



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en biorreactores de fermentación en medio sólido de escala laboratorio a piloto

Para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en C. A. José Fernando Méndez González

Director

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores

Dr. Octavio Loera Corral

Dr. Arturo Alejandro Figueroa Montero

Ciudad de México a 30 de marzo de 2022

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con la referencia 001466.

Ciudad de México a 30 de marzo de 2022

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en biorreactores de fermentación en
medio sólido de escala laboratorio a piloto

que presentó:

M. en C. A. José Fernando Méndez González

Comité tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Arturo Alejandro Figueroa Montero

Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dr. Arturo Alejandro Figueroa Montero

Vocal: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Vocal: Dr. Roberto Montesinos Matías

Agradecimientos

A Ernesto Favela Torres por ser mi mentor durante mi formación de posgrado.

A los doctores Octavio Loera Corral, Gerardo Saucedo Castañeda y Arturo Figueroa Montero por su asesoría y colaboración en la publicación de resultados.

A la UAM por permitirme ser parte de su comunidad desde el 2008.

Al CONACyT por la beca que me otorgó para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

1. Resumen

Los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* son importantes agentes de control biológico. Regularmente, los conidios de estos hongos se producen en biorreactores de bolsa que presentan una capacidad limitada (1 kg de sustrato) y dificultades para el monitoreo y control de las condiciones de cultivo. Por lo que, este tipo de proceso presenta importantes variaciones de producción, productividad y calidad de conidios, lo que junto a los altos requerimientos de mano de obra y área de planta afectan a la viabilidad del proceso y la comercialización exitosa del producto. Las limitantes del proceso hacen evidente la necesidad de establecer nuevos procesos controlados que operen a mayor escala y permitan obtener altas concentraciones de conidios. Por ello, en este proyecto se evaluó la producción de conidios en biorreactores con diferentes mecanismos de aireación, así como, diversas condiciones de operación. Una vez seleccionado el tipo de biorreactor y sus condiciones de operación, se seleccionó el material de fabricación de las unidades experimentales y se realizaron balances de transferencia de calor y masa para estimar sus dimensiones. Finalmente, se evaluaron estrategias para mejorar la estructura de la matriz sólida (agitación mecánica y adición de texturizantes), la remoción de calor, el desarrollo del microorganismo y la producción de conidios. Se seleccionó el biorreactor de columna empacada con aireación forzada debido a que en él se alcanza una productividad de conidios viables hasta 1.8 veces mayor que la obtenida los biorreactores de bolsa y charolas. En las columnas empacadas, la remoción de calor por mecanismos convectivos permite mantener una temperatura ≤ 33 °C en los primeros 30 cm de altura; la cual, favorece al desarrollo y la producción de conidios de *Metarhizium robertsii* (Xoch 8.1). No obstante, el incremento del diámetro de la columna aumenta sensiblemente la densidad del empaque (hasta 0.84 g/cm^3 a partir de los 10 cm de diámetro), dificultando el transporte de calor y masa, afectando, a su vez, al desarrollo del microorganismo y su producción de conidios. Para evitar este fenómeno, la adición de empaques esféricos de plástico al lecho de cultivo mejoró la estructura de la matriz sólida (disminuyendo su densidad), el intercambio gaseoso y la remoción de calor; con ello, se obtuvo una producción de conidios (1.23×10^9 conidios/gms) similar a la obtenida en biorreactores de escala laboratorio (de 1.23 a 1.44×10^9 conidios/gms). Bajo las condiciones evaluadas, se estima que el biorreactor de columna empacada puede alcanzar un volumen de operación de 47.71 L (~ 25 kgms) para producir $\sim 3.1 \times 10^{13}$ conidios por lote. Esta columna empacada podría formar parte de un biorreactor modular que opere en un proceso controlado a nivel industrial, con mayores rendimientos de producción y, menores requerimientos de mano de obra y área de planta que el proceso tradicional en biorreactores de bolsa.

