

Evaluación del potencial coleopterida de extractos crudos de quitinasa recombinante ChiBLUV 02 de *Bacillus licheniformis* sobre *Aethina tumida*

Deny de Jesús Velasco-Vique ^a

Argel Flores-Primo ^{a*}

Rodolfo Quintana-Castro ^b

Violeta Trinidad Pardío Sedas ^a

María Guadalupe Sánchez-Otero ^b

Anabel Cruz Romero ^a

^a Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Miguel Ángel de Quevedo S/N, 91710, Veracruz, Ver, México.

^b Universidad Veracruzana. Facultad de Bioanálisis, Veracruz, Ver, México.

*Autor para correspondencia: argflores@uv.mx

Resumen:

Aethina tumida es una plaga que causa afectaciones estructurales y de producción en la industria apícola. El método de control incluye usar plaguicidas sintéticos que pueden afectar a las abejas, contaminar la miel y otros productos de la colmena, así como generar resistencia a plagas. En el presente estudio se evaluó el efecto coleopterida de un extracto crudo de quitinasa recombinante ChiBLUV 02 de *Bacillus licheniformis* UV01 expresada en cepas de *Escherichia coli* BL21 (De3) sobre la especie *Aethina tumida*. Se evaluaron diferentes unidades de actividad enzimática (0.42, 1.26, 2.10, 4.20, 8.40, 12.60, 16.80 y 21.00 U/ml) mezcladas con el alimento de mantenimiento para larvas y escarabajos. El alimento fue administrado en raciones de 1 g/día durante 3 días y se evaluó el efecto coleopterida a las 24, 48 y 72 h. Las CL₅₀ y CL₉₀ se calcularon empleando un análisis Probit. La aplicación de 21.00 U/ml de quitinasa recombinante promovió la mortalidad del 45 % de larvas después de

72 h de administración; sin embargo, ninguna de las concentraciones evaluadas tuvo efecto sobre los escarabajos adultos. El análisis Probit indicó que se necesitan 27.03 y 168.92 U/ml para promover la mortalidad del 50 (CL₅₀) y 90 % (CL₉₀) de la *Aethina tumida*. La actividad enzimática de los extractos crudos fue baja para lograr una mayor mortalidad de las larvas y adultos de *Aethina tumida*, por lo tanto, se debe mejorar la actividad quitinolítica en las cepas ChiBLUV 02 para incrementar su efecto coleopterícida.

Palabras clave: Escarabajo, Larvas, Bioplaguicida, Enzima, Probit.

Recibido: 22/05/2024

Aceptado: 12/01/2025

Introducción

La apicultura es una actividad subyacente al sector pecuario que proporciona materias primas para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética nacional e internacional. Además, el sector apícola proporciona ingresos económicos para muchas familias⁽¹⁾. Sin embargo, uno de los grandes problemas de la apicultura son las malas prácticas de manejo y almacenamiento de los productos derivados de la colmena por parte de los apicultores, lo que favorece la presencia de plagas y provoca pérdidas económicas. Una de las plagas principales que afectan al sector apícola es la *Aethina tumida*, una especie conocida como "pequeño escarabajo de la colmena" que pudiera clasificarse como parásito de las abejas por la forma en la que se desarrolla a costa de las abejas dentro de la colmena. Esta especie es originaria de las regiones tropicales y subtropicales del África subsahariana⁽²⁾, pero en los últimos 20 años, ha cobrado importancia internacional al haber extendido su presencia a diferentes partes del mundo provocando infestaciones de colonias de abejas, principalmente *Apis mellifera scutellata* y *Apis mellifera capensis*⁽³⁾.

