que causa al área agrícola y veterinaria, que poseen quitina dentro de su estructura. Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de curvas de fermentación manteniendo la similitud en las metodologías propuestas en los ensayos acerca del medio camarón, permitió adaptar nuevos medios de cultivo que verificaran la degradación de la quitina a partir de diferentes fuentes presentes en la naturaleza.

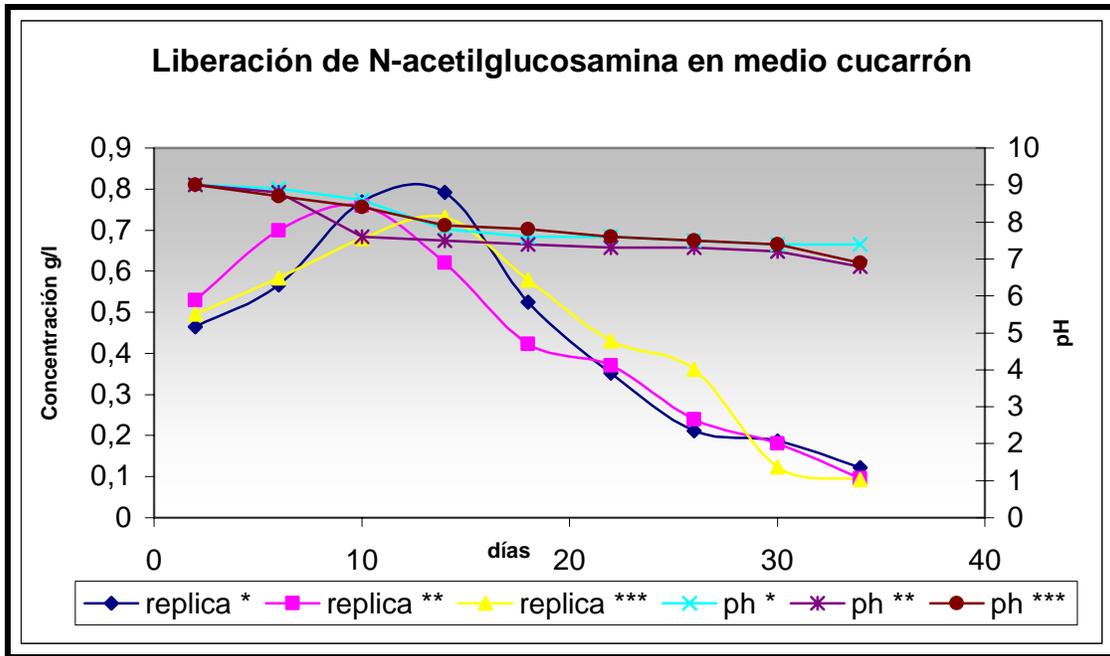


Figura 39. Liberación de N-acetilglucosamina y comportamiento del pH durante la fermentación medio cucarrón NaCl 1% Cepa seleccionada (actino A9). * replicas.

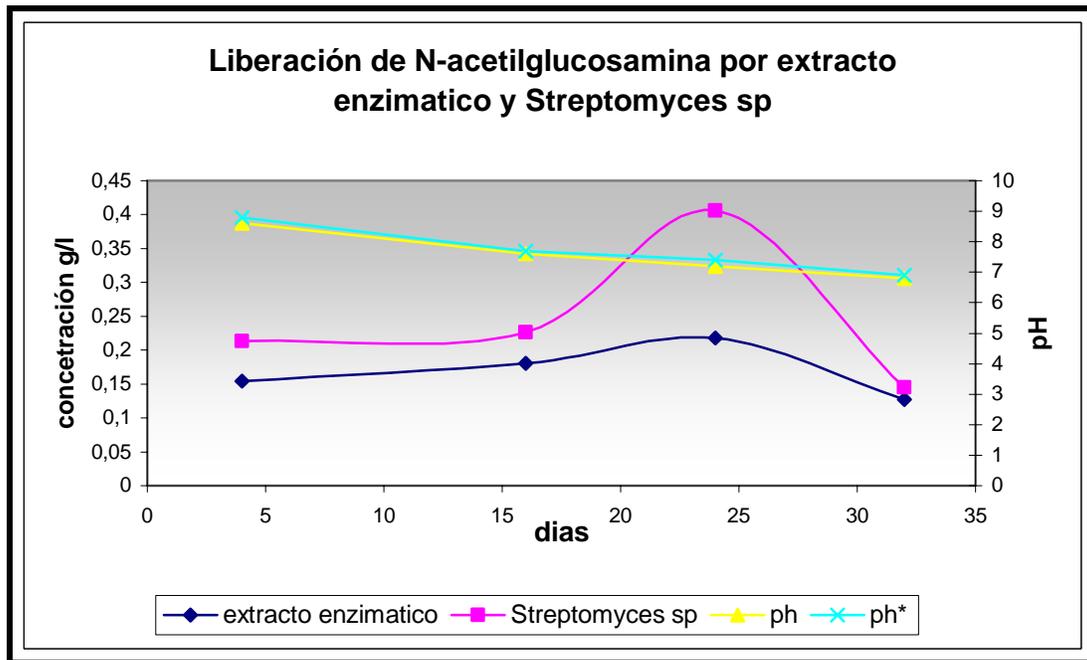


Figura 40. Liberación de N-acetilglucosamina y comportamiento del pH durante la fermentación medio garrapata. NaCl 1% Cepa seleccionada (A9) y extracto enzimático Promedio

Las lecturas de la concentración máxima N-acetilglucosamina liberada en medio cucarrón fue de 0.792 g/l a una T 30°, pH 7.5 y 150 rpm en el día 16 a diferencia del medio garrapata que fue de 0.406 g/l a una T 30° C, pH 7.4 y 150 rpm en el día 24, como se observa en las figuras 39 y 40 (anexo 10), esta diferencia se explica debido a que durante los anteriores ensayos se utilizaron fuentes quitina purificadas (quitina coloidal) con una concentración conocida, mientras que las fuente utilizadas para este estudio fueron cutícula de coleópteros molida (cucarrón) y larvas de garrapata lo cual permitió determinar una clara diferencia entre estos dos tipos de sustratos ya que se conocía la concentración de cutícula molida o larvas de garrapata pero no el contenido de quitina presente en tales cantidades.