2. Abstract

Entomopathogenic fungi of the genus *Metarhizium* are important biological control agents. Regularly, the conidia of these fungi are produced in bag bioreactors that have limited capacity (1 kg of the substrate) and difficulties in monitoring and controlling culture conditions. Therefore, this type of process presents important variations in production, productivity, and quality of conidia which together with the high requirements of labor and area affect the viability of the process and the successful commercialization of the product. The limitations of the process make evident the need to establish new controlled processes that operate on a larger scale and allow obtaining high concentrations of conidia. For this reason, in this project, the production of conidia in bioreactors with different aeration mechanisms, as well as different operating conditions, was evaluated. Once the type of bioreactor and its operating conditions were selected, the manufacturing material of the experimental units was selected, and heat and mass transfer balances were made to estimate their dimensions. Finally, strategies were evaluated to improve the structure of the solid matrix (mechanical agitation and addition of texturizers), heat removal, microorganism growth, and conidia production. The packed column bioreactor with forced aeration was selected because it achieves productivity of viable conidia up to 1.8 times greater than that obtained with bag and tray bioreactors. In packed columns, heat removal by convective mechanisms allows maintaining a temperature ≤ 33 °C in the first 30 cm of height, which favors the growth and production of conidia of *Metarhizium robertsii* (Xoch 8.1). However, the increase in the diameter of the column significantly increases the packed density (up to 0.84 g/cm^3 from 10 cm in diameter), hindering the transport of heat and mass, affecting, in turn, the microorganism growth and its conidia production. To avoid this phenomenon, the addition of plastic spherical packing to the culture bed improved the structure of the solid matrix (decreasing the packed density), gas exchange, and heat removal. The above allows reaching a conidia production (1.23×10^9 conidia/gdm) similar to those obtained in laboratory-scale bioreactors (from 1.23 to 1.44×10^9 conidia/gdm) was obtained. Under the conditions tested, the packed column bioreactor can reach an operating volume of 47.71 L (~ 25 kgdm) to produce $\sim 3.1 \times 10^{13}$ conidia per batch. This packed column could form part of a modular bioreactor that operates in an industrially controlled process, with higher production yields and lower labor and area requirements than the traditional bag bioreactor process.

Contenido

1. Resumen	5
2. Abstract	6
3. Introducción	19
4. Revisión bibliográfica	20
4.1. La problemática de las plagas agrícolas y su tratamiento químico	20
4.2. El control biológico	21
4.3. Los hongos entomopatógenos	24
4.3.1. Procesos de producción de conidios de hongos entomopatógenos	25
4.3.1.1. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores de bolsa	25
4.3.1.2. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores estáticos y agitados	27
4.3.1.2.1. Biorreactor de charolas	28
4.3.1.2.2. Biorreactor de columna empacada	30
4.3.1.2.3. Biorreactores agitados	32
4.3.2. <i>Metarhizium</i> sp. como agente de control biológico	35
5. Justificación	37
6. Hipótesis	37
7. Objetivos	38
7.1. Objetivo general	38
7.2. Objetivos específicos	38
8. Estrategia experimental	38
9. Materiales y métodos	39
9.1. Microorganismo y su propagación	40
9.2. Sustrato e inóculo	40
9.3. Efecto del mecanismo de aireación sobre la producción de conidios	41
9.3.1. Efecto la tasa de aireación sobre la producción de conidios en biorreactores de columna y charolas	41
9.3.2. Cinética de producción de conidios en biorreactores de bolsa, charola y columna	42
9.3.3. Comparación de la calidad de los conidios producidos en biorreactores de bolsa, charola y columna	42