Las principales afectaciones de la *A. tumida* en la apicultura incluye los daños estructurales a la colmena y la fermentación de la miel por los excrementos de adultos y larvas, lo que afecta directamente el registro de la colmena y el rendimiento y calidad de la miel obtenida^(3,4). Cuando la infestación de *A. tumida* en las colmenas es extrema puede desencadenar una disminución de la población de abejas, debido a que los adultos se alimentan de crías de abejas, así como del polen y la miel, estos factores sumados a la presencia de otros parásitos o enfermedades pueden desencadenar el colapso de la colmena⁽⁴⁾. El control de esta especie se realiza por varios métodos entre los que se incluyen el fortalecimiento de las colonias de abejas y las buenas prácticas de manejo apícola, el uso de trampas, así como el uso de plaguicidas como el cumafós (CheckMite⁺™) y fluvinato que son empleados en el interior de

la colmena o la permetrina que se aplica en los suelos alrededor de las colmenas. Los plaguicidas sintéticos son efectivos para el control de esta especie, sin embargo, su uso puede tener graves consecuencias que derivan en la contaminación de la miel y otros productos de la colmena, afectaciones al ambiente, alteraciones en la población de abejas, daños a la salud de los apicultores, así como la generación de plagas resistentes⁽⁵⁾.

La tendencia actual se ha centrado en el desarrollo de bioplaguicidas a partir de fuentes naturales, la aplicación de la biotecnología enzimática o el uso de depredadores o parasitoides naturales de la especie. Una de estas alternativas es el uso de quitinasas, enzimas altamente específicas que hidrolizan la quitina, un carbohidrato que forma parte del 75 % del exoesqueleto de los insectos, el cual les confiere resistencia y rigidez⁽⁶⁾, y que se podrían emplear de manera combinada con trampas en el interior de las colmenas que permitan el ingreso de las plagas y que eviten el contacto con las abejas. Además, algunos autores han mencionado que las quitinasas promueven un efecto antialimentario en larvas de insectos debido a que afectan la estructura de la membrana peritrófica de sus intestinos, promoviendo la disminución en el éxito de la pupación y aumentando la mortalidad en las etapas de larvas y pupas^(7,8). Las bacterias del género *Bacillus* son unas de las mayores fuentes de compuestos naturales biológicamente activos⁽⁹⁾, que producen numerosos metabolitos secundarios y una gran cantidad de enzimas, además, dentro de este género se encuentran algunas especies denominadas seguras y favorecedoras para los cultivos y el medio ambiente como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, sin embargo, antes de su utilización en campo se deben evaluar ampliamente en términos de bioseguridad⁽¹⁰⁾. Varias especies de *Bacillus* muestran actividad quitinolítica, como *Bacillus pumilus*⁽¹¹⁾, *B. licheniformis* cepa LHH100⁽¹²⁾, *B. licheniformis*^(13,14). Debido a que las quitinasas hidrolizan la quitina, un polisacárido encontrado en alta proporción en insectos, hongos, levaduras y estructuras internas de algunos vertebrados, varios estudios se han enfocado en el uso de estas enzimas para el control biológico de patógenos que afectan a las plantas y de plagas de insectos que afectan al sector agrícola^(14,15,16).

Al momento no existen estudios en los que se haya probado la efectividad de las quitinasas sobre *A. tumida*, pero debido al alto porcentaje de quitina que contiene su exoesqueleto⁽⁶⁾ y el efecto alimentario que ha sido reportado en otros estudios se considera que la aplicación de quitinasas⁽⁷⁾ pudiera ser una alternativa viable para su control. Sin embargo, las abejas también cuentan con un alto porcentaje de quitina en la composición de su exoesqueleto y podrían verse afectadas de manera indirecta durante su aplicación, por lo que, de ser efectivo el tratamiento, en los siguientes estudios se propondría evaluar diferentes métodos de aplicación en los que se podría combinar el uso de atrayentes químicos (feromonas) y trampas que permitan el ingreso de larvas o adultos de *A. tumida* pero no de abejas, para evitar afectaciones en la colmena. Por lo anterior, el presente trabajo es el primero de una serie de estudios que tiene la finalidad de generar las bases para el desarrollo de un tratamiento efectivo y natural para el control de *A. tumida* mediante la determinación del efecto coleopterocida de una

quitinasa obtenida de *B. licheniformis* UV01 y expresada en *Escherichia coli* BL21 (DE3) en condiciones de laboratorio.

