



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Producción a escala semipiloto de conidios usados en control biológico empleando una estrategia sencilla de reúso de sustrato”

TESIS

QUE PRESENTA

Akzayácatl García Valdés

MATRÍCULA 2212801193

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

DIRECTOR:

Dr. Octavio Loera Corral

JURADOS:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Dr. Óscar Arce Cervantes

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Iztapalapa, ciudad de México a 7 de agosto de 2023.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT, con la referencia 001465”

Ciudad de México a 7 de agosto del 2013.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Producción a escala semipiloto de conidios usados en control biológico
empleando una estrategia sencilla de reúso de sustrato”**

que presentó

IBI Akzayácatl García Valdés

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Asesor: Dra. Nohemi Garcia Ortiz

Jurado:

Presidente: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario: Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Vocal: Dr. Óscar Arce Cervantes

Vocal: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Índice

Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
1.1 Control Biológico.....	7
1.2 Hongos usados en control biológico.....	10
1.2.1 Hongos entomopatógenos.....	10
1.2.2 Hongos antagonistas de hongos fitopatógenos.....	13
1.3 Producción de conidios para control biológico.....	16
2. Antecedentes.....	18
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivo.....	21
5.1 Objetivos específicos.....	21
6. Estrategia experimental.....	22
7. Materiales y métodos.....	23
7.1 Microorganismos usados.....	23
7.2 Conservación de las cepas.....	24
7.3 Propagación de cepas en cultivo superficial.....	24
7.4 Determinación de humedad inicial.....	24
7.5 Determinación de la máxima producción de conidios en cultivos de arroz.....	25
7.6 Producción de conidios en cultivos en estado sólido.....	26
7.7 Pérdida de peso del sustrato.....	29
7.8 Actividad de agua (AW).....	30
7.9 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	30
7.10 Germinación.....	32

7.11 Viabilidad.....	32
7.12 Bioensayos.....	32
7.12.1 Infectividad.....	32
7.12.2 Prueba de antagonismo.....	33
7.13 Análisis estadístico.....	34
8. Resultados y Discusión.....	35
<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1.....	35
8.1 Rendimiento de producción.....	35
8.2 Perfiles de humedad.....	39
8.3 Actividad de agua (Aw).....	41
8.4 Pruebas de germinación.....	43
8.5 Perfiles de viabilidad.....	44
8.6 Pérdida de peso de sustrato en cada ciclo.....	45
8.7 Bioensayo (infectividad).....	46
8.8 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	49
<i>Trichoderma asperellum</i> Th-T4 (3).....	66
8.9 Rendimiento de producción.....	66
8.10 Perfiles de humedad.....	68
8.11 Actividad de agua (Aw).....	70
8.12 Pruebas de germinación.....	72
8.13 Pérdida de peso de sustrato en cada ciclo.....	73
8.14 Bioensayo (antagonismo).....	74
8.15 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	76
9. Conclusión.....	81
10. Perspectivas.....	82

11. Referencias.....83

Resumen

En los métodos de producción de conidios en sustratos sólidos el sustrato se deshecha posterior a la extracción de los conidios, quedando gran parte sin utilizar, generando desperdicios y elevando los costos de producción. Se han propuesto estrategias para reutilizar el sustrato residual, sin embargo, dichas metodologías involucran múltiples pasos adicionales de tratamiento, para su reacondicionamiento y posterior uso. Con base en esto, surge nuestro interés y objetivo de desarrollar un proceso sencillo de reúso de sustrato que se mantiene posterior a la recuperación de los conidios usados en control biológico sin descuidar el rendimiento de producción y calidad de los mismos, libre de operaciones adicionales, a una escala susceptible de producción masiva, con la finalidad de obtener un proceso rentable, fácilmente replicable, en el que se minimice el desperdicio de recursos, y que, además, pueda ser aplicado en sistemas de autoconsumo.

La metodología desarrollada a partir de la manipulación mínima de las mezclas arroz-conidios se aplicó a dos cepas fúngicas de géneros utilizados en control biológico: *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 (entomopatógeno) y *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) (antagonista de hongos fitopatógenos). Para *M. robertsii* Xoch-8.1 se lograron hasta 4 ciclos consecutivos en 34 días, con una producción acumulada de 6.54×10^9 con/gss, una pérdida de sustrato de 48 % y una humedad final del 63 %. Mientras que para *T. asperellum* Th-T4 (3) se lograron 2 ciclos consecutivos en 10 días, teniendo una producción acumulada de 7.4×10^9 con/gss con una pérdida de sustrato del 51 % y una humedad final del 66 %. En ambos casos la germinación superó 90 % y en los bioensayos se mantuvo la capacidad infectiva para ambas cepas al paso de los ciclos, lo cual implica que se conservó una buena calidad de los conidios al paso de los ciclos. Además, se midió la actividad de agua inicial en cada ciclo, se obtuvieron diferentes valores para cada uno de ellos, los cuales pueden influir en el tipo de crecimiento de los hongos propiciando una mayor conidiación o crecimiento en forma de micelio. Finalmente, la realización de análisis por microscopía electrónica de barrido permitió observar con mayor detalle la morfología de crecimiento del hongo y cómo ésta se modificó durante los ciclos consecutivos de cultivo.

En conclusión, es posible reutilizar el sustrato residual, manteniendo el rendimiento de producción y la calidad en al menos un ciclo de reúso, con una técnica sencilla que requiere de tecnología y capacitación básica lo que la hace fácilmente reproducible.

1. Introducción

1.1 Control Biológico

Bajo el contexto que se abordará durante este escrito, en agricultura se define como plaga: a aquel organismo o comunidad de organismos de cualquier tipo (Eukarya, Bacteria, Archaea y/o virus) que actúa como agente patógeno en cultivos agrícolas, afectando la dinámica del ecosistema además de ocasionar problemas de tipo social y económico (Zepeda-Jaso. 2018). En los cultivos agrícolas las pérdidas generadas por plagas se estiman que comprenden el 40 % de la producción agrícola total mundial, lo que se traduce en, pérdidas de más de 220 mil millones de dólares debido a enfermedades y al menos 70 mil millones de dólares por insectos plaga (Secretariat *et al.* 2021) (Morán-Diez y Glare, 2016). Por esta razón es crucial disminuir el daño que causan las plagas en los cultivos.

El control o combate de plagas en los cultivos agrícolas surgió aunado al inicio de la agricultura derivado del desarrollo de diferentes métodos control, algunos de ellos son: el control químico, control biológico, control mecánico, control cultural, control del cultivo, entre otros, y se ha extendido más recientemente a otras áreas como: la forestal, la veterinaria, el sector pecuario, etc. (MINSA *et al.* 2010) (Pacheco-Hernández *et al.* 2019). Se define al control biológico como una estrategia cuyo enfoque se fundamenta en el uso de sistemas biológicos, organismos y/o partes de ellos, como enemigos naturales de las plagas con el fin de reducirlas o eliminarlas, lo cual implica una estrecha relación y una especificidad elevada entre los organismos utilizados como enemigos naturales “control” y aquellos considerados plaga (Cicero-Jurado, 2020). En general, se describe a un enemigo natural como aquel que es capaz de alimentarse o causar enfermedad en otro organismo de forma intrínseca en la naturaleza, los principales enemigos naturales regularmente utilizados en el control biológico son: hongos, virus, bacterias, insectos, ácaros y depredadores. En otras palabras, el control biológico representa la aplicación directa para el combate de plagas del conocimiento sobre las interrelaciones entre los organismos y el medio que la rodea, de manera sostenible. En este sentido, se describen tres métodos básicos diferentes de control biológico (Hajek y Eilenberg, 2018):

1.- Método clásico: denominado también como método de introducción o importación, pues su principio básico se remite a la incorporación de una nueva especie (especie exótica), en una pequeña cantidad al lugar de interés donde se requiera realizar el control, con el fin de que a lo largo del tiempo la población control aumente y su presencia sea persistente. Además, cabe destacar que a menudo, otro de los objetivos de la implementación de este método radica en el restablecimiento del equilibrio natural de los hábitats, con la generación

de “nuevos hábitats” debido a la introducción del organismo control, el cual en el caso ideal no tiene enemigos naturales en el lugar de aplicación.

2.- Método de inundación también denominado método de aumento: en contra parte al control clásico, en este método el organismo control ya se localiza en el hábitat de interés y se busca un crecimiento significativo del mismo. Esta estrategia está basada en la liberación de grandes cantidades del organismo control, generalmente en repetidas ocasiones en intervalos cortos de tiempo, a diferencia del método clásico. Una de sus características principales es el tiempo en que disminuye la población plaga, el cual es notablemente menor en contraste con el método clásico. Los objetivos y expectativas de esta estrategia son semejantes a los del uso de pesticidas químicos, es utilizado comúnmente en monocultivos, por la necesidad de que los enemigos naturales deben estar presentes. Debido a la gran cantidad de organismos control que se liberan durante la aplicación de este método, se posee una mayor eficiencia y efectividad en comparación con los otros métodos de control biológico.

3.- Método de conservación: esta práctica consiste en la aplicación de medidas singulares en el lugar de interés, con el propósito de incrementar la población control de manera natural, esto es, sin la necesidad de introducir los organismos de manera externa, priorizando su crecimiento únicamente con mejoras en las condiciones de su ecosistema. Debido a la metodología utilizada, este método es utilizado en cultivos que requieren un control a largo plazo.

El éxito en los métodos de control biológico radica en identificar el organismo control, particular para una determinada plaga en específico; posteriormente se realiza su aplicación o implementación en los cultivos agrícolas que así lo requieran, usando cualquiera de los métodos de control anteriormente descritos. Asimismo, para lograr los resultados esperados es de suma importancia la comprensión de la relación y la conducta natural entre los organismos involucrados, esto es, del organismo control y del organismo plaga, además de los factores ambientales externos en los que se encuentra inmerso nuestro sistema tales como: la temperatura, la humedad, la radiación ultravioleta, la actividad de agua etc. (Cicero-Jurado, 2020; Pucheta-Díaz *et al.* 2006).

En la actualidad el uso de plaguicidas químicos es predominante, pues es un método eficaz y sumamente rápido, sin embargo, los plaguicidas utilizados se caracterizan por ser dañinos para la salud humana, para los organismos benéficos por el amplio espectro que abarcan y para el hábitat en que se aplica, generando desechos químicos peligrosos, contaminación de aguas y suelos, ocasionando en el peor de los casos resistencia de las plagas, por lo

que pierden su eficacia. A pesar de que el uso de pesticidas químicos ha cumplido con el objetivo de erradicar las plagas sobre todo de manera rauda, los efectos secundarios causados por su empleo de manera indiscriminada evidencian que no se trata de una maniobra segura ni sustentable para el manejo de plagas en los cultivos agrícolas (Zepeda-Jazo, 2018).

Por otro lado, por su esencia de origen natural, el control biológico se considera una disciplina viable y segura para el ambiente, consecuentemente, a diferencia del uso de plaguicidas químicos, se prioriza el desarrollo sustentable y el mantenimiento de los recursos (Hernández-Trejo *et al.* 2019). Algunas de las ventajas que ofrece son: los organismos benéficos que comparten el ecosistema no suelen afectarse directamente, debido a la especificidad de un producto microbiano, a diferencia de ciertos plaguicidas químicos el desarrollo de resistencia del organismo plaga “huésped” normalmente no es un problema, no se generan residuos agroquímicos, además de ser compatible con la mayoría de las otras técnicas de control (Gómez *et al.* 2018). Como se mencionó anteriormente, hoy en día, el uso de plaguicidas químicos todavía domina el mercado del control de plagas en los cultivos agrícolas, pero el valor del control biológico sobre el control químico de plagas ha ido aumentando en los últimos años (Kline, 2020).

En ambos casos y de manera inevitable el uso de cualquier estrategia de control que sea implementada *de novo* en algún ambiente causará alteraciones, y debido a ello es importante seleccionar las más adecuadas para que éstas sean las mínimas posibles con los resultados esperados (Ceccon, 2008). En este aspecto, el Manejo Integrado de Plagas (MIP) anteriormente llamado Manejo Sustentable de Plagas, es una estrategia que ha ido en aumento en los últimos años, cuya práctica tiene más de 50 años de empleo (Zepeda-Jazo, 2018). El MIP se justifica en la sinergia de las diversas estrategias de control, aprovechando las ventajas que cada uno puede ofrecer favoreciendo la conservación del medio ambiente y el desarrollo sustentable, en otras palabras, no se priva del uso de pesticidas químicos, más bien se procura que disminuya su consumo, con la sinergia de métodos como el control biológico. Así pues, el MIP se ajusta a los menesteres de las situaciones particulares en las que se llegue a utilizar, convirtiéndola en la opción más viable a corto plazo. En este asunto, México cuenta con el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), dependencia encargada de la generación de planes y estrategias que faciliten alternativas para la disminución del uso de plaguicidas químicos, mediante enfoques seguros y sostenibles para el medio ambiente que contribuyan al aumento de la calidad y productividad agrícola (AGRICULTURA, 2021).

El mercado de bioplaguicidas ha ido creciendo de manera paulatina en todo el mundo en los últimos años. En tal sentido, el mercado norteamericano de bioplaguicidas se encuentra encabezado por los tres países más desarrollados de la región: Estados Unidos, Canadá y México (Gómez *et al.* 2018). Se estima que en conjunto el mercado de bioplaguicidas se aproximó a 6.600 billones de dólares estadounidenses en 2020 (Muñiz-Paredes *et al.* 2017), con una tasa de crecimiento del mercado del 15 % (Gómez *et al.* 2018). En México durante 2019 se atendieron gracias al control biológico de plagas más de 13 mil hectáreas con microorganismos entomopatógenos, lo que evitó el uso de 272 toneladas de insecticidas químicos (AGRICULTURA, 2019).

La tendencia es que en el corto plazo las empresas de plaguicidas químicos introduzcan en sus catálogos de productos algunas alternativas de control biológico, especialmente con énfasis en los microorganismos (Kline, 2020). En vista de que cada vez más el mercado mundial demanda fuentes de producción alimenticias seguras y sostenibles, además de una menor trazabilidad química en los productos (Gómez *et al.* 2018), lo cual representa una importante oportunidad al uso de bioplaguicidas para dar respuesta a esta problemática, y cumplir con los requisitos de los fabricantes que quieran competir con las exigencias en ese mercado. Estas alternativas han mostrado ser respetuosas con el medio ambiente, eficaces y de fácil adecuación a protocolos de producción masiva (Pacheco-Hernández *et al.* 2020). Por consiguiente, las pequeñas y medianas empresas existentes pueden considerar una oportunidad para ingresar al mercado incorporando los productos de control biológico.

1.2 Hongos usados en control biológico

Dentro de los enemigos naturales más utilizados en el control biológico se encuentran los microorganismos, que a su vez se pueden dividir en 5 subcategorías, las cuales son: bacterias, hongos, virus, protozoos y levaduras. En la presente investigación nos centraremos particularmente en los hongos, los cuales representan aproximadamente el 10 % del mercado de bioplaguicidas, y son utilizados tanto para el tratamiento de enfermedades, como para el control de plagas (Mishra *et al.* 2015).

1.2.1 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son uno de los enemigos naturales más usados, y de mayor importancia en el control biológico de insectos. El significado etimológico de la palabra entomopatógeno se define como: aquellos capaces de propiciar enfermedad en insectos. Por consiguiente, los hongos entomopatógenos son un grupo de organismos eucariotas

con la facultad de originar padecimientos en insectos, generalmente tan graves como para causar su muerte, a este tipo de enfermedades se les conoce como muscardinas (Pacheco-Hernández *et al.* 2020). Hay una abundante y extensa cantidad de especies de hongos de diversos grupos que infectan a los insectos, para el año 2020 se habían descrito alrededor de 700 tipos de hongos de 90 géneros diferentes con esta virtud (Deepa *et al.* 2020), de las cuales destacan: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria*, *Cordyceps* y *Trichoderma spp*, al ser las más empleadas y caracterizadas para planes de control biológico (Gómez *et al.* 2018). Este tipo de géneros se encuentran comúnmente en la mayoría de los ambientes pues poseen la cualidad de ser saprófitos, dicho en otros términos, su ciclo de vida no depende de la necesidad de un huésped porque se alimentan alternativamente de materia orgánica (Baron *et al.* 2019).

Prácticamente toda clase de insectos son susceptibles a ser blanco de algún género de hongo entomopatógeno, algunos de estos hongos pueden atacar más de una especie de insecto, otros por el contrario son sumamente específicos. El mecanismo de acción por el cual los hongos entomopatógenos producen o causan enfermedad en sus huéspedes es a través del contacto, por medio de unas formas celulares peculiares llamadas conidios, las cuales son estructuras encargadas del esparcimiento y proliferación en cierta clase de hongos y además de la patogenicidad como en estos casos, este proceso se puede dividir en algunas etapas como se describe a continuación (Imagen 1) (Pucheta-Díaz *et al.* 2006; Téllez-Jurado *et al.* 2009; Gómez-Ramírez *et al.* 2014):

1.- Interacción de los conidios con el integumento del insecto y germinación: estas unidades celulares infectivas a diferencia de otros patógenos no necesitan ser ingeridas por su huésped, los conidios pueden iniciar su proceso infectivo con la adhesión a la capa exterior de los insectos llamada: cutícula, integumento, corteza, etc, o bien, a través de los espiráculos. Se sabe que la capacidad de unión de los conidios a la cutícula del insecto es debido a fenómenos físicos y químicos, estas regiones son denominadas regiones intersegmentales o zonas blandas. Posteriormente se produce la germinación de los conidios con la formación del tubo germinativo.

2.- Penetración del integumento y reproducción en el hemocele: El tubo germinativo realiza una presión mecánica en la corteza del insecto, de manera simultánea se producen una serie de enzimas (lipasas, proteasas, y quitinasas) capaces de degradar la corteza del insecto, dando como resultado la introducción del tubo germinativo al hemocele donde crecerá dentro del tejido produciendo formas micelares libres llamadas blastosporas.

3.-Muerte del insecto: el hongo mata a su huésped de dos formas: (1) con la generación de múltiples toxinas que pueden degradar estructuras celulares, o bien, con inhibidores enzimáticos (ácidos grasos orgánicos, péptidos cíclicos y lineales) y (2) consumiendo los nutrientes de su presa. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la fase saprofítica.

4.- Colonización, esporulación y diseminación: el hongo se dispersa por todo el organismo huésped, en esta etapa es cuando se visualizan cambios de coloración característica del hongo involucrado; después, si las condiciones ambientales lo permiten, las hifas penetrarán el integumento desde adentro de su huésped hacia el exterior donde se dará principio a la producción de conidios, los cuales se esparcirán por el ambiente mediante diferentes medios para volver a realizar este ciclo infeccioso descrito.

En la Imagen 1 se muestra de manera esquemática el mecanismo general de acción de infección de los hongos entomopatógenos.

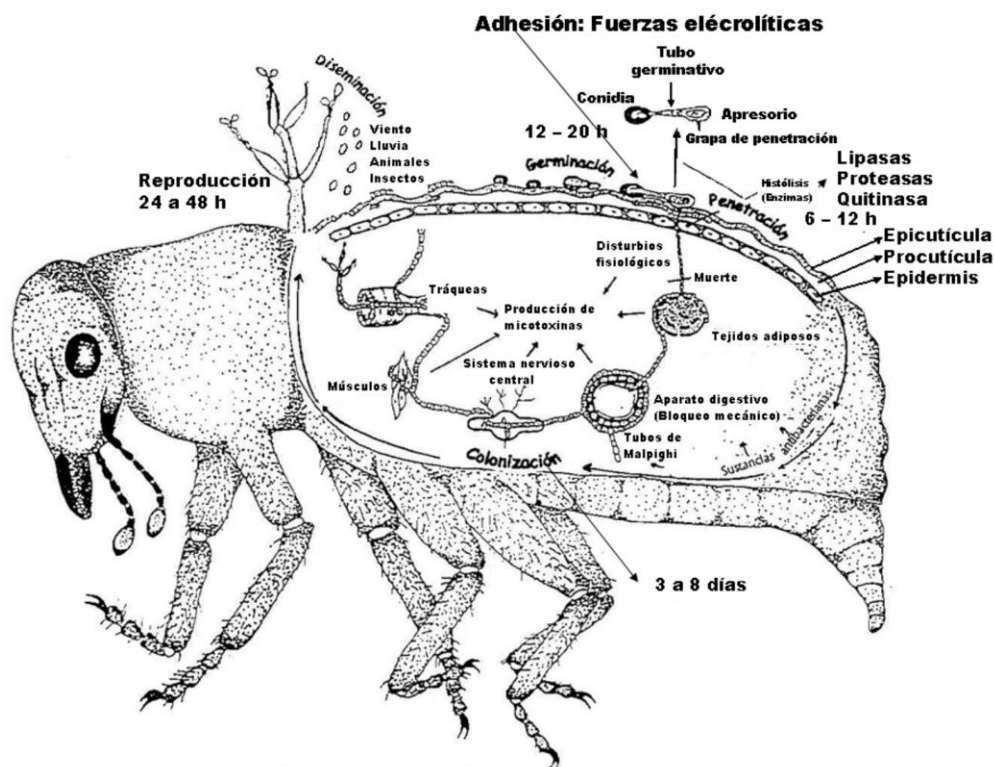


Imagen 1. Mecanismo de infección por conidios de hongos entomopatógenos (Gómez-Ramírez et al. 2014).

En el presente estudio nos enfocaremos particularmente en el hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* anteriormente catalogado como *Metarhizium anisopliae*, el cual ha

sido estudiado ampliamente tanto a nivel molecular como bioquímico, cuenta con una de las características anteriormente mencionadas, ataca un rango amplio de especies de ácaros e insectos (por lo menos 200) (Brunnen-Méndez *et al.* 2019), además de ser saprófito, se encuentra distribuido como un habitante común en los suelos a nivel mundial (Xu *et al.* 2014). *Metarhizium robertsii* es un hongo mesófilo de tipo filamentoso capaz de crecer en intervalos de temperatura de 10 °C a 35 °C siendo la óptima de 25 °C a 30 °C, asimismo *Metarhizium robertsii* promueve el crecimiento de algunas plantas y es capaz de asociarse simbióticamente tanto de manera endófito como en la rizosfera de las plantas (Ahmad *et al.* 2020; Ahmad *et al.* 2022; Franzin *et al.* 2022).

1.2.2 Hongos antagonistas de hongos fitopatógenos

Si bien los hongos entomopatógenos son los más usados en el control biológico, específicamente para el control de plagas de insectos, existen otro tipo de hongos que son antagonistas de otros hongos, es decir ejercen un impacto de control biológico contra otras especies de hongos fitopatógenos (Hernández-Lauzardo *et al.* 2007).

Los mecanismos por los cuales estos tipos de hongos antagónicos ejercen su acción patógena puede estar mediada por diferentes procesos, los principalmente descritos pertenecen a dos grupos: (1) aquellos que tienen una acción directa contra los hongos fitopatógenos (competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis), y (2) algunos otros que ejercen su actividad biocontroladora de manera indirecta (estimulación del crecimiento vegetal e inducción de resistencia) (Infante *et al.* 2009). A continuación, se describen de manera sucinta todos estos mecanismos (Companioni-González *et al.* 2019; Martínez *et al.* 2013; Infante *et al.* 2009):

- **Micoparasitismo:** este es un mecanismo análogo al de los hongos entomopatógenos, el hongo control se adhiere y sobrecrece por encima y alrededor de las hifas del hongo blanco, ejerciendo presión mecánica y al mismo tiempo excretando enzimas (quitinasas, celulasas, etc.) que hidrolizan la pared celular del hongo parasitado, posteriormente se adentra en él y consume su contenido celular (Imagen 2).

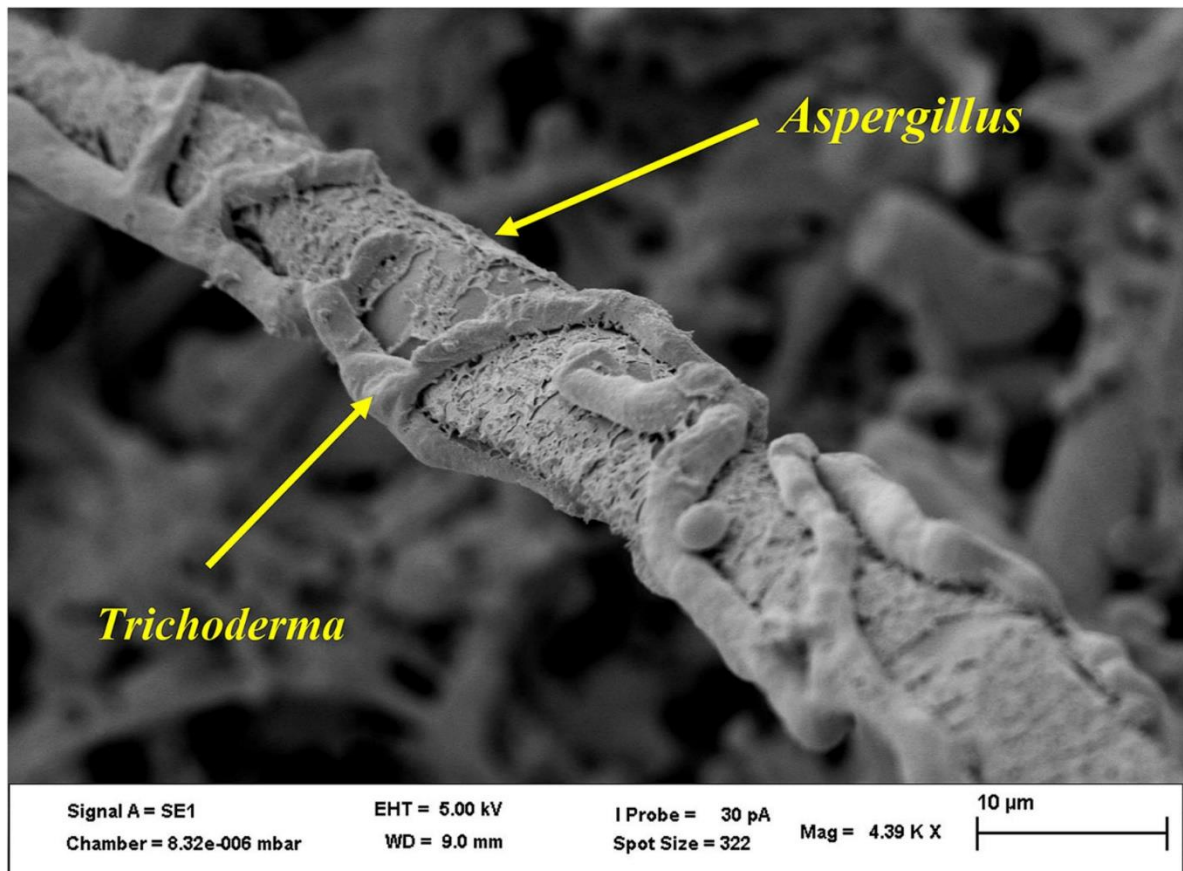


Imagen 2. Micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre *Aspergillus flavus* (Kifle *et al.* 2017).

- Competencia por espacio y nutrientes: en este proceso el hongo control posee actividades metabólicas favorablemente más altas que su blanco como: aprovechamiento de nutrientes, su velocidad de crecimiento y su capacidad de plasticidad ecológica, por lo cual de manera paulatina hará perecer al hongo plaga. En este método es esencial la limitante o insuficiencia de espacio y/o algún nutriente (Imagen 3).
- Antibiosis: la producción de metabolitos secundarios (antibióticos) que son tóxicos para el hongo fitopatógeno es la clave en esta táctica, dichos compuestos pueden actuar de maneras diversas según su naturaleza con contacto directo o sin él. Por la resistencia a muchos metabolitos secundarios que pueden presentar los organismos control, se cree que la antibiosis no es el mecanismo principal de antagonismo (Imagen 3).
- Estimulación del crecimiento vegetal: se ha observado que algunas especies de hongos son capaces de inducir el crecimiento vegetal mediante algunos

metabolitos secundarios de carácter hormonal, o bien por su capacidad de solubilizar nutrientes (Imagen 3).

- Inducción de resistencia: se ha hecho de manifiesto que algunas cepas de hongos usadas para el control biológico son capaces de activar las defensas naturales que poseen las plantas, esto mediante diferentes compuestos volátiles orgánicos (COV's), este fenómeno es conocido como inducción de resistencia sistémica. Lo que las hace actuar de manera más rápida frente al patógeno en cuestión, mejorando su resistencia y disminuyendo su incidencia a enfermar (Imagen 3).

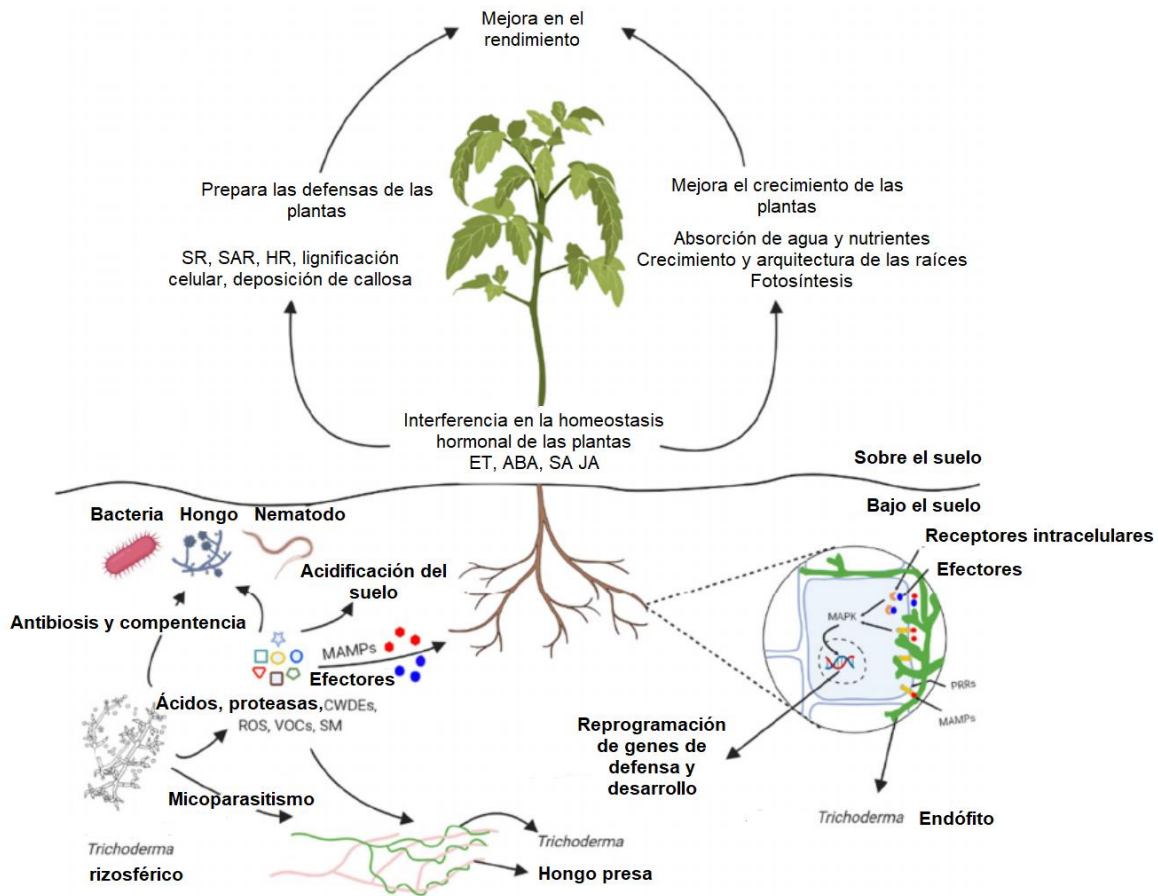


Imagen 3. Esquema de interacción *Trichoderma*- planta- patógeno. Mecanismos: competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, estimulación de crecimiento vegetal e inducción de resistencia (Alfiky & Weisskopf, 2021).