9.4.	Estudios cinéticos en biorreactores de columna empacada.....	43
9.4.1.	Análisis respirométrico.....	43
9.4.2.	Cinética de producción de conidios y CO ₂	44
9.5.	Efecto del aumento de escala sobre el cultivo de <i>M. robertsii</i>	45
9.5.1.	Efecto del material de fabricación del biorreactor sobre el cultivo de <i>M. robertsii</i>	45
9.5.2.	Determinación de la altura crítica del biorreactor.....	46
9.5.2.1.	Construcción del modelo de transferencia de calor en columna empacada.....	47
9.5.2.2.	Estimación de las propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo.....	49
9.5.2.2.1.	Estimación de la composición elemental del arroz.....	50
9.5.2.2.2.	Estimación de la capacidad calorífica.....	50
9.5.2.2.3.	Estimación de la conductividad calorífica de los granos de arroz.....	50
9.5.2.2.4.	Estimación de la fracción vacía del lecho de cultivo.....	52
9.5.2.2.5.	Estimación de la conductividad calorífica del lecho de cultivo.....	53
9.5.2.2.6.	Estimación del área superficial de las partículas sólidas por volumen unitario de lecho	53
9.5.2.3.	Cultivo de <i>M. robertsii</i> en biorreactor de columna empacada de escala piloto ...	53
9.5.2.4.	Estimación de las tasas de flujo de calor y parámetros asociados.....	54
9.5.2.5.	Simulación del perfil de temperatura en el BCE.....	56
9.5.3.	Efecto del aumento de las dimensiones del biorreactor sobre la densidad de empaque	56
9.5.4.	Efecto del aumento del diámetro del biorreactor sobre el cultivo de <i>M. robertsii</i>	57
9.5.5.	Estrategias para el mejoramiento de las condiciones de cultivo de <i>M. robertsii</i> .	57
9.5.5.1.	Producción de conidios en biorreactores de agitados.....	58
9.5.5.2.	Efecto del uso de empaques esféricos en el lecho de cultivo en biorreactores de columna empacada.....	58
9.6.	Análisis estadístico.....	59
10.	Resultados y discusión.....	59
10.1.	Efecto del mecanismo de aireación sobre la producción de conidios.....	59
10.1.1.	Efecto de la tasa de aireación sobre la producción de conidios en biorreactores de columna y charolas.....	60
10.1.2.	Cinética de producción de conidios en biorreactores de bolsa, charola y columna	62

10.1.3.	Comparación de la calidad de los conidios producidos en biorreactores de bolsa, charola y columna	63
10.2.	Estudios cinéticos en biorreactores de columna empacada.....	64
10.2.1.	Análisis respirométrico del cultivo de <i>Metarhizium robertsii</i> en biorreactores de columna empacada de escala laboratorio	65
10.2.2.	Cinética de producción de conidios y CO ₂	69
10.3.	Efecto del aumento de la altura y diámetro del biorreactor sobre el cultivo de <i>M. robertsii</i>	70
10.3.1.	Efecto del material de fabricación del biorreactor sobre el cultivo de <i>M. robertsii</i> 71	
10.3.2.	Estimación de la altura de operación del biorreactor.....	75
10.3.2.1.	Determinación de propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo.....	75
10.3.2.2.	Cultivo de <i>M. robertsii</i> en biorreactor columna empacada de escala piloto	76
10.3.2.3.	Estimación de las tasas de flujo de calor.....	79
10.3.2.4.	Simulación del perfil de temperatura en el biorreactor de escala piloto	82
10.3.3.	Efecto del aumento de las dimensiones del biorreactor sobre la densidad de empaque	84
10.3.4.	Efecto del aumento del diámetro del biorreactor sobre el cultivo de <i>M. robertsii</i> 85	
10.3.5.	Estrategias para el mejoramiento de las condiciones de cultivo de <i>M. robertsii</i> .	89
10.3.5.1.	Producción de conidios en biorreactores agitados.....	90
10.3.5.2.	Efecto del uso de empaques esféricos en el lecho de cultivo en biorreactores de columna empacada	92
10.3.5.2.1.	Análisis del transporte de calor y diseño del biorreactor	97
11.	Conclusiones	99
12.	Bibliografía	100
13.	Lista de productos académicos	125