Material y métodos

Las cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) productoras de la quitinasa recombinante fueron obtenidas del cepario del laboratorio de química y genómica de la Facultad de Bioanálisis campus Veracruz. Para la obtención del extracto crudo de la quitinasa recombinante se preinocularon las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3) en agar Luria Bertani (LB) adicionado con Kanamicina (10 mg/ml) para obtener un crecimiento exponencial de cultivo celular. Se realizó un cultivo de 50 ml de medio LB adicionándole isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína de interés (quitinasa) dejando la incubación durante 8 h a 37 °C y agitación de 220 rpm. Para obtener el extracto crudo enzimático se sonicó el cultivo durante 20 ciclos de 15 seg con 30 de descanso con la subsecuente centrifugación 17,200 xg durante 15 min y 4 °C⁽¹⁷⁾. El extracto crudo obtenido se almacenó a 4 °C en recipientes herméticamente tapados hasta su uso en los ensayos con *A. tumida*.

La viabilidad de la enzima recombinante como una alternativa natural para el control de *A. tumida*, se determinó mediante la evaluación de su actividad quitinolítica. Para esto, se adicionaron 500 ml de extracto crudo enzimático en un tubo eppendorf® y se incubó a 32 °C por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 500 ml de quitina coloidal al 1 % en buffer de fosfatos pH 6.0 100 mM y se incubó a 32 °C por 1 h. Después de la reacción se cuantificó la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS)⁽¹⁸⁾, como una medida indirecta de la concentración de N-acetil-D-glucosamina liberada en la reacción. La actividad enzimática se definió mM de N-acetil-D-glucosamina liberados min⁻¹ a 32 °C (pH 6). Como control negativo se evaluó la actividad quitinolítica de un extracto crudo de cepa no recombinante de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Las colonias de *A. tumida* silvestres se establecieron con adultos (machos y hembras) sanos recolectados de apiarios de la zona centro del estado de Veracruz que se acondicionaron en cámaras de cría con medio de mantenimiento (agua y alimento). Las cámaras de cría se diseñaron a partir de cajas Petri de 60 ×15 mm marca Científica Senna®, a las que se les realizó una perforación central de 4 cm de diámetro para favorecer la ventilación. El medio de mantenimiento consistió en la administración cada tercer día de 1 g de alimento elaborado con miel, polen y cebada de cerveza (1:1:1). Una vez que ovipositaron los escarabajos se reubicaron en otra caja Petri y las larvas que eclosionaron se mantuvieron con las mismas condiciones de alimento y agua por un periodo de 3 semanas, posteriormente, se colocaron en cámaras de empupado. Para esta etapa, se diseñaron cámaras que consistieron en recipientes de plástico con una capacidad de 1 L a los cuales se les agregó ¾ partes de arena y en la parte superior se adaptó una caja Petri con una perforación en la base que les permitió

a las larvas descender e iniciar su etapa de empupado. Los nuevos individuos se ubicaron en cámaras independientes a las primeras generaciones y fueron mantenidos con las mismas condiciones de agua y alimentación. Todas las etapas de desarrollo de la *A. tumida* se mantuvieron en una estufa de cultivo (Benchtop incubator 12E, Quincy Lab Inc. Illinois, USA) a 28 ± 2 °C y una humedad relativa promedio de 82 ± 3 % que se midió con un termohigrómetro (HTC-2 Uplayteck, México). La HR se estabilizó agregando una torunda de algodón con 5 ml de agua al interior de las cámaras de cría, la cual se cambió cada 48 h. Para los ensayos de actividad coleopterícida se utilizaron escarabajos en estadio adulto con metamorfosis completa con una edad de 10 días (de tonalidad oscura y completamente esclerosado). Para las pruebas en el estadio larvario, se utilizaron larvas de 3 a 4 días posterior a su eclosión⁽¹⁹⁾.

