

## Fermentación sólida de *Metarhizium robertsii*: sustrato y condiciones de cultivo en la producción de conidios y la eficacia biológica

Lilian Stephanie Angeles-Vega<sup>1</sup>

Héctor Gabriel Ramos-Jaimes<sup>1</sup>

Josefa Espitia-López<sup>2</sup>

Paul Misael Garza-López<sup>2</sup>

Alejandro Angel-Cuapio<sup>1,§</sup>

1 División de Ingeniería Química y Bioquímica-Tecnológico Nacional de México. Av. Tecnológico s/n, Valle de Anáhuac, sección Fuentes, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México. CP. 55210. (201911376@tese.edu.mx; HGRJ202011225@tese.edu.mx).

2 Instituto de Ciencias Agropecuarias-Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Rancho Universitario, Av. Universidad km 1, Ex-Hacienda de Aquetzalpa, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. CP. 43600. Tel. 55 82334715. (josefa-espitia11153@uaeh.edu.mx; paul-garza@uaeh.edu.mx).

Autor para correspondencia: rafaelangel@tese.edu.mx.

### Resumen

La implementación de conidios de hongos entomopatógenos representa una alternativa con ventajas en comparación con los insecticidas químicos. Su producción puede llevarse a cabo en sustratos económicos. Se examinaron las condiciones de cultivo, que incluyen sustratos, temperatura, humedad y tasa de aireación, para la producción de conidios de Mr Xoch8.1 en cultivo sólido, la investigación se realizó en Ecatepec de Morelos, Estado de México, en 2022. Se llevó a cabo un análisis de la calidad de los conidios a nivel de laboratorio, considerando la germinación, viabilidad e infectividad. Se realizó un perfil de conidiación durante 11 días de cultivo de la cepa Mr Xoch8.1 en fermentación sólida. La mayor producción de conidios se observó a los ocho días. Se evaluó la producción en diferentes sustratos, destacando la producción con arroz blanco. La temperatura de incubación a 28 °C resultó la más adecuada. La ausencia de aireación forzada generó la mayor producción. La humedad inicial del 60% condujo a una producción alta de conidios. La germinación y viabilidad de los conidios fueron del 93% y 57%, respectivamente. En términos de infectividad, se logró una mortalidad del 60% en gusano de la harina. La producción de conidios de Mr Xoch8.1 en fermentación sólida es una alternativa sustentable, mediante el uso de sustratos económicos y condiciones controladas, como una temperatura de 28 °C, humedad del 60% y ausencia de aireación forzada. Estas condiciones permiten una alta producción de conidios con buena germinación, viabilidad e infectividad, demostrando su potencial como agente de control biológico.

### Palabras clave:

*Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, Tenebrio molitor, conidios, control biológico, infectividad.



License (open-access): Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia **Creative Commons**

## Introducción

El incremento sostenido en la demanda alimentaria, impulsado por el crecimiento poblacional, ha motivado la exploración de nuevas estrategias para optimizar la producción agrícola. Una medida clave en este contexto es la reducción de las pérdidas en los cultivos, las cuales son atribuibles a la acción de organismos fitopatógenos, tales como insectos, nematodos y hongos perjudiciales para las plantas. Entre las estrategias más ampliamente adoptadas, el uso de agroquímicos ha demostrado ser fundamental para mitigar el impacto económico de estas plagas, al desempeñar un rol decisivo en la preservación y aumento del rendimiento agrícola.

A pesar de los beneficios de ciertos agroquímicos, su toxicidad, su persistencia ambiental y su incorrecta aplicación ha generado la necesidad de reconsiderar las estrategias de control de plagas (Guédez *et al.*, 2008). Además, los plaguicidas también son potencialmente tóxicos para los seres humanos, pueden provocar cáncer, daños en el cerebro, provocar cambios en el feto. El uso excesivo de plaguicidas en las zonas agrícolas del país se relaciona con efectos negativos en ecosistemas terrestres y costeros (García-Hernández *et al.*, 2018).

Para reducir los efectos anteriores, se formulan agentes de control biológico, que consisten en organismos vivos cuyo propósito es disminuir la población de insectos plaga y patógenos que impactan negativamente en los cultivos. El uso de hongos entomopatógenos, bacterias, virus y nemátodos como agentes de control biológico ofrece una alternativa prometedora. Estos organismos pueden regular las poblaciones de insectos plaga y patógenos de manera eficaz sin los riesgos asociados con los agroquímicos convencionales.

Además, su capacidad para controlar las plagas de manera específica reduce el impacto negativo en otros organismos no objetivo y en el medio ambiente en general (Sharma *et al.*, 2023). Las empresas y los organismos de investigación están particularmente interesados en los hongos debido a su capacidad para desempeñar un papel en el control de plagas y enfermedades en los cultivos, sin causar daños al medio ambiente ni a la salud (Nava-Pérez *et al.*, 2012). La optimización de las condiciones de cultivo para la producción masiva de células infectivas de organismos utilizados en el control biológico es esencial para su viabilidad comercial. Comprender los factores que afectan el crecimiento y la reproducción de estos organismos, como hongos entomopatógenos, es fundamental para maximizar la eficacia de los productos bioinsecticidas (Jackson *et al.*, 2010). Identificar y ajustar las condiciones óptimas de cultivo es crucial. Esto incluye factores como temperatura, humedad, pH del medio de cultivo y la composición de nutrientes. La variabilidad en estas condiciones puede afectar significativamente la tasa de crecimiento y reproducción (Xing *et al.*, 2023).