Índice de Figuras

Figura 1. Biorreactor de charolas.....	29
Figura 2. Biorreactor de columna empacada.....	30
Figura 3. Biorreactor con agitación interna.....	34
Figura 4. Biorreactor de tambor rotatorio.....	34
Figura 5. Estrategia experimental.....	39
Figura 6. Ubicación de los termopares en biorreactores de $D_i=10\text{cm}$ y biorreactores CA y CV.....	46
Figura 7. Distribución de las secciones de muestreo en los biorreactores CV, CA y CP, imagen del lecho empacado y imagen de los sectores de muestreo.....	46
Figura 8. Esquema de la columna empacada con coordenadas cilíndrica.....	47
Figura 9. Biorreactor de columna empacada de escala piloto e instrumentación.....	54
Figura 10. Algoritmo para la obtención de flujos de calor y validación del modelo.....	55
Figura 11. Biorreactores de columna empacada de diferentes diámetros.....	57
Figura 12. Biorreactor de aspas y biorreactor de tambor rotatorio.....	58
Figura 13. Humedad final del sustrato y producción de conidios en biorreactores de columna empacada con diferente tasa de aireación.....	61
Figura 14. Humedad final del sustrato y producción de conidios en biorreactores de charolas con diferente tasa de aireación.....	61
Figura 15. Producción de conidios en biorreactores de columna empacada, charolas y bolsas.....	63
Figura 16. Productividad de conidios en biorreactores de columna empacada, charolas y bolsas.....	63
Figura 17. Perfil cinético de las tasas de consumo de O_2 y producción de CO_2	65
Figura 18. Perfil cinético del consumo de O_2 y producción de CO_2	66
Figura 19. Ajuste de la producción global de CO_2 con el modelo exponencial.....	67
Figura 20. Estimación de la fase Lag.....	68
Figura 21. Perfil cinético del coeficiente respiratorio (CO_2/O_2).....	69
Figura 22. Cinética de producción de conidios y CO_2	70
Figura 23. Tasa de producción de CO_2 en biorreactores de columna empacada de diferentes materiales.....	72
Figura 24. Producción global de CO_2 en biorreactores de columna empacada de diferentes materiales.....	72

Figura 25. Cinética de temperatura en biorreactores de columna empacada de 10 cm de diámetro fabricados en vidrio y acero inoxidable.	73
Figura 26. Comparación de la humedad y producción de conidios en biorreactores de 2 y 10 cm de diámetro interno.	74
Figura 27. Cinética de la tasa de consumo de O ₂ , tasa de producción de CO ₂ y coeficiente respiratorio del cultivo en el biorreactor de columna empacada de escala piloto.	77
Figura 28. Humedad y temperatura del aire a la entrada y salida del biorreactor.	78
Figura 29. Perfil de temperatura ambiental y en diferentes puntos axiales del biorreactor de columna empacada de escala piloto.	78
Figura 30. Cinética de las tasas de flujo de calor estimadas en el sistema. L.	80
Figura 31. Cinética de tasa de flujo de calor acumulado experimental y calculado en el biorreactor de columna empacada de escala piloto.	81
Figura 32. Perfil de temperatura global experimental y calculada en el biorreactor de columna empacada de escala piloto.	81
Figura 33. Distribución de la temperatura en el BCE de escala piloto.	83
Figura 34. Densidad de empaque en función del diámetro y la altura del biorreactor del empaque.	85
Figura 35. Producción de CO ₂ en biorreactores de columna empacada de 2, 4, 10 y 19 centímetros de diámetro interno.	86
Figura 36. Tasa de producción de CO ₂ en biorreactores de columna empacada de 2, 4, 10 y 19 centímetros de diámetro interno.	86
Figura 37. Humedad final del lecho y producción de conidios en secciones centrales y periféricas de biorreactores de columna empacada de 10 y 19 centímetros de diámetro.	89
Figura 38. Comparación de la humedad final del lecho y la producción de conidios en biorreactores de columna empacada, tambor rotario y aspas.	91
Figura 39. Tasa de producción de CO ₂ en biorreactores de columna empacada con y sin empaques esféricos.	93
Figura 40. Producción de CO ₂ en biorreactores de columna empacada con y sin empaques esféricos.	93
Figura 41. Perfiles de temperatura en Ax1, Ax2, Ax3 y C, registrados en los biorreactores de columna empacada con y sin empaques esféricos.	96

Figura 42. Contenido de humedad y producción de conidios en las diferentes secciones axiales de los biorreactores de columna empacada con y sin empaques esféricos.	97
Figura 43. Distribución de temperatura axial en el biorreactor de columna empacada con empaques esféricos plásticos.....	98