Para preparar las diferentes unidades de actividad a evaluar en el ensayo coleopterícida se cuantificó su actividad de la enzima recombinante y a partir de ésta se evaluaron 8 concentraciones (0.42, 1.26, 2.10, 4.20, 8.40, 12.60, 16.80 y 21.00 U/ml). El extracto crudo de quitinasa recombinante se mezcló con el alimento y se administró a grupos de 10 escarabajos o larvas para cada una de las concentraciones evaluadas y se determinó el efecto agudo a las 24, 48 y 72 h. Para el grupo control se administró alimento de mantenimiento sin enzima para ambos estadios. Se consideró muerto todo aquel espécimen que no caminara o no respondiera a la manipulación con las pinzas de disección Luzeren[®]. En todos los ensayos, los escarabajos y larvas tratados se mantuvieron a una temperatura de (28 ± 2 °C) con oscuridad relativa. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad de los escarabajos y larvas (24, 48 y 72 h después de iniciado el ensayo). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Los datos de mortalidad fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANDEVA) a un nivel de significancia de 0.05 y comparación de medias por medio de la prueba de Tukey usando el paquete estadístico SAS versión 9.3. Para el cálculo de las CL₅₀ y CL₉₀ se empleó el análisis Probit⁽²⁰⁾.

Resultados y discusión

El extracto crudo de quitinasa recombinante presentó 42 unidades de actividad enzimática por mililitro (U/ml), las cuales fueron tomadas como base de cálculo para ajustar las unidades de actividad que se evaluaron sobre *A. tumida*. El extracto crudo de la enzima no recombinante no presentó actividad quitinolítica, lo que comprueba la viabilidad de la enzima recombinante. Una vez que el alimento con enzima recombinante se administró a las larvas y adultos de *A. tumida* se evaluó la mortalidad cada 24 h hasta las 72 h. La máxima mortalidad de larvas de *A. tumida* se observó a las 48 h de administración del alimento, posterior a ese tiempo ya no

hubo mortalidad de larvas. Debido a esto, el cálculo de las CL₅₀ y CL₉₀ se realizó con las observaciones obtenidas en este tiempo.

Actividad coleopterica del extracto crudo de quitinasa recombinante

Los resultados de las pruebas coleoptericas en larvas de *A. tumida* mostraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de mortalidad cuando se aplicaron diferentes unidades de actividad enzimática ($P \leq 0.05$). El porcentaje de mortalidad aumentó conforme se incrementó la actividad enzimática, siendo el mejor resultado el uso de 21 U/ml de quitinasa recombinante, que promovió el 45 % de mortalidad de larvas de *A. tumida* (Cuadro 1). El tiempo mínimo requerido para observar el efecto agudo de los extractos enzimáticos fue de 48 h. Por otro lado, el efecto coleopterica se pudo apreciar desde la adición de la de 4.2 U/ml de quitinasa recombinante con la que se obtuvo 10 % de mortalidad, sin embargo, la actividad enzimática en el extracto fue insuficiente para obtener mortalidades superiores al 45 %. Lo anterior muestra la necesidad de aumentar la actividad enzimática mediante el cambio de vectores de expresión o de células hospederas para su expresión que aumente la concentración de proteína y potencie su actividad quitinolítica.

Cuadro 1: Actividad coleopterica de los extractos crudos de quitinasa recombinante en el estadio larvario de *A. tumida* (U/ml)

	24 h			48 h			72 h		
	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)
*Testigo	20	0	0	20	0	0	20	0	0
0.42	20	0	0	20	0	0	20	0	0
1.26	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2.10	20	0	0	20	0	0	20	0	0
4.20	20	0	0	18	2	10	18	2	10
8.40	20	0	0	16	4	20	16	4	20
12.60	20	0	0	14	6	30	14	6	30
16.80	19	1	5	13	7	35	13	7	35
21.00	18	2	10	11	9	45	11	9	45

*Alimento sin enzima recombinante.