La disponibilidad de nutrientes, como carbohidratos y proteínas, es esencial para el crecimiento microbiano. Comprender cómo el organismo utiliza y aprovecha estas fuentes de nutrientes puede ayudar a diseñar medios de cultivo más eficientes (Jaronski, 2023). Evaluar la velocidad de crecimiento del organismo a diferentes temperaturas y en diversos sustratos proporciona información valiosa sobre su versatilidad y adaptabilidad. Esto permite seleccionar cepas que funcionen bien en una variedad de condiciones. Comprender el metabolismo del organismo es crucial.

La velocidad a la cual un organismo se reproduce y se multiplica es un factor clave (Parveen y Jeyarani, 2023). Los hongos con tasas de crecimiento más rápidas pueden tener ventajas competitivas en la producción a gran escala y en la aplicación en el campo (Quesada-Moraga *et al.*, 2023). El objetivo de esta investigación fue evaluar las condiciones de cultivo (sustratos, temperatura, humedad y tasa de aireación) en la producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en cultivo sólido, así como analizar la calidad de las células infectivas (germinación, viabilidad e infectividad) a nivel laboratorio.

## Materiales y métodos

### Microrganismo, propagación y conservación

El estudio se realizó con la cepa Mr Xoch8.1 (*Metarhizium robertsii*) obtenida de la colección de hongos del laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de Hongos Filamentosos de la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa, México). La cepa fue propagada por estría en medio agar Avena (Tlecuil-Beristain *et al.*, 2010), cuya composición fue la siguiente ( $\text{g L}^{-1}$ ): 33.33 avena (uno), 10 peptona de carne (Bioxon, México) y 15 agar bacteriológico (Bioxon, México), se utilizaron cajas Petri de 100 x 15 mm con 20 ml de medio de cultivo en cada caja, las condiciones de esterilización fueron 121 °C, 15 psi durante 20 min.

La cepa fue incubada a 28 °C durante 10 días, posteriormente, se realizó la conservación de la cepa cuya técnica consistió en cortar fragmentos de agar esporulado de aproximadamente  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  los cuales se colocaron en tubos de 15 ml que contenían 5 ml de agua desionizada previamente esterilizada, finalmente los tubos se conservaron a 4 °C (López-Lastra *et al.*, 2022).

### Perfil de conidiación

Como unidades experimentales se utilizaron reactores de columna de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de altura, se utilizaron 10 g de sustrato seco inicial en cada reactor. El sustrato utilizado fue arroz precocido, con un contenido de humedad de 1.96% antes de la esterilización (Méndez-González *et al.*, 2018), se esterilizó a 121 °C, 15 psi durante 20 min, posteriormente, el sustrato se inoculó con una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , se ajustó la humedad inicial al 40% mediante la adición de agua destilada estéril y todas las unidades experimentales se incubaron en un baño de agua a 28 °C durante 11 días (Angel-Cuapio *et al.*, 2015).

Se realizó el conteo de conidios cada 24 h a partir de una columna, la cual se consideró como una unidad experimental independiente. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado en diferentes fechas, se realizó la extracción de los conidios utilizando toda la materia sólida contenida (10 g) en cada columna, los conidios se cosecharon adicionando 60 mL de una solución de Tween 80 (0.05%) (Amresco, Ohio, USA), se agitó durante 10 min con un agitador magnético a 350 rpm.

Después de agitar la muestra, se filtró con una gasa estéril de 10 x 10 cm para separar las partículas de arroz (Angel-Cuapio y Loera, 2016), a partir del día 3 hasta el día 11 se contaron los conidios en cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany) en un microscopio (Velab VE-M5LCD) y un objetivo 40X. La producción de conidios se reportó como conidios por gramo de sustrato seco inicial (conidios  $\text{gssi}^{-1}$ ).

### Efecto del sustrato, temperatura, humedad y la tasa de aireación sobre la producción de conidios

Para evaluar el efecto del sustrato, humedad, temperatura y la tasa de aireación sobre la producción de conidios, se prepararon reactores de columna con arroz, las condiciones de esterilización, inoculación, incubación, extracción y conteo de conidios se realizaron como se describió previamente, todos los cultivos fueron realizados durante 8 días de cultivo (día de mayor producción de conidios).

Para evaluar el efecto del sustrato se utilizaron los siguientes: arroz precocido (verde valle), frijol peruano (verde valle), arroz blanco (verde valle), lenteja (la merced), maíz palomero (la Merced), mijo (Los arbolitos, Sinaloa, México) y salvado de trigo (Los arbolitos, Sinaloa, México). Para determinar el efecto de la humedad inicial del sustrato en la producción de conidios se evaluaron contenidos de humedad de 20 a 70%.

Para evaluar los efectos de la temperatura durante el cultivo se evaluaron temperaturas de incubación de 24 a 32 °C. Finalmente, se evaluó efecto de la tasa de aireación en la producción de conidios; para ello, se evaluaron flujos de aire húmedo de 0 a 50  $\text{mL aire min}^{-1}$  (Méndez-González *et al.*, 2022).

## Germinación y viabilidad

Para calcular el porcentaje de germinación se utilizaron conidios obtenidos a ocho días de cultivo. Se prepararon cajas Petri con medio agar dextrosa Sabouraud, ADS (Bioxon, México), se estandarizaron suspensiones de conidios a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , en las cajas Petri se inocularon 50  $\mu\text{l}$  de esta suspensión y con una varilla de vidrio se distribuyó, las cajas se incubaron a 28°C durante 12 h. Se realizó el conteo de conidios considerando los germinados y los no germinados, la observación se efectuó en un microscopio (VELAB VE-M5LCD) con objetivo 40X.