El tamaño de partícula de los sustratos en los medios utilizados juega un papel fundamental en la rapidez y las diferencias significativas en la degradación que se ven reflejadas en la diferencia de los tiempos de concentración máxima de N-acetilglucosamina liberada; tal afirmación puede ser sustentada frente a los procesos de verificación de el rompimiento y actividad de la enzima sobre el sustrato. Es necesario mantener la homogeneidad como en los anteriores ensayos acerca de factores intrínsecos como el menor tamaño relativo de las partículas constituyentes de los restos organógenos, o el mayor grado de porosidad, ya que estos factores favorecen los procesos de biodegradación; por este motivo, la fragmentación de los restos o la disolución de sus componentes minerales, que respectivamente disminuyen su tamaño y aumentan su porosidad, puede incrementar la tasa de descomposición como se ve reflejado en las lecturas en el medio cucarrón con respecto al garrapata (figura 41 y 42).

Frente al grave problema de resistencia de la garrapata a los acaricidas tradicionales que enfrentada la población ganadera expuesta o endémica al flagelo devastador de las fiebres de garrapatas, se presenta la utilización de las quitinasas producidas por *Streptomyces sp* como una alternativa a futuro capaz de controlar las poblaciones de *Boophilus microplus* existentes.

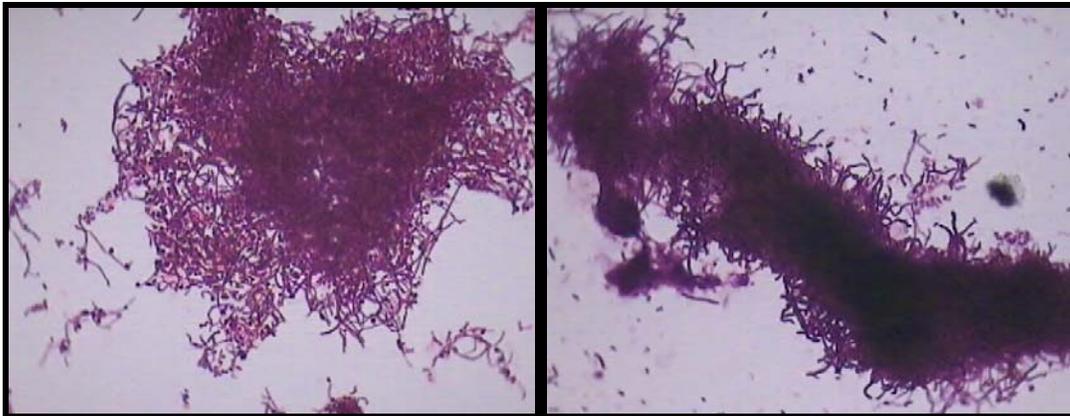


Figura 41. Imagen microscópica de la degradación de la quitina de cucarrón por *Streptomyces sp*
Fuente: autor.

Las quitinasas producidas por este microorganismos, son proteínas específicas que reconocen los enlaces β 1-4 y rompen la molécula quitina liberando N-acetilglucosamina. Esta enzima tiene la propiedad de degradar en la garrapata (específicamente) la quitina, indispensable para constituir su exoesqueleto (cutícula) y favorecer la biodinámica de los procesos de muda o ecdisis (Zhicheng y Marcelo, 1999).



Figura 42. Aspecto del medio cucarrón durante el día de mayor liberación de n-acetilglucosamina
Fuente autor.

El uso de las enzima o el microorganismo podría ser clasificados en el grupo de los inhibidores de crecimiento de insectos (IGRs), siendo su indicación exclusiva para aquellos organismos que su principal componente es quitina, con selectividad determinada para *Boophilus microplus* por su condición de parasitar a un solo hospedero y gozar de un ciclo parasítico de 21 días. (Cabezas, 1996).

Para entender mejor, su acción dinámica frente al proceso de degradación de la Quitina, es conveniente tener en cuenta que la quitina es un constituyente principal del exoesqueleto, juega un papel esencial durante la muda; y es vital para dar estructura y resistencia a la cutícula que, a su vez, es esencial para mantener la forma externa, para asegurar la inserción de los músculos, para proteger el cuerpo, etc. (Gillot, 1980).

Hasta los primeros años de la década de los ochenta, el control químico de los insectos forestales nocivos se basaba en compuestos que interferían con procesos bioquímicos comunes, tanto a los insectos como a los vertebrados. La selectividad de estos insecticidas para los vertebrados es sólo cuantitativa. Los primeros ejemplos de selectividad cualitativa, lograda mediante la interferencia en procesos que se producen casi exclusivamente en insectos, se hallaron entre el grupo de los reguladores del crecimiento en insectos y de los inhibidores del desarrollo de insectos (Leger *et al*, 1986)

Las quitinasas y el uso de microorganismos quitinolíticos son compuestos que interfieren de forma específica en la deposición de quitina en la cutícula de insectos, ya que producen procesos de degradación dejando sin protección aparente al patógeno entre otros efectos como la incapacidad de que se produzca la muda o la eclosión de los huevos (Mulder y Gijswijt, 1973).

Los efectos producidos por las quitinasas en este ensayo determinan el comportamiento de la enzima y el microorganismo en laboratorio, favoreciendo las condiciones optimas de la enzima, su modo de acción y actividad insecticida sobre los insectos, a demás se evalúa brevemente la degradación de la quitina de organismos diferentes de los insectos que la poseen (crustáceos, hongos).