Los mecanismos anteriormente descritos no están excluidos entre sí y puede presentarse más de uno de manera conjunta. En el presente escrito, para este tipo de hongos nos centraremos en el hongo antagonista *Trichoderma asperellum*, el cual se puede encontrar de manera comercial, en algunos productos para su uso en el control biológico contra fitopatógenos como: *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Pseudoperonospora cubensis*,

Cladosporium spp., *Verticillium spp.*, *Botrytis sp.*, *Sclerotium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, entre otros. (IICA. 2015). Además, el género *Trichoderma* se ha identificado en una diversidad grande de hábitats (Martínez *et al.* 2013), también cuenta con cualidades importantes como amplios rangos de tolerancia a factores externos como pH (4-9) y temperatura (20 °C-35 °C), asimismo posee una velocidad de crecimiento relativamente rápida en distintos sustratos y se ha comprobado su capacidad para desarrollar todos los mecanismos de acción contra los fitopatógenos anteriormente descritos (Infante *et al.* 2009). También es utilizado en una amplia gama de cultivos y establece su mecanismo antagonista ante varios tipos de hongos lo que lo hace sumamente versátil. Estos hongos son capaces de producir clamidosporas como estructuras de supervivencia que le permiten permanecer en condiciones adversas (Companioni-González *et al.* 2019).

1.3 Producción de conidios para control biológico

La producción de hongos para control biológico consiste en el aumento significativo de las unidades infecciosas (conidios) de interés, los métodos de producción se adecuan al uso de sustratos naturales que suministren los nutrientes suficientes, que éstos sean preferentemente asequibles, sin descuidar la calidad y la producción de las esporas. Las alternativas de métodos de producción se establecen a diferentes escalas como lo son: artesanal, semi-industrial e industrial, ordinariamente en cultivos líquidos, cultivos sólidos y cultivos mixtos o bifásicos, la mayoría de los hongos empleados en control biológico a una escala de producción masiva se llevan a cabo en cultivos sólidos (Rodríguez-Gámez *et al.* 2017). Aunque el arroz es el sustrato de mayor uso para la producción de hongos en control biológico por sus propiedades nutrimentales, estructura adecuada para el crecimiento, además de ser accesible, es importante evaluar otros sustratos (puros o mezclas) donde se pueda obtener mayor producción de conidios para así tomar una decisión final considerando asimismo el factor costo-beneficio (Cando-Narvaez *et al.* 2021; Muñiz-Paredes *et al.* 2017; Rodríguez-Gámez *et al.* 2017). Los diferentes biorreactores utilizados para la producción masiva de conidios son: bolsas de polipropileno, matraces y reactores de bandeja y columna, los cuales en la mayoría de los casos no han mostrado diferencias significativas con relación a la producción de conidios (Muñiz-Paredes *et al.* 2017). También es importante detectar las condiciones ideales de factores como: la concentración inicial del inóculo, actividad de agua, el tipo de sustrato, el pH, la humedad, la temperatura, la aireación y el tiempo de incubación, para la obtención de una buena producción de conidios (Mulatu *et al.* 2021; Muñiz-Paredes *et al.* 2017). Las metodologías típicas de producción de conidios se caracterizan por realizar un solo ciclo de producción, por consiguiente, un solo

ciclo de uso del sustrato, desechándolo posterior a la cosecha de los conidios, aun cuando permanece más del 80 % de éste sin utilizar (Ye *et al.* 2006; Kruger *et al.* 2014; Cando-Narvaez *et al.* 2021).

Para las cepas de interés en esta investigación, bajo diferentes condiciones de producción en cultivo sólido, utilizando arroz como sustrato, se han logrado producciones máximas de 9×10^8 conidios por gramo de sustrato seco (con/gss) (Alcántara-Vargas *et al.* 2020), 8.99×10^8 con/gss (García-Cruz *et al.* 2019), 2.22×10^6 con/gss (Bich *et al.* 2018) y 1×10^9 con/gss (Loera-Corral *et al.* 2016) para el hongo *Metarhizium anisopliae*, y de 3.2×10^7 con/gss (Mulatu *et al.* 2021), 9.34×10^8 con/gss (López-Alcántara, 2018), y 1×10^9 con/gss (Cando-Narvaez *et al.* 2021) para el hongo *Trichoderma asperellum*.

2. Antecedentes

En cuanto al reúso de sustrato, específicamente arroz para la producción de conidios para su uso en control biológico, se han desarrollado algunos estudios obteniendo una buena producción y calidad de estas unidades infecciosas, en comparación con los procedimientos típicos de producción de un solo ciclo de uso del sustrato. De hecho, se ha obtenido incluso una mayor producción en los siguientes ciclos de producción, los de reúso, conservando su calidad en al menos un ciclo de reutilización, lo que evidencia que el reciclaje de arroz es una estrategia que favorece la disminución en los costos y tiempos de producción de conidios, empero la dificultad de estas metodologías radica en los numerosos pasos que se efectúan para reacondicionar y posteriormente usar el sustrato antes de los siguientes ciclos de producción (Cando-Narvaez *et al.* 2021).

Empleando *Metarhizium anisopliae* en biorreactores de bolsa de polipropileno con 100 gramos, en comparación con arroz nuevo, Santi *et al.*, (2011) elevaron la producción de conidios 1.5 veces más con arroz reusado; sin embargo, hubo una disminución significativa en la calidad de los conidios con arroz reusado. En ese trabajo, para adecuar el sustrato se llevaron a cabo procesos de: lavado, secado y reinoculado. Por otro lado, Kruger *et al.*, (2014) utilizando bolsas de polipropileno con 45 gramos de arroz de diferentes tipos alcanzaron una buena producción de conidios solo con arroz precocido en un único ciclo de reúso, manteniendo el rendimiento de producción de 2.04×10^9 con/gss con arroz nuevo y 2.09×10^9 con/gss con arroz reusado, pero con una disminución en la germinación de los conidios con arroz reusado (95.09 %) en comparación con arroz nuevo (97.98 %); el arroz reusado se sometió a la misma metodología con la cual se acondicionó el sustrato nuevo. Asimismo, Barra *et al.*, (2016) utilizando biorreactores de bolsa de polietileno con 500 gramos de arroz precocido nuevo o de arroz precocido reciclado, observaron un mayor rendimiento de producción y menor costo en el ciclo de reutilización del sustrato, pasando de 2.42×10^9 con/gss con arroz nuevo a 2.67×10^9 con/gss con arroz reciclado, aunque el proceso requirió de: lavados, ajuste de humedad y reinoculación antes del ciclo de reúso. Por otra parte, utilizando un biorreactor de lecho compacto, en el cual la zona de reacción estaba compuesta por tres módulos, conteniendo 400 g de sólidos (360 g de arroz y 40 g de bagazo Portilho-da-Cunha *et al.*, (2020) mantuvieron estadísticamente el rendimiento de producción reutilizando el arroz en 2 ocasiones, aumentado 2.5 veces la cantidad total de conidios cosechados en comparación con el uso, en esta metodología se emplearon pasos de secado y reinoculación del sustrato antes del nuevo ciclo de producción.

Como una alternativa a las metodologías propuestas anteriormente, Cando-Narvaez *et al.*, (2021) analizaron la factibilidad de reusar el arroz sin pasos adicionales de tratamiento, es decir una vez culminado el primer ciclo de producción y cosechados los conidios, utilizar el sustrato de inmediato sin más, aprovechando como inóculo los conidios que aún permanecen en el grano después de la recolección. La metodología se llevó a cabo sobre pequeños frascos de vidrio con una pequeña cantidad de sustrato de 2.5 gramos. Se emplearon dos géneros de hongos diferentes, para *Trichoderma asperellum* la producción de conidios aumentó en el primer ciclo de reúso de sustrato, aunque para el segundo ciclo no se observó diferencias significativas ni en la producción ni en la calidad, con respecto al método tradicional sin reúso de sustrato, obteniendo una producción total de conidios de 4.89×10^9 con/gss, casi 5 veces mayor a lo obtenido en un solo ciclo de producción (1×10^9 con/gss). Por su parte, con el hongo *Metarhizium robertsii* se obtuvieron aumentos significativos en los rendimientos de producción de conidios en el segundo y tercer ciclo de reúso, además que para el cuarto ciclo no se observaron diferencias significativas en la producción ni en la calidad de los conidios en comparación con el primer ciclo, aumentando significativamente los niveles de producción total de conidios a 3.77×10^9 con/gss, hasta 6.5 veces mayor a lo obtenido en un solo ciclo de producción (5.7×10^8 con/gss). Todas estas investigaciones corroboran la factibilidad de reusar el sustrato, pero a un costo considerable o en pequeña escala, por lo tanto, es importante mejorar los métodos de reúso de sustrato a una escala de producción masiva.

Por último, en los últimos años los productores agrícolas han mostrado mayor interés y confianza en el uso de microorganismos para el control de plagas en los cultivos, lo cual ha puesto en su atención no solo en su uso, si no, también en el desarrollo y aplicación de sus propios microorganismos para su autoconsumo a nivel local lo que se conoce como (*on-farm*) o control en la finca (Faria *et al.* 2023), en este tipo de control los agricultores cuentan con sus propios laboratorios y poseen con enemigos naturales específicos para las plagas que se encuentran en los cultivos de la cuales particularmente son dueños (IICA. 2015), el tener estrategias que satisfagan las necesidades de este tipo de control y que además sean más eficientes son otras de las motivaciones para desarrollo de metodologías sencillas a una escala de producción masiva y que implique el reúso de sustrato.

3. Justificación

Se estima que las pérdidas en los cultivos agrícolas relacionadas con las plagas alcanzan el 40 % de la producción agrícola mundial anual. Desde hace ya algún tiempo el control biológico surgió como una alternativa al uso de plaguicidas químicos para solventar esta problemática por medio de estrategias limpias, sustentables, seguras, y eficaces. Para la producción de conidios de uso en el control biológico, el sustrato sólido más utilizado es el arroz, sin embargo, los métodos tradicionales llevan a cabo en un solo ciclo de producción de conidios y por lo tanto un solo ciclo de uso del sustrato, permaneciendo más del 80 % de éste sin utilizar, generando desperdicios y elevando los costos de producción. Así pues, se han propuestos algunos métodos que involucran el uso del sustrato residual, que se mantiene posterior a la cosecha de los conidios, obteniendo resultados favorables en cuanto a rendimientos de producción y calidad de conidios, incluso en ocasiones con mejoras en los ciclos de reuso, empero estos procesos demandan numerosos pasos o de técnicas sofisticadas, por ejemplo, para reacondicionar el sustrato antes de su reutilización y en consecuencia el inicio del próximo ciclo de producción. Además, recientemente se ha despertado un mayor interés por parte de los productores agrícolas en desarrollar e implementar sus propios microorganismos de manera local. Debido a ello surge nuestro objetivo e interés de desarrollar una nueva estrategia sencilla que involucre el reuso del sustrato, libre de operaciones adicionales de tratamiento, con énfasis en una escala susceptible de producción masiva con la finalidad de disminuir los costos de producción, teniendo un proceso más rentable y eficiente, fácilmente replicable, en el que se minimice el desperdicio de los recursos, sin afectar los rendimientos de producción ni la calidad de los conidios, y que además, pueda ser aplicada particularmente en sistemas de producción de autoconsumo de control biológico.

4. Hipótesis

El arroz residual posterior a la recolección de conidios es reutilizable sin la necesidad de reacondicionamiento, y sin afectar el rendimiento de producción ni la calidad de los conidios a una escala semipiloto.

5. Objetivo

Desarrollar una metodología sencilla de reúso de sustrato exenta de operaciones adicionales de tratamiento para la producción de conidios con aplicación en control biológico.

5.1 Objetivos específicos

- Seleccionar y conservar las cepas de hongos para control biológico a utilizar.
- Diseñar un proceso de reúso de sustrato sólido (arroz) fácilmente replicable.
- Identificar la factibilidad del reúso de sustrato para la producción de conidios a una escala con aplicación en producción masiva.
- Determinar el número de ciclos para reusar el sustrato manteniendo el rendimiento de producción y calidad de los conidios.
- Comparar la producción y calidad de conidios contra el método convencional.

6. Estrategia experimental

En el siguiente diagrama se representa de manera esquemática la estrategia experimental empleada.

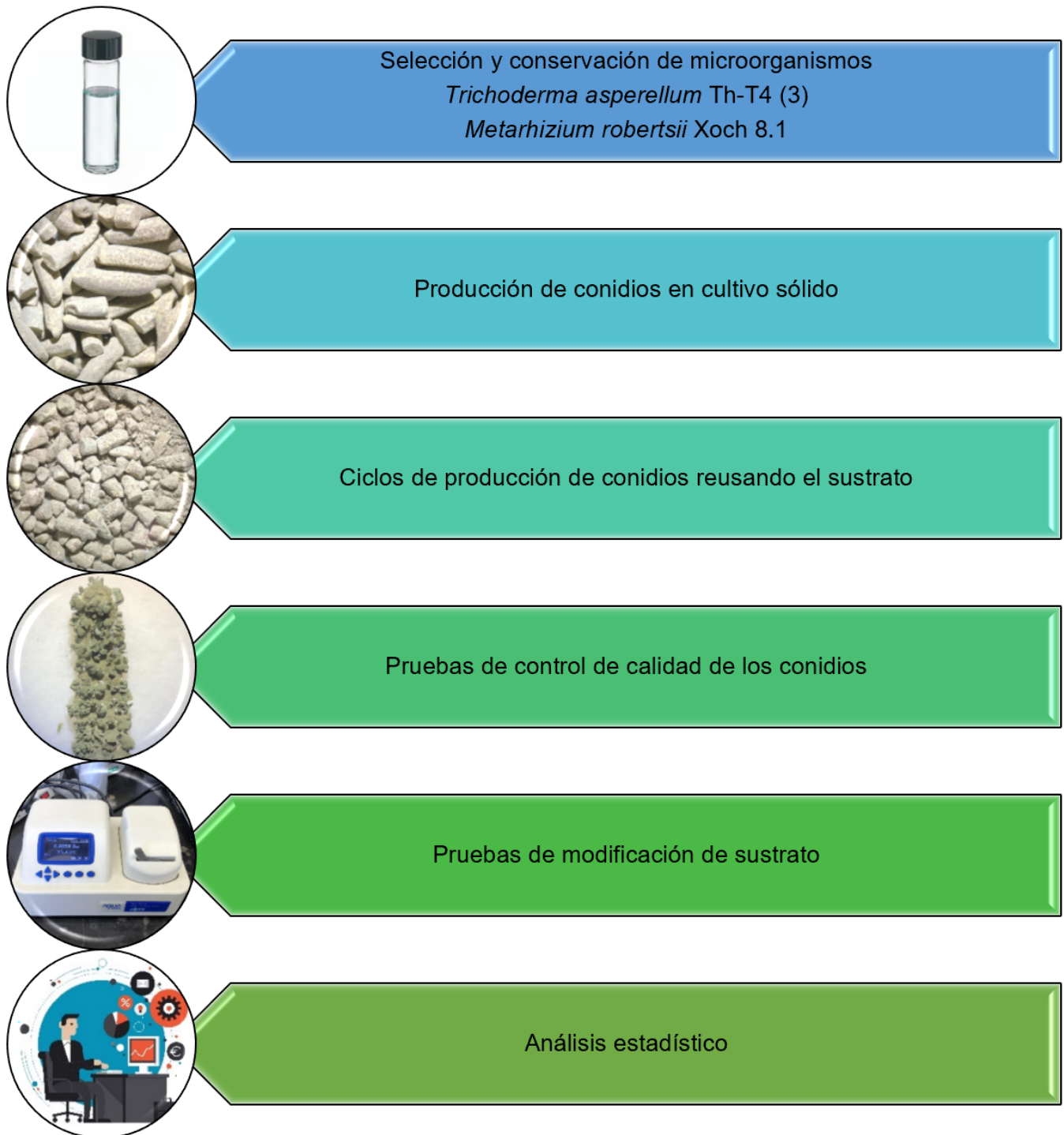


Diagrama 1. Estrategia experimental

7. Materiales y métodos

A continuación, se describen los materiales y métodos utilizados:

- **7.1 Microorganismos usados**

En este estudio se utilizaron las cepas *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) (Imagen 4) y *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 (Imagen 5) de la colección de hongos del laboratorio de Biología Molecular y Enzimología de Hongos de la UAM Iztapalapa. Ambos hongos se propagaron en cajas Petri con medio de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubaron a 28 ± 1 °C hasta que se observó un crecimiento homogéneo de 7-10 días para *Trichoderma asperellum* Th-T4 y de 8-12 días para *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 (Méndez-González *et al.* 2020). Transcurrido este tiempo se rasparon los conidios y se suspendieron en 20 mL de Tween[®] 80 estéril (0.05 % v/v), esta suspensión se utilizó como inóculo para cultivos en estado sólido.

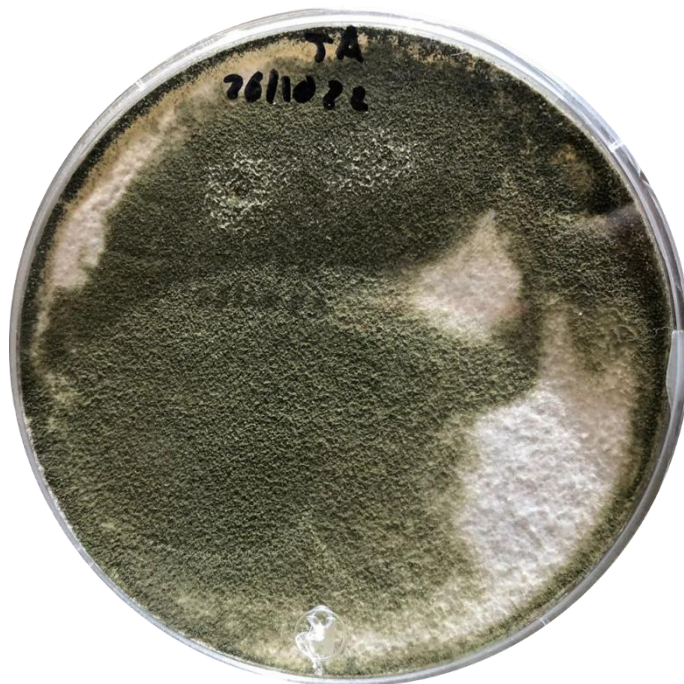


Imagen 4. *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3). Hongo antagonista de hongos fitopatógenos.



Imagen 5. *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1. Hongo entomopatógeno.

- **7.2 Conservación de las Cepas**

Para mantener los cultivos viables y libres de contaminación, se utilizó el método de conservación en agua destilada, se tomaron cajas Petri de cada cepa con crecimiento homogéneo de conidios, después con una espátula metálica estéril se cortaron 5 cuadros de 0.2 cm² de medio con conidios y se transfirieron a viales de vidrio con agua destilada, posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4 °C (Ayala-Zermeño *et al.* 2017).

- **7.3 Propagación de cepas en cultivo superficial**

A partir de los viales conservados se inocularon cajas Petri con medio ADS para cada hongo cuando fue requerido, para ello, se tomaron 400 µL de agua con conidios suspendidos y se esparcieron sobre cada placa distribuyendo homogéneamente con una varilla de Drigalsky y se incubaron a 28 ± 1 °C hasta que se observó una conidiación homogénea. Posteriormente fueron utilizados como inóculo en los medios de cultivo como se describió anteriormente (en la sección 7.1).

- **7.4 Determinación de la humedad inicial**

Se siguió la metodología que establece Gómez-Ramírez *et al.*, (2014), para la producción masiva de hongos usados en control biológico en bolsas y adecuándolo a nuestro sistema, en este caso 50 g de arroz. Se agregó una cantidad de agua conocida a las bolsas con el

sustrato: 13 mL y 14 mL para *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), respectivamente; después se esterilizaron durante 15 min y 15 psi. Una vez estéril, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 40 minutos, transcurrido ese tiempo se inocularon con 2 mL de una suspensión con una concentración a 5×10^7 con/mL, equivalente a 2×10^6 conidios/gramo de sustrato seco inicial (con/gss). Posterior a la inoculación, se mantuvieron 20 minutos a temperatura ambiente y se registró la humedad, la cual fue considerada como la humedad inicial. La determinación de la humedad del sustrato se realizó usando un analizador de humedad MA 35 Sartorius®. La humedad del sustrato se expresó en porcentaje y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% Hs = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) * (100)$$

% Hs = Porcentaje de humedad del sustrato

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

7.4.1 Humedad inicial de los ciclos de producción de reúso de sustrato

Para determinar la humedad inicial en los ciclos consecutivos de producción (los de reúso), se cuantificó dejando reposar el sustrato 20 minutos a temperatura ambiente, posterior a la extracción de los conidios (Cando-Narvaez *et al.* 2021). Para todos los casos, se llevaron a cabo 5 repeticiones y se calcularon las medias con las desviaciones estándar.

- **7.5 Determinación de la máxima producción de conidios en cultivos en arroz**

El objetivo principal de este experimento fue determinar el tiempo de máxima producción de conidios para un primer ciclo, de manera que fuera el punto de partida para los ciclos de reúso sucesivos. Por lo tanto, se realizó un diseño factorial de 2 factores los cuales fueron: el tiempo de incubación con 4 y 5 niveles para *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 y *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), respectivamente, y la edad de las suspensiones con las que fueron tratadas con 2 niveles: muestra 1 (suspensión de conidios recién cosechados) y muestra 2 (conidios con un día en refrigeración), se realizaron 3 réplicas para cada tratamiento.

Las unidades experimentales constaron de biorreactores de bolsas de polietileno de alta densidad de 17.5 x 25 cm (Imagen 6). Usando 50 g de arroz seco con una humedad inicial del 28 % y 30 %, para *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 y *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), respectivamente, en ambas cepas la cantidad de inóculo que se utilizó fue de 2×10^6 con/gss

incubando a una temperatura de 28 ± 1 °C. Las bolsas se agitaron manualmente cada 2 días para deshacer los agregados de arroz, para romper el micelio y propiciar el crecimiento de conidios de manera uniforme. La producción de conidios se cuantificó de los 6-9 días de cultivo para *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) y de los 9-13 días de cultivo para *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 (Gómez-Ramírez *et al.* 2014).

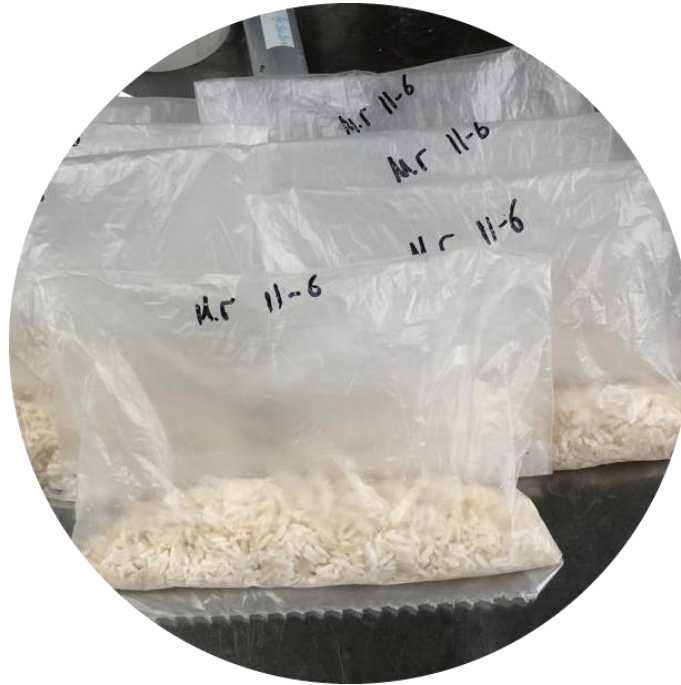


Imagen 6. Unidad experimental con 50 gss.

- **7.6 Producción de conidios en cultivos en estado sólido**

- 7.6.1 *Primer ciclo de producción*

Con los resultados obtenidos en la sección anterior (sección 7.5), se procedió a realizar la producción masiva de conidios en cultivo en estado sólido, con los tiempos de incubación establecidos donde se observó la mayor producción de conidios. Como se describió de manera similar en la sección previa (sección 7.5), las unidades experimentales consistieron en bolsas de polietileno de alta densidad de 17.5 x 25 cm que contenían 50 g de arroz como sustrato (Arroz Precocido, Verde Valle TM, Uruguay), se evaluaron 5 bolsas por cada cepa. Se agregaron 13 y 14 mL de agua a cada bolsa de *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), respectivamente, las bolsas se cerraron realizando dos dobleces en la parte superior de la bolsa y engrapándolas en ambos extremos (Imagen 6), posteriormente se esterilizaron en autoclave a 15 psi durante 15 min. Después de la esterilización, el sustrato se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 2 mL de una suspensión de conidios

que contenía 5×10^7 con/mL para ambas cepas. En estas condiciones el tamaño del inóculo fue de 2×10^6 con/gss (Méndez-González *et al.* 2020), y la humedad inicial fue de 28 %, y 30 % para *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), respectivamente (Gómez-Ramírez *et al.* 2014). El arroz se mezcló vigorosamente a mano para distribuir uniformemente el inóculo y se incubó a 28 °C durante 9 días para *M. robertsii* Xoch 8.1 y 6 días para *T. asperellum* Th-T4 (3).

Transcurrido ese tiempo, el contenido de cada bolsa (arroz conidiado) se colocó en un matraz con 250 mL de Tween® 80 estéril (0.05 % v/v), y se agitó durante 5 minutos (Imagen 7) (Super-Nuova™, Thermo Scientific™). La suspensión obtenida se decantó asegurando la eliminación de la mayor cantidad de líquido posible y cuidando que los granos de arroz permanecieran dentro del matraz. Las concentraciones de las suspensiones se determinaron utilizando un hemocitómetro con la ayuda de un microscopio a 40x (Imagen 8 y 9). Los resultados se expresaron en conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gss). Además del rendimiento de producción de conidios, se cuantificaron las siguientes variables respuesta para cada ciclo: productividad (con/gss*día), porcentaje de humedad (%), la duración de cada ciclo (días), germinación (%), viabilidad (%) actividad de agua (*A_w*) y la pérdida de peso del sustrato (%).

7.6.2 Ciclos sucesivos de producción de conidios (Reciclaje de arroz)

El arroz que quedó después de la cosecha de los conidios (considerado en adelante como “arroz reciclado”) se colocó en una nueva bolsa estéril y se volvió a incubar en las condiciones descritas anteriormente, este fue el inicio del segundo ciclo de producción de conidios. Es importante mencionar que las bolsas que contenían arroz reciclado fueron re-incubadas sin ningún tratamiento extra, es decir, sin re-esterilización, reinoculación ni ajuste de humedad. Después de la incubación, los conidios se cosecharon y contaron como se mencionó anteriormente y el arroz restante se reutilizó en un tercer ciclo.



Imagen 7. Extracción de conidios.

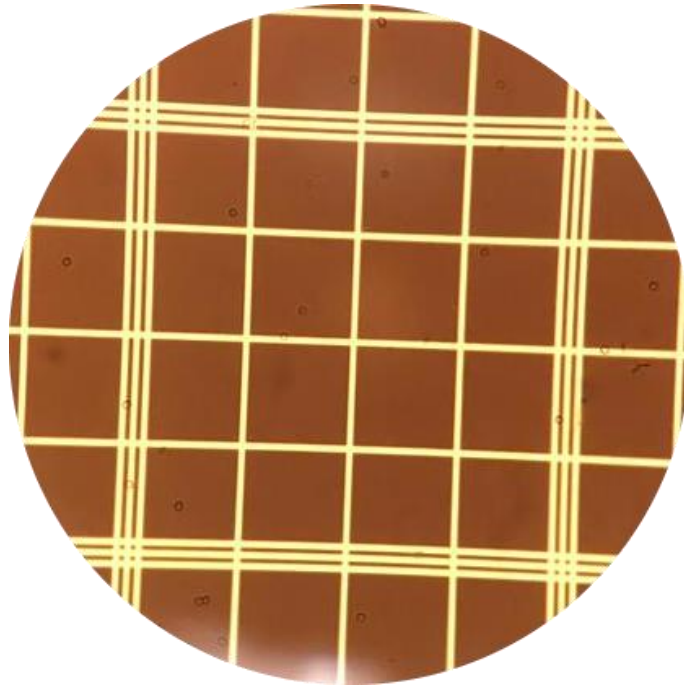


Imagen 8. Conidios típicos de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en cámara de Neubauer (hemocitómetro).