Se consideró un conidio germinado aquel que presentó la longitud del tubo germinativo de dos veces el diámetro del conidio (Ibrahim *et al.*, 2002). Se realizó la prueba por triplicado. Para determinar la viabilidad de los conidios se cosecharon a ocho días de cultivo, se estandarizaron suspensiones de conidios ( $1 \times 10^4$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ ) y se adicionaron 30  $\mu\text{l}$  (300 conidios) en cajas Petri con medio ADS, se incubaron a 28 °C y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 h de cultivo (Alcantara-Vargas *et al.*, 2020). Se realizó la prueba por triplicado.

## Pruebas de infectividad

Para las pruebas de infectividad se emplearon larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) como insecto modelo, los conidios producidos en cada reactor de columna se evaluaron de la siguiente manera: se colocaron 10 larvas de *T. molitor* en cada caja, ocho cajas Petri fueron utilizadas por tratamiento (cinco cajas para larvas infectadas y tres cajas como testigo negativo), la infección se realizó por inmersión de las larvas durante 10 s en suspensiones estandarizadas a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , las cuales se prepararon en tubos con capacidad de 50 ml.

Para los controles negativos, las larvas se sumergieron durante 10 s en una solución estéril de Tween 80 (0.05%). Para estimar los parámetros de infectividad, se utilizó la ecuación exponencial de decaimiento (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009):

$$Y = (100 - S_f) e^{-k(t-t_0)} + S_f \quad \text{para } t > t_0$$

Donde: Y es el porcentaje de sobrevivencia (%) al tiempo t, k es la tasa específica de muerte ( $\text{d}^{-1}$ ),  $t_0$  es el tiempo en que apareció la primera larva muerta (d) y  $S_f$  es la sobrevivencia estimada asintótica (%).

## Análisis estadístico

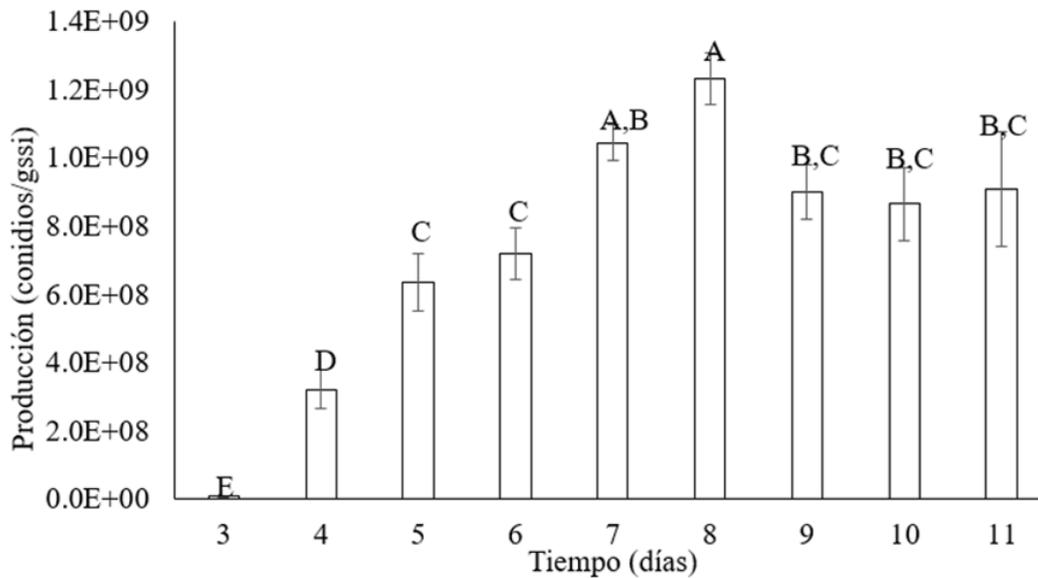
Se utilizó un análisis de varianza de una vía (Anova) con la prueba de Tukey (95% nivel de confianza), se compararon los valores promedio de los datos experimentales mediante el software IBM SPSS Statistics 21 (SPSS, Chicago, IL).

## Resultados y discusión

### Perfil de conidiación

La producción de conidios en función del tiempo es mayor a los ocho días del cultivo con un valor de  $1.3 \times 10^9$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$  y permanece constante ( $8.91 \times 10^8$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$ ) de los días 9 a 11 de incubación (Figura 1). Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron a este tiempo de incubación.

Figura 1. Perfil de conidiación de *Metarhizium robertsii* en cultivo sólido. Letras diferentes difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.