Otro aspecto para considerar es que no fue posible utilizar una mayor cantidad de enzima ya que, al ser un extracto crudo líquido, al mezclarla con el alimento lo diluía y dificultaba su administración. Además, la enzima debe pasar el tracto digestivo del escarabajo para poder realizar su acción, lo que puede dificultar su acción. El extracto de quitinasa recombinante tuvo efecto coleopterica sobre *A. tumida* en su estadio larvario promoviendo hasta 45 % de mortalidad al emplear 21.00 U/ml. El ensayo fue replicado con los escarabajos en su estadio

maduro, pero no se observó ningún efecto con las actividades enzimáticas evaluadas. Una explicación de este resultado puede ser el mecanismo de digestión de los escarabajos, ya que se menciona que algunos grupos depredadores realizan su digestión en el buche por medio de enzimas del intestino medio entre las que se incluyen proteasas, enzimas que podrían limitar la acción de las quitinasas⁽²¹⁾. Otros autores han mencionado que el tracto digestivo de los escarabajos cambia durante su metamorfosis en la etapa de empupado, para adecuarse a su etapa adulta, lo que podría condicionar la efectividad de la quitinasa recombinante al mezclarse con el alimento⁽²²⁾. Estos factores sumados a la baja concentración de enzima y a la imposibilidad de probar una concentración mayor de enzima por la dilución que promovía del alimento, pudieran ser responsables de la nula mortalidad mostrada en el estadio adulto.

Determinación de la CL₅₀ y CL₉₀

Los datos de mortalidad de larvas se emplearon para realizar el análisis Probit y calcular las unidades de actividad quitinolítica requeridas para promover la mortalidad del 50 (CL₅₀) (Figura 1) y 90 % (CL₉₀) (Figura 2) de la población, que fueron de 27.03 y 168.93 U/ml, respectivamente. El efecto coleopterocida mostrado por el extracto crudo de la quitinasa de *B. licheniformis* UV01 confirma su potencial uso como método alternativo de control de *A. tumida*.

Figura 1: CL₅₀ del extracto crudo de quitinasa recombinante sobre larvas de *A. tumida*

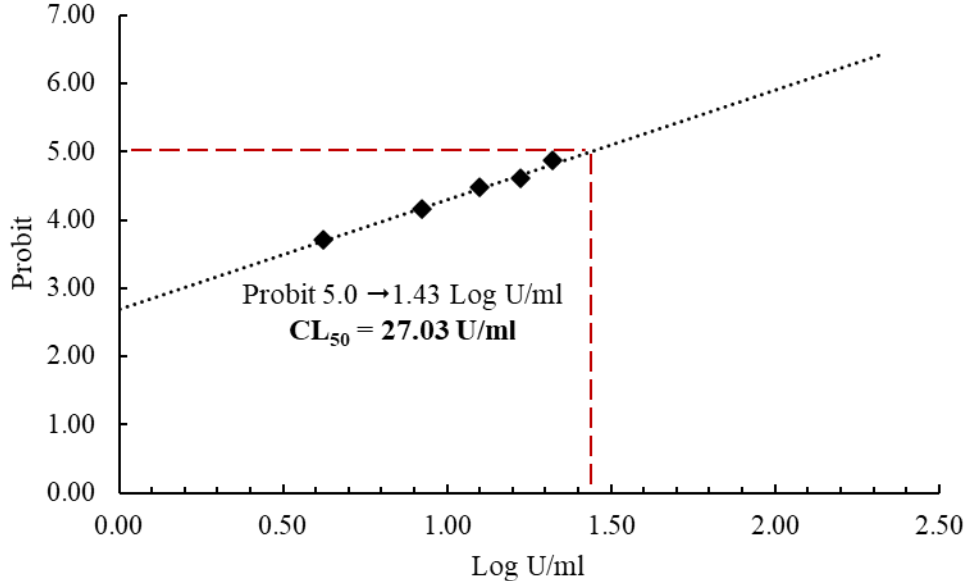
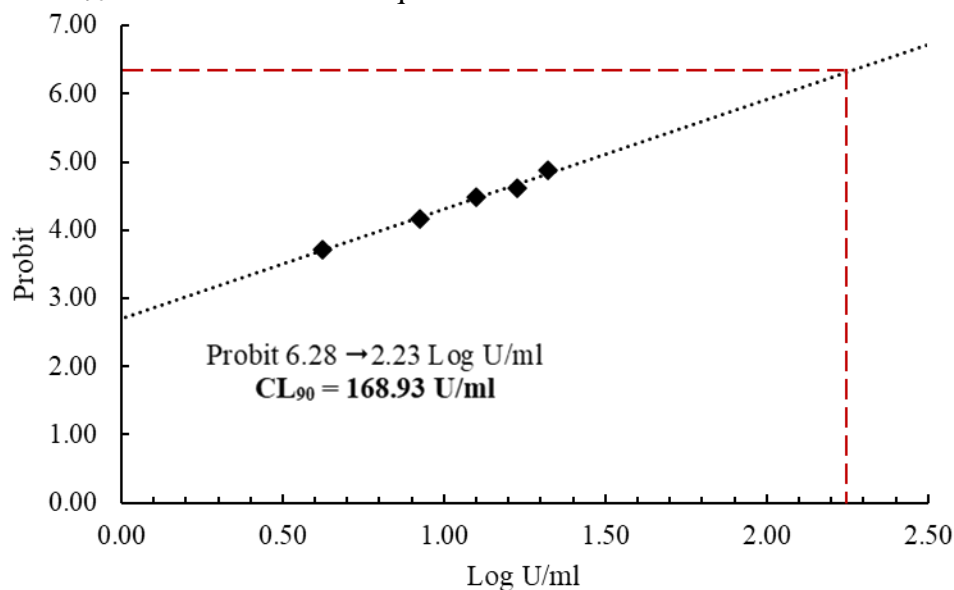