Observaciones al microscopio óptico de larvas tratadas con la quitinasa y el microorganismo, tras su fijación y tinción, muestran alteraciones en la deposición laminar de la cutícula (Leger *et al*, 1986b). El grado de alteración puede ser diferente en las distintas regiones de la cutícula. El tratamiento con la quitinasas hace que alteraciones sean de forma gradual y que finalmente desaparezcan en las láminas que se depositan. Esta observación indica que el efecto de la enzima no es reversible (Zacharuk, 1973 Y Gillot, 1980) (Figura 43).



Figura 43. Imagen microscópica de la degradación de la quitina de garrapata por *Streptomyces sp*
Fuente: autor.

La primera publicación de Evlakhova y Rakitin, 1968 señaló que los efectos descritos de las quitinasas radican sobre la formación de la cutícula eran debidos a la degradación de la quitina, La inhibición de la deposición de la quitina todavía parece ser la explicación más convincente del efecto primario de los productos químicos. La hipótesis se apoya en la rapidez observada del comienzo de la acción, que provoca la inhibición total de la deposición a los 15 minutos de haber inyectado a larvas de *Pieris brassicae*. Además, de forma concomitante se observó que aparecía un precursor de la quitina, un compuesto de uridina-difosfato-N-acetilglucosamina (UDPGlcNAc) (Shaikh and Desphande, 1993).

En un caso (Turnbull y Howells, 1983), se publicó que la sustancia química diflubenzuron había inhibido parcialmente (50%-70%) la quitina sintasa de varias especies de moscas. Sin embargo, este resultado pudo ser explicado por la presencia de fragmentos celulares grandes que pudieran todavía contener el complejo de la síntesis de la quitina como estructura organizada.

Actualmente, la hipótesis más probable para explicar la inhibición de la síntesis de quitina ejercida por sustancias químicas como el benzoilureas es que éstas bloquean el transporte por la membrana de los precursores de la quitina proporcionando la evidencia de tal mecanismo (Zhicheng y Marcelo, 1999).

Sobre las larvas, la quitinasa y el microorganismo pueden ser activos principalmente por ingestión o contacto (Grosscurt y Jongsma, 1987), el tratamiento de larvas susceptibles a la quitinasas, normalmente produce la incapacidad de mudar. Las larvas son incapaces de escapar de la exuvia y a menudo dañan en el intento la nueva cutícula de forma letal. Incluso cuando la muda se realiza con éxito, normalmente mueren poco tiempo después. Los efectos letales de las quitinasas normalmente no suceden antes de que se realice la siguiente muda y el exoesqueleto del siguiente estadio larvario está seriamente debilitado por la falta de quitina, lo que produce la muerte durante la muda o al poco tiempo de ésta. Sin embargo, generalmente se observó a los pocos días del tratamiento con quitinasas un descenso significativo en la consistencia de las estructuras, debido a que las alteraciones en la deposición de la quitina en las nuevas capas de la quitina. De haber realizado el ensayo con larvas vivas se podría haber demostrado daños que dificultaran cada vez más la correcta locomoción y alimentación. (Zhicheng y Marcelo, 1999).

Debido a su modo de acción, las quitinasas no son de rápido efecto. Por lo tanto, para evaluar su potencia total son necesarios periodos de observación más prolongados que para insecticidas clásicos. La comprobación de que las quitinasas son activas sobre todos los estadios larvarios susceptibles está por

comprobarse, aunque en general, la eficacia es dependiente de la concentración de quitina y la facilidad del contacto y el reconocimiento por parte de la enzima.

En ensayos de laboratorio, se han descrito cierto número de deficiencias funcionales de la cutícula de adultos, tales como la capacidad reducida para desplazarse, copular y volar (Mendonsa *et al.* 1996) y élitros con menos resistencia mecánica, lo que evidencia una menor capacidad de la cutícula para actuar como escudo protector frente a predadores y parásitos.

6.10. EFECTO DEL pH Y TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las pruebas fueron realizadas con el fin de estimar los efectos que pueden producir las variaciones de pH y temperatura en la actividad enzimática de la cepa utilizada, con el fin de evaluar las condiciones más adecuadas que se deben tener en cuenta en la aplicación de estos microorganismos o la enzima a escala mayor.

En la figura 44 se presentan los resultados obtenidos a los diferentes valores de pH que van desde 2 hasta 11 y su efecto sobre la actividad quitinolítica dando como resultado que a un valor pH 7 se presenta la máxima actividad quitinolítica.

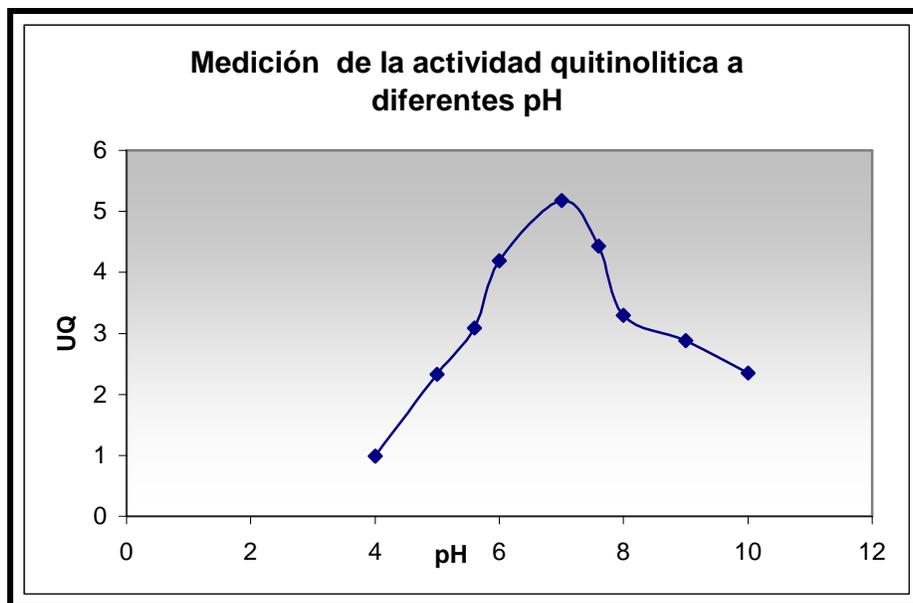


Figura 44. Medición de la actividad quitinolítica a diferentes pHs del extracto enzimático.