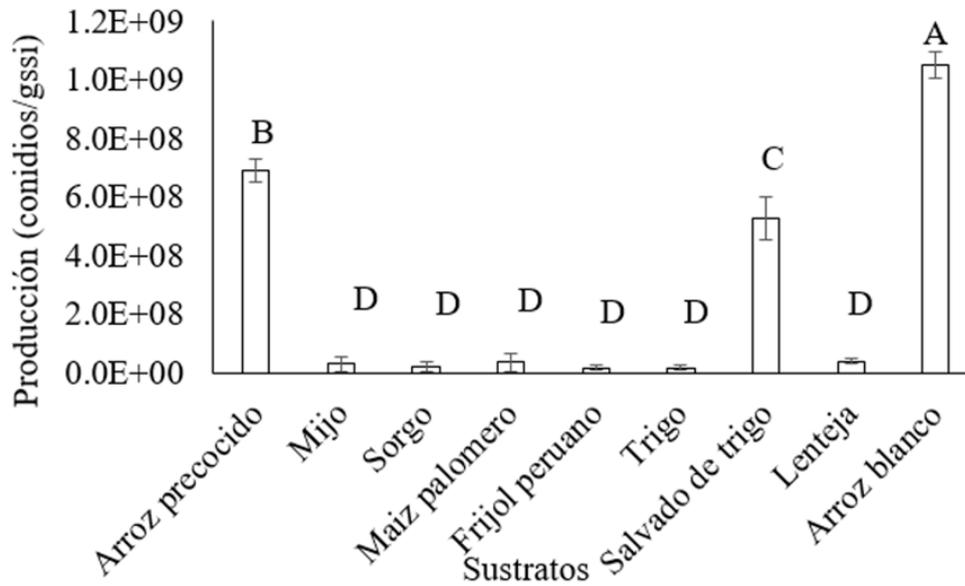


### Efecto del sustrato, temperatura, humedad y la tasa de aireación sobre la producción de conidios

Se evaluaron nueve sustratos sólidos para la producción de conidios de *Metarhizium robertsii* (Figura 2), al utilizar arroz blanco se alcanzó el valor más alto de producción ( $1.05 \times 10^9$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$ ), el valor obtenido fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) en comparación a los resultados encontrados en otros sustratos evaluados (mijo, sorgo, maíz palomero, trigo y lenteja). Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron a ocho días de incubación utilizando arroz blanco.



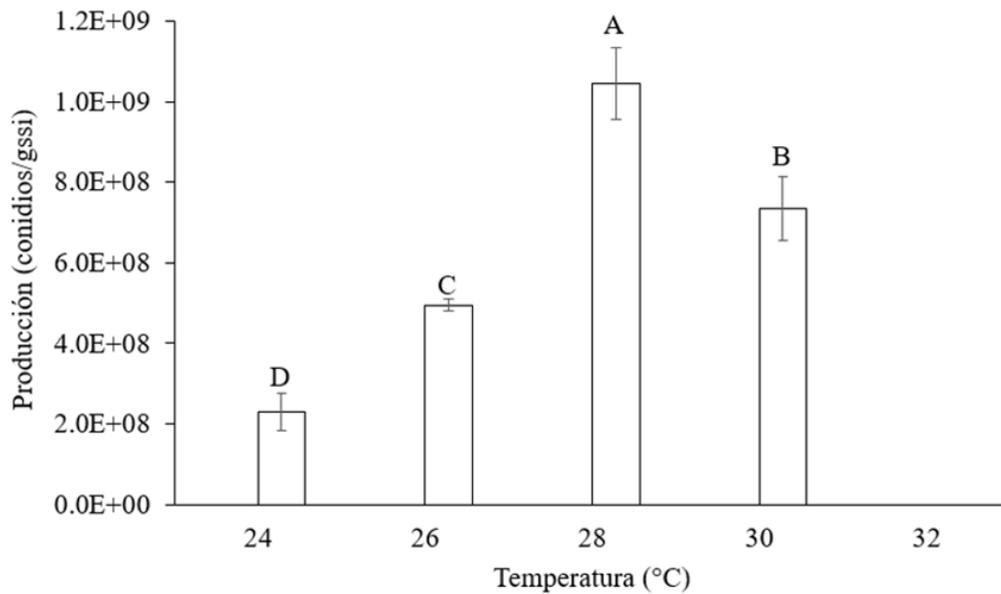
Figura 2. Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en diferentes sustratos sólidos. Letras diferentes difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.



Posteriormente, la temperatura de incubación fue analizada y se encontró que a 28 °C se alcanzó la mayor producción de conidios, mostrándose una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las temperaturas analizadas con una producción de  $1.04 \times 10^9$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$ , de manera contrastante no se observó producción de conidios a 32 °C (Figura 3). Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron a 8 días de incubación utilizando arroz blanco con una temperatura de incubación de 28 °C.



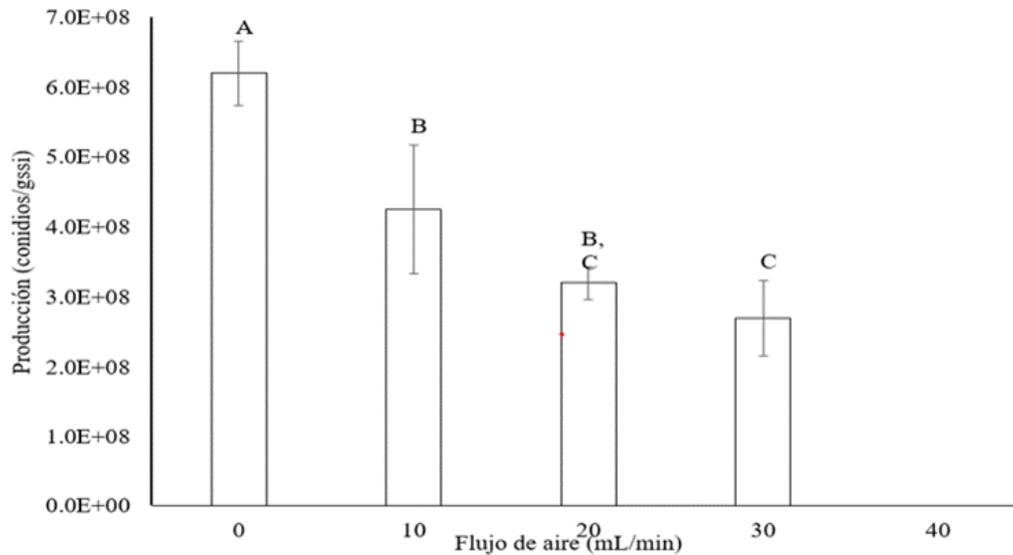
Figura 3. Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* a diferentes temperaturas de cultivo. Letras diferentes difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.