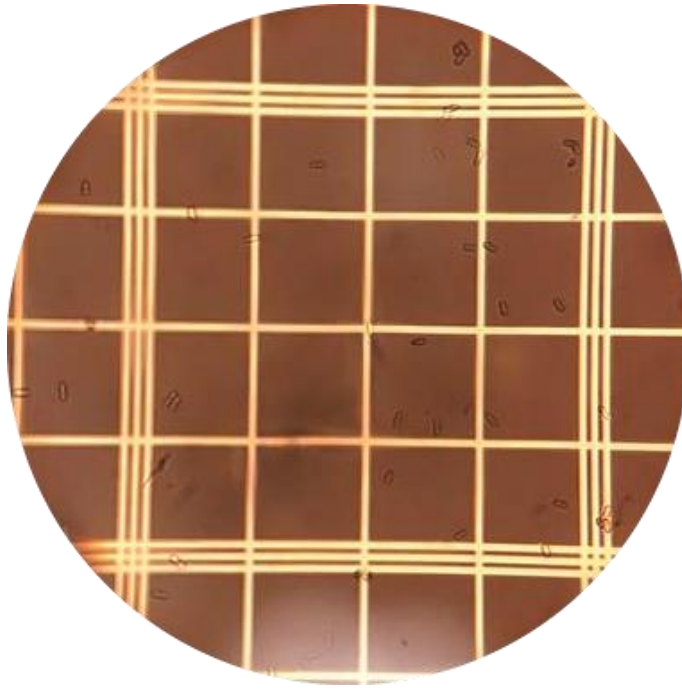


Imagen 9. Conidios típicos de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 en cámara de Neubauer (hemocitómetro).

- **7.7 Pérdida de peso del sustrato**

La pérdida de peso del sustrato se estimó al inicio de cada ciclo de producción con base en la materia seca (MS) disponible. Se evaluaron 5 muestras por ciclo, los resultados se expresaron en porcentaje y se calcularon mediante la siguiente ecuación: (Cando-Narvaez *et al.* 2021).

$$\text{MS disponible} \left(\frac{\text{g MS}}{\text{g sustrato}} \right) = \frac{(100 - \%Hs)}{100}$$

Donde:

MS disponible: Materia seca disponible

gMS: Gramos de materia seca

gSustrato: Gramos de sustrato

$$\%Hs = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} (100)$$

Donde:

%Hs: Porcentaje de humedad del sustrato

Pi: Peso inicial del sustrato

Pf: Peso final del sustrato

- **7.8 Actividad de agua (Aw)**

La actividad de agua del sustrato se cuantificó al inicio de cada ciclo de producción usando un analizador de actividad de agua (AquaLab 4[®] TE) (Imagen 10) (Dagno *et al.* 2010; Nuñez-Gaona *et al.* 2010), se analizaron 5 muestras por ciclo.



Imagen 10. Analizador de actividad de agua (AquaLab[®] 4 TE).

- **7.9 Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

Como muestras para su análisis, se tomaron granos de arroz después de la extracción de los conidios para cada ciclo de producción. El sustrato se fijó durante un día en glutaraldehído al 2.5 % (v/v) a 4 °C, posteriormente se realizaron tres lavados con amortiguador de fosfatos (PBS 1X) (pH 7.4, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.5 mM), se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1 % (v/v) en PBS por dos horas; a continuación, el sustrato se deshidrató en un tren de soluciones de etanol

del 30 % al 100 % durante 10 minutos 2 veces para cada concentración, en intervalos de aumento de 10 %. Las muestras se secaron a su punto crítico con CO₂ (Autosamdri®-815, Series A) y fueron recubiertas con oro (DENTON VACUUM Desk III). Las muestras de sustrato se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 5900 en el laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Los granos de arroz se montaron de tal forma que se pudiera visualizar tanto la parte superficial como la transversal (Imágenes 11 y 12) respectivamente.

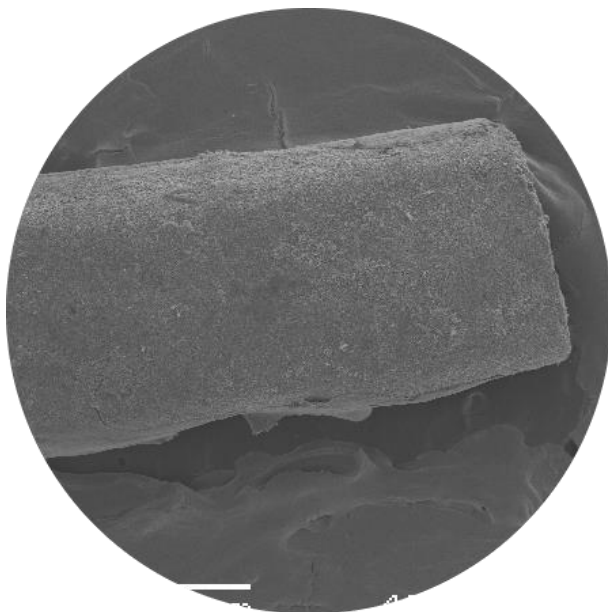


Imagen 11. Sustrato de manera superficial.

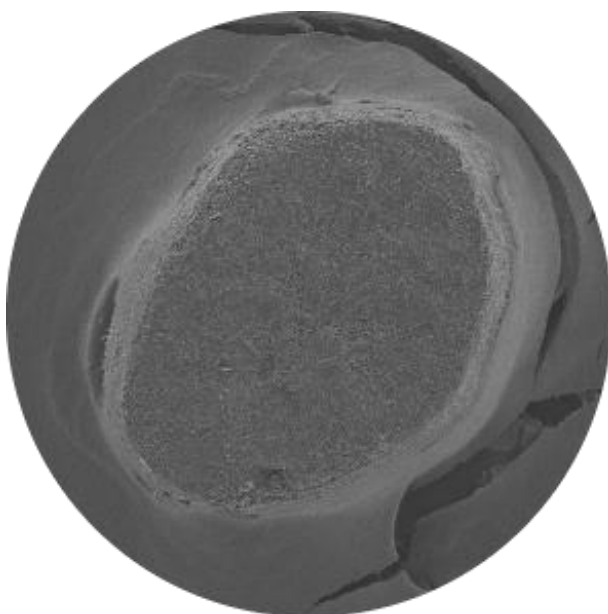


Imagen 12. Sustrato de manera transversal.

- **7.10 Germinación**

La germinación se evaluó a partir de cinco réplicas independientes de conidios de ambas cepas. Después de cosechar los conidios como se describió anteriormente (sección 7.6 Producción de conidios), las suspensiones se ajustaron a 1×10^6 con/mL, luego se agregaron 50 μ L de la suspensión se distribuyeron homogéneamente en cajas Petri que contenían agar estéril al 2 %, y se incubaron durante 20 h y 18 h a 28 °C para *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), respectivamente (Cando-Narvaez *et al.* 2021). Se cortaron secciones de agar de aproximadamente 2 cm² y se contaron 100 conidios utilizando un microscopio a 40X (Boeco, Alemania). Se consideró que los conidios habían germinado si la longitud del tubo germinativo era mayor que el diámetro de los conidios (Ibrahim *et al.* 2002).

- **7.11 Viabilidad**

Los conidios de cinco repeticiones independientes se recolectaron como se describió anteriormente (sección 7.6 Producción de conidios), y las suspensiones se ajustaron a 1×10^4 con/mL, luego se agregaron 10 μ L de la suspensión (100 conidios) a cajas de Petri que contenían ADS, y las cajas se incubaron a 28 °C. Después de 72 h, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se determinó el porcentaje de viabilidad. Esta prueba se realizó solo para *M. robertsii* Xoch 8.1 (Muñiz-Paredes *et al.* 2016).

Esta prueba de calidad no se llevó a cabo *Trichoderma asperellum*, debido a que su morfología y rápida velocidad de crecimiento dan lugar al entrecruzamiento entre sus hifas en menos de 24 h, lo que impide observar y cuantificar las UFC.

7.12 Bioensayos

7.12.1 Infectividad

Se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), las cuales fueron desinfectadas con Tween® 80 al 0.05 % y posteriormente con hipoclorito de sodio al 0.1 %, cada lavado durante 15 segundos. Después de cosechar los conidios como se describió anteriormente (sección 7.6 Producción de conidios), se prepararon suspensiones de conidios de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 con las siguientes concentraciones (1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6) con/mL. Las larvas se sumergieron durante 20 segundos en una suspensión de conidios de 20 mL, como control se utilizó una solución al 0.05 % de Tween® 80 sin conidios. Las unidades experimentales consistieron en placas Petri que contenían 5 larvas, se añadió salvado de trigo como alimento y se realizaron diez réplicas por cada tratamiento

(Imagen 13). Las placas se mantuvieron a 28 °C, con un fotoperíodo de 12:12 h. Las larvas fueron monitoreadas durante 15 días. La mortalidad se registró diariamente y las larvas muertas se transfirieron a cámaras húmedas para estimular la esporulación externa con el fin de confirmar que la muerte se debió a una infección fúngica. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de decaimiento (Rodríguez-Gómez *et al.* 2009):

$$Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S$$

$$Y = 100 \text{ si } 0 \leq t \leq t_0$$

Donde Y es el porcentaje de supervivencia al tiempo t; k es la tasa específica de muerte (d^{-1}); t_0 es el tiempo en el que murió la primera larva (d) y S es la supervivencia final asintótica (%). Para la suspensión de conidios alta (1×10^8 con/mL), se calculó el tiempo que tardó en morir el 50 por ciento de las larvas estudiadas (tiempo letal 50 (TL_{50})), así como la concentración de la suspensión de conidios necesaria para matar el 50 por ciento de las larvas (dosis letal 50 (DL_{50})) con el método aritmético Reed-Muench.



Imagen 13. Caja Petri con larvas de *Tenebrio molitor* y salvado de trigo.

7.12.2 Prueba de antagonismo

El enfrentamiento entre *T. asperellum* Th-T4 (3) y *Fusarium oxysporum* AB2 se realizó en cajas Petri con ADS a 28 ± 1 °C y un periodo de luz:oscuridad 12:12. Se inocularon 0.5 μ L

de una suspensión de conidios de 1×10^5 con/mL de ambas cepas. En el caso de *T. asperellum* Th-T4 (3), las suspensiones se obtuvieron de la misma manera descrita anteriormente (sección 7.6 Producción de conidios), para las suspensiones de conidios de *Fusarium oxysporum* AB2 se obtuvieron de cajas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con 7 días de crecimiento. Primero se inoculó *Fusarium oxysporum* AB2 y se le dio una ventaja de crecimiento de 6 días, posteriormente se inoculó *T. asperellum* Th-T4 (3). El antagonismo se evaluó a partir de diez réplicas independientes. El crecimiento radial se midió diariamente usando un calibrador Vernier y se determinó la tasa de crecimiento en milímetros por día (mm/d) (Reynoso-López *et al.* 2022).

- **7.13 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, los valores medios se presentan con desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza de una vía o la prueba *t* para detectar la diferencia entre los tratamientos, y las medias se compararon con el análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Number Cruncher Statistical System (2020) (NCSS) (Utah, EE. UU.).

- **8. Resultados y Discusión**

***Metarhizium robertsii* Xoch-8.1**

Primeramente, se muestran todos los resultados obtenidos para *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1. Para comenzar, se describen los resultados obtenidos para los rendimientos de producción de conidios en los ciclos logrados.

- **8.1 Rendimiento de producción**

El hongo entomopatógeno *M. robertsii* Xoch-8.1 tuvo cuatro ciclos sucesivos de producción de conidios (Tabla 1). Para el primer ciclo empleando sustrato nuevo se alcanzó un rendimiento de producción de 2.54×10^9 con/gss, teniendo una duración de 9 días, lo cual corresponde a una productividad de 2.7×10^8 con/gss•día. En el segundo ciclo (arroz reusado) el hongo creció más rápidamente y ambos parámetros aumentaron de manera significativa, siendo el rendimiento de producción 1.5 veces mayor al primer ciclo con 3.84×10^9 con/gss en 7 días, y una productividad de 5.5×10^8 con/gss•día, lo que representa el doble de productividad que el registrado en el primer ciclo. Para el tercer ciclo consecutivo de producción, se observó una caída pronunciada de la producción de 1.7×10^8 con/gss en 9 días, disminuyendo también la productividad a 1.9×10^7 con/gss•día, de la misma manera para el cuarto ciclo el rendimiento de producción fue aún menor al ciclo previo de un orden de magnitud, obteniendo 2.3×10^7 con/gss en 9 días con una productividad de 1.8×10^6 con/gss•día.

En total se obtuvo un rendimiento de producción acumulado de 6.54×10^9 con/gss reusando el sustrato en tres ocasiones (arroz), esto es aproximadamente 7 veces mayor a lo obtenido por Méndez-González *et al.*, (2018) con 0.88×10^9 con/gss y más del doble de los resultados reportados por Ibrahim *et al.*, (2015) con 2.9×10^9 con/gss, en ambos casos usando *Metarhizium anisopliae* y arroz nuevo en bolsas en un único ciclo de producción.

Por otro lado, en estudios previos de reúso de sustrato usando *Metarhizium anisopliae* se observó un comportamiento similar en cuanto al rendimiento de producción, hay un ligero aumento en el segundo ciclo y en consecuencia una mayor productividad. Usando como sustrato arroz con bagazo en un biorreactor de lecho empacado, Portilho-da-Cunha *et al.*, (2020) reportaron un rendimiento de 3.25×10^9 con/gss con una productividad de 3.25×10^8 con/gss•día en el primer ciclo, aumentando a 3.45×10^9 con/gss y 3.4×10^8 con/gss•día, respectivamente para el segundo ciclo. Aunque el sustrato se secó, posteriormente se esterilizó y re-inoculó para su uso en el segundo ciclo. Por su parte, usando arroz con melaza en bolsas, Barra *et al.*, (2016) lograron un rendimiento de producción de 2.4×10^9

con/gss con una productividad de 1.2×10^8 con/gss•día, aumentando a 2.7×10^9 con/gss y 1.3×10^8 con/gss•día respectivamente con sustrato reusado, no obstante el sustrato se reacondicionó con una esterilización, ajustando su humedad y re-inoculando para el ciclo de reúso, en ambos estudios la productividad es al menos 1.5 veces menor que la mayor productividad obtenida en nuestro estudio (ciclo 2) (5.5×10^8 con/gss•día).

Además, en nuestro caso el aumento en la productividad se debió tanto al incremento en el rendimiento de producción, como a la disminución en el tiempo de duración del segundo ciclo. Lo anterior muestra que el proceso es más eficiente, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Cando-Narvaez *et al.*, (2021) utilizando *Metarhizium robertsii* a una escala de laboratorio en frascos de 120 mL con 2.5 g de arroz, donde obtuvieron 5.7×10^8 con/gss en 10 días usando sustrato nuevo, incrementándose a 1.4×10^9 con/gss en menor tiempo (6 días) con sustrato reusado, esto equivale a una productividad de 5.7×10^7 con/gss•día y 2.3×10^8 con/gss•día, respectivamente. En esta metodología no se requirieron pasos adicionales de tratamiento para el sustrato reciclado, solo se incubó posterior a la cosecha de los conidios, estos valores representan dos veces menos de lo obtenido en nuestro estudio, por lo que usando el mismo hongo se obtuvieron mejores resultados en una escala de producción mayor. El incremento en el rendimiento de producción para el segundo ciclo en todos estos estudios se puede atribuir a diversas causas. Por ejemplo, el tamaño de partícula del sustrato indudablemente se encontraba más fragmentado, proporcionando una mayor área para la conidiación (Imagen 15 A). También el hongo se encontraba mejor adaptado al sustrato para el segundo ciclo, probablemente con presencia de enzimas hidrolíticas (amilasas) que permitían acceder más fácilmente al sustrato, por lo cual el periodo de latencia fue menor o nulo, además de que se pudieron haber generado algunos compuesto volátiles orgánicos (COV's) que propician la conidiación fúngica y que podrían estar en mayor proporción durante el segundo ciclo (Cando-Narvaez *et al.* 2021; Portilho-da-Cunha *et al.* 2020; Krujer *et al.* (2014). Asimismo, los cambios que sufrió el sustrato al paso de los ciclos son determinantes tanto para la morfología y fisiología de los hongos, lo cual se discute más adelante.

Tabla 1. Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 en ciclos consecutivos.

Ciclos de producción de conidios			
Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4

Duración del ciclo (días)	9	7	9	9
Rendimiento de producción (con/gss)	$2.51 \times 10^9 \pm 0.86 \times 10^9$ b	$3.84 \times 10^9 \pm 0.99 \times 10^9$ a	$1.7 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ c	$2.3 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^7$ d
Productividad (con/gss*día)	$0.28 \times 10^9 \pm 0.1 \times 10^9$ b	$0.55 \times 10^9 \pm 0.14 \times 10^9$ a	$1.9 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$ c	$2.2 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$ d

Medias (\pm DE) seguidas de la misma letra dentro de la misma fila no son significativamente diferentes según el método de Tukey ($P < 0.05$).

Por último, se muestran imágenes de la apariencia del sustrato antes y después de la extracción para cada ciclo.

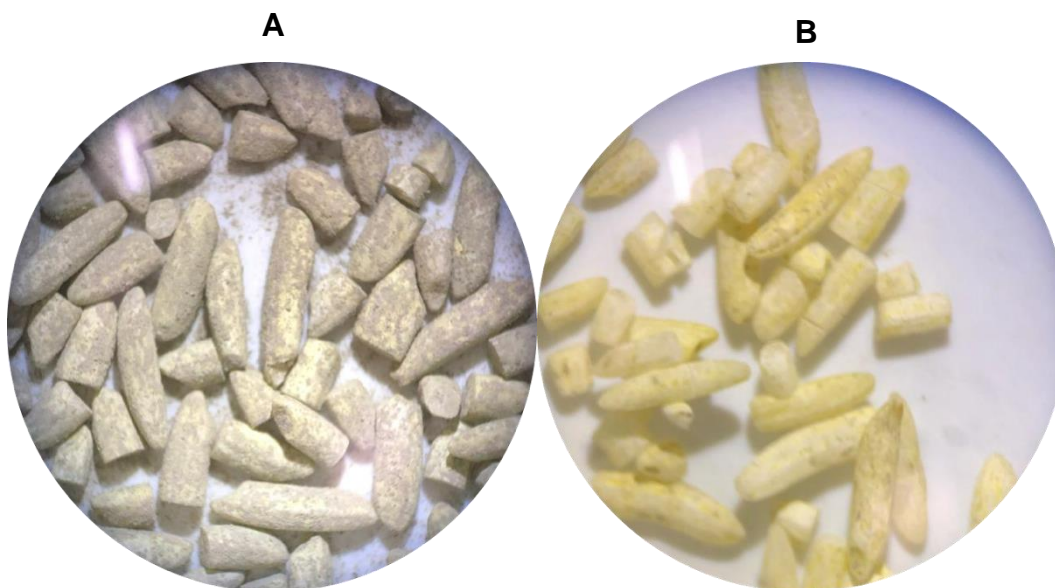


Imagen 14. Ciclo 1 día 9, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, apariencia del sustrato. A) antes de la extracción, B) después de la extracción.

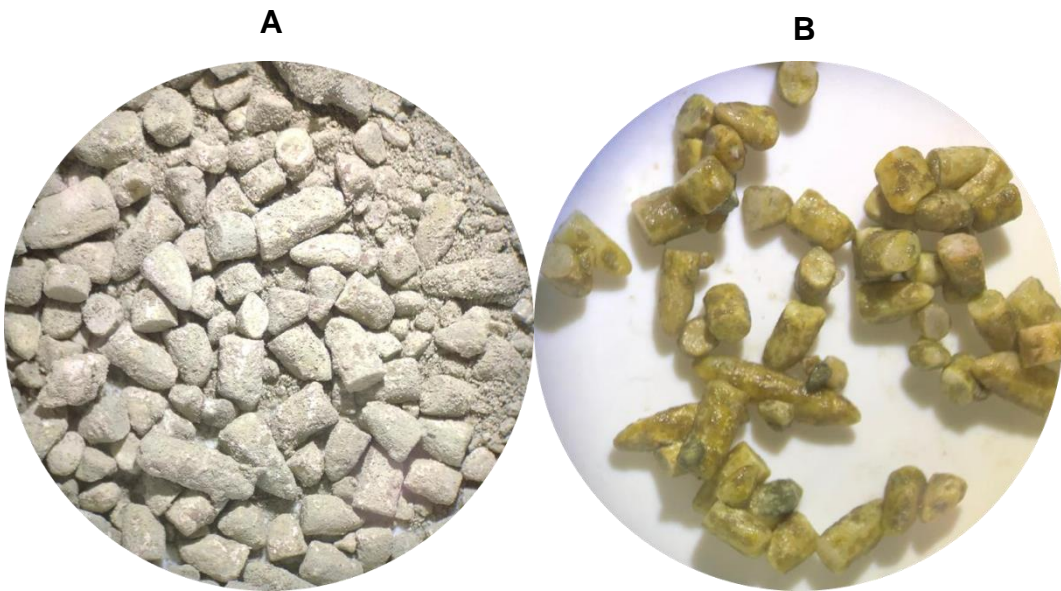


Imagen 15. Ciclo 2 día 7, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, apariencia del sustrato. A) antes de la extracción, B) después de la extracción.

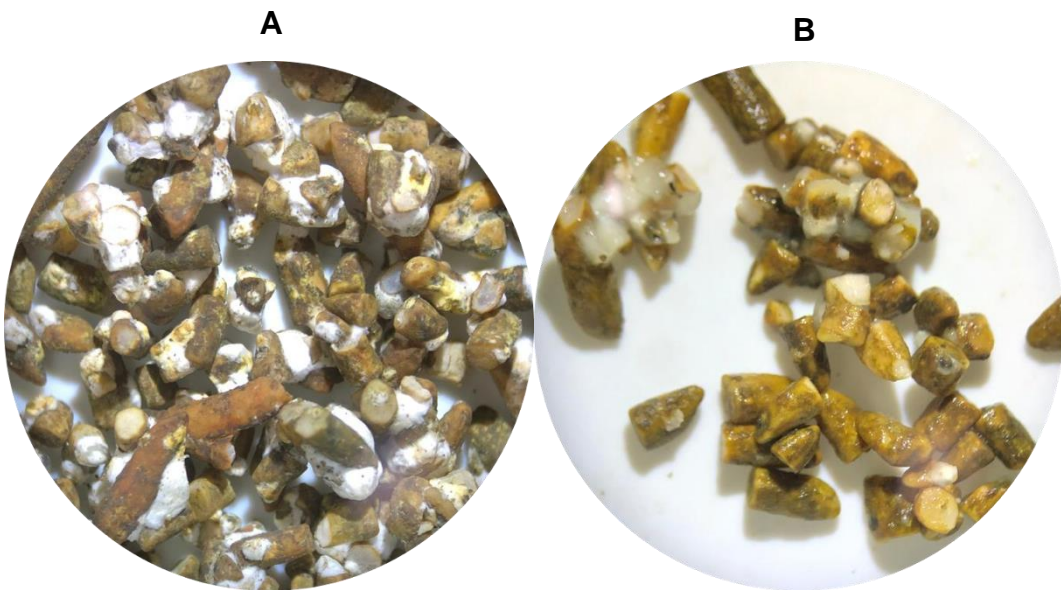


Imagen 16. Ciclo 3 día 9, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, apariencia del sustrato. A) antes de la extracción, B) después de la extracción.

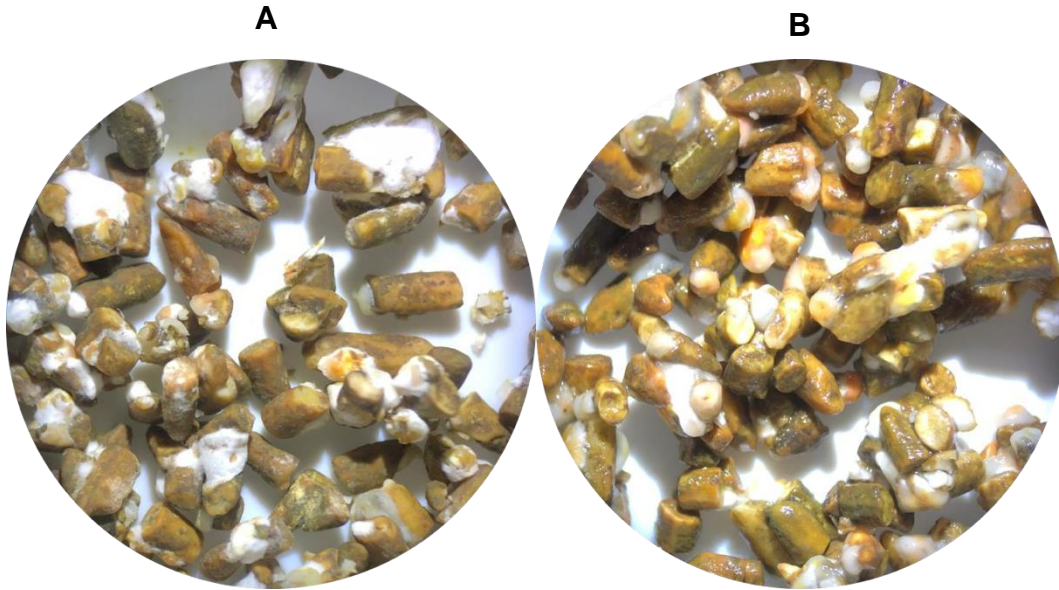


Imagen 17. Ciclo 4 día 9, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, apariencia del sustrato. A) antes de la extracción, B) después de la extracción.

En la siguiente sección se muestran los perfiles de humedad al paso de los ciclos.

- **8.2 Perfiles de humedad**

En el Gráfico 1 y en la Tabla 2 se muestra la relación entre los perfiles de producción de conidios y los cambios en la humedad del sustrato a cada ciclo de reciclaje de arroz. Los valores de humedad inicial donde se obtuvieron rendimientos de conidios adecuados para la producción masiva fueron del 27 % para el primer ciclo (arroz nuevo) y del 37 % en el segundo con arroz reutilizado; posteriormente para los siguientes ciclos con arroz reutilizado en los ciclos 3 y 4 la humedad aumentó considerablemente siendo del 48 % y 56 %, respectivamente, y el rendimiento de conidios se redujo significativamente. Estudios previos han mostrado la importancia de una correcta humedad en los cultivos sólidos para obtener resultados sobresalientes en la producción de conidios, ya que el sustrato se modifica con el incremento de la humedad. Esto genera aglomeraciones que dificultan la solubilización de los nutrientes, el crecimiento fúngico y, en consecuencia, repercute en la cantidad de conidios producidos. Este fenómeno fue reportado por Santi *et al.*, (2011), logrando dos ciclos consecutivos de producción de conidios con *Metarhizium anisopliae*, siendo hasta el tercer ciclo donde hubo una recuperación menor de conidios. Esto se atribuyó a que el exceso de humedad en el sustrato causó que éste se aglomerara y adquiriera una consistencia pastosa, dificultando el crecimiento y la recuperación de los

conidios. En el mismo sentido, Cando-Narvaez *et al.*, (2021) usando *Metarhizium robertsii* reportaron resultados similares con diferentes niveles de humedad reusando arroz, teniendo el mayor rendimiento de producción de conidios en el segundo y tercer ciclo, con humedades iniciales del 43 % y 50 %, respectivamente, disminuyendo para el cuarto ciclo con una humedad del 57 % a causa de las modificaciones en el sustrato por el aumento de humedad, que termina con una consistencia pastosa. En nuestro estudio se observaron las agregaciones de arroz a partir del tercer ciclo, además de la aparición de algunas estructuras no antes vistas en el sustrato (puntos blancos) (Imagen 16) y manifestándose en mayor proporción ambos comportamientos para el cuarto ciclo, unos de los motivos por los cuales pudo haber decaído tan pronunciadamente la producción para estos ciclos.

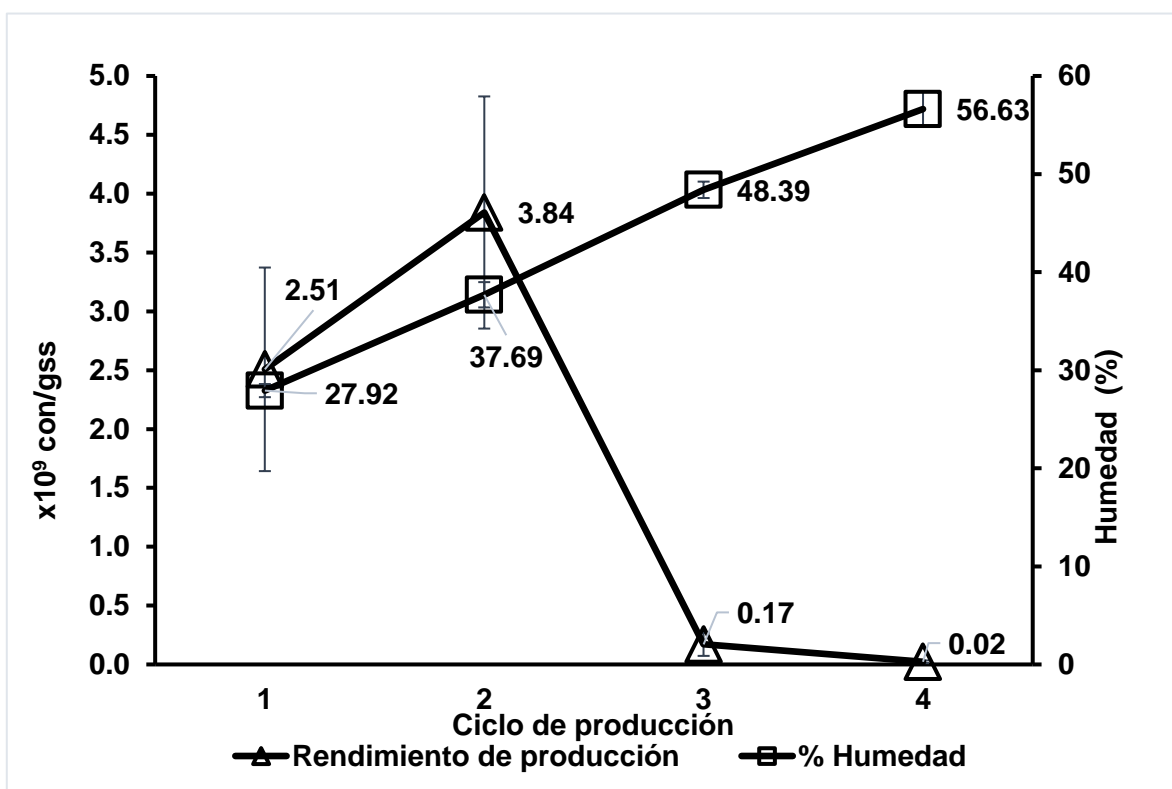


Gráfico 1. Rendimiento de producción de conidios (con/gss) de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 en cada ciclo de reúso de sustrato. Se muestra la Humedad (%) en el eje secundario derecho.