Con estos resultados se confirma lo reportado por (Felse y Panda, 2000) quienes reportan un rango optimo de actividad quitinolítica en pHs entre 6 y 8 con un pH óptimo de 7.0 +/- 2 y un temperatura 30°C.

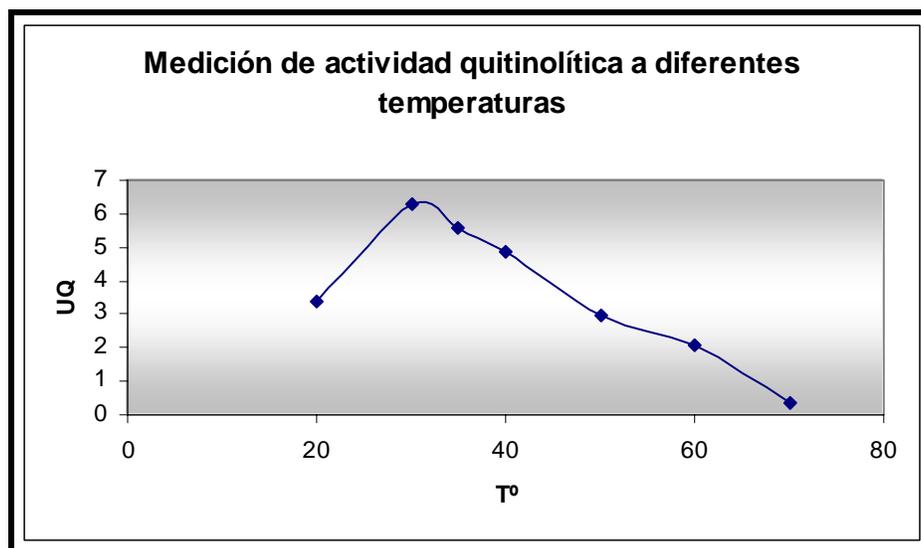


Figura 45. Medición de la actividad quitinolítica a diferentes temperaturas del extracto enzimático.

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidenció que la temperatura óptima en la cual la enzima presenta mayor actividad es de 30°C y un pH de 7 para los ensayos biotecnológicos realizados (Figura 45).

6.11. ESTABILIDAD TÉRMICA Y AL pH DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la estabilidad a diferentes temperaturas (Figura 46) y (Anexo 13), se pudo concluir.

Para valores de T° entre 60 y 70 °C la actividad quitinolítica se disminuye entre un 90 y 94 % con respecto a la muestra sin tratamiento (control).

Para valores de T° entre 30 y 50 °C la actividad quitinolítica disminuye entre 36% y 60% con respecto a la muestra sin tratamiento (control).

Para valores de T° entre 20 y 40 °C la actividad quitinolítica disminuye entre 28% con respecto a la muestra sin tratamiento (control).

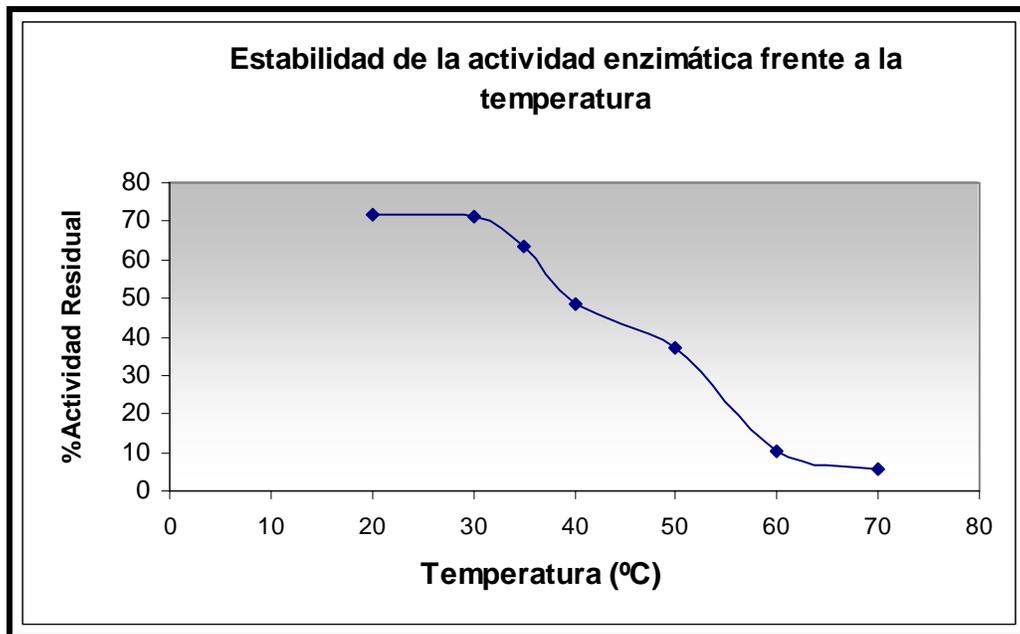


Figura 46. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica a diferentes temperaturas a un pH 7 durante 60 min.

Fuente: autor.

De acuerdo con lo anterior se observa que la enzima pierde su estabilidad en más 50% cuando permanece durante 60 min a T° entre 40 y 70 °C.

La mayor estabilidad de la enzima es entre 20 y 30 °C.