Figura 2: CL₉₀ del extracto crudo de quitinasa recombinante sobre larvas de *A. tumida*

Estos resultados son comparables con otros estudios^(23,24,25) en los que han empleado quitinasas recombinantes que han resultado en alternativas prometedoras en el control de plagas.

Discusión

Las quitinasas recombinantes obtenidas a partir de *B. licheniformis* han sido evaluadas en varios estudios con resultados prometedores en el control de especies que afectan al sector agropecuario. El extracto crudo con quitinasa de *B. licheniformis* USMW10IK se ha evaluado en especies como termitas *Globitermes sulphureus* indicando que posee propiedades bioinsecticidas con una letalidad del 23.81 % a las 48 h de exposición⁽²⁵⁾. Asimismo, se ha propuesto que las enzimas producidas por el género *Bacillus* son una alternativa efectiva de biocontrol contra fitopatógenos o plagas de insectos a través de la degradación de la pared celular o cutículas de insectos⁽²⁶⁾. La actividad quitinolítica del género *Bacillus* ha sido reportada contra diversas plagas que afectan las plantas y frutos con una efectividad superior al 60 %^(27,28). Esta característica sugiere que las quitinasas tienen la capacidad para ser empleadas como una herramienta sostenible en el manejo de plagas^(28,29).

En el presente trabajo se evaluó el uso de una quitinasa recombinante de *B. licheniformis* para el control *A. tumida*, obteniendo resultados destacados sobre el estado larvario, pero sin efecto en el estadio adulto. La nula efectividad de los extractos de quitinasa recombinante en el estadio adulto se debe probablemente al método de aplicación ya que, al combinarla con el

alimento, la enzima está expuesta a componentes que pudieran disminuir su actividad, sumado al mecanismo de alimentación de algunos escarabajos depredadores que pueden incluir enzimas proteolíticas, que afectaría la actividad de la quitinasa.