Tabla 2. Porcentaje de humedad y rendimiento de producción de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 para cada ciclo.

Ciclo	Humedad (%)	Rendimiento de producción (con/gss)
1	27.92 ± 0.67 e	2.51x10 ⁹ ± 0.86x10 ⁹ b

2	37.69 ± 1.29 d	3.84x10 ⁹ ± 0.99x10 ⁹ a
3	48.39 ± 0.84 c	0.17x10 ⁹ ± 0.10x10 ⁹ c
4	56.63 ± 1.75 b	0.02x10 ⁹ ± 0.012x10 ⁹ c
Final ciclo 4	62.49 ± 1.55 a	NA

Medias (±DE) seguidas de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el método de Tukey (P < 0.05). NA no aplica.

A continuación, se especifican los valores de actividad de agua iniciales para cada ciclo.

- **8.3 Actividad de agua (Aw)**

El sustrato inicial en los primeros dos ciclos de producción presentó una Aw de 0.9864 y 0.988 respectivamente, dando lugar a rendimientos de producción elevados. Posteriormente se observó una disminución importante en la producción de conidios para el tercer y cuarto ciclo, con valores significativamente más altos de actividad de agua de 0.998 y 0.999 respectivamente (Tabla 2 y Gráfico 5). La actividad de agua es un factor importante que determina el crecimiento de los hongos ya sea propiciando la generación de conidios (conidiogénesis) o el crecimiento en forma de micelio. Con respecto a ello Dorta *et al.*, (1990) reportaron que el rango óptimo de actividad de agua para la producción de conidios en *Metarhizium anisopliae* se encuentra entre 0.995-0.998. Considerando los rendimientos de producción obtenidos en nuestro estudio, con ayuda de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, se puede observar que para nuestra cepa existe una mayor producción de conidios con niveles de actividad de agua bajos (los primeros dos ciclos), posteriormente hubo mayor crecimiento en forma de hifas, y algunas otras formas de micelio para el tercer y cuarto ciclo en condiciones de actividad de agua superiores.

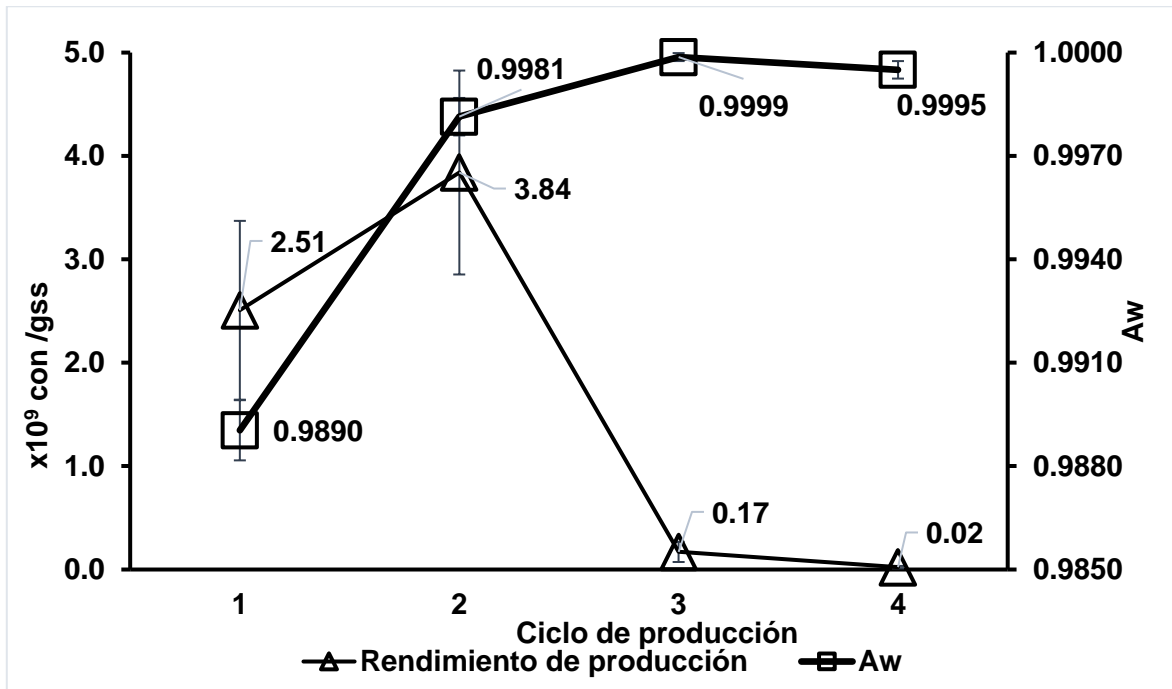


Gráfico 5. Rendimiento de producción (con/gss) de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 en cada ciclo de reuso de sustrato. Se muestra la actividad de agua en el eje secundario derecho.

Tabla 2. Actividad de agua y rendimiento de producción de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 para cada ciclo.

Ciclo	Aw	Rendimiento de producción (con/gss)
1	0.9890 ± 0.0009 c	2.51x10 ⁹ ± 0.86x10 ⁹ b
2	0.9981 ± 0.0005 b	3.84x10 ⁹ ± 0.99x10 ⁹ a
3	0.9999 ± 0.0001 a	0.17x10 ⁹ ± 0.10x10 ⁹ c
4	0.9995 ± 0.0003 a	0.02x10 ⁹ ± 0.012x10 ⁹ c

Medias (±DE) seguidas de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el método de Tukey (P < 0.05).

En la siguiente sección se describe la calidad de los conidios producidos en términos de su porcentaje de germinación y capacidad para formar colonias.

8.4 Pruebas de germinación

Con respecto a la germinación de los conidios de *Metarhizium robertsii*, se obtuvieron valores superiores al 90 % en todos los ciclos de producción (Gráfico 2), siendo hasta el cuarto ciclo donde hubo un decaimiento estadísticamente significativo, sin embargo, el porcentaje de germinación permaneció por arriba del 90 %, alcanzando un 93.6 %. Estos resultados fueron similares a lo obtenido por Cando-Narvaez *et al.*, (2021), con la misma cepa consiguieron mantener la calidad de los conidios reusando arroz en 4 ciclos consecutivos, con 89 % de germinación en medio agar-agua. En contra parte, empleando *Metarhizium anisopliae*, Kruger *et al.*, (2014) obtuvieron una disminución en la calidad de los conidios reusando el sustrato, teniendo un porcentaje de germinación en medio PDA del 95.09 % en comparación con arroz nuevo con 97.98 %.

Los resultados de nuestro estudio superan a la germinación de conidios de *Metarhizium robertsii* reportada por Reynoso-López *et al.* (2022). Estos autores alcanzaron un porcentaje de germinación del 85 % en medio ADS, asimismo Jenkins & Grzywacz (2000) establecen que, para tener un producto de calidad con aplicación en el control biológico, la germinación debe ser igual o mayor al 85 %, valor superado en los cuatro ciclos de producción logrados. Así pues, la técnica de reúso de arroz desarrollada no afecta la germinación de los conidios al paso de los ciclos.

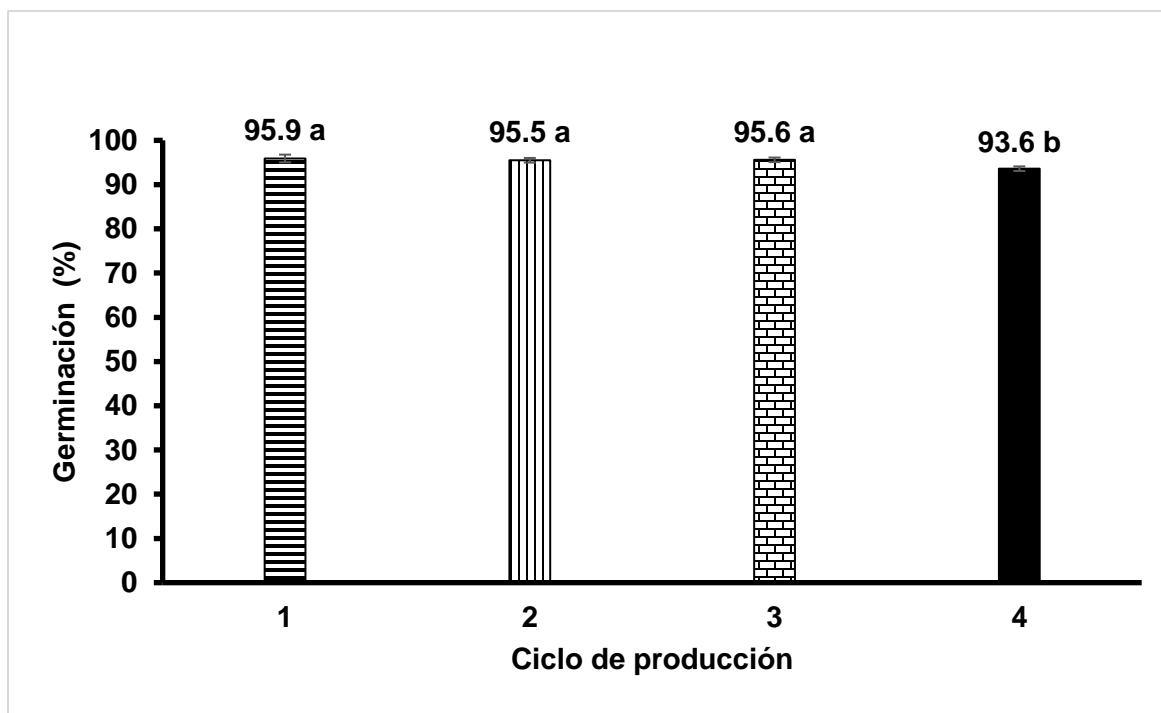


Gráfico 2. Porcentaje de germinación de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 para cada ciclo. (1) arroz nuevo, (2) arroz reutilizado, (3) tercer ciclo, (4) cuarto ciclo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En la siguiente sección se muestran los perfiles de viabilidad obtenidos para cada ciclo de producción.

- **8.5 Perfiles de viabilidad**

Los resultados obtenidos para la viabilidad de los conidios al transcurso de los ciclos se presentan en el Gráfico 3. En los primeros tres ciclos la viabilidad fue superior al 99 %, con un ligero decremento, aunque estadísticamente diferente en el último ciclo de producción (98.2 %). Estos resultados corroboran la viabilidad de los conidios cosechados en todos los ciclos, es decir, esto indica que los conidios son capaces de desarrollar unidades formadoras de colonias bajo diferentes condiciones de producción, conservando los parámetros de calidad considerados como buenos para su uso en el control biológico (Jenkins & Grzywacz. 2000).

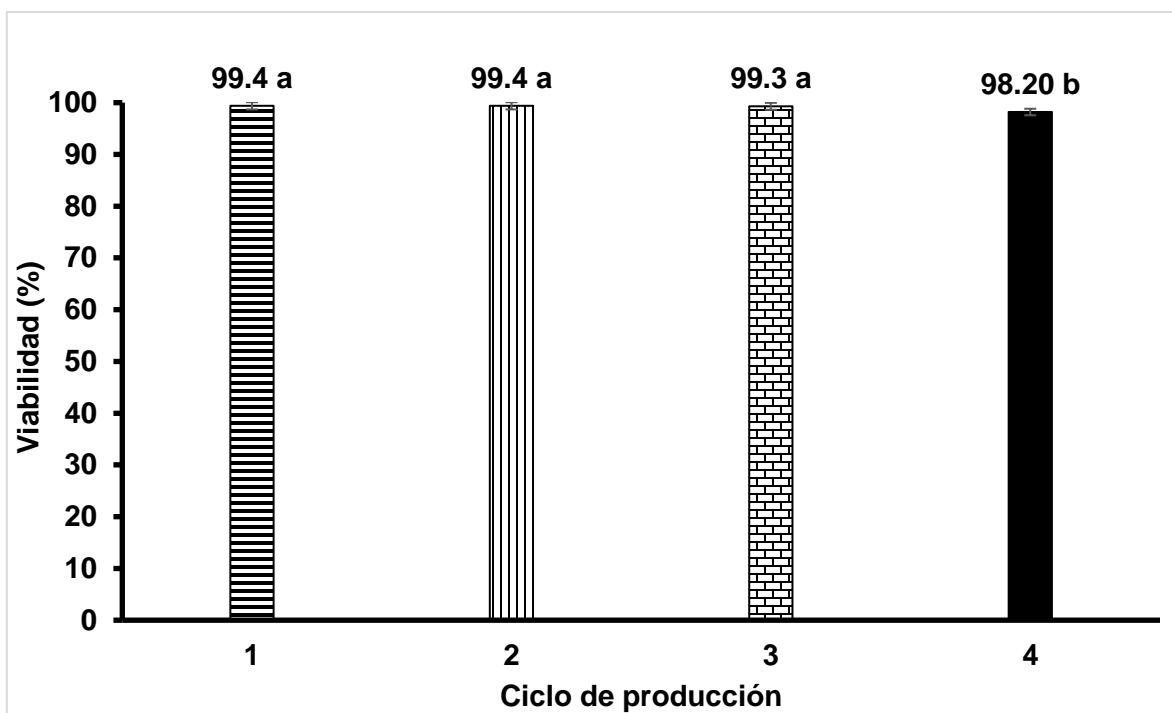


Gráfico 3. Porcentaje de viabilidad de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 para cada ciclo. (1) arroz nuevo, (2) arroz reutilizado, (3) tercer ciclo, (4) cuarto ciclo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A continuación, los resultados de la pérdida de peso de sustrato en cada ciclo.

- **8.6 Pérdida de peso de sustrato en cada ciclo**

En el Gráfico 4 muestra la reducción del sustrato al paso de los ciclos para *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1. Al final del primer ciclo se perdió el 13.56 % del peso inicial, posteriormente en el segundo ciclo se registró la mayor pérdida (14.84 %), y para el tercer y cuarto ciclos consecutivos de producción se obtuvieron pérdidas del 11.4 % y 8.13 %, respectivamente, lo que de forma acumulada resultó en una pérdida total del 47.96 % en los cuatro ciclos, es decir, el hongo consumió casi la mitad del sustrato inicial. En otro estudio, usando el mismo hongo y condiciones similares de cultivo Cando-Narvaez *et al.*, (2021) reportaron una pérdida total de arroz del 48 % después de cuatro ciclos de producción sucesivos, encontrándose una pérdida de sustrato de 15 %, 22 %, 9 % y 2 % respectivamente para cada ciclo. En ambos estudios coincidió que la mayor pérdida de sustrato se registró durante el segundo ciclo, momento en el cual también se obtuvo el mayor rendimiento de producción de conidios. Por otro lado, Portilho-da-Cunha *et al.*, (2020) con *Metarhizium anisopliae* lograron una pérdida total de sustrato del 47 % en dos ciclos seguidos de producción de conidios, siendo del 24 % para el primer ciclo y del 23 % para el segundo ciclo, manteniendo los rendimientos de producción de conidios.

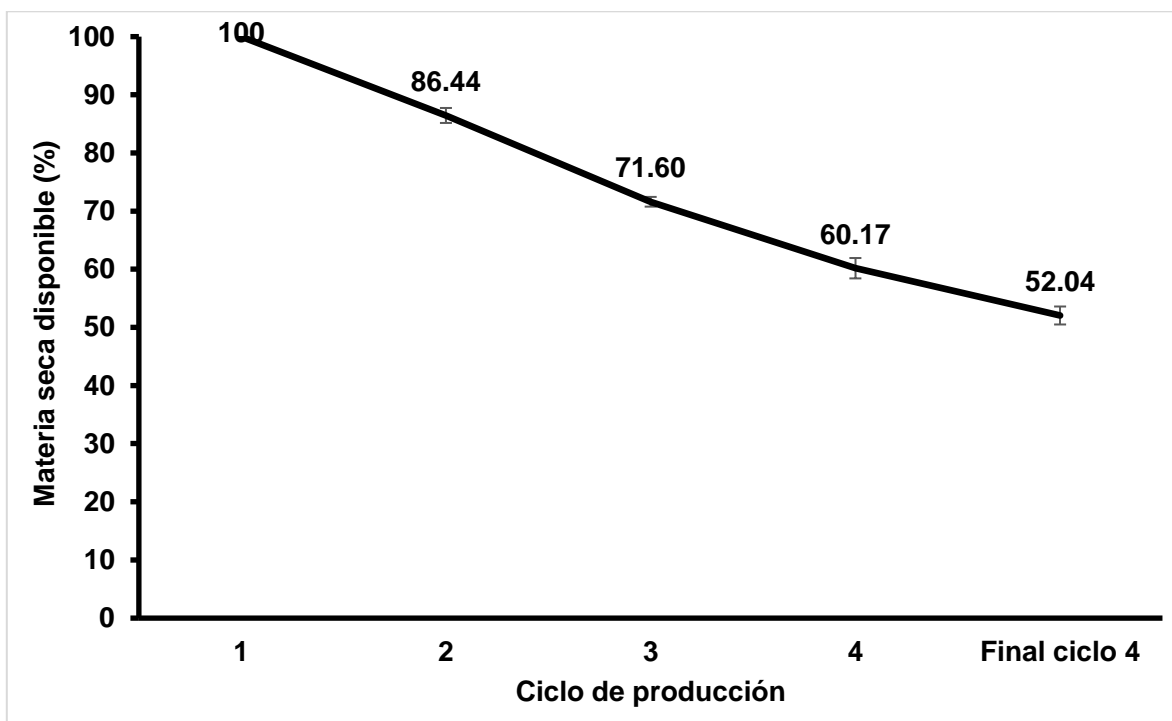


Gráfico 4. Materia seca disponible inicial (%) para cada ciclo de producción con *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1

En la siguiente sección se describirán los resultados obtenidos para el ensayo de infectividad realizado.

- **8.7 Bioensayo (infectividad)**

La suspensión a la concentración media 1×10^7 con/mL es usualmente la más utilizada en los bioensayos de infectividad (Toledo *et al.* 2021), sin embargo, en este estudio el empleo de otras concentraciones permitió tener un mayor conocimiento de la calidad infectiva de *M. robertsii* y su conservación o pérdida al paso de los ciclos.

Suspensión alta (1×10^8 con/mL)

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para la suspensión con la concentración más alta (1×10^8 con/mL) después de 15 días. Los niveles de mortalidad de las larvas de *Tenebrio molitor* obtenidos fueron del 55 % (S=45 %) con arroz nuevo, elevándose estadísticamente para el segundo ciclo con arroz reusado a 63 % (S=37 %), por otra parte, no se registraron diferencias significativas entre los valores de TL_{50} y las DL_{50} fueron 7.4×10^7 con/mL y 6.7×10^7 con/mL respectivamente. Existen resultados similares por Praprotnik *et al.*, (2021) con *Metarhizium robertsii* empleando una suspensión a la misma concentración (1×10^8 con/mL), con la mortalidad de larvas de *Tenebrio molitor* de 58 % a los 14 días. También, usando los mismos parámetros (concentración de conidios e insecto), pero con *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), Altahawi *et al.*, (2020) lograron una mortalidad del 64 % en 10 días. Estos porcentajes de mortalidad no son tan altos en comparación por lo mostrado con cepas más virulentas como *Metarhizium robertsii* 2637 con 84 %, *Metarhizium brunneum* F52 con el 87 % y *Metarhizium brunneum* 1154 con el 100 % (Praprotnik *et al.* 2021; Bharadwaj y Stafford III. 2011;), en todos estos casos usando una concentración de conidios de 1×10^8 con/mL; sin embargo, es importante destacar que este es el primer estudio donde se muestra que la estrategia de reusar el sustrato es más eficiente a una escala con aplicación masiva, sin tener afectaciones en la calidad (germinación, viabilidad y virulencia) de los conidios, por lo que sería recomendable evaluar esta estrategia en los casos de las cepas más virulentas empleadas para el control biológico.

Tabla 3. Resultados obtenidos para cada ciclo usando la suspensión con la concentración alta 1×10^8 con/mL.

Ciclo	k (d ⁻¹)	t_0 (d)	TL_{50} (d)	S (%)	DL_{50} (con/mL)
1	0.51 ± 0.06 a	3.17 ± 0.72 a	11.45 ± 0.75 a	44.69 ± 1.63 a	7.4×10^7

2 0.43 ± 0.03 a 3.40 ± 0.75 a 11.28 ± 0.5 a 36.7 ± 1.86 b 6.7×10^7

Donde k es la tasa específica de muerte, t_0 es tiempo en que el primer insecto muere TL_{50} es el tiempo letal 50, S es la sobrevivencia estimada asintótica y DL_{50} es la dosis letal 50. Diferentes letras representan diferencias entre los tratamientos para cada parámetro (prueba de Tukey $p < 0.05$)

Suspensión media (1×10^7 con/mL)

Por su parte los resultados para la suspensión con concentración media de conidios (1×10^7 con /mL) se visualizan en la Tabla 4, se obtuvo un porcentaje de muerte del 25.86 % ($S=75$ %) con conidios cosechados de arroz nuevo (ciclo 1), de la misma manera que con la concentración más alta, el nivel de virulencia tuvo un incremento significativo para los ciclos de reúso siendo del 29.53 % ($S=70$ %) para el segundo ciclo y de 28.76 % ($S=71$ %) para el tercero. Resultados similares obtuvieron Golo *et al.*, (2014) con una suspensión de *Metarhizium anisopliae* con una concentración de 1×10^7 con/mL, con un porcentaje de muerte de larvas de *Tenebrio molitor* del 21 %. Por su parte, Engin *et al.*, (2019) usando el mismo hongo e insecto, pero expuesto a una suspensión con una concentración de 2×10^7 con/mL alcanzaron el 30 % de mortalidad.

Tabla 4. Resultados obtenidos para cada ciclo usando la suspensión con la concentración media 1×10^7 con/mL.

Ciclo	k (d^{-1})	t_0 (d)	TL_{50}	S (%)
1	0.44 ± 0.11 a	4.83 ± 0.80 a	N.A.	74.14 ± 1.61 a
2	0.65 ± 0.31 a	4.24 ± 0.57 a	N.A.	70.37 ± 0.31 b
3	0.54 ± 0.05 a	4.44 ± 0.95 a	N.A.	71.224 ± 0.76 b

NA, no alcanzado, los conidios no fueron capaces de matar al 50 % de los insectos durante el tiempo del bioensayo. Donde k es la tasa específica de muerte, t_0 es tiempo en que el primer insecto muere TL_{50} es el tiempo letal 50, S es la sobrevivencia estimada asintótica y DL_{50} es la dosis letal 50. Diferentes letras representan diferencias entre los tratamientos para cada parámetro (prueba de Tukey $p < 0.05$)

Suspensión baja (1×10^6 con/mL)

Del mismo modo que para las suspensiones anteriores, en el caso de la concentración baja (1×10^6 con/mL), no existe diferencia significativa en la mortalidad con conidios provenientes de los primeros tres ciclos consecutivos de producción. La mortalidad alcanzada fue de 18 %, 19 % y 19 % ($S=81$ %), respectivamente, siendo hasta el cuarto ciclo donde hubo una diferencia estadísticamente significativa en la mortalidad (11 %) ($S=89$ %), como se muestra

en la Tabla 5. Esta disminución en la calidad también se presentó en la germinación, así pues, la germinación afecta la infectividad de los conidios, por lo cual, este ligero decremento pudo haber repercutido en el nivel infectivo de los conidios para el cuarto ciclo; aunado a ello, la edad de los conidios es otro factor importante a considerar en el proceso infectivo, por lo que, probablemente para el cuarto ciclo había poca producción de nuevos conidios, y más bien, se lograron extraer los conidios que quedaron adheridos de ciclos anteriores al sustrato, por lo tanto representaban conidios más viejos afectando así su calidad (Smith *et al.* 2011; Faria *et al.* 2015).

Tabla 5. Resultados obtenidos para cada ciclo usando la suspensión con la concentración baja 1×10^6 con/mL.

Ciclo	k (d ⁻¹)	t_0 (d)	TL ₅₀	S (%)
1	0.41 ± 0.03 d	6.15 ± 0.86 a	N.A.	81.17 ± 0.82 b
2	0.72 ± 0.07 a	5.80 ± 1.10 a	N.A.	80.32 ± 0.42 b
3	0.58 ± 0.11 c	6.75 ± 1.82 a	N.A.	80.97 ± 0.94 b
4	0.60 ± 0.04 b	7.48 ± 0.50 a	N.A.	89.11 ± 0.21 a

NA, no alcanzado, los conidios no fueron capaces de matar al 50 % de los insectos durante el tiempo del bioensayo. Donde k es la tasa específica de muerte, t_0 es tiempo en que el primer insecto muere TL₅₀ es el tiempo letal 50, S es la sobrevivencia estimada asintótica y DL₅₀ es la dosis letal 50. Diferentes letras representan diferencias entre los tratamientos para cada parámetro (prueba de Tukey $p < 0.05$)

En el caso de los controles, es decir, larvas que fueron expuestas únicamente a la solución con Tween® 80 sin conidios, el registro de muerte fue menor al 5 % en todos los casos, motivo por el cual no fue necesario realizar la corrección de Abbott, corroborando así que el hongo utilizado si es patógeno contra las larvas de *Tenebrio molitor* y causan su muerte.

Las siguientes imágenes corresponden a diferentes larvas de *Tenebrio molitor* micosadas por *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1. Se observa la forma y color característico de la cepa.



Imagen 18. Diferentes larvas de *Tenebrio molitor* muertas y micosadas por *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1.

A continuación, se muestran los resultados del análisis por microscopía electrónica de barrido de los cultivos obtenidos en cada ciclo de producción de conidios de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1.

- **8.8 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido mostraron los cambios en la morfología del crecimiento del hongo en cada ciclo, lo que se relaciona con la variación de diferentes factores como: la forma de sustrato, la humedad, la actividad de agua, la materia disponible etc.

Ciclo 1

En estas imágenes correspondientes al ciclo 1 se observan partes del sustrato que se mantienen libres, con una estructura en forma de poliedro característica del almidón (Imagen 19, 20 y 21, círculo verde) (Kaláb. 2018). Además, también se observó poco crecimiento del hongo en forma de hifas (Imagen 19 y 20, círculo amarillo) y zonas con conidios característicos (forma análoga a bacilos) de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 (Imagen 19, 20 y 21, círculo turquesa). Las imágenes corresponden a diferentes zonas del sustrato.