El rango de estabilidad presentado por las cepas le confiere cualidades dentro de diversos campos, Y favorece la actividad quitinasa en diversos procesos industriales.

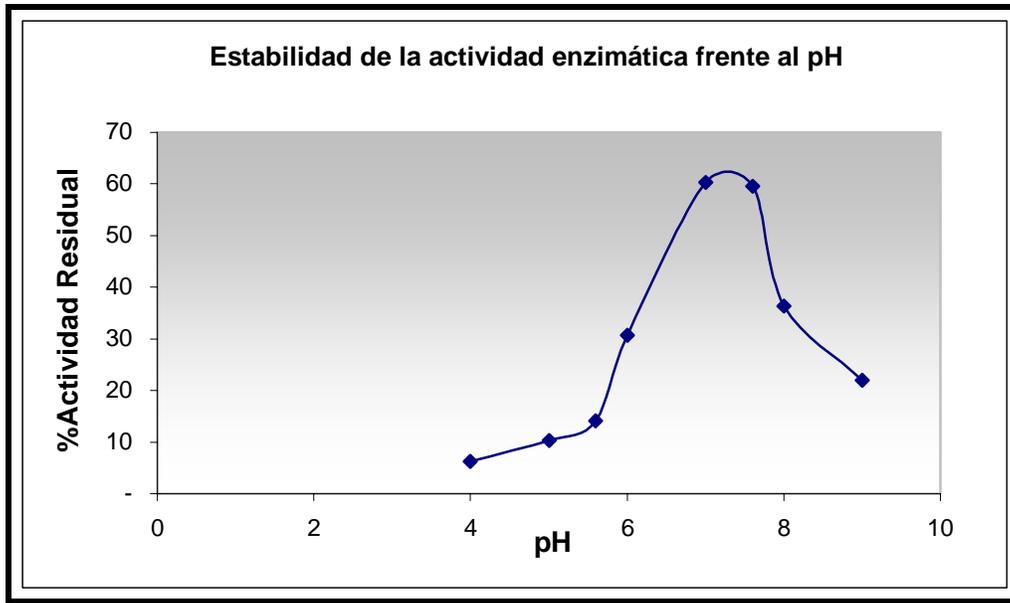


Figura 47. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica a diferentes pHs a 60 min a una T 30°C

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la estabilidad a diferentes pHs (Figura 47) y (Anexo 13) se pudo concluir.

Para valores de pH 4 y 5.6 la actividad quitinolítica disminuye entre un 85 y 93% con respecto a la muestra sin tratamiento de pH con respecto a la muestra sin tratamiento (control).

Para valores de pH 8 y 9 la actividad quitinolítica disminuye entre un 63 y 78% con respecto a la muestra sin tratamiento de pH con respecto a la muestra sin tratamiento (control).

Para valores de pH 7 y 7.6 la actividad quitinolítica disminuye entre un 40 % con respecto a la muestra sin tratamiento de pH con respecto a la muestra sin tratamiento (control). Por lo tanto a este intervalo de pH el extracto enzimático presenta su mayor estabilidad.

Comparando pH ácidos y alcalinos presenta una menor estabilidad a pHs ácidos y por tanto una disminución considerable de la actividad quitinolítica

7. CONCLUSIONES.

Las cepas utilizadas en este estudio provienen del aislamiento a partir de residuos de concha de camarón destacándose el género *actynomicetes*, siendo la cepa A9 quien presentó mayor actividad quitinolítica, de acuerdo con las condiciones de crecimiento establecidas para el microorganismo.

El aumento de la concentración de quitina coloidal 1.5% incrementó en más de un 300% las actividades quitinolíticas, debido a un aumento en la tasa de producción enzimática como respuesta a un estímulo ejercido por el sustrato. Los mayores niveles de producción enzimática con una concentración de 1.3 g/L⁻¹, con una viabilidad de 10¹¹UFC/ml.

Las condiciones óptimas para el crecimiento y producción de quitinasas con *Streptomyces sp* fueron: concentración de quitina 1,5%, pH de 9.2 y temperatura de 30°C para los ensayos biotecnológicos realizados.

En las pruebas de antagonismo *in vitro* se observó que los aislamientos de *extractos de fermentación* con una concentración 1.3 g/L⁻¹, lograron afectar el desarrollo de *F. oxysporum* y los demás fitopatógenos presentándose un halo de inhibición micelial promedio de 1.4 cm.

Streptomyces sp degradó quitina proveniente de residuos de concha de camarón, de cucarrón y de garrapata. Arrojando valores de 0.47g/L, 0.792 g/L y 0.406 g/L de N-acetilglucosamina respectivamente demostrando la aplicabilidad de *Streptomyces sp* en la degradación de residuos de la industria camaronera y su utilidad en varios campos.

El pH y la Temperatura óptimos del extracto enzimático fueron de 7 y 30°C respectivamente.

8. RECOMENDACIONES

Utilizar sustratos cromogénicos para evidenciar la actividad quitinasa de manera más exacta y acordar los tiempos de evaluación de la misma.

Mejorar el tamaño de partícula de la quitina para los distintos ensayos con el fin de acelerar los procesos de degradación o buscar formas de líquidas del sustrato y disminuir los tiempos de fermentación.

Realizar estudios sobre el efecto de la adición de n-acetilglucosamina u otro tipo de azúcares para potenciar la expresión de las enzimas quitinolíticas ya que se reportan por muchos autores.

Realizar estudios utilizando las enzimas quitinolíticas, producidas por *Streptomyces* sp, con otros microorganismos quitinolíticos reportados, y evaluar la actividad controladora de estos microorganismos en asociación.