Índice de Tablas

Tabla 1. Relación de organismos más utilizados en el control biológico.....	23
Tabla 2. Condiciones de proceso y rendimientos de producción de conidios de agentes de control biológico en biorreactores de bolsa.....	27
Tabla 3. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores de charolas.....	28
Tabla 4. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores de columna empacada.....	32
Tabla 5. Composición química del arroz.....	50
Tabla 6. Propiedades del sistema ingresadas al software	56
Tabla 7. Parámetros de la fermentación y calidad de los conidios producidos en BCE, BCh y BB. ..	64
Tabla 8. Parámetros estimados usando los modelos matemáticos	69
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo.....	76
Tabla 10. Comparación de propiedades del sistema en biorreactores con diferentes diámetros...	88
Tabla 11. Comparación de las propiedades en biorreactores de columna empacada con y sin empaques esféricos de plástico.....	95

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Producción de CO ₂ por modelo logístico.....	44
Ecuación 2. Consumo de O ₂ por el modelo de Soto-Cruz	44
Ecuación 3. Modelo exponencial para la producción de CO ₂	44
Ecuación 4. Balance general de transferencia de calor en BCE.	47
Ecuación 5. Acumulación de calor en el lecho de cultivo.	48
Ecuación 6. Generación de calor por acción microbiana.....	48
Ecuación 7. Disipación de calor por conducción.....	48
Ecuación 8. Coeficiente radial de transferencia de calor.....	48
Ecuación 9. Ecuación desarrollada para la disipación radial de calor.....	49
Ecuación 10. Disipación de calor por convección.	49
Ecuación 11. Disipación de calor por evaporación.	49
Ecuación 12. Modelo experimental para el balance de la transferencia de calor en BCE.....	49
Ecuación 13. Correlación para la estimación de la capacidad calorífica.....	50
Ecuación 14. Densidad del arroz húmedo.	51
Ecuación 15. Correlación para la estimación de la densidad del agua en una mezcla.	51
Ecuación 16. Correlación para la estimación de la densidad de los carbohidratos.....	51
Ecuación 17. Correlación para la estimación de la densidad de las proteínas.	51
Ecuación 18. Correlación para la estimación de la densidad de las grasas.	51
Ecuación 19. Correlación para la estimación de la densidad de la fibra.....	51
Ecuación 20. Correlación para la estimación de la densidad de las cenizas.....	51
Ecuación 21. Estimación de la fracción volumétrica.....	51
Ecuación 22. Conductividad calorífica del arroz húmedo.....	52
Ecuación 23. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica del agua.	52
Ecuación 24. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de los carbohidratos.	52
Ecuación 25. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de las proteínas.	52
Ecuación 26. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de las grasas.....	52
Ecuación 27. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de la fibra.	52
Ecuación 28. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de las cenizas.	52
Ecuación 29. Densidad del lecho.	52
Ecuación 30. Fracción vacía del lecho.....	52

Ecuación 31. Capacidad calorífica del lecho de cultivo.....	53
Ecuación 32. Superficie específica de la partícula de arroz.	53
Ecuación 33. Área superficial de las partículas por volumen unitario de lecho.	53
Ecuación 34. Igualdades para la estimación del calor removido por mecanismo convectivo.	55

Simbología y unidades

Símbolo	Concepto	Unidades
q_{acum}	Tasa de flujo de calor acumulado	J/h
q_{prod}	Tasa de flujo de calor generado	J/h
q_z	Tasa de flujo de calor removido por convección en dirección axial	J/h
q_r	Tasa de flujo de calor removido por conducción en dirección radial	J/h
q_{vap}	Tasa de flujo de calor removido por evaporación	J/h
C_{pb}	Capacidad calorífica del lecho a presión constante	J/g
C_{pair}	Capacidad calorífica del aire a presión constante	J/g
m_b	Masa del lecho	gmh
m_{bsi}	Masa seca inicial del lecho	gms
ϵ	Porosidad del lecho	
r_{CO_2}	Tasa molar de producción de CO ₂	mol _{CO2} /gmsi h
α	Coefficiente de producción de calor por mol de CO ₂ producido	J/mol _{CO2}
U_r	Coefficiente radial de transferencia de calor	W/m ² K
A_c	Área característica de transferencia de calor	cm ²
k_{wall}	Conductividad calorífica de la pared del biorreactor	W/m K
k_b	Conductividad calorífica del lecho	W/m K
k_{air}	Conductividad calorífica del aire	W/m K
k_r	Conductividad calorífica del arroz	W/m K
k_w	Conductividad calorífica del agua	W/m K
k_c	Conductividad calorífica de los carbohidratos	W/m K
k_p	Conductividad calorífica de las proteínas	W/m K
k_g	Conductividad calorífica de las grasas	W/m K
k_f	Conductividad calorífica de la fibra	W/m K
k_a	Conductividad calorífica de las cenizas	W/m K