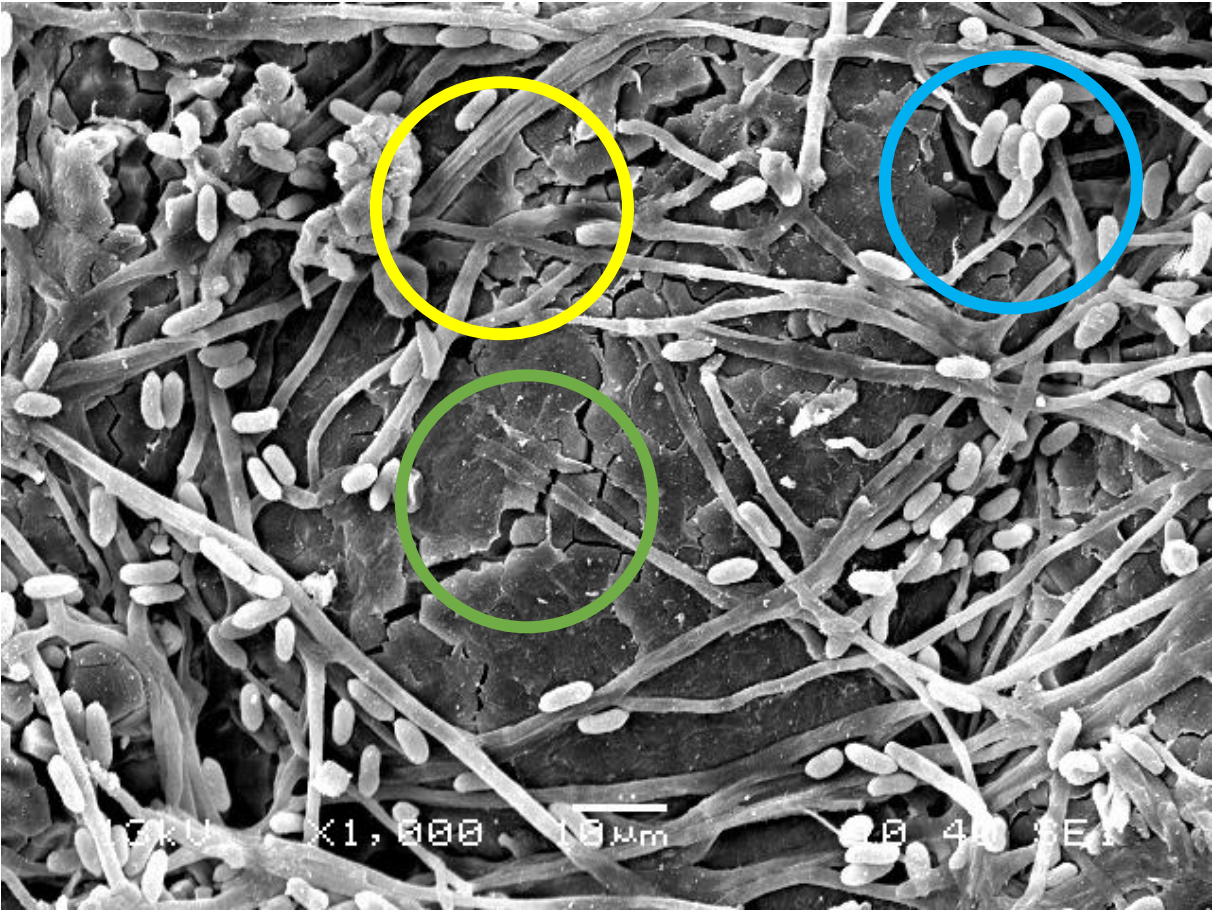


Imagen 19. Micrografía del sustrato posterior a la recolección de los conidios del primer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

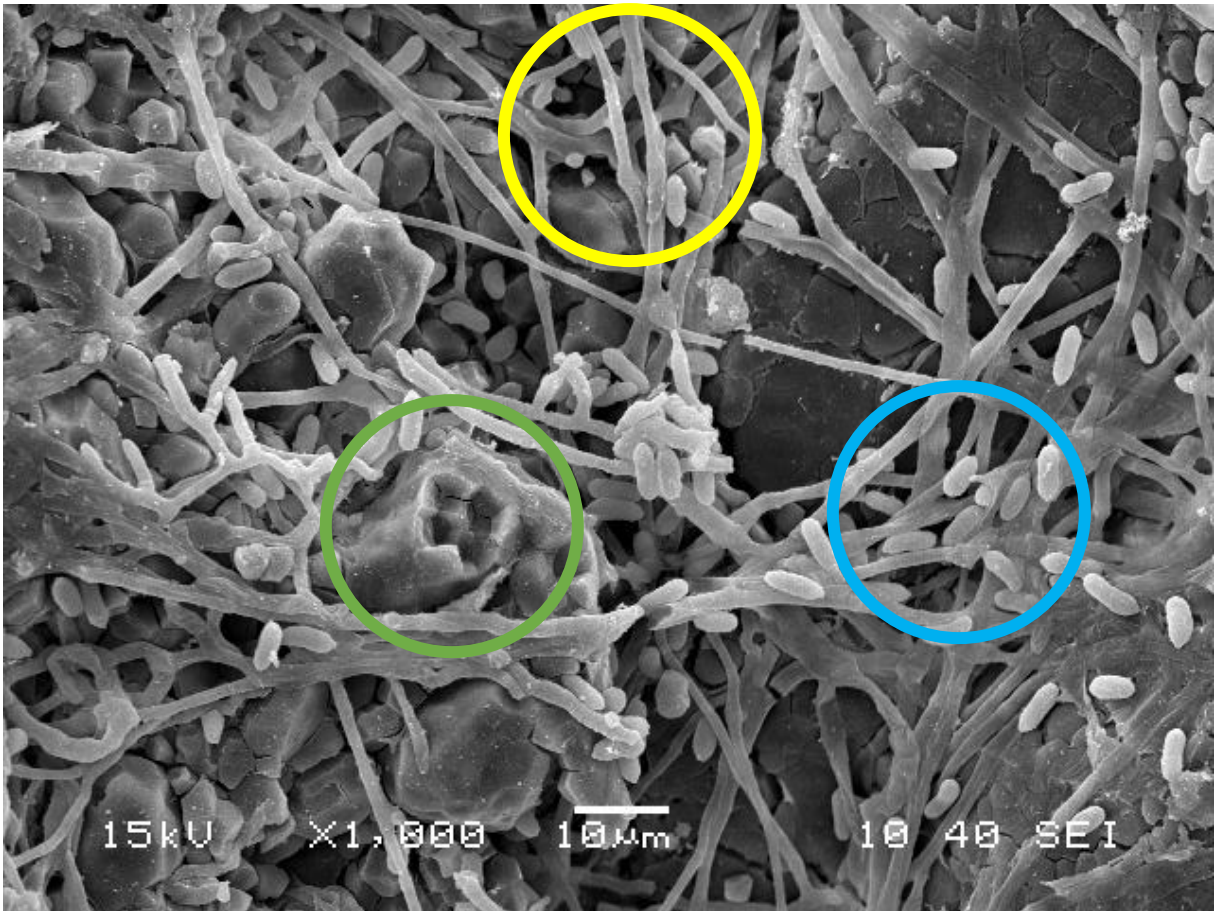


Imagen 20. Micrografía del sustrato posterior a la recolección de los conidios del primer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

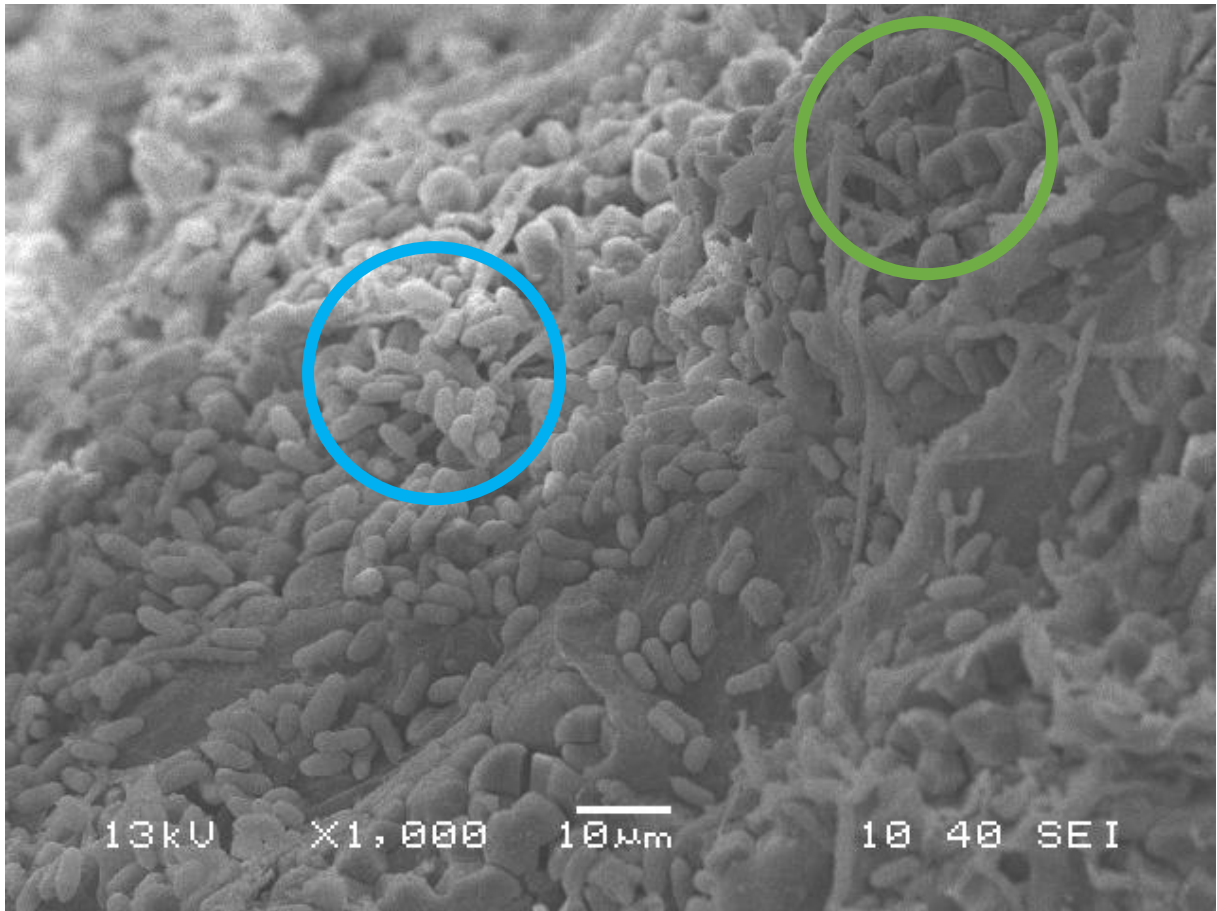


Imagen 21. Micrografía del sustrato posterior a la recolección de los conidios del primer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

Ciclo 2

Para el segundo ciclo ya no fue posible observar parte del sustrato libre, bajo estas condiciones predominó el crecimiento en forma de conidios (Imagen 22,23 y 24, círculo turquesa) y en menor grado hifas y micelio (Imagen 23 y 24, círculo amarillo).

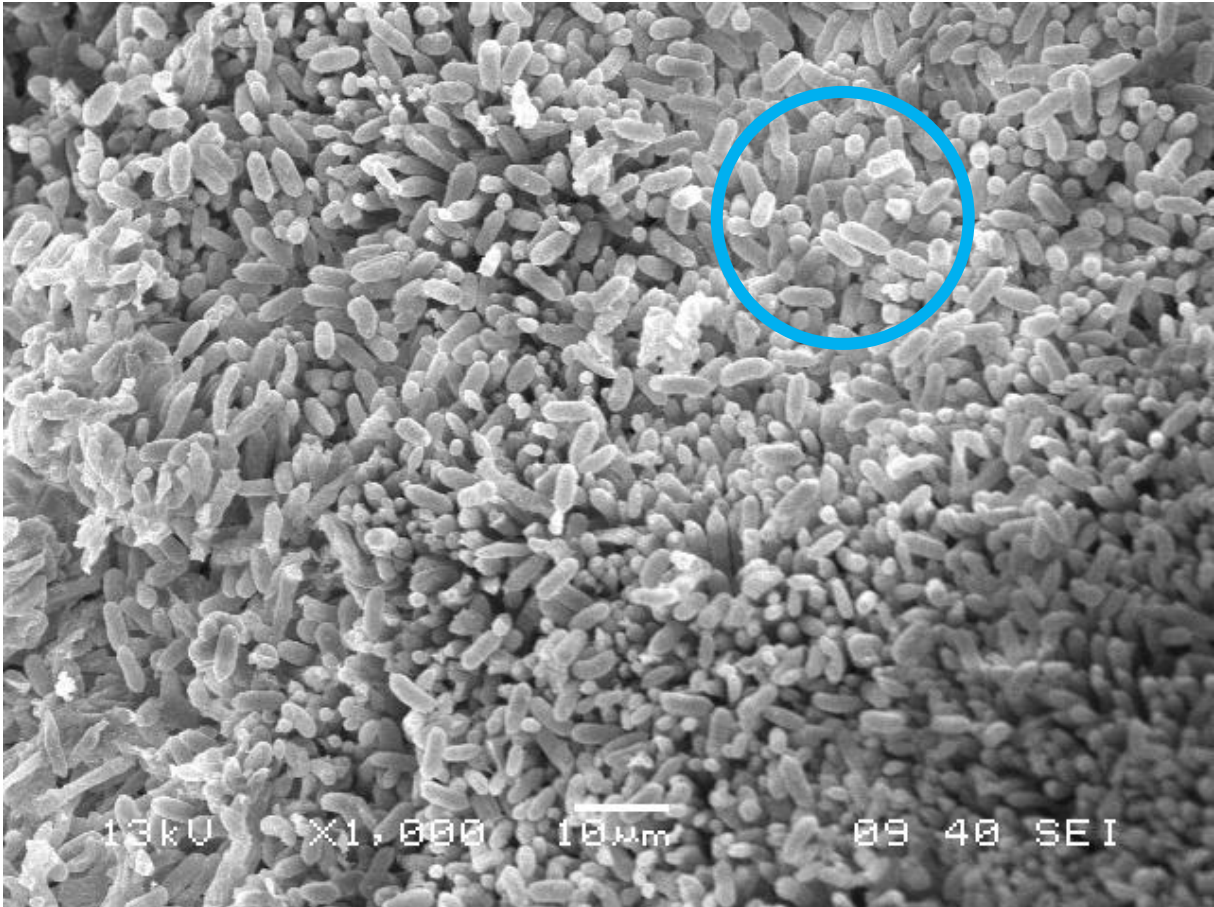


Imagen 22. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del segundo ciclo para *Metarhizium robertsii*.

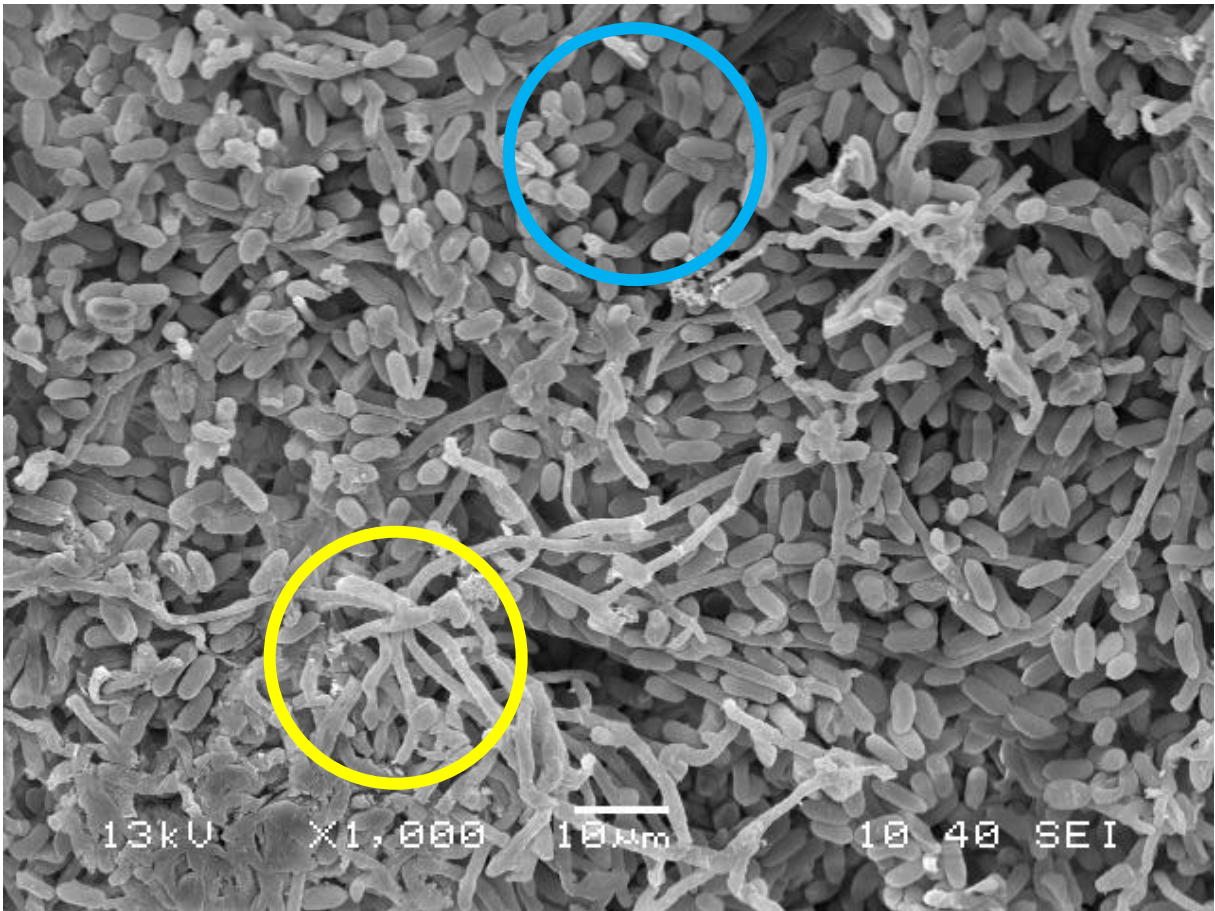


Imagen 23. Microscopia de sustrato posterior a la recolección de los conidios del segundo ciclo para *Metarhizium robertsii*.

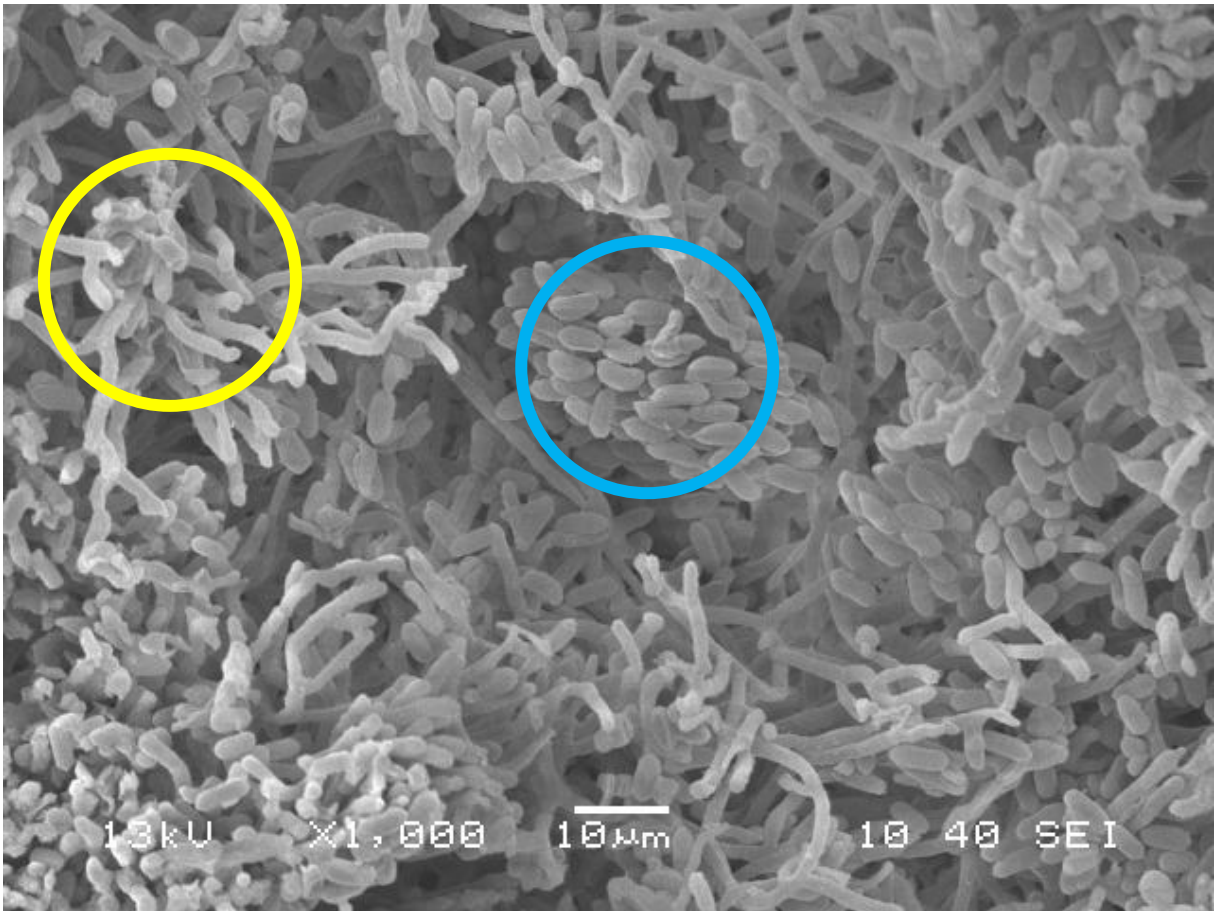


Imagen 24. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del segundo ciclo para *Metarhizium robertsii*.

Ciclo 3

Para el tercer ciclo se puede observar una mayor abundancia de crecimiento en forma de hifas y micelio. Por otra parte, se visualizó la formación de nuevas estructuras de morfología de crecimiento denominadas prosénquimas, las cuales son hifas entrecruzadas o fusionadas (Imagen 25, 26, 27 y 28, círculo rojo), este proceso también suele ser denominado anastomosis (Ramírez Granillo *et al.* 2015). Este tipo de estructura de crecimiento en forma de biopelículas (círculos rojos) es característico en hongos patógenos y en otras comunidades de microorganismos. La formación de biopelículas fúngicas es un proceso regulado con precisión a nivel genético, de manera general está delimitado por los siguientes pasos: adhesión, colonización, secreción de una matriz extracelular (MEC), crecimiento, expansión celular y dispersión, ya sea en una superficie biótica o abiótica.

El interés en el estudio de las biopelículas destaca por varios motivos: su formación es un factor importante en la virulencia (secreción de enzimas/toxinas y procesos de adhesión), son generalmente más resistentes a fármacos que células individuales, los canales formados son especializados en el transporte de agua y nutrientes, etc. (Fanning & Mitchell. (2012); Ramírez Granillo *et al.* (2015)). Además, los hongos filamentosos son de suma importancia en procesos biotecnológicos para la obtención de metabolitos y enzimas de uso industrial (Villena *et al.* 2007). Por lo tanto, el análisis de la presencia de este tipo de moléculas sería un doble aprovechamiento de los productos microbianos, por una parte, para el control biológico y por otra la obtención de metabolitos de importancia comercial. Parece ser que las condiciones para un mayor crecimiento diferencial en forma de hifas fusionadas y biopelículas se encuentran a partir del tercer ciclo, y a las condiciones físicas y bioquímicas ahí presentes como compuestos que se acumulan desde las etapas previas (Portilho-da-Cunha *et al.* 2020; Krujer *et al.* 2014).

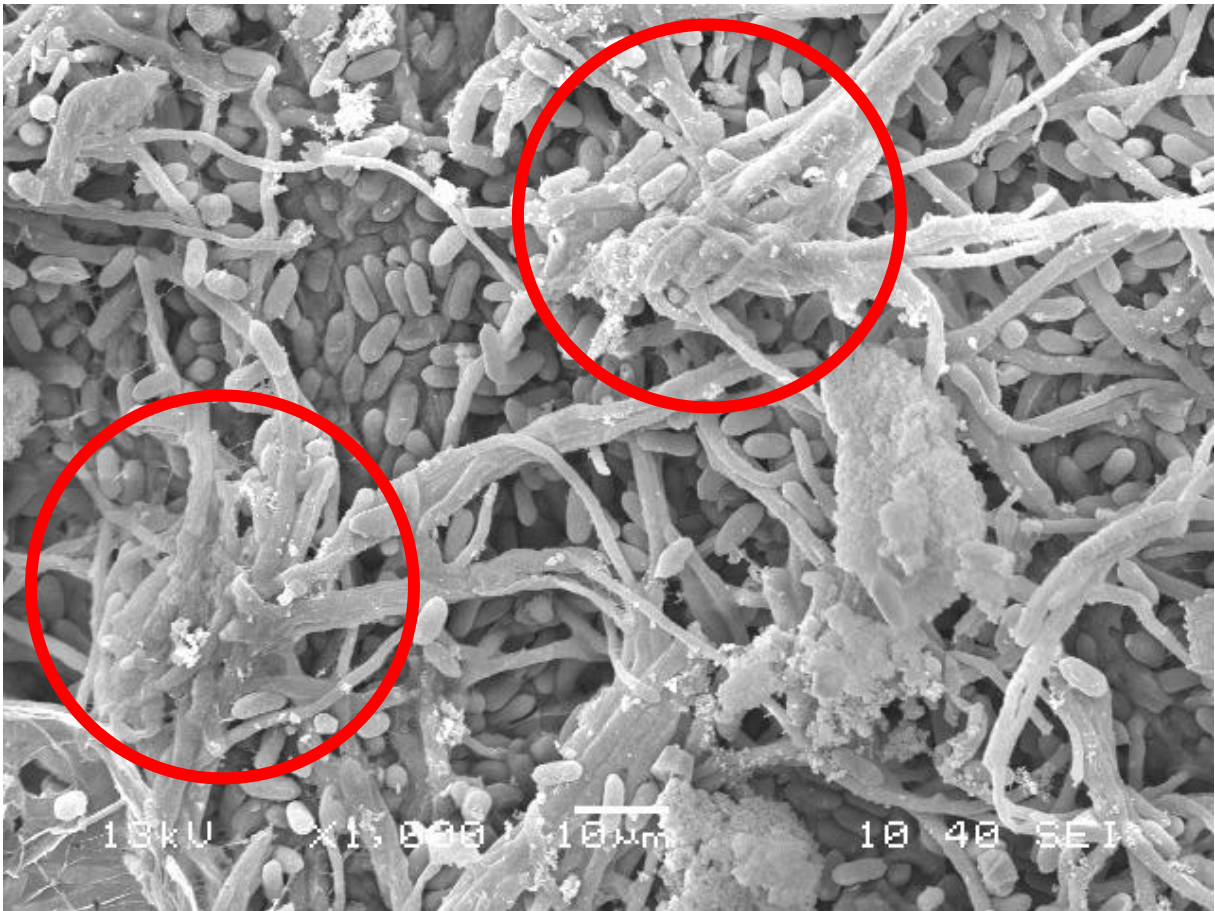


Imagen 25. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del tercer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

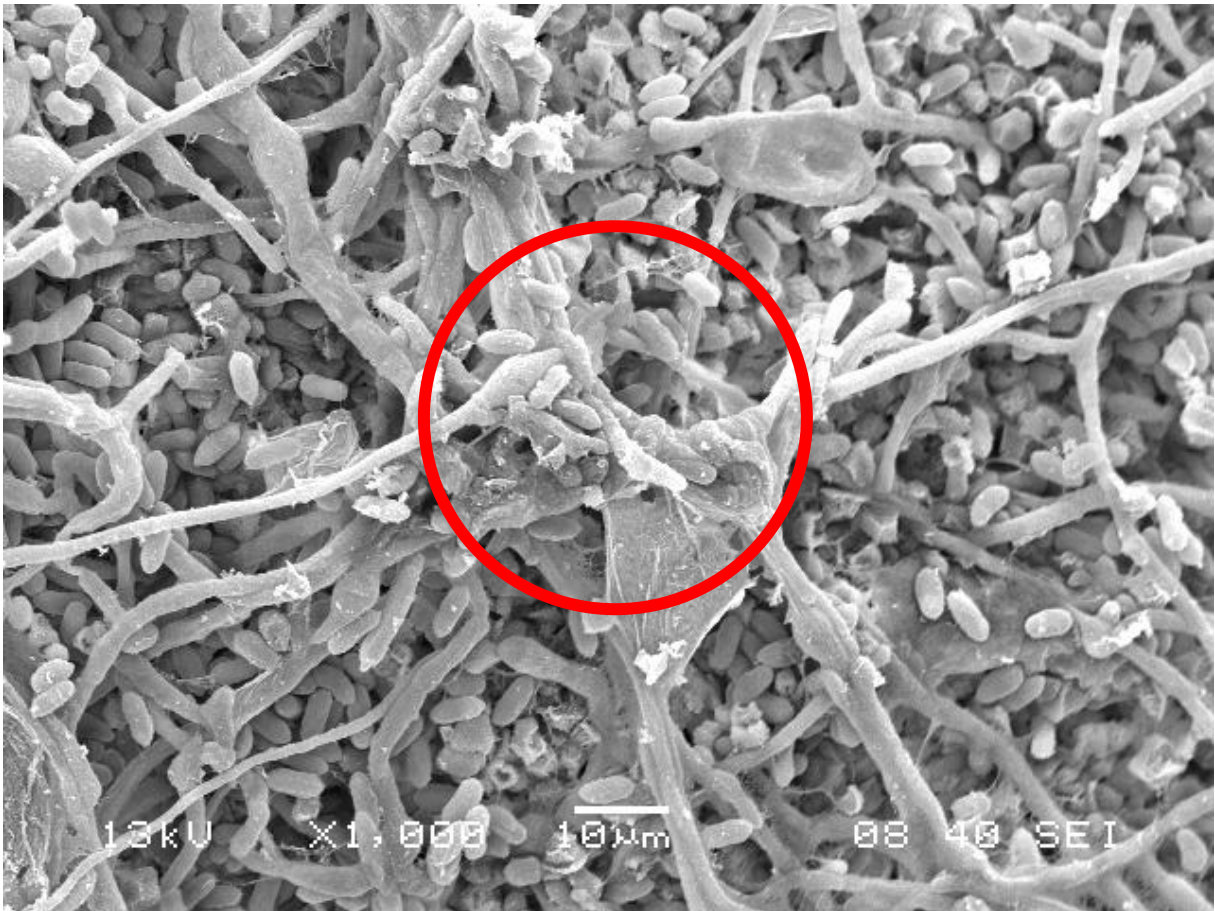


Imagen 26. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del tercer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

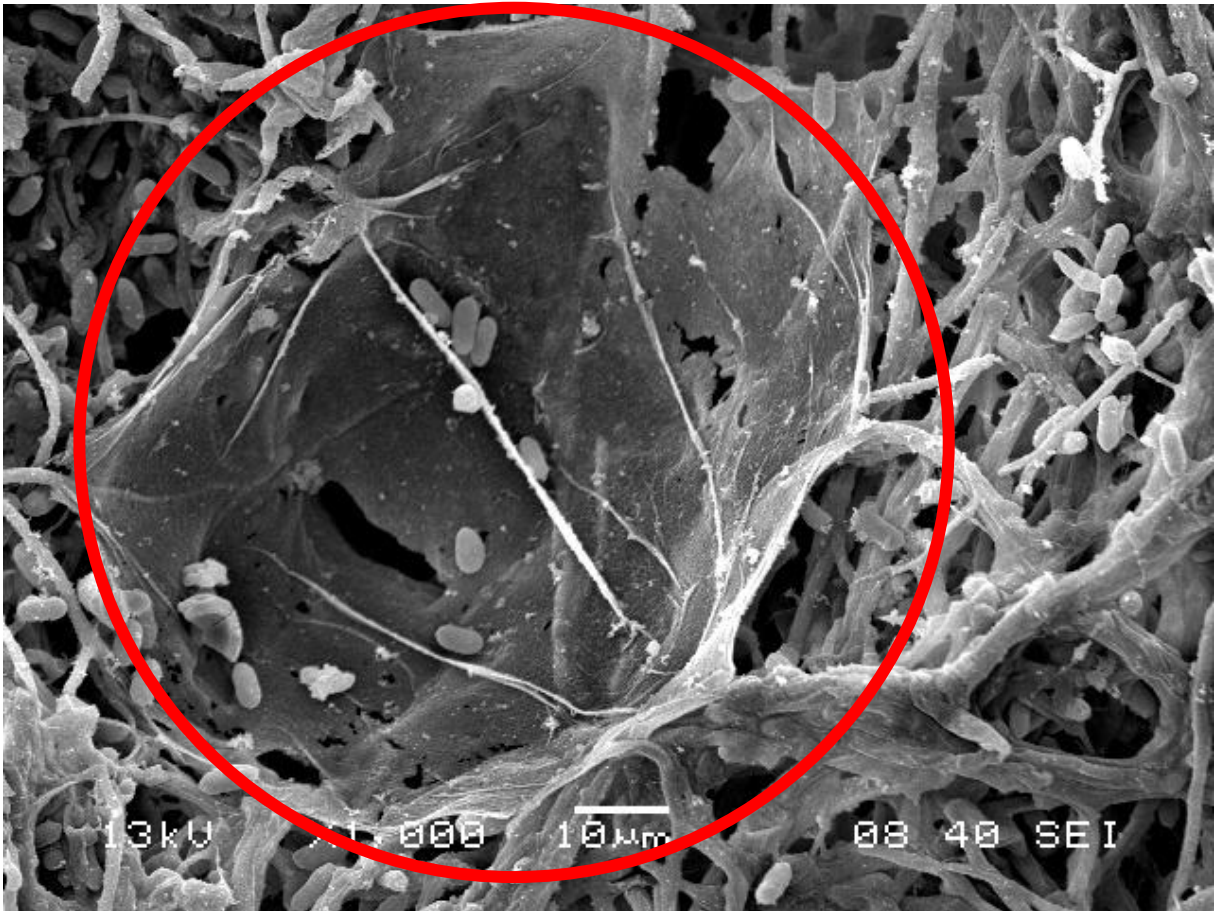


Imagen 27. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del tercer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

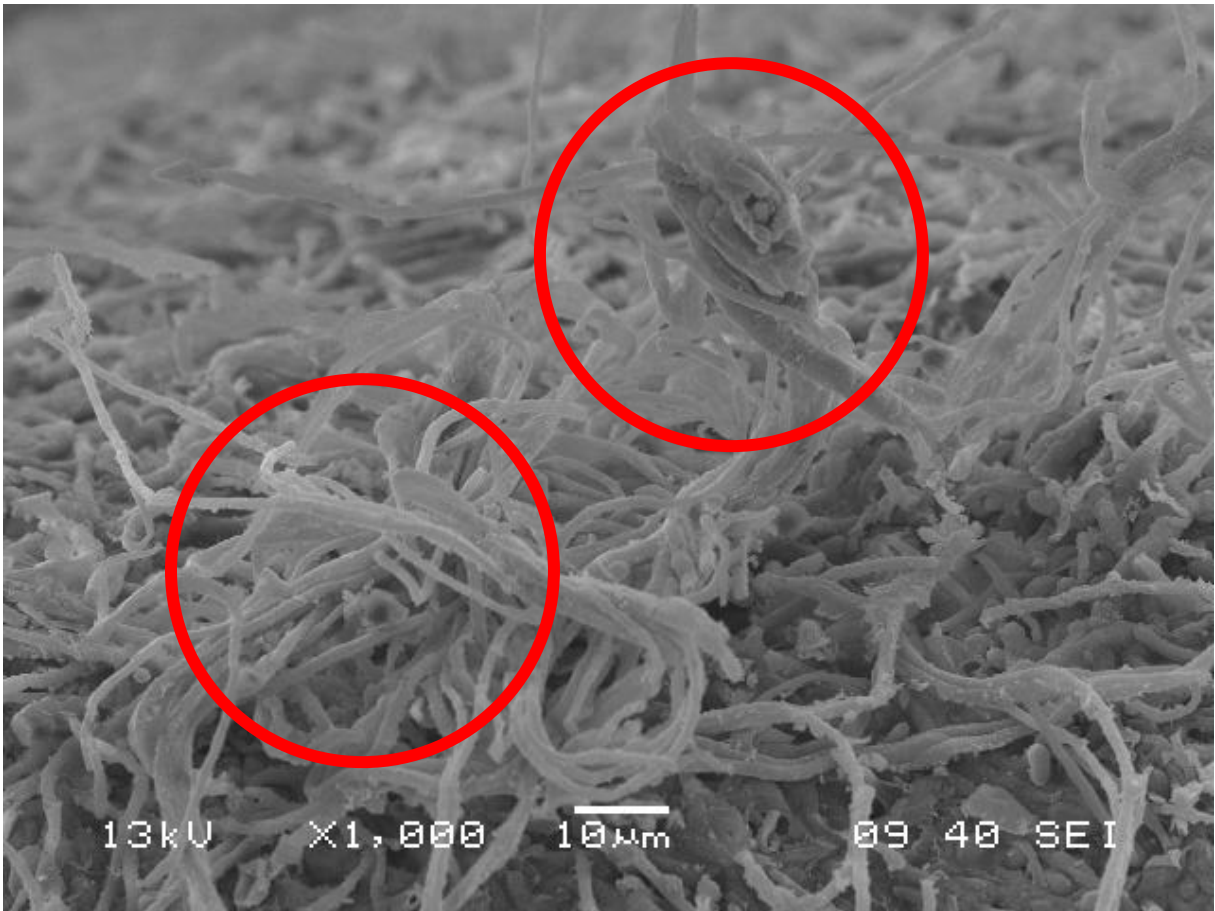


Imagen 28. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del tercer ciclo para *Metarhizium robertsii*.