Determinar y realizar estudios sobre la quitinasas y su actividad antifúngica producida por *Streptomyces* sp A9 con el fin de evaluar el efecto antagónico de ésta sobre fitopatógenos que afectan cultivos de importancia agronómica en Colombia.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ace M. Baty, Callie C. Eastburn, Somkiet Techkarnjanaruk, Amanda E. Goodman, and Gill G. Geesey. 2000. Spatial and Temporal Variations in Chitinolytic Gene Expression and Bacterial Biomass Production during Chitin Degradation. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 66, No. 8

Ace M. Baty, Callie C. Eastburn, Somkiet Techkarnjanaruk, Amanda E. Goodman, and Gill G. Geesey. 2000. Differentiation of Chitinase-Active and Non-Chitinase-Active Subpopulations of a Marine Bacterium during. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 66, No. 8p. 3566–3573

Acuanal. 1998 Guía ambiental para el subsector Camaronicultor

Acuavisión, Secretaría de Pesca. 1987. Revista Mexicana de Acuicultura. Fideicomiso Fondo Nacional para el Desarrollo Pesquero. 2-8

Agrios, N. 2004. Fitopatología. Limusa. España.

Aguilar A., Ingemansson, T., 1.998. Extremophiles microorganims as cell factories. Support from the European Union. *Extremophiles*.

Aktuganov, A. I. Melent'ev, L. Yu. Kuz'mina, N. F. Galimzyanova, and A. V. Shirokov. 2003. The Chitinolytic Activity of *Bacillus* Cohn Bacteria Antagonistic to Phytopathogenic Fungi. *Microbiology*, Vol. 72, No. 3, pp. 313–317.

Amortegui. A, Fernández. J. 2001. Estudio de la factibilidad técnica económica de la extracción del polímero N-acetilglucosamina a partir de caparazón de cangrejo azul (Jaiba). UNAD Colombia. Facultad de ingeniería departamento de ingeniería química.

Amy L. Svitil and David L. Kirchman.1998. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4-*b*-glycanases. *Microbiology*, **144**, 1299–1308

Arbeláez G. S. Guzmán. J. León. M. González. J. C. Molina. J. Parra. J. F. Angulo & J. D. Alvarez. 1993. Control integrado del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*. X:68-89

Astudillo. M. B. Blanco & M. Martínez.1999. Establecimiento de los parámetros para producción semi-industrial del hongo *Trichoderma harzianum*. Bogotá. Trabajo de grado (Microbiólogo industrial). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial.

Atlas, R Y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson educación. págs 312.

Bing-Lan Liu, Pao-Min Kao, Yew-Min Tzeng, Kuo-Ching Feng.2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 410–415.

Boer. W, Veen. J. 2001. Are chitinolytic rhizosphere bacteria really beneficial to plants?. *Biotic interactions in plant –pathogen associations* chapter 7 pag 121-130.

Boletín da Información Oportuna del Sector Alimentarlo (1997) INEGI 142: 38, 78 y 79.

Cabello Velasco A., A.; Hernández Saavedra; E. Reyes Salinas; E. Cristiani Urbina y M. Jiménez Lozano. 1988. Uso del Caparazón de Camarón como sustrato de fermentación *Rev Lat-Amer. Microbiol.* 29: 239-244.

Cabezas, M., F.A. 1996. Introducción a la Entomología. Trillas México.148 p.

Carrascal, A., Paez, A. Y Burbano.M. 2003. Manual de laboratorio: Microbiología de alimentos. Primera edición. CEJA. Bogotá, D.C; Colombia. págs.30-132 .

Coleman, David C., 1996 *Fundamentals of soil ecology*. San Diego, California: Academic. 205 p

Cottrell, M., Moore, J., Kirchman, D. 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (6) 2553-2557.

Cottrell, M., Wood, D., Yu, L., Kirchman, D. 2000b. Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the α - and γ -subclasses of the proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3) 1195-1201.

Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A. 1993 Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3899-3905.

Cross. T. 1989. The Actinomycetes II: Growth and examination of Actinomycetes. p. 2340-2347. en S. T. Williams, M. E. Sharpe y G. G. Holt (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.4. Williams and Wilkins, Baltimore,

Davies, G. & Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosil hidrolases . *Structure*. Vol. 3, 853-859.

Ellas. R. O. Arcos. & G. Arbeláez. 1993 Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Colombiana*; X. 1:52-61.

Ensign. J. C. 1992. Introduction to the Actinomycetes p.811-815. *The Prokaryotes, a Handbook on habitats, insolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlin

Ensor LA, Stosz SK and Weiner RM. 1999. Expression of multiple complex polysaccharide-degrading enzyme systems by marine bacterium strain 2-40. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 23: 123-126.

Erazo. M. D. Congote. K. Carrascal. & M. Franco. 2000. Evaluación del efecto antagónico de actinomicetes nativos del suelo del municipio de Mosquera frente a *E.coli* 0157: H7. Bogotá. Trabajo de grado (Microbiólogo Industrial) Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial.

Escott M., Hearn M. Veronica, Adams J. David. 1998. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*. 144: 1575-1581.

Felse, P. A., Panda, T. 2000. Production of microbial chitinases – A revisit. *Bioproc. Eng.* 23:127-134.

Felse. P, Panda, T. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioproc. Eng.* 20:505-512.

Figuroa, F. S. 2000. Identificación de géneros bacterianos en camarón. *Panorama Acuícola*. Marzo-Abril 2000. 48 – 51.

Franco. M. 1999. Aislamiento, caracterización y evaluación de Actinomicetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos, Bogotá. Tesis de maestría. Posgrado de Microbiología. Universidad Nacional. Departamento de Microbiología.

Franco-Monsreal, J., Flórez, J., Puc, M., Heredia M. y Vivas, M. 2001. Prevalencias de la especie *Vibrio fluvialis* biovariedad II en alimentos marinos de origen animal de restaurantes de la ciudad de Mérida. Yucatán, México. Artículo Original.

Garcés. de Granada E. M. Orozco Y C. Zapata. 1999. Fitopatología en flores, *Acta Biológica Colombiana*,; 4:5-26

Gillot, C. 1980. *Entomology* plenum press. New york.