Debido a que *M. robertsii* es un microorganismo aerobio, se evaluó la incorporación de aire húmedo a diferentes tasas de aireación sobre la producción de conidios (Figura 4). Al aumentar la tasa de aireación disminuye la producción de conidios. La mayor producción se obtuvo con  $0 \text{ ml min}^{-1}$  ( $6 \times 10^8$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$ ) siendo estadísticamente diferente entre los demás flujos de aire evaluados ( $p \leq 0.05$ ). Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron a ocho días de incubación utilizando arroz blanco con una temperatura de incubación de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  y sin flujo de aire.



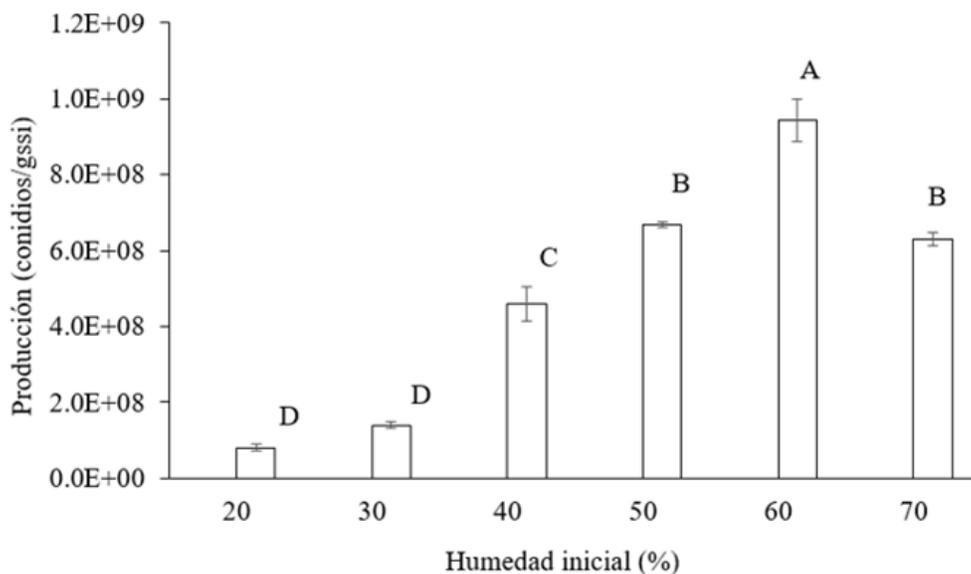
Figura 4. Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* a diferentes tasas de aireación. Letras diferentes difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.



Se evaluaron diferentes porcentajes de humedad inicial en el cultivo (Figura 5), se encontró que al incrementar la humedad la producción de conidios aumenta; sin embargo, existe un valor de humedad en el cual la producción de conidios es mayor, en ese sentido, se observó una producción de  $9.44 \times 10^8$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$  con una humedad del 60% siendo estadísticamente diferente este resultado ( $p \# 0.05$ ) entre los demás tratamientos.



Figura 5. Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* a diferentes porcentajes de humedad inicial. Letras diferentes difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.

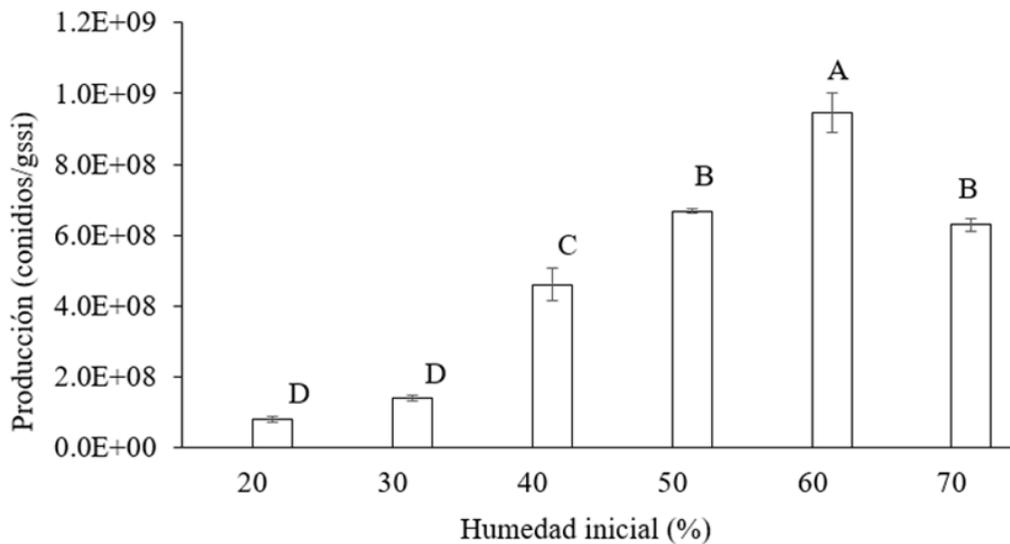


### Germinación y viabilidad

Con el propósito de medir la calidad de los conidios obtenidos a ocho días de incubación utilizando arroz blanco con una temperatura de incubación de 28 °C, sin aireación forzada y una humedad inicial del 60%, se determinó la germinación, viabilidad (Figura 6) e infectividad. Sobre la germinación se encontró un valor del 93%, por otra parte, en la viabilidad se alcanzó un valor del 57%.