Ciclo 4

En el cuarto ciclo se observó una mayor abundancia de crecimiento en forma de micelio, hifas y prosénquimas (anastomosis) (Imagen 29). Asimismo, para este ciclo se observaron algunas estructuras nuevas que sobresalían de las hifas en forma de picos (Imagen 30, 32 y 33, círculo naranja). Por un lado, se cree que dicha morfología de crecimiento podrían ser hifas con cambio en su morfología, denominadas rizoides, que permite tener una mayor adherencia al sustrato; por otro lado, en un estudio de biomineralización fúngica estructuras muy similares fueron visualizadas por MEB en un hongo micorrízico (Imagen 31), dichas formas son producto de la precipitación del oxalato de calcio por parte del hongo (Bindschedler *et al.* 2016).

Los procesos de biomineralización se han estudiado en organismos eucariontes, corroborando su importancia en la biogeoquímica de los ciclos del C y del Ca (Bindschedler *et al.* 2016). Lo que representaría otro de los beneficios ecológicos que se obtienen al utilizar estos tipos de hongo más allá del control biológico. Será necesario llevar a cabo un estudio más minucioso para determinar la composición de estas estructuras y poder establecer una posible función.

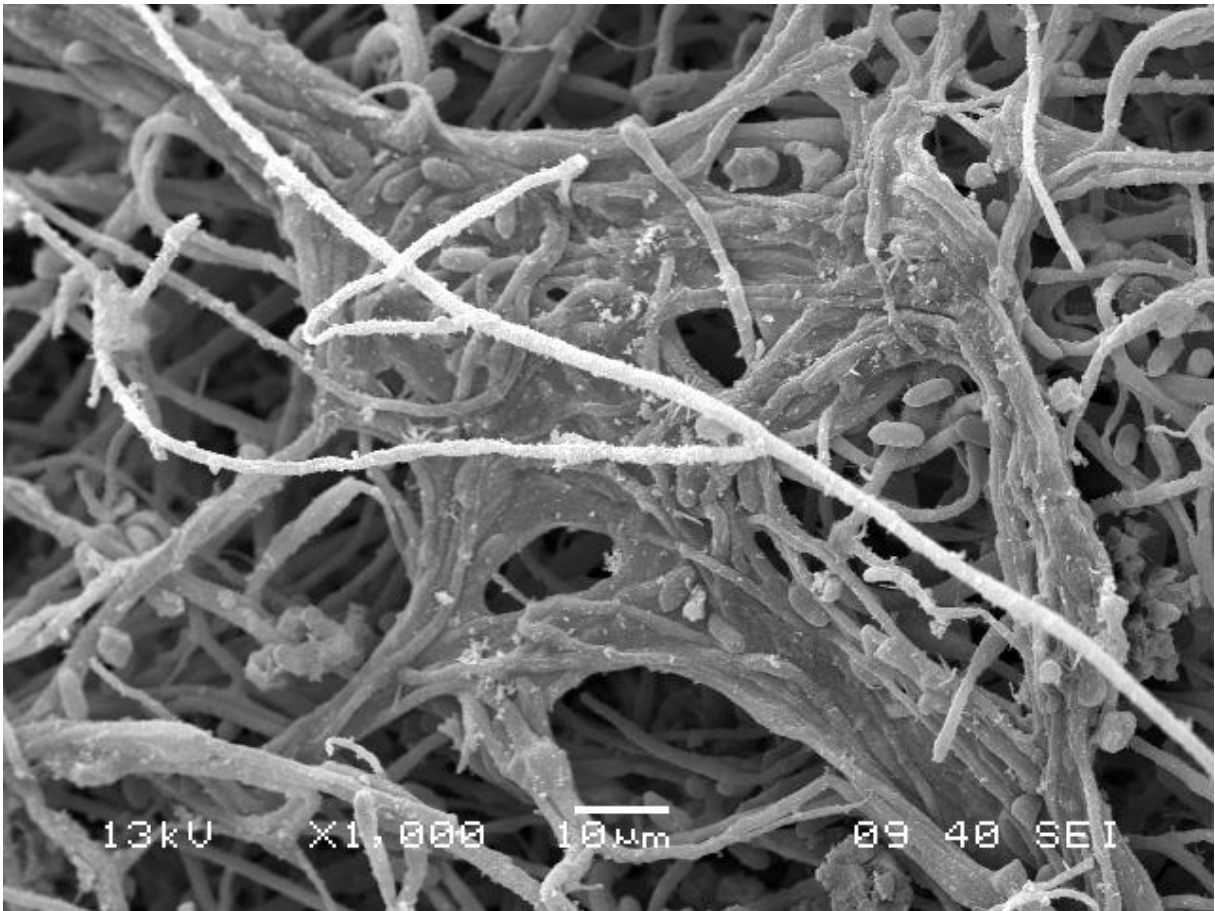


Imagen 29. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del cuarto ciclo para *Metarhizium robertsii*.

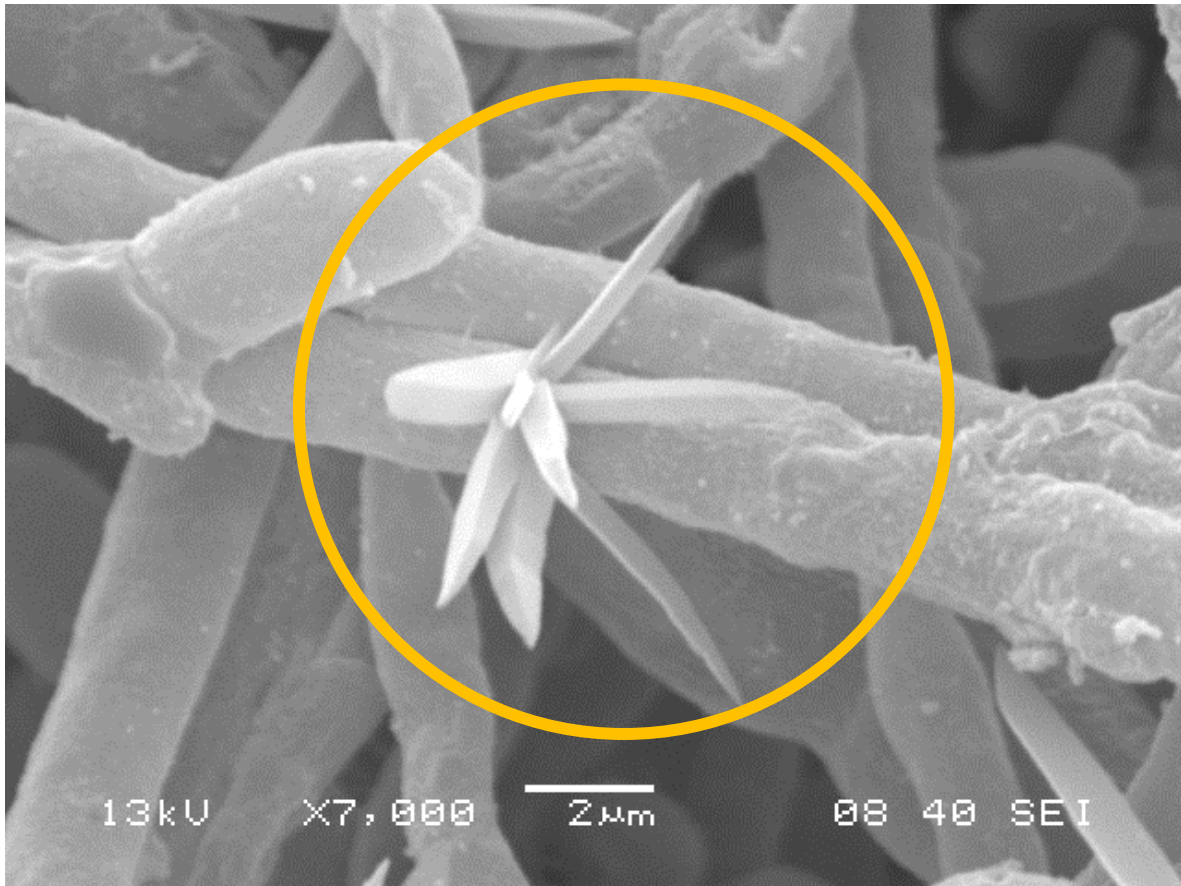


Imagen 30. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del cuarto ciclo para *Metarhizium robertsii*.

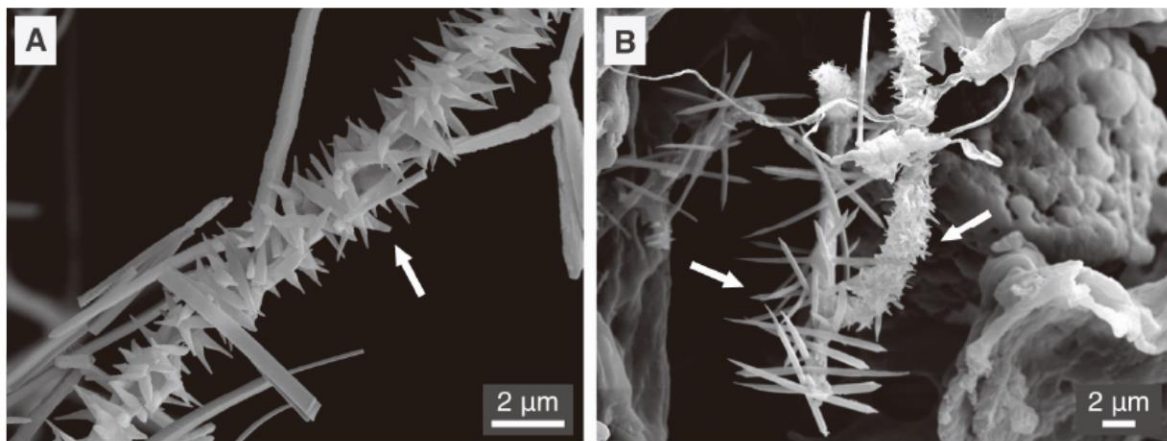


Imagen 31. Imágenes de microscopio electrónico de barrido (MEB) de hifas fúngicas (flecha blanca) cubiertas con cristales de oxalato de calcio (probablemente wheddellita). Ambas imágenes (A) y (B) son de una muestra de raíces de plantas asociadas a hifas fúngicas (posiblemente hongos micorrízicos) en un depósito secundario de CaCO_3 (Bindschedler *et al.* 2016).

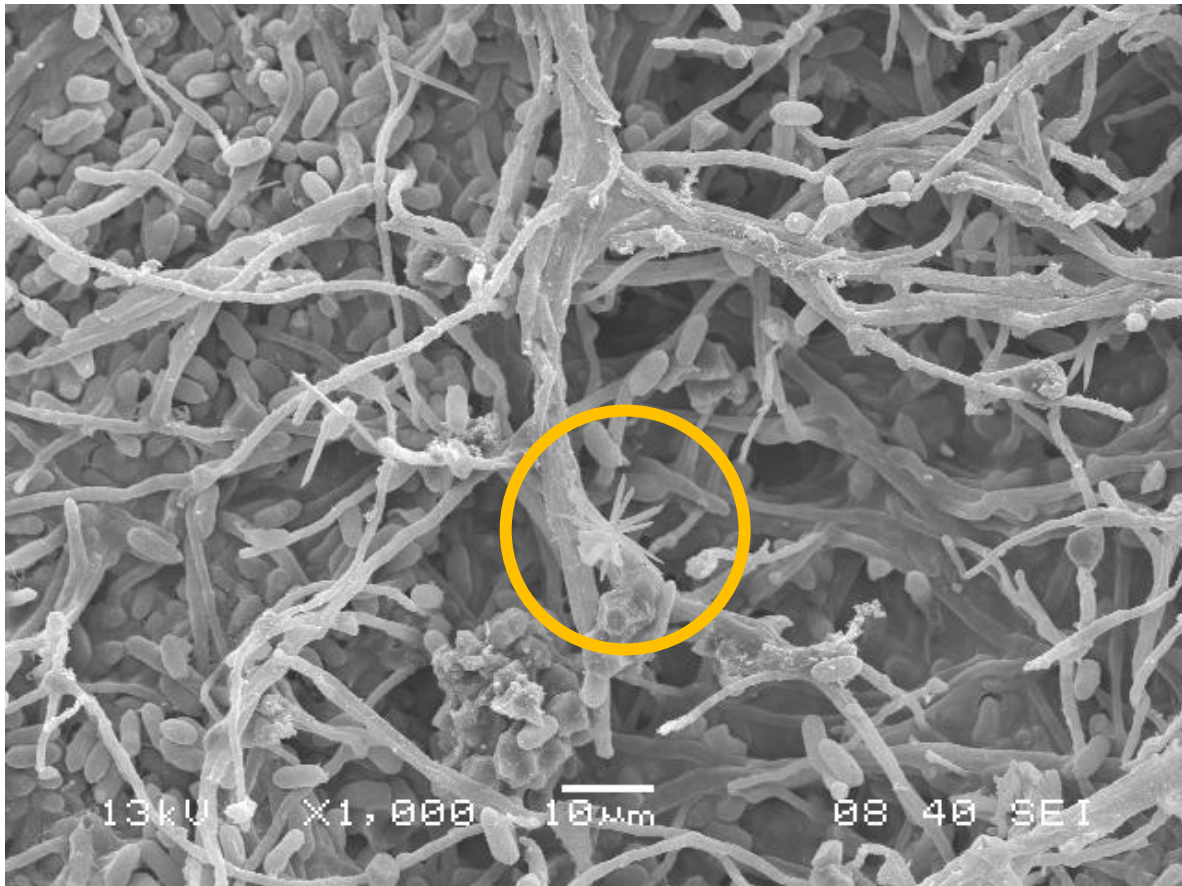


Imagen 32. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del cuarto ciclo para *Metarhizium robertsii*.

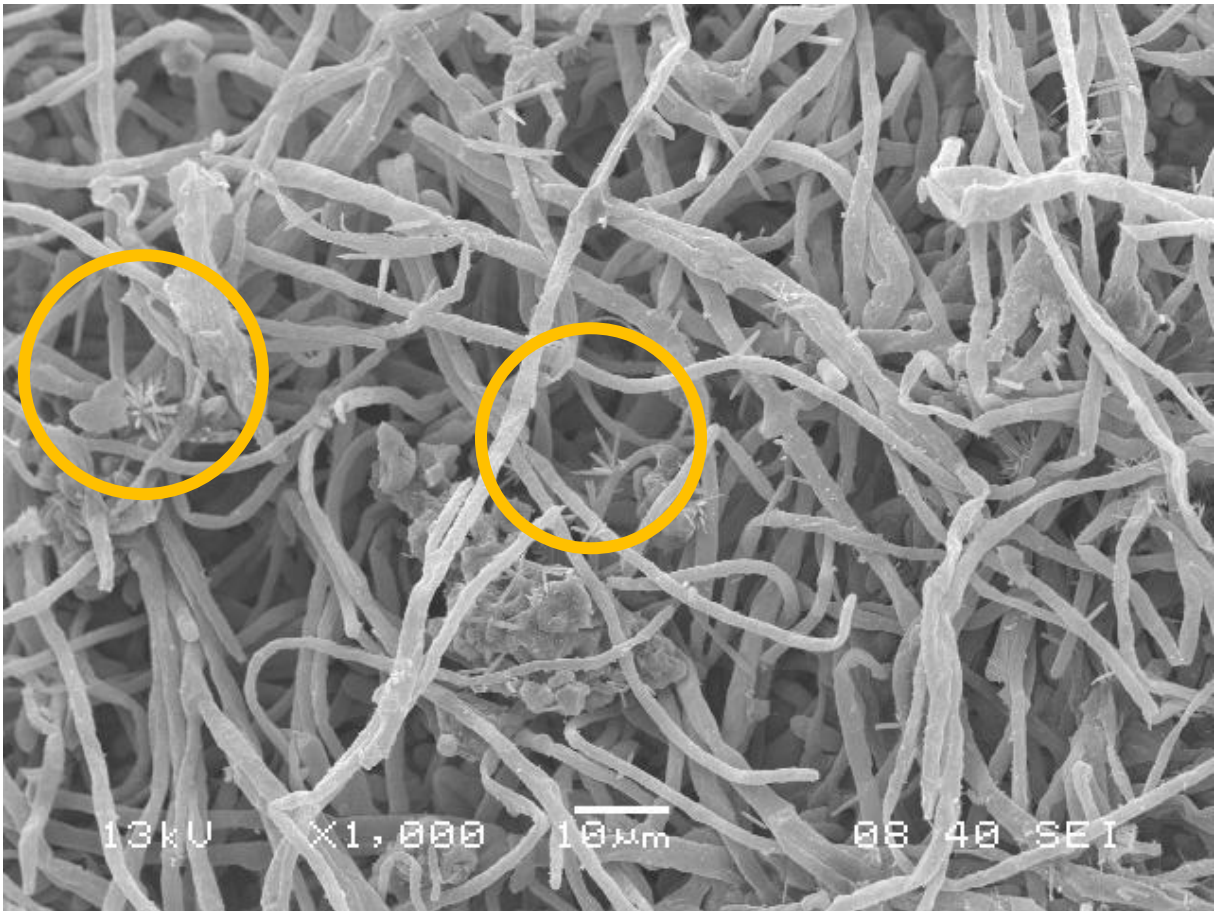


Imagen 33. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del cuarto ciclo para *Metarhizium robertsii*.

***Trichoderma asperellum* Th-T4 (3)**

A continuación, se muestran los resultados sobre la producción de conidios de *T. asperellum* en los dos ciclos consecutivos que se consiguieron.

8.9 Rendimiento de producción

Para el hongo antagonista *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) se obtuvieron 2 ciclos consecutivos de producción (Tabla 6). Para el primer ciclo se consiguió un rendimiento de producción de 4.13×10^9 con/gss con una duración de 6 días, es decir una productividad de 6.9×10^8 con/gss•día. En el segundo ciclo el rendimiento de producción bajó significativamente a 3.28×10^9 con/gss en 4 días, pero la productividad se mantuvo estadísticamente con 0.82×10^9 con/gss•día. En conjunto por ambos ciclos, el rendimiento total alcanzó 7.41×10^9 con/gss, lo cual es más de 5 veces lo obtenido por De la Cruz-Quiroz *et al.*, (2017) con una producción de conidios de 1.4×10^9 con/gss en bolsas con maíz quebrado como sustrato, y dos órdenes de magnitud mayor a lo reportado por en Mulatu *et al.*, (2021) con una producción de conidios de 3.2×10^7 con/gss en matraces con una mezcla de salvado de trigo y arroz como sustrato, ambos estudios con un solo ciclo de producción usando *Trichoderma asperellum*. Además, nuestra producción total de conidios es competitiva contra lo obtenido en sistemas más complejos de un solo ciclo usando *Trichoderma asperellum*. Rayhane *et al.*, (2019) reportó 8.55×10^9 con/gss en un biorreactor de un solo uso que permitía la aireación, que contenía una mezcla de arroz y salvado de trigo como sustrato; por otra parte, Maïga *et al.*, (2021) tuvieron una producción de conidios de 2.1×10^{10} con/gss en un reactor de lecho empacado que contenía una mezcla de residuos agroindustriales como sustrato.

Resultados similares se obtuvieron con respecto al reúso de arroz a escala laboratorio usando *Trichoderma asperellum*. Cando-Narvaez *et al.*, (2021), usando pequeños frascos de 120 mL con 2.5 g de sustrato, reportaron una producción de 1×10^9 con/gss en un periodo de 3 días, con una productividad de 3.5×10^8 con/gss•día con arroz nuevo, ambos parámetros aumentaron con arroz reusado alcanzando 2.9×10^9 con/gss en 2 días, con una productividad de 1.4×10^9 con/gss•día, como se mencionó anteriormente la metodología desarrollada por Cando-Narvaez *et al.*, (2021) fue la primera estrategia sin la necesidad de reacondicionar el sustrato aunque a una pequeña escala, además de ser la única técnica donde se exploró otro género usado en control biológico como lo es *Trichoderma*.

Tabla 6. Producción de conidios de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en ciclos consecutivos.

	Ciclos de producción de conidios	
	Ciclo 1	Ciclo 2
Duración del ciclo (días)	6	4
Rendimiento de producción (con/gss)	$4.13 \times 10^9 \pm 0.80 \times 10^9$ a	$3.28 \times 10^9 \pm 0.64 \times 10^9$ b
Productividad (con/gss*día)	$0.69 \times 10^9 \pm 0.13 \times 10^9$ a	$0.82 \times 10^9 \pm 0.016 \times 10^9$ a

Medias (\pm DE) seguidas de la misma letra dentro de la misma fila no son significativamente diferentes según el método de Tukey ($P < 0.05$).

Por último, se muestran imágenes de la apariencia del sustrato antes y después de la extracción de conidios para cada ciclo.

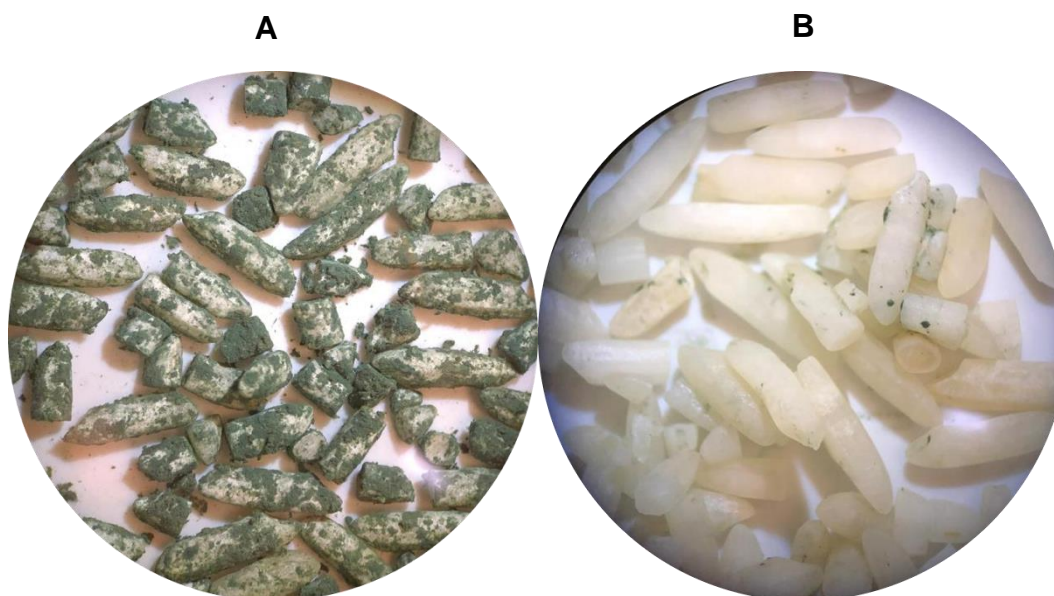


Imagen 34. Ciclo 1 día 6, *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), apariencia del sustrato. A) antes de la extracción, B) después de la extracción.

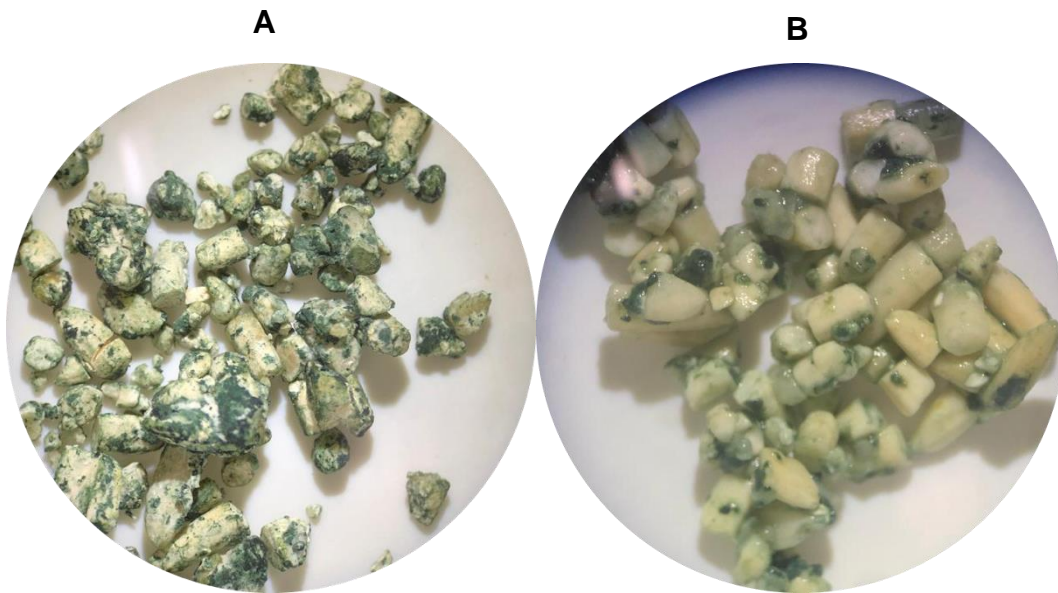


Imagen 35. Ciclo 2 día 4, *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), apariencia del sustrato. A) antes de la extracción, B) después de la extracción.



Imagen 36. Ciclo 3, *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), apariencia de sustrato 2 días posterior a la incubación.

En la siguiente sección se detallan los perfiles de humedad iniciales para cada ciclo.

- **8.10 Perfiles de humedad**

Los resultados de humedad y su relación con los rendimientos de producción obtenidos se detallan en el Gráfico 6 y en la Tabla 7. Con un valor de humedad inicial del 30 % con arroz nuevo se obtuvo la mayor producción de conidios de *Trichoderma asperellum* en nuestro sistema, para el segundo ciclo con arroz reusado y humedad del sustrato del 46 % hubo

una ligera disminución en la producción, aunque con un valor competitivo. Para el tercer ciclo de producción el arroz se notó considerablemente húmedo y aglomerado, de hecho, no se observó conidiogénesis (Imagen 36), por lo que ya no fue posible llevar a cabo la cosecha de los conidios. Como se mencionó anteriormente, la humedad del sustrato sólido es determinante para la producción de conidios fúngicos. En el caso de *Trichoderma harzianum*, Cavalcante *et al.*, (2008) reportaron que, para propiciar la conidiación, el valor óptimo de humedad con arroz para *Trichoderma* es de 34 % (5.8×10^8 con/gss), disminuyendo significativamente con un ligero aumento de humedad del 35 % (2.13×10^8 con/gss). Por otro lado, Cando- Narvaez *et al.*, (2021) usando el mismo hongo *Trichoderma asperellum* del presente estudio obtuvieron el mejor rendimiento de producción de conidios en un segundo ciclo, con arroz reusado con un valor de humedad inicial del 46 % (2.9×10^9 con/gss) y de la misma forma se afectó el rendimiento significativamente, también el exceso de humedad (63.8 %) se asoció en el tercer ciclo de producción con un nivel bajo (9.9×10^8 con/gss).