Gomez R.C, Semedo L.T.A.S, Soares R.M.A, Alviano C.S, Lindares L.F and Coelho R.R.R. 2000. Chitinolytic activity of actinomicetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in applied microbiology*. 30: 146-150.

Gómez. S & L.M. Ortega. 1993. Evaluación de *Streptomyces griseoviridis* (MYCOSTOP®), en el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, en dos variedades de clavel estándar bajo condiciones comerciales. Bogotá. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional.

Gonzales.J, Peña. A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hanseni*. Revista Latinoamericana de microbiología. Vol. 44, 3-4.

Goodfellow. M.1989.The Actinomycetes I: surageneric clasification of Actinomycetes p. 2333-2339 en S. T. Williams, M. E. Sharpe y G. G. Holt (ed), Bergyey's manual of systematic bacteriology, Vol.4. Williams and Wilkins, Baltimore,

Grosscurt, Arnold C,Jongsman , Pels, Teun,1987 A literature review and new observations on the use of diflubenzuron for control of locusts and grasshoppers throughout the world. Journal of Orthoptera Research 11: 43-54.

Henrissat, B. 1991. A classification of glycosil hydrolases based on amino acid sequence similarities. biochem j. Vol. 280, 309– 316.

Herrera-Ruiz J. 1990. La síntesis de quitina en los hongos, publicaciones de la universidad de sevilla.

Herrera-Ruiz J. Sentandreu R. Martinez J. P. 1992. Chitin biosynthesis in fungi, Handbook of Applied Mycology, vol 4.

Herrera-Ruiz J., 1993 La quitina. Inv. Cien. Julio 1993. pag 42-49.

Horsch M, Mayer C, Sennhauser U, Rast DM (1997) β -Nacetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. Pharma 76:187–218

Horst, M., 1981. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine srhimp. The journal of biological chemistry. Vol. 256, No. 3. 1412 – 1419.

Howard B. J. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacterial that grow aerobically. 4th Ed. Approved Standard. pp: 645-650.

Howard, B. Hutcheson, S., 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30:627 – 635.

INPA. 1999. Boletín estadístico pesquero. Ministerio de Agricultura

Ipsita Roy, Meryam Sardar, Munishwar N. Gupta.2003 Hydrolisis of chitin by pectinex. Enzyme and microbial techonology. 22: 82 - 85.

Johnson, B.R., and Chen. G.C.1983. Ocurrance and inhibition of chitin in cell walls of wood-decay fungi . *Holzforschung*, 37:255-259.

Kent Nilsson; Jonny Bjurman.1998 Chitin as an indicator of the biomass of two wood-decay fungi in relation *Canadian Journal of Microbiology*; Jun; 44, 6; ProQuest Medical Library pg. 575

Korn-Wendisch & Kutzner. The Family Streptomicetaceae p 921-995 The Prokaryotes, a Handbook on habitats, insolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin 1992.

Krupa y Dommergues. 1981. Ecology of root pathogens, 2^a edición. Elsevier scientific publishing company. USA.

Lahdenperä. M. L. The control of *Fusarium* wilt on carantion with *Streptomyces* preparation, *Acta Horticulturae*, 1987; 216:85-91

Latzko F, Hampel W. 1995. Enzyme formation by a yeast cell wall lytic arthrobacter species chitinolytic activity. *Appl. Microbiol biotechnol* 1995. 44: 185-189.

Leger R. J, Cooper, R. M.; Charnley, A. K. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85-95.

Leger R. J, Cooper, R. M.; Charnley, A. K. 1986b. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 167-177.

Loci R. 1989. Section 29 Streptomycetes and related Genera. p. 2451-2. en S. T. Williams, M. E. Sharpe y G. G. Holt (ed), *Bergyey's manual of systematic bacteriology*, Vol.4. Williams and Wilkins, Baltimore,.

Mahadevan B, Crawford DL (1997) Properties of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC 108. *Enzyme Microb Technol* 20:489–493

Manucharova N. A, E. V. Belova, L. M. Polyanskaya, and G. M. Zenova. 2004, A Chitinolytic Actinomycete Complex in Chernozem Soil. *Microbiology*, Vol. 73, No. 1, pp. 56–59.

Martin, F.,Delaurelle, C., and Hilbert, J.L.1990.An improved ergosterol assay to estimate fangal biomasa in ectomycorrhizas. *Mycol. Res.* 94: 1059-1064

Mehlhorn, H., Piekarski, G. 1993. Fundamentos de parasitología, parásitos del hombre y de los animales domésticos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Melent'ev, A. I., Aktuganov, G. E., 2001. The role of antifungal activity of *Bacillus* sp. 739. Microbiology. Vol. 70, No. 5, 548 – 552.

Mendonsa ES, Vartak PH, Rao JU, Deshpande MV (1996) An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticle for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. Biotechnol Lett 18:373–376

Miller, G., 1958. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical chemistry. 35:426-428.

Molano. A. F. 2000. Evaluación y selección de un medio de cultivo para la obtención de un antifúngico a partir de *Nocardia gardneri*. Mosquera-Colombia. Bogotá. Trabajo de grado (Microbiólogo Industrial). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial,

Mulder R & Gijswijt M I. 1973. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. Pestic. Sd. 4:737-45.

Niehaus F, Bertoldo C, Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. Microbial Biotechnol. 51:711-729.

Ochoa. J. M. 1996 Control biológico del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* mediante el uso de los microorganismos potencialmente antagonistas *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum* Bogotá. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Carrera de Biología,

Priest, F. 1984. Extracellular enzymes. Serie Aspects of Microbiology. Editorial American Society for Microbiology. Washington, U.S.A. pg. 51-62.

Rachel Cohen-Kupiec and Ilan Chet. 1998. The molecular biology of chitin digestion. Otto-Warburg-Center for Agricultural Biotechnology, Biotechnology, vol 9; 270-277.