Contrario a los adultos, las quitinas promovieron la mortalidad de hasta el 45 % de larvas, esto puede deberse a que en este estadio *A. tumida* presenta diferencias notorias, ya que consume su alimento en forma líquida, secretando enzimas a su alimento antes de ingerirlo⁽²¹⁾, tiene una mayor tasa de alimentación debido a los requerimientos nutricionales y energéticos que necesita para realizar su metamorfosis final, y se ha mencionado que las quitinasas pueden promover alteraciones en las membranas peritrópicas de los intestinos de larvas que desencadenarían un efecto antialimentario y el aumento de la mortalidad⁽⁷⁾. Lo anterior se reflejó en los resultados de mortalidad de las larvas, la cual aumentó conforme aumentó las unidades de actividad de la enzima recombinante. Este resultado es notable, ya que se empleó un extracto crudo de la enzima que presentó 42 U/ml, lo que supondría que se puede mejorar su actividad quitinolítica mediante el uso de diferentes vectores de expresión o de células hospedadoras que aumenten la producción de la enzima, así como optimizando las condiciones de fermentación y los componentes del medio de cultivo⁽²⁹⁾.

Conclusiones e implicaciones

El potencial de los extractos crudos de quitinasa recombinante en el control de plagas del sector agropecuario es prometedor debido a su efecto insecticida. Además, su uso sustentable en el control de especies como *A. tumida* posiblemente disminuiría los daños provocados por los plaguicidas sintéticos como la contaminación del ambiente, las abejas y los productos derivados de la colmena; así como las afectaciones a la salud de los apicultores. No obstante, es fundamental continuar con los estudios para mejorar su actividad quitinolítica, evaluar métodos de aplicación que promuevan una mayor actividad coleopterocida, identificar la ventana de bioseguridad en la que no se afecte a la abeja y establecer estrategias para su aplicación en las colmenas mediante el uso combinado de trampas o dispositivos en los que solo puedan ingresar los escarabajos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada al primer autor.

Conflictos de interés

Ninguno de los autores presenta conflicto de interés.

Literatura citada:

1. Baena-Díaz F, Chévez E, De La Merced FR, Porter-Bolland L. *Apis mellifera* en México: producción de miel, flora melífera y aspectos de polinización. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu 2022;13(2):525-548. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i2.5960>.
2. Murray J. Description of a new species of *Cryptophagus*. Entomol Mon Mag 1867;4:212-213.
3. Neumann P, Ellis JD. The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. J Apic Res 2008;47(3):181-183. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101453>.
4. Neumann P, Pettis JS, Schäfer MO. Quo vadis *Aethina tumida*? Biology and control of small hive beetles. Apidologie 2016;47:427-466. <https://doi.org.ezproxy.uv.mx/10.1007/s13592-016-0426-x>.
5. Murcia-Morales M, Heinzen H, Parrilla-Vázquez P, Gómez-Ramos MM, Fernández-Alba AR. Presence and distribution of pesticides in apicultural products: A critical appraisal. Trac-Trend Anal Chem 2022;146:116506. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116506>.
6. Urbina SAD, Inca TAR, Carbonero AMP, Palomas JB. Preparación de quitina fúngica a partir de subproductos de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*). Pol Con 2020; 5(4):115-140. doi:10.23857/pc.v5i4.1369.
7. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol de enfermedades de las plantas: una perspectiva (Gram-) positiva. FEMS Microbiol Lett 1999;171(1):1-9.
8. Shoda M. Bacterial control of plant diseases. Am J Biosc Bioeng 2000;89(6):515-521. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80049-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80049-3).
9. Agarwal M, Dheeman S, Dubey RC, Kumar P, Maheshwari DK, Bajpai VK. Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. Microbiol Res 2017;205:40-47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.012>.
10. Laribi HH, Bouanane A, Drouiche N, Pauss A, Mameri N. Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* strain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. Int J Biol Macromol 2015;72:1117-1128.
11. Xiao L, Liu C, Xie C, Cai J, Liu D, Chen Y. Heterogeneous expression of chitinase gene from *Bacillus licheniformis* MY75 and the characterization of expressed ChiMY. Wei Sheng wu xue bao. Acta Microbiol Sin 2010;50(6):749-754.