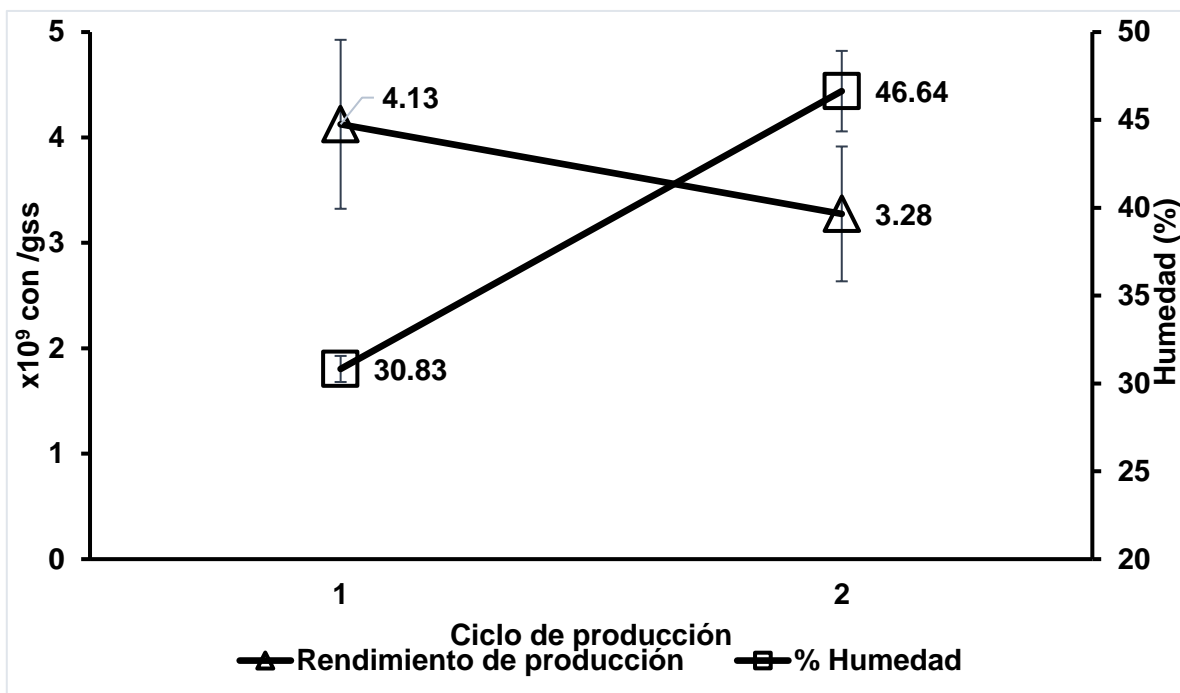


Gráfico 6. Rendimiento de producción de conidios (con/gss) de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en cada ciclo de reúso de sustrato. Se muestra la Humedad (%) en el eje secundario derecho.

Tabla 7. Porcentaje de humedad y rendimiento de producción de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) para cada ciclo.

Ciclo	Humedad (%)	Rendimiento de producción (con/gss)
1	30.83 ± 0.74 c	4.13x10 ⁹ ± 0.80x10 ⁹ a
2	46.64 ± 2.29 b	3.28x10 ⁹ ± 0.64x10 ⁹ b
Final ciclo 2	65.94 ± 1.75 a	NA

Medias (±DE) seguidas de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el método de Tukey (P < 0.05).NA no aplica.

A continuación, se especifican los valores de actividad de agua iniciales para cada ciclo.

- **8.11 Actividad de agua (Aw)**

En el Gráfico 9 y la Tabla 8 se muestran los resultados para la actividad de agua del hongo micoparacitista *Trichoderma asperellum*. Para el primer ciclo con arroz nuevo, la actividad de agua fue en promedio de 0.9870, teniendo el mayor rendimiento en la producción de conidios (4.13x10⁹ con/gss). Posteriormente con el arroz reusado la actividad de agua aumentó significativamente a un valor de 0.9985, observándose una ligera disminución en la producción (3.28x10⁹ con/gss), aunque manteniéndose competitiva como se comentó en la sección de rendimiento de producción (8.9). La actividad de agua es un factor importante que determina la forma de crecimiento de este tipo de hongos, en el caso de *Trichoderma viride* TS, Grajek & Gervais *et al.*, (1987) reportaron que la mayor producción de conidios (conidiogénesis) se logró con valores relativamente bajos de actividad de agua de 0.975 a 0.985, siendo el óptimo a 0.98. Por otra parte, Kedrics *et al.*, (2004) observaron que para cinco cepas diferentes de *Trichoderma* el crecimiento micelial se favorece en el valor más alto probado de actividad de agua (Aw=0.9920). En el mismo sentido Daryaei *et al.*, (2016), usando *Trichoderma atroviride* obtuvieron una producción de conidios más alta en un valor de Aw=0.995 (9.7x10⁷ con/gss), con respecto al resultado con Aw=0.998 (5.5x10⁷ con/gss). Por lo cual, nuestra cepa responde de manera similar, teniendo una mayor conidiogénesis en valores relativamente bajos de actividad de agua, y creciendo en forma de hifas y de micelio en valores más altos del mismo.

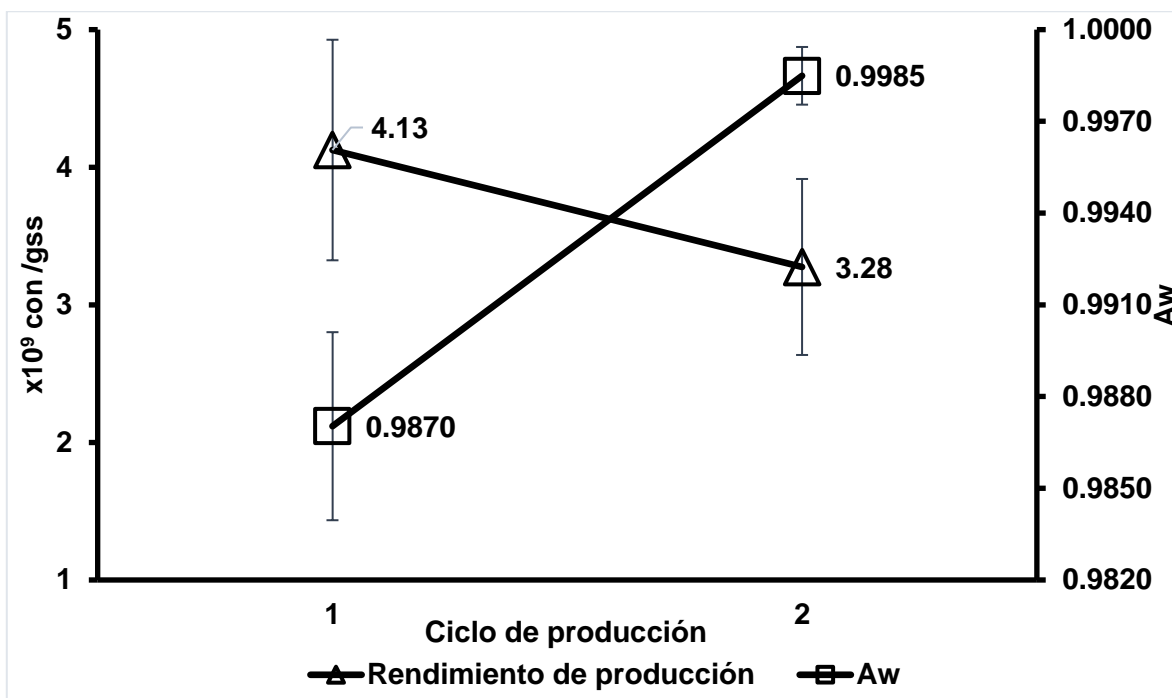


Gráfico 9. Rendimiento de producción (con/gss) de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en cada ciclo de reúso de sustrato. Se muestra la actividad de agua en el eje secundario derecho.

Tabla 8. Actividad de agua y rendimiento de producción de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) para cada ciclo.

Ciclo	Aw	Rendimiento de producción (con/gss)
1	0.987 ± 0.0031 b	$4.13 \times 10^9 \pm 0.80 \times 10^9$ a
2	0.998 ± 0.0009 a	$3.28 \times 10^9 \pm 0.64 \times 10^9$ b

Medias (\pm DE) seguidas de la misma letra dentro de la misma fila no son significativamente diferentes según el método de Tukey ($P < 0.05$).

El experimentar con diferentes géneros de hongos usados en el control biológico e incluso hongos que atacan diferentes plagas, tiene como objetivo conocer las diferencias o similitudes entre el comportamiento entre cepas con parámetros similares y aprovechar al máximo las condiciones óptimas para cada uno.

En la siguiente sección se describen las pruebas de germinación de los conidios al paso de los ciclos.

- **8.12 Pruebas de germinación**

Para *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en ambos ciclos de producción obtenidos con arroz nuevo y arroz reusado se alcanzó una germinación de 98.6 % (Gráfico 7). Como se mencionó anteriormente, estos resultados se encuentran por encima de la recomendación para considerar conidios de calidad para su uso en el control biológico (Jenkins & Grzywacz *et al.* 2000). En el mismo sentido, usando una estrategia de reúso de sustrato y empleando *Trichoderma asperellum* Cando-Narvaez *et al.*, (2021) obtuvieron 3 ciclos de producción sucesivos, sin diferencias significativas en el porcentaje de germinación siendo de 98 % con arroz nuevo, de 97.2 % con arroz reusado y de 94.3 % para el tercer ciclo. Por otro lado, Reynoso-López *et al.*, (2022) cultivando *Trichoderma asperellum* en cajas Petri con medio ADS reportaron una germinación 99 %. De forma similar, usando el mismo hongo Herrera *et al.*, (2020) alcanzaron un porcentaje de germinación de 97.6 % en medio agar-agua. Los resultados obtenidos en estos estudios confirman la tasa elevada de germinación que posee el hongo antagonista *Trichoderma asperellum*, uno de los motivos por el cual es uno de los géneros más utilizado en el control biológico para hongos fitopatógenos (Gómez-Ramírez *et al.* 2015), además se confirmó que se mantiene dicha calidad con sustrato reutilizado.

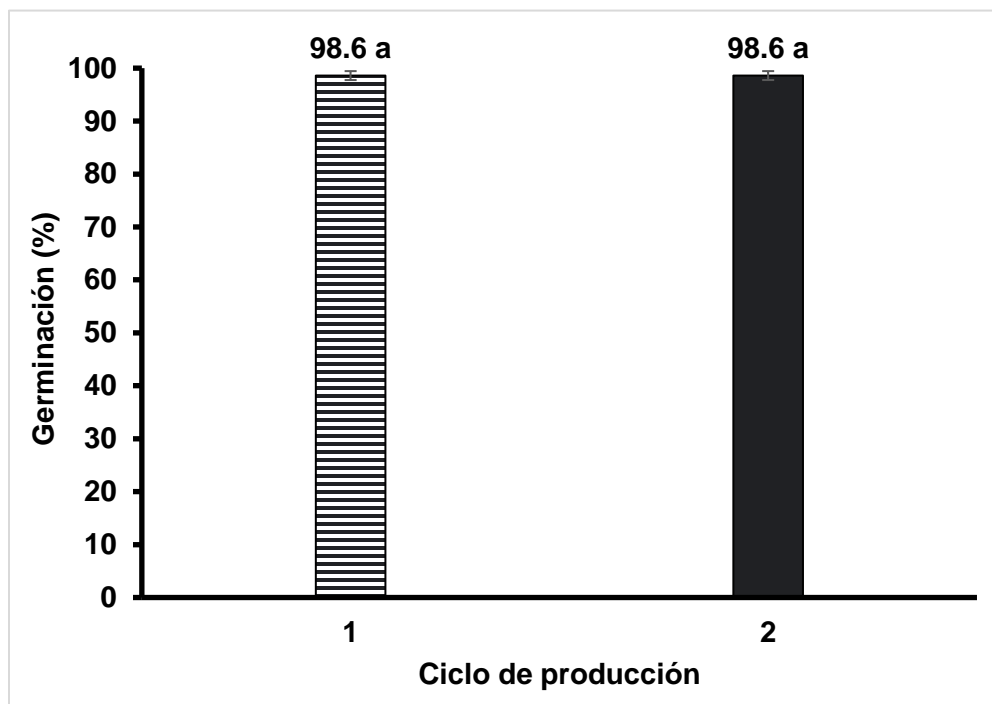


Gráfico 7. Porcentaje de germinación de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) para cada ciclo. (1) arroz nuevo y (2) arroz reutilizado. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A continuación, se presentan los resultados con respecto a la pérdida de peso de sustrato en cada ciclo de cultivo.

- **8.13 Pérdida de peso del sustrato en cada ciclo**

Los resultados de la pérdida de sustrato para *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) para cada ciclo se muestran en el gráfico 8. Se obtuvo una pérdida acumulada de 50.82 % para ambos ciclos, con una disminución del 22.86 % y 27.96 % para cada ciclo, respectivamente. Cando-Narvaez *et al.*, 2021 obtuvieron una pérdida de sustrato final del 53 % con *Trichoderma asperellum* en dos ciclos de producción, habiendo una disminución por ciclo del 18 % y 35 % respectivamente. Estos resultados favorecen la estrategia de reusar el sustrato para la obtención de conidios fúngicos, pues se logra aprovechar mucha más materia de la que se reporta con ciclos únicos de producción (aproximadamente 20 %) (Ye *et al.*2006), teniendo procesos más eficientes.

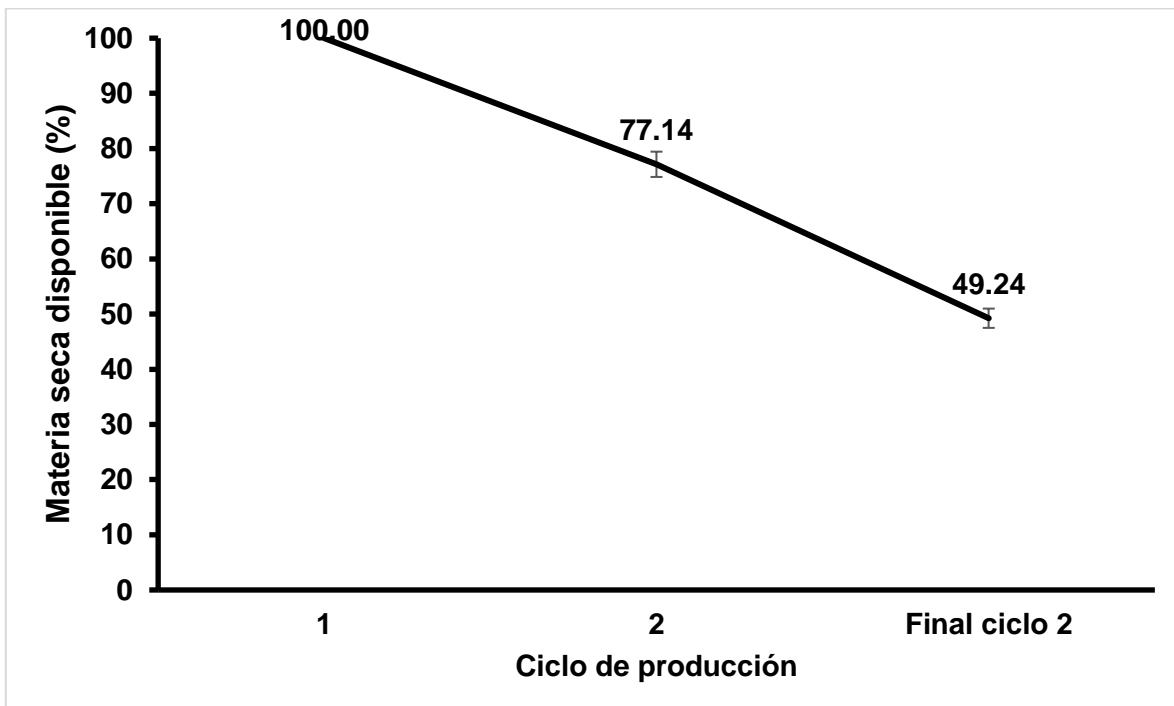


Gráfico 8. Materia seca disponible inicial (%) para cada ciclo de producción con *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la prueba de confrontación fúngica.

- **8.14 Bioensayo (antagonismo)**

En la prueba de confrontación entre el hongo antagonista *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) y el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* AB2 se observó que al día 5 de incubación hubo contacto entre los hongos, *T. asperellum* comenzó a invadir el área de crecimiento de *F. oxysporum* (Imagen 45 A), para el día 8 el hongo micoparacitista sobrecreció completamente sobre el hongo plaga y cubrió totalmente la superficie del medio (Imagen 45 B). Estos resultados corresponden a un nivel 1 de antagonismo en la escala de Bell *et al.*, (1982). Además, en la prueba de confrontación con conidios que se extrajeron de sustrato reusado, hubo un aumento significativo en la velocidad de crecimiento radial de *T. asperellum* sobre *F. oxysporum*, siendo ésta de 9.92 mm/día en comparación con lo obtenido con sustrato nuevo con 9.65 mm/día (Tabla 9 y Gráfico 10). Esto representa un resultado prometedor en cuanto a la capacidad de mantenimiento e incluso de mejora en los niveles de virulencia de *Trichoderma* bajo condiciones diferentes, incluso bajo condiciones de estrés que ahí se estén generando, o cambios en la disponibilidad de fracciones más accesibles del sustrato. De acuerdo con Kredics *et al.*, (2004) las actividades enzimáticas extracelulares involucradas en el micoparasitismo y la competencia por nutrientes de aislados de *Trichoderma* de diversas especies, con potencial para uso en biocontrol, se afectan por parámetros ambientales como la actividad de agua, lo que repercute no solo en la producción de enzimas, sino también en la variedad de éstas que pueden repercutir en la virulencia mayor observada. Este fenómeno se pudo haber presentado en nuestro estudio al paso de los ciclos, motivo del aumento en la velocidad radial, pues con un valor menor correspondiente de $A_w = 0.987$ para el primer ciclo la velocidad radial fue menor, aumentado la velocidad radial significativamente con un valor de $A_w = 0.998$ para el segundo ciclo. También probablemente algunos metabolitos secundarios se acumularon para el segundo ciclo, lo que influyó en la velocidad de crecimiento radial. Este es el primer estudio de confrontación de *T. asperellum* con conidios obtenidos reusando el sustrato y que corroboran que bajo estas condiciones se mantiene la virulencia.

Por otra parte, en un estudio similar Reynoso-López *et al.*, (2022) confrontaron a *Trichoderma asperellum* contra 2 especies de *Fusarium*, *Fusarium sp* y *Fusarium euwallaceae* 744.. En el primer caso contra *Fusarium s.p* obtuvieron una velocidad de crecimiento radial de *T. asperellum* de 13.9 mm/día cubriendo completamente al hongo

patógeno y el medio en 7 días; para la otra cepa, contra *Fusarium euwallaceae* 744, *T. asperellum* solo logró colonizar tres cuartas partes de la superficie de la caja Petri al día 11, con una velocidad de crecimiento radial de 13.9 mm/día, lo que nos confirma la capacidad antagonista del hongo *Trichoderma asperellum* y su variación en la velocidad de crecimiento frente a diferentes especies de hongos fitopatógenos.

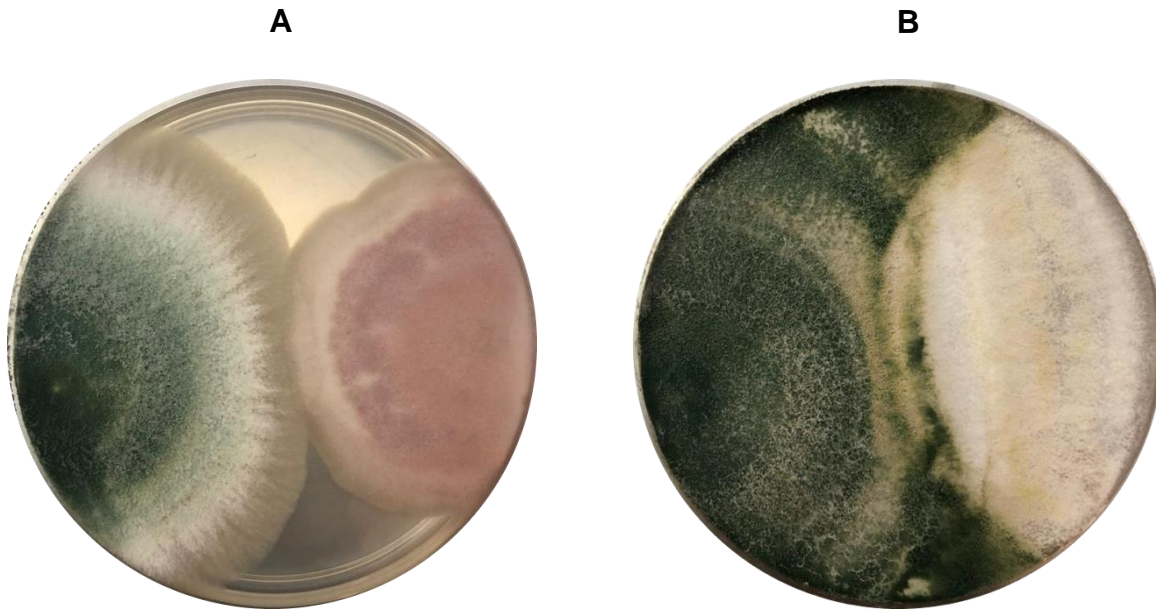


Imagen 37. Confrontación de *T. asperellum* Th-T4 (3) (color verde) Vs *Fusarium oxysporum* AB2 (color rosa) en cajas Petri con medio ADS. A) Confrontación al día 5, B) confrontación al día 8.

Tabla 9. Crecimiento radial de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) (mm/día).

	Ciclos de producción de conidios	
	Ciclo 1	Ciclo 2
Velocidad de crecimiento radial (mm/día)	9.65 ± 0.27 b	9.92 ± 0.05 a

Medias (±DE) Letras distintas dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05).

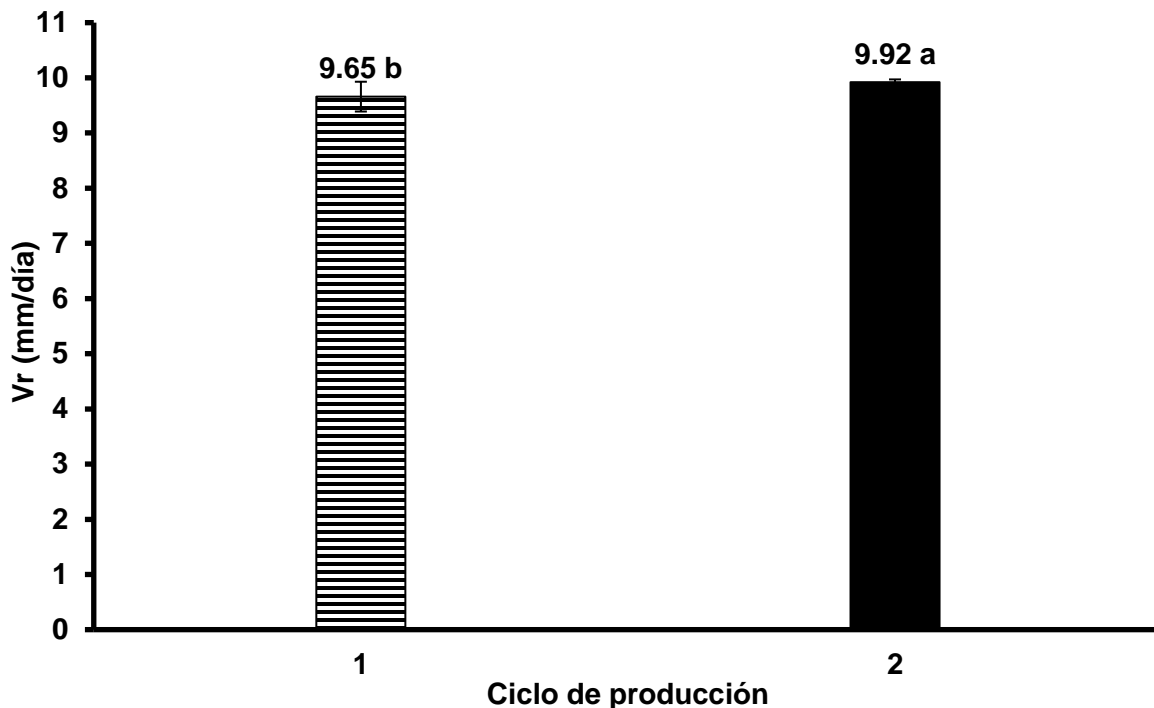


Gráfico 10. Crecimiento radial de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en confrontación vs *Fusarium oxysporum* AB2 para cada ciclo. (1) arroz nuevo y (2) arroz reutilizado. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica para *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) en ambos ciclos de producción. Las imágenes corresponden a diferentes zonas del sustrato

- **8.15 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Ciclo 1

Del mismo modo, en las imágenes correspondientes al ciclo 1, se observa parte del sustrato aun libre en forma de almidón (Imagen 38 y 39, círculo verde), algunas hifas (Imagen 38 y 39, círculo amarillo) y zonas con conidios característicos de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) (forma análoga a cocos) (Imagen 38 y 39, círculo turquesa).

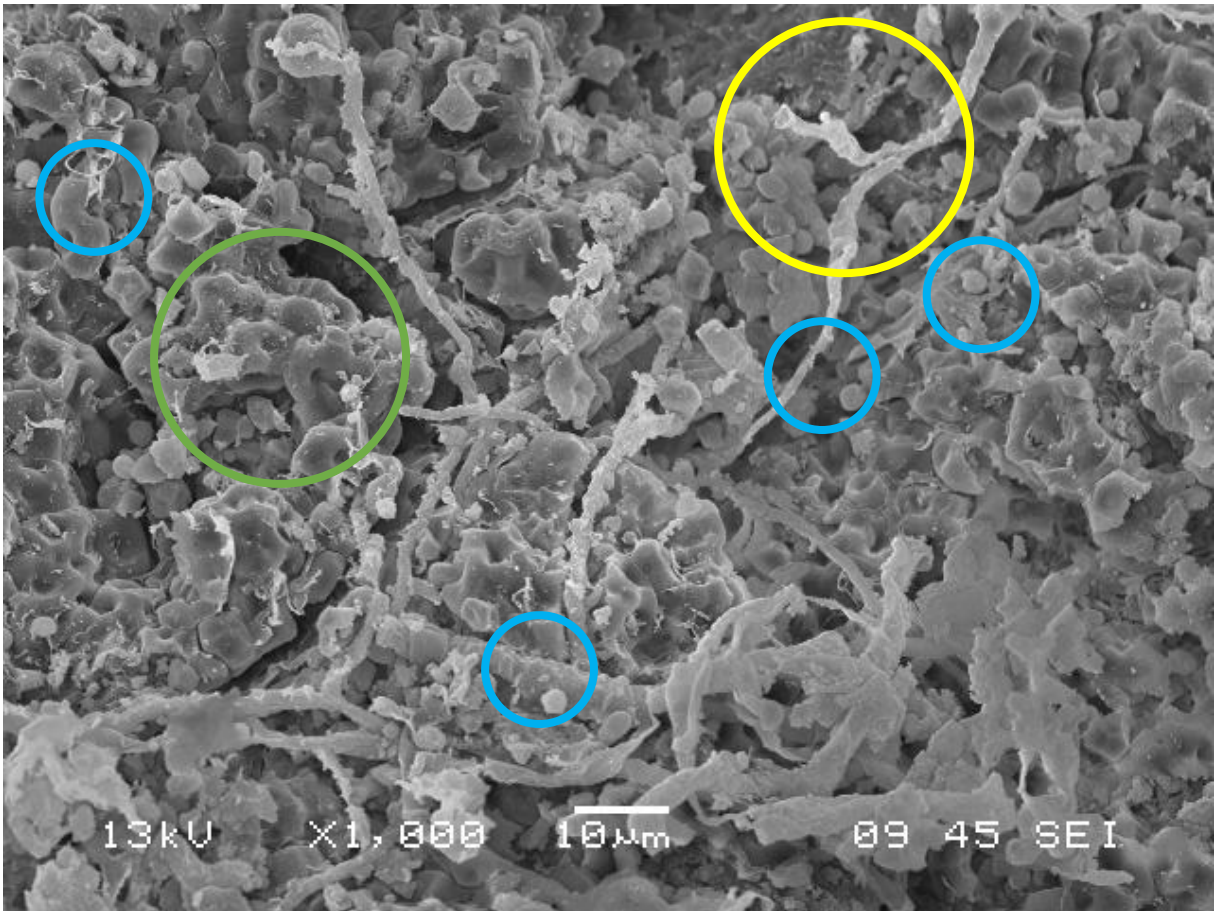


Imagen 38. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del primer ciclo para *Trichoderma asperellum*.