Rao, M., Muñoz, J. Stevens, W. F. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54:808-813.

Rattink .H. Y Aalameer. 2000. Marchitez *Fusarium* del clavel p 75-89 En: Clavel (*Dianthus caryophyllus*) Ed Harti Tecnic.

Reetarani, S. Patil, Vandana Ghormade, Mukund V. Deshpande. 2000. chitinolytic enzymes : an exploration. Enzyme and microbial technology 26:473-483.

Reissig, L. Jose, Strominger L. Jack, Leloir F. Luis. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of n-acetilglucosamino sugars. Pag 959-967.

Rippan. J. Tratado de micología medica 3^{ra} ed. México Mc. Graw Hill. 1990.

Rodríguez,J.2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofíticos, contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate. Tesis de magíster en microbiología. Universidad mayor de San Marcos. Lima Perú.

Rojas. A.M & N. Valencia. 2000. Evaluación del efecto antagónico de cepas nativas de Actinomycetes frente a *Listeria monocytogenes*_Bogotá. Trabajo de grado (Microbiólogo Industrial). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial,.

Routh, J.I. Eyman, D.P Burton, D.J. 1990. Compendio esencial de química general, Orgánica y bioquímica , tomos I y II Segunda Edición .Editorial Reverté. Bogotá –Col.

Sabry, S.A .1992. Microbial degradation of shrimp shell waste. J. Basic. Microbiol. 32: 378 -383.

Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M. y Moriguchi, M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 64 (9) 3397-3402.

Sampson N. Mark, Gooday W. Graham. 1998. involvement of chitinases of *Bacillus thuringensis* during pathogenesis in insects. Microbiology. Vol 144, 2189-2194.

San-Lang Wang, K, Jau-Ren Hwang. 2001. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. Enzyme and microbial technology. 28:376 - 382.

San-Lang Wang, K, Sau-Hwa chio.1998. Reversible immobilization of chitinase via coupling to reversibly soluble polymer. Enzyme and microbial technology. 22:634 - 640.

Shaikh SA, Desphande MV (1993) Chitinolytic enzymes their contribution to basic and applied research. World J Microbiol Biotechnol 9:468–475

Sharma, P.D., Fisher, P,j., and Webster, J. 1977. Critique of the chitin technique for estimation of fungal biomass. Trans. Br. Mycol. Soc. 69: 479-483.

Schirmbock, M., Lorito, M., Yong-Li, W et al. 1994 Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotic, molecular mechanisms

involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi . *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 4364-4370.

Sietsma, J.H., and Wessels, J.G.H. 1977. Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta*, 496:225-239.

Svitil, A., Ní Chadhain, S., Moore, J., Kirchman, D. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. (*Appl. Environ. Microbiol.* 63 2) 408-413.

Sylvia. D. J. Fuhrmann. P. Hartel & D. Zuberer Principles and applications of soil microbiology, New Jersey. editions Prentice Hall. 1998.

Takeshi Watanabe, Kanai Ryo. 1999. Family 19 chitinases of streptomyces species Characterization of chitinase and distribution. *Microbiology*. 145: 3353-3363.

Tiezt, Norbert. 1972. Química clínica moderna. Segunda Edición. Ed. Interamericana. México.

Tsujibo Hiroshi,* Takahiro Kubota, Mitsugu Yamamoto, Katsushiro Miyamoto, and Yoshihiko Inamori. 2003. Characterization of Chitinase Genes from an Alkaliphilic Actinomycete, *Nocardioopsis prasina* OPC-131. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 69, No. 2 p. 894–900.

Tsujibo, H., Orikoishi, H., Shiotani, K. 1998. La caracterización de chitinase C de una bacteria marina, sp de *Alteromonas*. strain O-7, and its corresponding gene and domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (2) 472-478.

Turnbull IF, Howells AJ. 1983 Integumental chitin synthase activity in cell-free extracts of larvae of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, and two other species of diptera. *J Biol Sci* ;36(3):251-62.

Vladimir E. Tikhonov , Lidya A. Radigina, Igor A. Yamskov. 1998. Affinity purification of major chitinases produced by *Streptomyces kurssanovii*. *Enzyme and microbial technology*. 22:634 - 640.

Vladimir E. Tikhonov , Llorca Lopez V. Luis. Salinas Jesus and Jansson Borje –Hans. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. Suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology* . 35: 67 - 78.

Voigh, R. y Borns, M. 1979. Tratado de tecnología farmacéutica. Acribia Zaragoza, España.

Wang SL, Yen YH, Tsiao WJ, Chang WT, Wang CL (2002) Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Microb Technol* 31:337–344

Warren, R. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:183-212.

Win N.N., Stevens W.F, 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl. Microbiol. biotechnol* 2001.57:334 -341.

Wu, M., Ching, Y., Chen, J., Chen, C., Chang, M. 2001. Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase chi 92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. 67 (11) 5100-5106. Taiwan. Republic of China.

Yoon Ho-Geun, Kim Hee-Yun, Lim Young-Hee, Kim Hye-Kyung, Shin Dong-Hoon. 2000. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4; Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Applied and environmental Microbiology.* Vol 66: 3727 -3734.

Yu, C, A. M. Lee, B. L. Bassier and S. Roseman, 1991. Chitin utilization by marine bacteria. *J. Biol. Chem.* 266: 24260-24266.

Yuan. W. M y D. L. Crawford. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as potential agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ Microbiol,* 1995; 61:3119-3128.

Zacharuk, R. 1973. Penetration of the cuticular layers of elaterid larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarhizium anisopliae* and notes on bacterial invasion. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 101-106.

Zhicheng Shen, Marcelo Jacobs Lorena. 1999. Evolution of chitin –binding proteins in invertebrates. *J. Mol Evol* 48: 341-347.