12. Kwon JH, Won SJ, Moon JH, Lee U, Park YS, Maung CE, *et al.* *Bacillus licheniformis* PR2 controls fungal diseases and increases production of jujube fruit under field conditions. *Horticulturae* 2021;7(3):49. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030049>.
13. Clavijo A, Cotes AM. Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Rev Colomb Biotecnol* 1998;1(2):58-66.
14. Micocci, KC, Moreira AC, Sanchez AD, Pettinatti JL, Rocha MC, Dionizio BS, *et al.* Identification, cloning, and characterization of a novel chitinase from leaf-cutting ant *Atta sexdens*: An enzyme with antifungal and insecticidal activity. *BBA-General Subjects* 2023;1867(1):130249. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130249>.
15. Dikbaş N, Uçar S, Tozlu G, Ozer TO, Kotan R. Bacterial chitinase biochemical properties, immobilization on zinc oxide (ZnO) nanoparticle and its effect on *Sitophilus zeamais* as a potential insecticide. *World J Microbiol Biotechnol* 2021;37:173. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03138-8>.
16. Chung C, Suzanne L, Niemela S, Miller R. One – step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS* 1989;86:2172–2175. doi:10.1101/pdb.prot101212.
17. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*; 1987;59:257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>.
18. Tucuch HJI, Rangel FMA, Casanova LF, Ruíz SE, Utrera QF, Tucuch H CJ. Control alternativo de *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae) con polvos vegetales. *Acta Agric Pecu* 2020;6:1. <https://doi.org/10.30973/aap/>.
19. González GR, Otero CG, Villanueva JJA, Pérez JA, Soto HRM. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (acari: varroidae). *Agrociencia* 2006;40(6):741-751. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30240606>.
20. Chiang MR, Shelomi M. Anatomical changes of the beetle digestive tract during metamorphosis correspond to dietary changes. *J Morphol* 2023;284: e21575. <https://doi.org/10.1002/jmor.21575>.
21. Rivera-Berrío JG, Rivera-García JE. Escarabajos: coleópteros. 1st ed. Córdoba, España: Fondo Editorial RED Descartes; 2023.

22. Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME, Panbangred W. Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65(2):183-192. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1606-6>.
23. Poria V, Rana A, Kumari A, Grewal J, Pranaw K, Singh S. Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology* 2021;10(12):1319. <https://doi.org/10.3390/biology10121319>.
24. Hussin NA, Ab Majid AH. Termiticidal activity of chitinase enzyme of *Bacillus licheniformis*, a symbiont isolated from the gut of *Globitermes sulphureus* worker. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020;24:101548. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101548>.
25. Ajuna HB, Lim HI, Moon JH, Won SJ, Choub V, Choi SI, *et al.* The prospect of hydrolytic enzymes from *Bacillus* species in the biological control of pests and diseases in forest and fruit tree production. *Int J Mol Sci* 2023;24(23):16889. <https://doi.org/10.3390/ijms242316889>.
26. Nabti EH, Mokrane N, Ghoul M, Manyani H, Dary M, Megias MG. Isolation and characterization of two halophilic *Bacillus* (*B. licheniformis* and *Bacillus sp*) with antifungal activity. *J Ecol Health Env* 2013;1(1):13-17. <http://dx.doi.org/10.12785/jehe/010102>.
27. Ibarra J, Del Rincón MC, Galindo E, Patiño M, Serrano L, García R, *et al.* Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev Latinoam Microbiol* 2006;48(2):113-120.
28. Abulikemu S, Yesilyurt A, Gencer D, Usta M, Nalcacioglu R. Comparison of the potential activities of viral and bacterial chitinases. *Egypt J Biol Pest Control* 2021;31(1):91. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00435-0>.
29. Qi Z, Lei B, Xiong M, Li W, Liao Y, Cai D, *et al.* High-level production of chitinase by multi-strategy combination optimization in *Bacillus licheniformis*. *World J Microbiol Biotechnol* 2024;40:181. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03995-z>.