Figura 6. Viabilidad y germinación de los conidios producidos por el hongo *Metarhizium robertsii*



### Pruebas de infectividad

Con respecto a los parámetros de infectividad, se encontró un tiempo de retardo ( $t_0$ ) de 3.5 d, con una tasa de mortalidad ( $k$ ) de  $0.17 \text{ d}^{-1}$ , un tiempo letal 50 ( $TL_{50}$ ) de 15 d y una sobrevivencia final ( $S$ ) del 40%.

Se han reportado diferentes valores de producción de conidios para el hongo entomopatógeno *Metarhizium*, tales valores apuntan a que los rendimientos alcanzados dependen de las condiciones del cultivo (pH, humedad, temperatura, aireación, sustrato, tipo de reactor, etc.) (Castillo-Castillo *et al.*, 2022).

En ese sentido, uno de los sustratos más económicos y utilizados en fermentación sólida con un alto porcentaje de almidón (80%) es el arroz (Latifian *et al.*, 2013). Angel Cuapio y Loera (2016) reportan una producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX de  $5 \times 10^8$  conidios  $\text{gssi}^{-1}$  a los seis días de cultivo usando como sustrato una mezcla de arroz precocido con viruta de madera.

Por otro lado, García-Cruz *et al.* (2019) reportaron una producción de conidios de  $8.9 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  arroz con la cepa Ma-005 de *M. anisopliae* a 14 días de incubación. Por su parte, Méndez-González *et al.* (2018) analizaron la producción de conidios de *M. anisopliae* en biorreactores de bolsa, obtuvieron una producción de  $7 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  arroz a los 11 días de cultivo. Mientras tanto, da Cunha *et al.* (2019) estudiaron la producción de conidios de *M. anisopliae* en biorreactores de charolas, se observó una producción de  $2.8 \times 10^9$  conidios  $\text{g}^{-1}$  arroz durante 10 d de cultivo.

Por otro lado, Prakash *et al.* (2008) realizaron una investigación para optimizar la producción de conidios de *M. anisopliae* en bolsas de polipropileno, se encontró un rendimiento de  $6.2 \times 10^{10}$  conidios  $\text{g}^{-1}$  arroz a los 15 días de incubación. La temperatura es el factor clave que limita el uso efectivo de *Metarhizium*, Vishwanath *et al.* (2021) reportaron que *Metarhizium anisopliae* presenta una mejor conidiación a una temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a los siete días de incubación, lo cual resulta concordante con lo encontrado en la presente investigación; asimismo, se ha comprobado que el género *Metarhizium* es considerado un microorganismo mesófilo que puede crecer en un rango de temperatura entre  $15$  y  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; sin embargo, el crecimiento óptimo se encuentra entre  $25$  y  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Zimmermann, 2007).

En cuanto al suministro de aire se encontró que con tasas de aireación altas la conidiación de *M. robertsii* se vio afectada negativamente, lo cual es concordante con lo reportado por Arzumanov *et al.* (2005), con la cepa de *Metarhizium anisopliae* IMI330189 encontraron la mayor producción de conidios sin flujo de aire, mencionan que el aire forzado no es crucial para la conidiación.

Por otro lado, los hongos entomopatógenos son microorganismos aerobios que requieren un suministro de aire para el crecimiento y conidiación (Muñiz-Paredes y Loera, 2006), de acuerdo con Méndez-González *et al.* (2022) mencionan que el suministro de aireación por convección forzada ( $0.33 \text{ L kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) en biorreactores de columna presentaron altos niveles de producción y productividad de conidios de *M. robertsii* sin afectar la calidad de las células obtenidas, también sugieren que la aireación entre  $0.1$  y  $0.66 \text{ L kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  es suficiente para eliminar eficazmente el  $\text{CO}_2$  producido por el microorganismo ya que la acumulación de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera gaseosa de los biorreactores afecta la conidiación.

La germinación y viabilidad de conidios (esporas asexuales) de hongos entomopatógenos son aspectos cruciales para el éxito de estos organismos como agentes de control biológico de insectos, siendo una alternativa respetuosa con el medio ambiente a los pesticidas químicos (Shahid *et al.*, 2012). La germinación de conidios está influenciada por factores ambientales como la temperatura, la humedad y la luz, aunque cada especie de hongo entomopatógeno puede tener requisitos específicos para germinar de manera eficiente; sin embargo, es esencial para comprender y optimizar las aplicaciones en el campo (Benítez *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se encontró una germinación del 93% y una viabilidad del 40%, estos valores son concordantes con lo reportado por otros autores, tal como lo menciona Ruiz-Sánchez *et al.* (2011) encontraron con la cepa *M. anisopliae* una germinación del 100% a las seis horas de incubación con una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , considerando como conidio germinado aquel que tuviera longitud del tubo germinativo igual que el tamaño del conidio; por otro lado, Alcantara-Vargas *et al.* (2020) encontraron una viabilidad del 50% para los conidios producidos en arroz de la cepa *M. anisopliae*.

Los parámetros de germinación y viabilidad de hongos entomopatógenos cumplen con los estándares establecidos para la formulación de micoinsecticidas (Jenkins y Grzywacz, 2000), estos estándares son parámetros específicos que indican la idoneidad de las cepas para la producción de bioplaguicidas. Los conidios de hongos entomopatógenos suelen ser la forma infectiva para los insectos, de ahí la importancia de producirlos en grandes cantidades y de evaluar la calidad de los mismos; sin embargo, existen diferentes factores que influyen en la efectividad como los mecanismos de infección que consideran la penetración cuticular, la producción de enzimas y toxinas (Jiubari *et al.*, 2023)

También es importante la especificidad del hospedador que implica cómo los conidios se adhieren, germinan y penetran en el insecto, así como los mecanismos que el insecto puede desencadenar en respuesta a la infección (Wang *et al.*, 2023). Otro rasgo de mencionar tiene que ver con los factores ambientales ya que la infectividad puede depender de factores ambientales, como la temperatura, la humedad y la disponibilidad de nutrientes (Xing *et al.*, 2023).