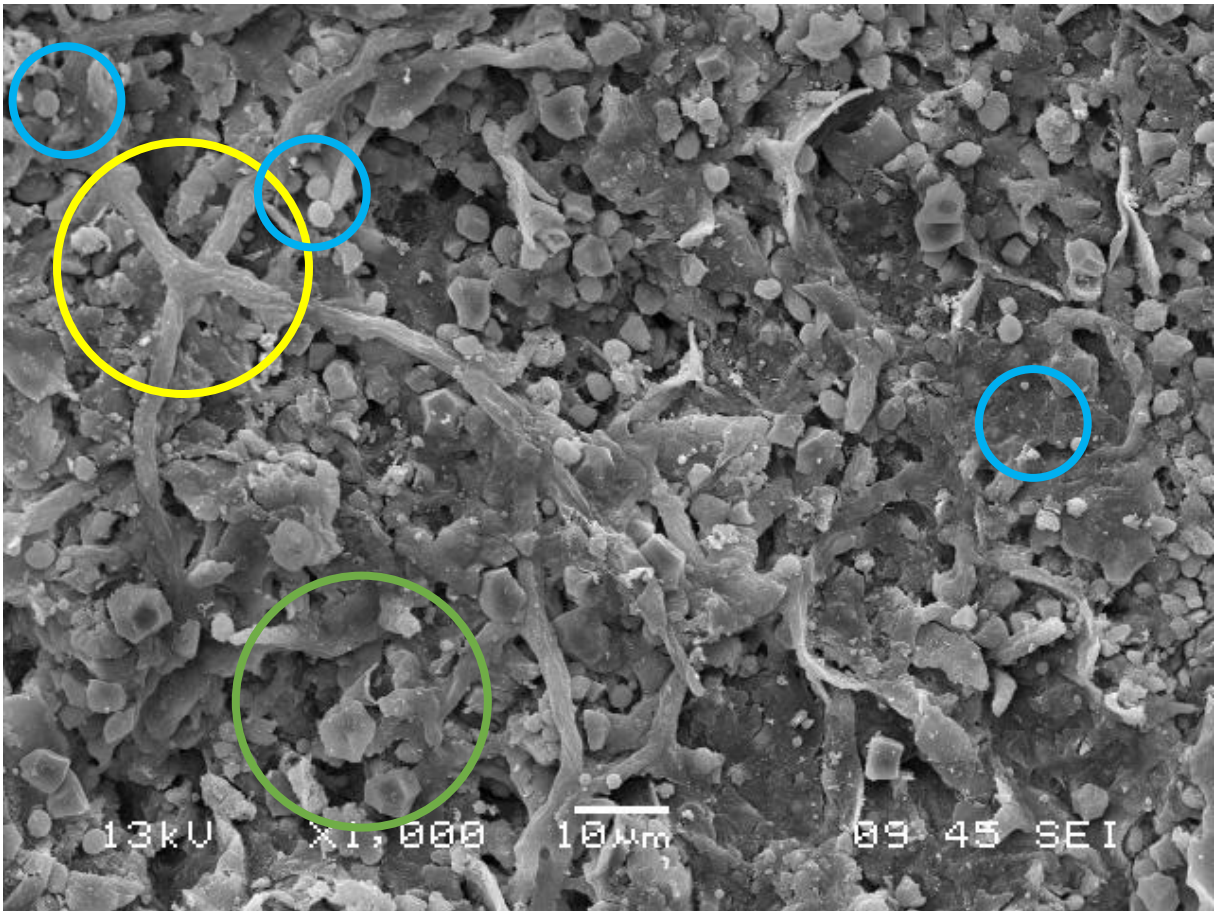


Imagen 39. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del primer ciclo para *Trichoderma asperellum*.

Ciclo 2

Para el ciclo dos aún se observa parte del sustrato libre (Imagen 40 y 41, círculo verde), además mayor abundancia tanto de conidios (Imagen 40 y 41, círculo turquesa), como de hifas y micelio (Imagen 40 y 41, círculo amarillo). En este caso también existe inicio de posible formación de biopelículas, aunque no tan notorias ni tan desarrolladas como con *Metarhizium robertsii*. Aunque el método de recuperación de conidios que se utilizó fue el mismo para ambos hongos, con este hongo se observó una menor densidad de crecimiento de estructuras fúngicas (hifas, micelio y conidios) por parte de *Trichoderma asperellum*, probablemente porque los conidios de este género son menos hidrofóbicos, comparado con *Metarhizium*, por lo tanto, se pudo haber logrado una mayor recuperación de conidios durante la cosecha, o también es probable que las adhesinas (péptidos encargados de adherencia al sustrato) se produzcan en menor cantidad o no sean tan efectivas.

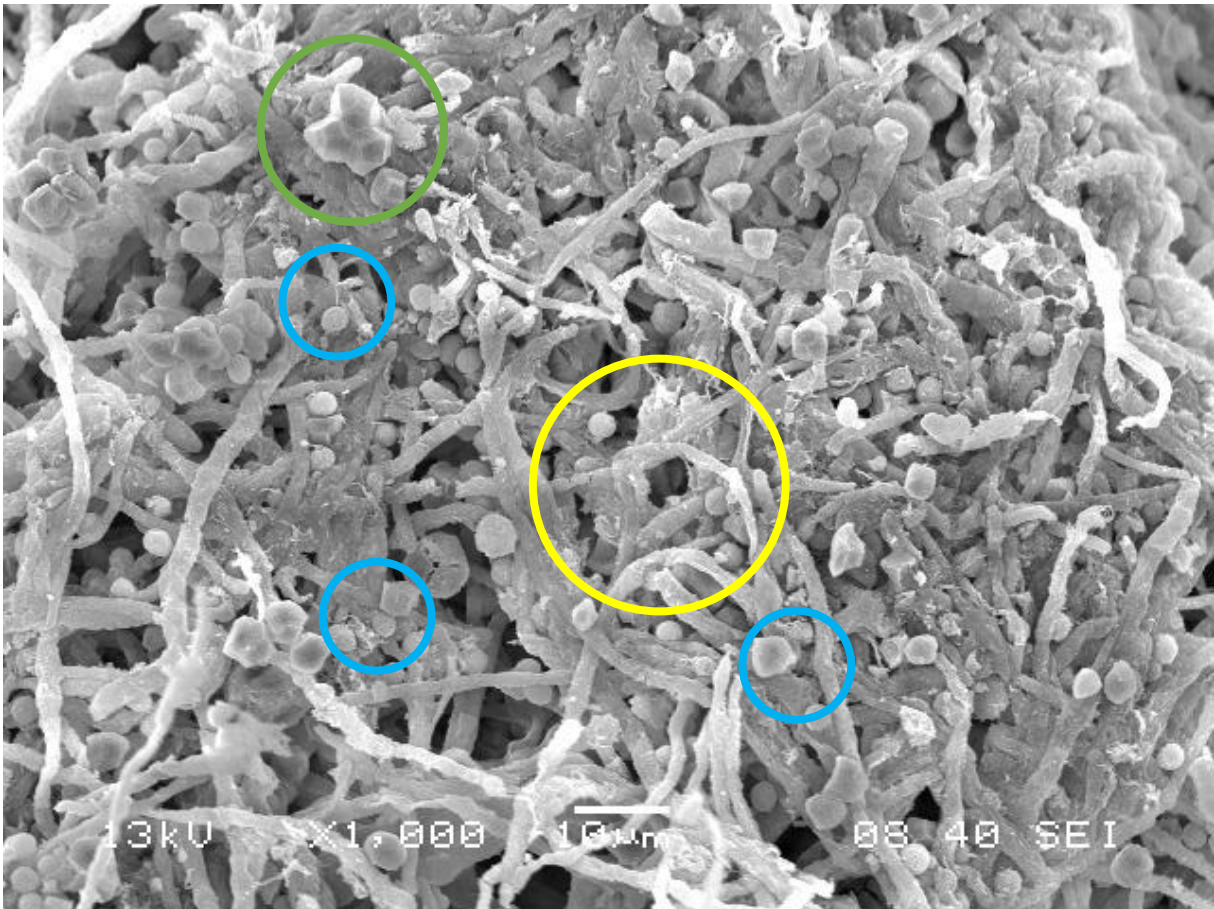


Imagen 40. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del segundo ciclo para *Trichoderma asperellum*.

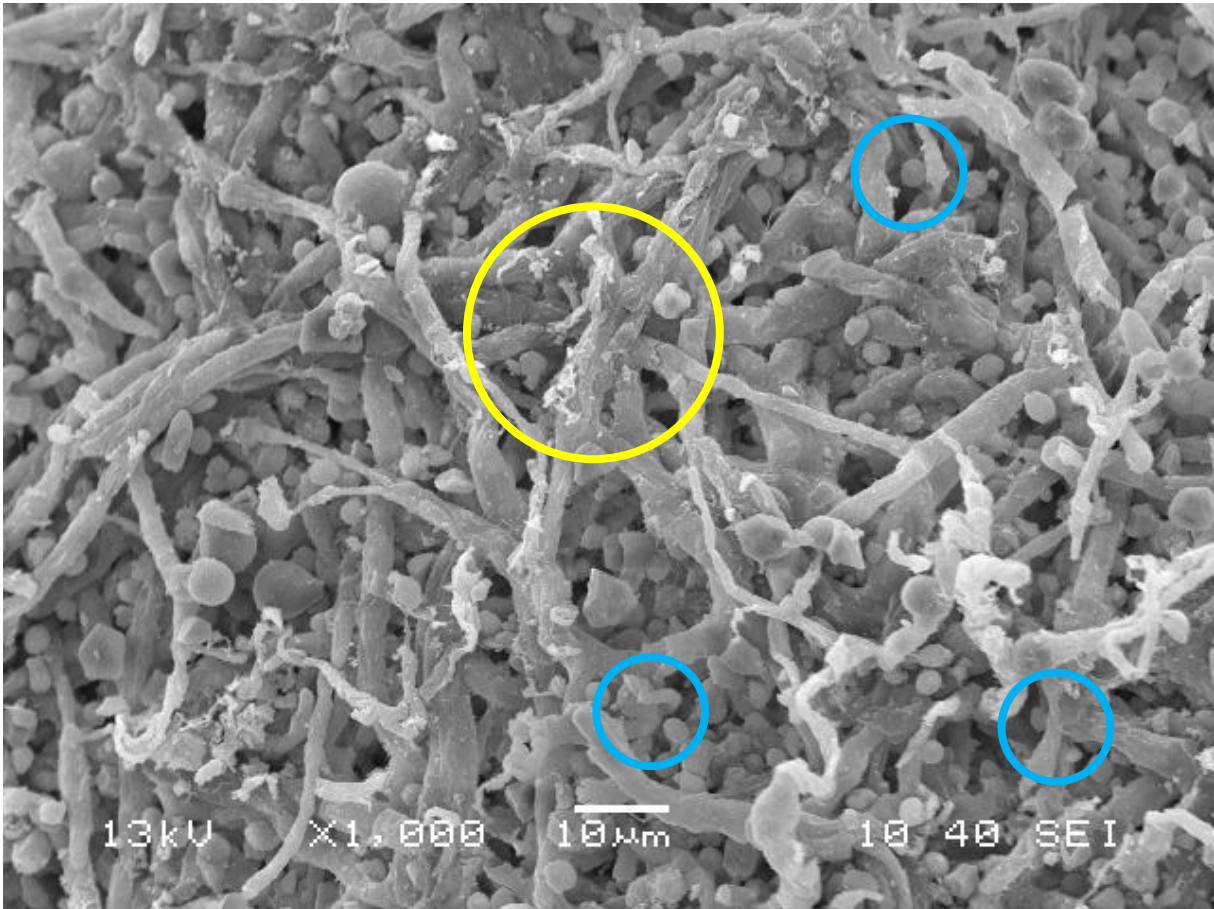


Imagen 41. Micrografía de sustrato posterior a la recolección de los conidios del segundo ciclo para *Trichoderma asperellum*.

Para ambos hongos que se estudiaron por microscopía electrónica se visualizaron conidios típicos para cada uno de los géneros, corroborando que la estrategia de reusar el sustrato libre de operaciones adicionales está ausente de contaminación.

9. Conclusión

Se desarrolló exitosamente una metodología sencilla para reusar el sustrato (arroz), logrando hasta 4 ciclos de reúso para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y 2 ciclos para *Trichoderma asperellum* Th-T4(3), sin operaciones adicionales de tratamiento a una escala semipiloto manteniendo la producción y calidad de los conidios. El límite para ciclos adicionales se encuentra cercano a la pérdida del 50 % del peso original del sustrato, esto se corroboró para ambos hongos.

10. Perspectivas

Los resultados obtenidos son prometedores en cuanto al aprovechamiento eficiente de los recursos en la producción de conidios fúngicos, manteniendo el rendimiento y calidad. Es importante como siguiente etapa aplicar dicha estrategia en sistemas de producción optimizados, con características parecidas de producción masiva (tipo de sustrato, cantidad y biorreactor). Además, la metodología desarrollada es simple, requiere de una capacitación y tecnología básica, por lo que se podría implementar en productores que estén interesados en ser autosustentables, es decir, utilizar esta estrategia para controlar las plagas en su cultivo más allá de comercializar. La implementación podría ser en primera instancia para productores que requieran de insumos para el control biológico bajo el esquema de autoconsumo, usando cepas probadas en las condiciones de campo.

En las condiciones analizadas de cultivo, existe un límite de reuso para el sustrato inicial (cerca del 50 % del peso original) donde las propiedades físicas y de probable acumulación de inhibidores impiden ciclos adicionales. Aunque el sustrato total utilizado con ciclos sucesivos fue de casi el 50 % del peso inicial, la parte que no se usa se podría evaluar para promover el crecimiento vegetal, con otros posibles efectos benéficos en las plantas, como abono en los cultivos con el fin de tener un proceso totalmente libre de residuos.

Por otro lado, las diferencias en los parámetros en cada ciclo de producción indudablemente cambian la morfología y fisiología de los hongos, lo que está relacionado con la producción de diferentes metabolitos que inciden en diferentes procesos (conidiación, virulencia, etc.) de inducción/represión, que se podrían estudiar más a detalle ampliando el conocimiento básico sobre estos hongos benéficos.

La formación de biopelículas fúngicas también está fuertemente regulada a nivel genético. Se ha reportado que en las biopelículas se da una mayor producción y variedad de enzimas, metabolitos y sustancias con valor comercial; además de proporcionar mayor resistencia a fármacos, mayor virulencia y otros beneficios. Sin embargo, el estudio de estas biopelículas se ha desarrollado más en bacterias, con menos conocimiento sobre la composición y características de las biopelículas de los hongos, motivo por el cual sería importante profundizar más en ello.

11. Referencias

- AGRICULTURA, (2021). Control biológico de plagas, al combate de los plaguicidas químicos. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/control-biologico-de-plagas-trabajo-en-conjunto-para-el-campo-mexicano?idiom=es>.
- AGRICULTURA, (2019). México potencia en control biológico de plagas. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/mexico-potencia-en-control-biologico-de-plagas?idiom=es>.
- Ahmad, I., del Mar Jiménez-Gasco, M., Luthe, D. S., Shakeel, S. N., & Barbercheck, M. E. (2020). Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biological Control*, *144*, 104167.
- Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M. D. M., Luthe, D. S., & Barbercheck, M. E. (2022). Endophytic *Metarhizium robertsii* suppresses the phytopathogen, *Cochliobolus heterostrophus* and modulates maize defenses. *PLoS one*, *17*(9), e0272944.
- Alcantara-Vargas E, Espitia-López J, Garza-López PM, Angel-Cuapio A. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, *91*, (e912912). <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.2912>.
- Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering Trichoderma–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, *7*(1), 61.
- Altahawi, A. G., Ibrahim, A. A., Eid, F. M., Ahmed, S. A., & Mahfouz, H. M. (2020). Efficacy of New Isolates of Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), from Sinai Peninsula against Yellow Mealworm *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae) under Laboratory Conditions. *Journal of Plant Protection and Pathology*, *11*(12), 687-691.
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Andrade-Michel, G. Y., Rodríguez-Rodríguez, J. C., Arredondo-Bernal, H. C., & Montesinos-Matías, R. (2017). Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal biology*, *121*(11), 920-928. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.07.007.
- Baron NC, Rigobelo EC, Zied DC. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, *79*(2), 307-315. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307>.
- Barra L, Vergara P, Cortes A. (2016). Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschh.) Sorokin 1883 in different substrates. *Chilean Journal of Agricultural Research* *76*(764). DOI:10.4067/S0718-58392016000400008.
- Bell, D. K. Wells. HD, & Markham, CR (1982). *in vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, *72*(4), 379-382,
- Bharadwaj, A., & Stafford III, K. C. (2011). Potential of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as a bioassay probe for *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) activity against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of economic entomology*, *104*(6), 2095-2098.
- Bich GA, Castrillo ML, Villalba LL, Zapata PD. (2018). Evaluation of rice by-products, incubation time, and photoperiod for solid state mass multiplication of the biocontrol agents *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Agronomy Research*, *16*(5), 1921-1930. <https://doi.org/10.15159/AR.18.197>.

- Bindschedler, S., Cailleau, G., & Verrecchia, E. (2016). Role of fungi in the biomineralization of calcite. *Minerals*, 6(2), 41.
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. D. R., Moonjely, S., Bidochka, M. J., & Toriello, C. (2019). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 83-102. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111>
- Cando-Narvaez A, Loera-Corral O, Hernández-Méndez JE. (2021). Rice recycling: A simple strategy to improve conidia production in solid-state cultures. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/lam.13614>.
- Cavalcante, R. S., Lima, H. L., Pinto, G. A., Gava, C. A., & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 100-104.
- Ceccon, Eliane. (2008). La revolución verde tragedia en dos actos. *Ciencias*. Julio-septiembre. Núm. 91. pp. 20-29.
- Cicero-Jurado L. (2020). INIFAP promueve y evalúa el control biológico de plagas. *Innovaciones para el campo*, (1), 22-24. https://vun.inifap.gob.mx/VUN_Media/PortalWeb/_media/_boletines/Innovaciones_para_el_campo_Num_1.pdf.
- Companioni-González B, Domínguez-Arizmendi G, García-Velasco R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Bioteología Vegetal*, 19(4), 237-248. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/639/html>.
- Dagno, K., Lahlali, R., & Jijakli, M. H. (2010). Effect of temperature and water activity on spore germination and mycelial growth of three fungal biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of Applied Microbiology*, 110, 521–528. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04908.x.
- Daryaei, A., Jones, E. E., Glare, T. R., & Falloon, R. E. (2016). pH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 92, 24-30.
- Deepa V, Temitope B, Madhvi C, Nikhil T, Rohan G. (2020). Chapter 10 Microbial Control of Pests and Weeds. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, (119-126). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00010-5>.
- De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Hernandez-Castillo, D., Rodríguez-Herrera, R., López-López, L. I., Castillo, F., & Aguilar, C. N. (2017). Solid-state fermentation in a bag bioreactor: effect of corn cob mixed with phytopathogen biomass on spore and cellulase production by *Trichoderma asperellum*. *Fermentation Processes; IntechOpen: London, UK*, 3, 43-56.
- Dorta, B., Bosch, A., Arcas, J. A., & Ertola, R. J. (1990). High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 712-715.
- Engin, K. (2019). Isolation, Molecular Characterization And Pathogenicity Of *Metarhizium Anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) From Soil In Erzincan Province, Turkey.
- Faria, M., Mascarin, G. M., Butt, T., & Lopes, R. B. (2023). On-farm Production of Microbial Entomopathogens for use in Agriculture: Brazil as a Case Study. *Neotropical Entomology*, 1-12.

- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 68-72. //doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002585.
- Franzin, M. L., Moreira, C. C., da Silva, L. N., Martins, E. F., Fadini, M. A., Pallini, A., ... & Venzon, M. (2022). *Metarhizium* Associated with Coffee Seedling Roots: Positive Effects on Plant Growth and Protection against *Leucoptera coffeella*. *Agriculture*, 12(12), 2030.
- García-Cruz I, del Pozo-Núñez EM, Hernández-Pérez Y. (2019). Producción y conservación de conidios del aislado Ma-005 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Centro Agrícola*, 46(1), 5-12. https://www.researchgate.net/publication/333016429_Conidial_production_and_conservation_of_the_isolate_Ma-005_of_Metarhizium_anisopliae_Metsch_Sorokin.
- Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, Duan Z, Hu X, Xie XQ, Zhou G, Peng G, Luo Z, Huang W, Wang B, Fang W, Wang S, Zhong Y, Ma LJ, St Leger RJ, Zhao GP, Pei Y, Feng MG, Xia Y, Wang C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*, 7(1), e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>.
- Golo, P. S., Gardner, D. R., Grilley, M. M., Takemoto, J. Y., Krasnoff, S. B., Pires, M. S., ... & Roberts, D. W. (2014). Production of destruxins from *Metarhizium spp.* fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. *PloS one*, 9(8), e104946.
- Gómez I, Alarcón A, León Ma, Oehlschlager C, Solórzano L. (2018). Capítulo 16: Comercialización de agentes de control biológico. *Control biológico de fitopatógeno, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas (766-791)*. AGROSAVIA. <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/34081/CB%20CAPITULO%2016%20-%20WEB.pdf?sequence=5&isAllowed=yesta>.
- Gómez-Ramírez H, Zapata-Granja A, Torres-Del Aguila E, Tenorio-Cantoral M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógeno. *Laboratorio de entomopatógenos*. SCB-SENASA. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Usode-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>.
- Grajek, W., & Gervais, P. (1987). Effect of the sugar-beet pulp water activity on the solid-state culture of *Trichoderma viride* TS. *Applied microbiology and biotechnology*, 26, 537-541.
- Hajek A, Eilenberg J. (2018). Strategies for using natural enemies. *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control (41-71)*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781107280267>.
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-del Valle MG, Hernández-Rodríguez A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009&lng=es&tlng=es.
- Hernández-Trejo A, Estrada-Drouaillet B, Rodríguez-Herrera R, García-Giron JM, Patiño-Arellano SA, Osorio-Hernández E. (2019). Importancia del control biológico de plagas

- en maíz (*Zea mays L.*). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 803-813. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1665>.
- Herrera, W., Valbuena, O., & Pavone-Maniscalco, D. (2020). Formulation of *Trichoderma asperellum* TV190 for biological control of *Rhizoctonia solani* on corn seedlings. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 1-8.
- IICA. (2015). Protocolos para la formulación y aplicación del bio-insumo: *Trichoderma* spp. Para el control biológico de enfermedades.
- Ibrahim, L., & JENKINSON, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106(6), 705-715. doi:10.1017/S0953756202006044
- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es.
- Kaláb, M. (2018). A Bowl of Rice and SEM. *Infocus Magazine-Proceedings of the Royal Microscopical Society in the UK*, 1(51), 13-36.
- Kifle, M. H., Yobo, K. S., & Laing, M. D. (2017). Biocontrol of *Aspergillus flavus* in groundnut using *Trichoderma harzianum* stain kd. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124, 51-56.
- Kline, (2020). Key Growth Forces for the Latin America Biopesticides Market: An Outlook to 2024. <https://klinegroup.com/key-growth-forces-for-the-latin-america-biopesticides-market/>.
- Kredics L, Manczinger L, Antal Z, Péntzes Z, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. In vitro water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *J Appl Microbiol*. 2004;96(3):491-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02167.x. PMID: 14962129.
- Kruger R, Posadas J, Lewylle M, Mini J, Lecuona R. (2014). Solid Substrate Production and Formulation of an Isolate of *Metarhizium anisopliae* for Biological Control of Stem Bug *Tibraca limbativentris*. *World Applied Sciences Journal* 32 (7), 1242-1251. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2014.32.07.82407. [https://www.idosi.org/wasj/wasj32\(7\)14/8.pdf](https://www.idosi.org/wasj/wasj32(7)14/8.pdf)
- Loera-Corral O, Porcayo-Loza J, Montesinos-Matias R, Favela-Torres E. (2016). Production of Conidia by the Fungus *Metarhizium anisopliae* Using Solid-State Fermentation. *Microbial Based Biopesticides*, 61-69. doi: 10.1007/978-1-4939-6367-6_6. PMID: 27565492.
- López-Alcántara YM. (2018). Producción y formulación de *Trichoderma asperellum* para el manejo de patógenos de la raíz de caña de azúcar [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].
- Maïga, Y., Carboué, Q., Hamrouni, R., Tranier, M. S., Ben Menadi, Y., & Roussos, S. (2021). Development and evaluation of a disposable solid-state culture packed-bed bioreactor for the production of conidia from *Trichoderma asperellum* grown under water stress. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 3223-3231.
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tlng=es.

- Méndez-González F, Loera-Corral O, Saucedo-Castañeda G, Favela-Torres E. (2020). Forced aeration promotes high production and productivity of infective conidia from *Metarhizium robertsii* in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*. (156). doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107492>
- MINSA, MIDA, MEDUCA-JICA. (2010). Guía del manejo integrado de plagas (MIP) para técnicos y productores. <https://corporacionbiologica.info/wp-content/uploads/2021/07/Guia-del-MIP-para-tecnicos-y-productores.pdf>
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Kumar, N. (2015). Biopesticides: Where We Stand? En N. K. Arora, (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* (pp. 37-75). Nueva Delhi, India: Springer
- Morán-Diez, ME, Glare, TR. (2016). What are Microbial-based Biopesticides? In *Microbial-Based Biopesticides*. ed. 279 Glare T.R, Morán-Diez M.E. pp. 1- 10. Humana Press, New York, NY.
- Mulatu A, Alemu T, Megersa N, Vetukuri RR. (2021). Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. *Microorganisms*, 9(8), 1675. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081675>.
- Muñiz-Paredes F, Miranda-Hernández F, Loera-Corral O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3). doi: 10.007/s11274-017-2229-2.
- Montesinos-Matías, R., Ayala-Zermeño, M., & Berlanga-Padilla, A. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Unidad de Promoción y Vinculación- SENASICA. ISBN: 978-968-5384-08-7
- Nuñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 771-777. doi: 10.1590/S1516-89132010000400004.
- Pacheco-Hernández ML, Reséndiz-Martínez JF, Arriola-Padilla VJ. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>.
- Portilho-da-Cunha L, Perpétua-Casciadori F, Valente-Vicente I, Laurito- Garcia R, Cláudio-Thomé J. (2020). *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. *Process biochemistry*, v.97, 104-111.
- Praprotnik, E., Lončar, J., & Razinger, J. (2021). Testing virulence of different species of insect associated fungi against yellow mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) and their potential growth stimulation to maize. *Plants*, 10(11), 2498.
- Pucheta-Díaz M, Flores-Macías A, Rodríguez-Navarro S, de la Torre M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es.
- Rayhane, H., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., & Sevastianos, R. (2019). From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of environmental management*, 252, 109496.

- Ramírez Granillo, A., Canales, M. G. M., Espíndola, M. E. S., Martínez Rivera, M. A., De Lucio, V. M. B., & Tovar, A. V. R. (2015). Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC microbiology*, 15, 1-15.
- Reynoso-López, E., Méndez-Hernández, J., Ek-Ramos, J., Montesinos-Matías, R., & O. Loera. (2021). *Metarhizium robertsii* in combination with *Trichoderma asperellum* reduce the malathion doses used to control ambrosia beetles: the case of *Xyleborus affinis*. *Biocontrol Science and Technology*, 31:10, 1080-1097, DOI: 10.1080/09583157.2021.1923656.
- Rodríguez-Gámez A, Gandarilla-Pacheco FL, Maldonado-Blanco MG, Quintero-Zapata I, Morales-Ramos LH, Alfaro-Alvarez JH, Elías-Santos M. (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (BALS.) vuill. (HYPOCREALES: CORDYCIPITACEAE) en cultivo bifásico. *Interciencia*, 42, (11), 739-743. <https://www.redalyc.org/journal/339/33953499006/html/>.
- Santelices C, Castro J. (2020). Preservación de microorganismos por liofilización. *Conformación de colecciones de cultivos microbianos*, (428), 94-115. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6945/NR42412.pdf?sequence=11&isAllowed=y>
- Santi L, Silva L, Beys-da-Silva W, Corrêa A, Rangel D, Carlini C, Schrank A, Vainstein M. (2011). Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (27). 10.1007/s11274-011-0695-5. https://www.researchgate.net/publication/225168889_Virulence_of_the_entomopathogenic_fungus_Metarhizium_anisopliae_using_soybean_oil_formulation_for_control_of_the_cotton_stainer_bug_Dysdercus_peruvianus
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99(1), 101-107.
- Secretariat, I. P. P. C., Gullino, M. L., Albajes, R., Al-Jboory, I., Angelotti, F., Chakraborty, S., ... & Stephenson, T. (2021). *Scientific review of the impact of climate change on plant pests*. FAO on behalf of the IPPC Secretariat. <https://doi.org/10.4060/cb4769en>
- Smith, C., & Edgington, S. (2011). Germination at different water activities of similarly aged *Metarhizium conidia* harvested from ageing cultures. *Journal of stored products research*, 47(3), 157-160. [//doi.org/10.1016/j.jspr.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.01.007)
- Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, Arana-Cuenca A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30, 73-80. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007&lng=es&tling=es.
- Toscano-Palomar L, Vertiz-Pelaez E, Cervantes-Díaz L, Amado-Moreno MG, García-Velázquez A, Beleño-Cabarcas MT, Castro-Toscano MJ. (2015). Comparación de tres tecnologías en la preservación de conidias de hongos filamentosos y pruebas de viabilidad. *Ciencia y Tecnología*, 15, 125-134. ISSN 1850-0870. https://www.palermo.edu/ingenieria/pdf2015/15/CyT_15_09.pdf
- Toledo, A. V., Lopez Lastra, C. C., Gutierrez, A. C., Muttis, E., & Garcia, J. J. (2021). Bioensayos con entomopatógenos y uso de protocolos.


- Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2007). Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 231-237.
- Xu C, Zhang X, Qian Y, Chen X, Liu R, Zeng G, et al. (2014). A High-Throughput Gene Disruption Methodology for the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. *PLoS ONE* 9(9), e107657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107657>.
- Ye, S.D., Ying, S.H., Chen, C. and Feng, M.G. (2006) New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnol Let* 28, 799–804.
- Zepeda-Jazo I. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 15(1), 99-108. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722018000100099&lng=es&tlng=es.



Producción a escala semipiloto de conidios usados en contol biológico empleando una estrategia sencilla de reuso de sustrato.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 7 del mes de agosto del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
- DR. SERGIO HUERTA OCHOA
- DR. OSCAR ARCE CERVANTES
- DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ



AKZAYACATL GARCIA VALDES
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DE: AKZAYACATL GARCIA VALDES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

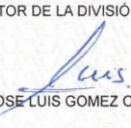
REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

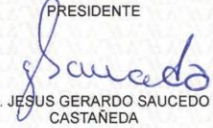
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. JESUS GERARDO SAUCEDO
CASTAÑEDA

VOCAL



DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL



DR. OSCAR ARCE CERVANTES

SECRETARIA



DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