## Conclusiones

Se identificaron las mejores condiciones de cultivo para la producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en fermentación sólida. La naturaleza del sustrato es muy importante para la producción de conidios. El arroz blanco condujo a la mayor producción. De las variables evaluadas, la temperatura de incubación y la aireación fueron las que tuvieron mayor impacto en la producción de conidios.

Bajo las condiciones de producción, los conidios de Mr Xoch8.1 presentaron una alta calidad, con tasas de germinación, viabilidad e infectividad suficiente para causar un 60% de mortalidad en larvas de gusano de la harina, lo que demostró su eficacia biológica como agente de control. La sugerencia de evaluar la posibilidad de aplicación simultánea con otros hongos es interesante ya que las sinergias entre diferentes cepas fúngicas podrían mejorar la eficacia del control biológico y expandir el rango de especies objetivo. Además, si esto se puede lograr sin costos adicionales significativos, podría ser una estrategia viable.

El bajo costo de producción es un factor clave que puede hacer que la aplicación de *Metarhizium robertsii* sea económicamente viable. Esto es esencial para considerar su aplicación a gran escala en la agricultura. La propuesta de continuar la investigación en este campo es crucial. Ampliar el conocimiento sobre la producción masiva de *Metarhizium robertsii* podría llevar a mejoras en la eficacia, estabilidad y aplicabilidad del hongo en diferentes contextos agrícolas.

## Agradecimientos

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por el apoyo de estancia de investigación de la primera autora LSAV (Folio: ESYCA2023-139097), al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para estudios de maestría del segundo autor HGRJ (CVU 765598), al PRODEP por el apoyo para Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2021 (ITSECA-CA-18) y a la empresa AAC BIOLAB por el financiamiento parcial de esta investigación.

## Bibliografía

- 1 Alcantara-Vargas, E.; Espitia-López, J.; Garza-López, P. M. and Angel-Cuapio, A. 2020. Conidia production and quality of entomopathogenic strains of the genus *Metarhizium anisopliae*, isolated in agricultural zones of the State of Mexico. México. Revista Mexicana de Biodiversidad. (91):1-11. 10.22201/ib.20078706e.2020.91.2912.
- 2 Angel-Cuapio, A. and Loera, O. 2016. Uso de residuos agroindustriales como texturizantes para la producción de hongos entomopatógenos en cultivo en estado sólido. México. Mexican Journal of Biotechnology. 1(1):21-33.
- 3 Angel-Cuapio, A.; Figueroa-Montero, A.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G.; Perraud-Gaime, I. and Loera, O. 2015. Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: effect on conidial yields and quality. México. Applied Biochemistry and Biotechnology. (177):446-457. 10.1007/s12010-015-1754-4.
- 4 Arzumanov, T.; Jenkins, N. and Roussos, S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Reino Unido. Process Biochem. 40(3-4):1037-1042. 10.1016/j.procbio.2004.03.013.
- 5 Benítez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C. and Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. España. International Microbiology. 7(4):249-260.
- 6 Castillo-Castillo, H.; Rojas-Gutiérrez, L.; Espitia-López, J.; Garza-López, P.; Martínez-de Jesús, G.; Neria-González, I. and Angel-Cuapio, A. 2022. Texturizers increase the conidia production of *Metarhizium anisopliae*. México. Mexican Journal of Technology and Engineering. 2(1):22-29. <https://doi.org/10.61767/mjte.001.2.2229>.
- 7 Da Cunha, L. P.; Casciadori, F. P.; Cenço, L. I. and Thoméo, J. C. 2019. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. Brasil. Bioprocess and Biosystems Engineering. 11(42):1757-1768. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02172-z>.
- 8 García-Cruz, I.; del Pozo-Núñez, E. M. and Hernández-Pérez, Y. 2019. Producción y conservación de conidios del aislado Ma-005 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Cuba. Centro Agrícola. 1(46):5-12.
- 9 García-Hernández, J.; Leyva-Morales, J. B.; Martínez-Rodríguez, I. E.; Hernández-Ochoa, M. I.; Aldana-Madrid, M. L.; Rojas-García, A. E.; Betancourt-Lozano, M.; Perez-Herrera, N. E. and Perera-Rios, J. H. 2018. Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 34(1):29-60. 10.20937/RICA.2018.34.esp01.03.

- 10 Guédez, C.; Castillo, C.; Cañizales, L. and Olivar, R. 2008. Biological control is a tool for sustaining and sustainable development. Venezuela. *Academia*. 7 (13):50-74.
- 11 Ibrahim, L.; Butt, T. M. and Jenkinson, P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Reino Unido. *Mycological Research*. 106(6):705-715. [10.1017/S0953756202006044](https://doi.org/10.1017/S0953756202006044).
- 12 Jackson, M. A.; Dunlap, C. A. and Jaronski, S. T. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*. 55(1):129-145. [10.1007/s10526-009-9240-y](https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y).
- 13 Jaronski, S. T. 2023. Mass production of entomopathogenic fungi-state of the art. *In: mass production of beneficial organisms: invertebrates and Entomopathogens*. Morales, J. A., Ed. 2<sup>nd</sup>. Academic Press. USA. 317-357 pp. [10.1016/B978-0-12-822106-8.00017-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822106-8.00017-8).
- 14 Jenkins, N. E. and Grzywacz, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. Brazil. *Biocontrol Science and Technology*. 6(10):753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>.
- 15 Latifian, M.; Rad, B.; Amani, M. and Rahkhodaei, E. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid-solid diphasic method for date palm pest control. Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5 (19):2337-2341. <https://doi.org/10.5897/AJB07.778>.
- 16 López-Lastra, C. C.; Hajek, A. E. and Humber, R. A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canada. *Canadian Journal of Botany*. 80 (10):1126-1130. <https://doi.org/10.1139/b02-090>.
- 17 Méndez-González, F.; Figueroa-Montero, A.; Loera, O.; Saucedo-Castañeda, G. and Favela-Torres, E. 2022. Addition of spherical-style packing improves the production of conidia by *Metarhizium robertsii* in packed column bioreactors. Reino Unido. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 97 (6):1517-1525. [10.1002/jctb.6993](https://doi.org/10.1002/jctb.6993).
- 18 Méndez-González, F.; Loera, O. and Favela-Torres, E. 2018. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. Brazil. *Current Biotechnology*. 7 (1):65-69. [10.2174/2211550105666160926123350](https://doi.org/10.2174/2211550105666160926123350).
- 19 Muñiz, F. R. and Loera, O. 2006. The importance of strong inoculum in fungal cultures. México. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1):120-134.
- 20 Nava-Pérez, E.; García-Gutiérrez, C.; Camacho-Báez, J. R. and Vázquez-Montoya, E. L. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*. 8(3):17-29. [10.35197/rx.08.03.e2.2012.03.en](https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.03.en).
- 21 Parveen, S. S. and Jeyarani, S. 2023. Laboratory evaluation of temperature effects on germination, radial growth and sporulation of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to red spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. India. *Indian Journal of Agricultural Research*. 57 (3):376-382. [10.1002/ps.622](https://doi.org/10.1002/ps.622).
- 22 Prakash, G. B.; Padmaja, V. and Kiran, R. S. 2008. Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. India. *Bioresource Technology*. 99(6):1530-1537. [10.1016/j.biortech.2007.04.031](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.031).
- 23 Quesada-Moraga, E.; González-Mas, N.; Yousef-Yousef, M.; Garrido-Jurado, I. and Fernández-Bravo, M. 2023. Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. España. *Journal of Pest Science*. 97(1):1-15. [10.1007/s10340-023-01622-8](https://doi.org/10.1007/s10340-023-01622-8).
- 24 Rodríguez-Gómez, D.; Loera, O.; Saucedo-Castañeda, G. and Viniegra-González, G. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae

- and adults of *Tenebrio molitor*. México. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25:513-518. 10.1007/s11274-008-9917-x.
- 25 Ruiz-Sánchez, E.; Chan-Cupul, W.; Pérez Gutiérrez, A.; Cristóbal-Alejo, J.; Uch-Vazquez, B.; Tun-Suárez, J. M. and Munguía-Rosales, R. 2011. Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. México. Revista Mexicana de Micología. 33:9-15.
  - 26 Shahid, A. A.; Rao, A. Q.; Bakhsh, A. and Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. Pakistán. Archives of Biological Sciences. 1(64):21-42. <https://doi.org/10.2298/ABS1201021S>.
  - 27 Sharma, A.; Sharma, S. and Yadav, P. K. 2023. Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. Nepal. Cogent Food & Agriculture. 9(1):2180857. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2180857>.
  - 28 Tlecuitl-Beristain, S.; Viniegra-González, G.; Díaz-Godínez, G. and Loera, O. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. México. Mycopathologia. 169(5):387-394. 10.1007/s11046-009-9268-7.
  - 29 Vishwanath, P. P.; Ahire, R. S.; Patil, S. R. and Pawar, S. B. 2021. Isolation, identification and evaluation of media for *Metarhizium anisopliae* growth and sporulation. India. Educational Research (IJMCER). 3 (4):250-258.
  - 30 Wang, J. B.; Lu, H. L.; Sheng, H. and St. Leger, R. J. 2023. A *Drosophila melanogaster* model shows that fast growing *Metarhizium* species are the deadliest despite eliciting a strong immune response. Estados Unidos. Virulence. 14(1):2275493. 10.1080/21505594.2023.2275493.
  - 31 Xing, P.; Diao, H.; Wang, D.; Zhou, W.; Tian, J. and Ma, R. 2023. Identification, pathogenicity, and culture conditions of a new isolate of *Cordyceps javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae) from soil. Estados Unidos. Journal of Economic Entomology. 116(1):98-107. 10.1093/jee/toac199.
  - 32 Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Canadá. Biocontrol Science and Technology. 17(9):879-920. 10.1002/ps.2780370410.



## Fermentación sólida de *Metarhizium robertsii*: sustrato y condiciones de cultivo en la producción de conidios y la eficacia biológica

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 December 2024
Date accepted: 01 February 2025
Publication date: 29 April 2025
Publication date: Apr-May 2025
Volume: 16
Issue: 3
Electronic Location Identifier: e3596
DOI: 10.29312/remexca.v16i3.3596
Funded by: Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología
Funded by: Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías
Funded by: PRODEP
Funded by: AAC BIOLAB
Award ID: ESYCA2023-139097
Award ID: CVU 765598
Award ID: ITSECA-CA-18

### Categories

Subject: Artículo

### Palabras clave:

**Palabras clave:**

*Metarhizium robertsii* Xoch 8.1

*Tenebrio molitor*

conidios

control biológico

infectividad.

### Counts

Figures: 6

Tables: 0

Equations: 2

References: 32

Pages: 0