h	Coefficiente convectivo de transferencia de calor	$W/m^2 K$
T_{air}	Temperatura del aire	$^{\circ}C$
T_b	Temperatura del lecho	$^{\circ}C$
a	Área superficial de la partícula sólida por volumen unitario de lecho	$1/cm$
S	Área de corte transversal vacía del lecho	cm^2
L	Longitud del lecho	cm
λ_w	Calor latente de vaporización del agua	kJ/kg
ρ_{air}	Densidad del aire	g/cm^3
Q_{air}	Flujo volumétrico del aire	cm^3/min
H_{air}	Humedad del aire	$g_w/g \text{ mezcla}$
x_w	Fracción másica del agua	$g_w/g \text{ mezcla}$
x_c	Fracción másica de los carbohidratos	$g_c/g \text{ mezcla}$
x_p	Fracción másica de las proteínas	$g_p/g \text{ mezcla}$
x_g	Fracción másica de las grasas	$g_g/g \text{ mezcla}$
x_f	Fracción másica de la fibra	$g_f/g \text{ mezcla}$
x_a	Fracción másica de las cenizas	$g_a/g \text{ mezcla}$
ρ_w	Densidad del agua	g_w/cm^3_w
ρ_c	Densidad de los carbohidratos	g_c/cm^3_c
ρ_p	Densidad de las proteínas	g_p/cm^3_p
ρ_g	Densidad de las grasas	g_g/cm^3_g
ρ_f	Densidad de la fibra	g_f/cm^3_f
ρ_a	Densidad de las cenizas	g_a/cm^3_a
ρ_r	Densidad de los granos de arroz húmedos	g/cm^3
ρ_b	Densidad del lecho	g/cm^3
x_{vi}	Fracción volumétrica del arroz	cm^3_r/cm^3_b
V_b	Volumen útil de la columna	cm^3
V_p	Volumen de los granos de arroz	cm^3
S_p	Área superficial de los granos de arroz	cm^2
a_{part}	Superficie específica de la partícula de arroz	$1/cm$
CO_2/O_2	Coefficiente respiratorio	mol_{CO_2}/mol_{O_2}
$CO_{2(o)}$	Producción inicial de CO_2 por masa de sustrato inicial	$mg/gmsi$

CO_{2max}	Producción máxima de CO_2 por masa de sustrato inicial	mg/gmsi
$O_{2(o)}$	Consumo inicial de O_2 por masa de sustrato inicial	mg/gmsi
O_{2max}	Consumo máximo de O_2 por masa de sustrato inicial	mg/gmsi
μ	Tasa específica de producción de CO_2	mg/mg h
t	Tiempo	h
Y_{CO_2/O_2}	Proporción másica de producción de CO_2 por consumo de O_2	mg $_{CO_2}$ /mg $_{O_2}$
m_{O_2}	Coefficiente de mantenimiento	mg $_{O_2}$ /mg $_{CO_2}$ h

3. Introducción

La demanda mundial de alimentos libres de químicos ha impulsado y consolidado programas para el manejo integrado de plagas (Amerio et al., 2020; Rajula et al., 2020; Ravensberg, 2011). En algunos de ellos, se aplican propágulos de hongos entomopatógenos (HE) en lugar de plaguicidas químicos (Inglis et al., 2009; Mascarín and Jaronski, 2016). Entre los HE más utilizados se encuentran aquellos de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* y *Lecanicillium* (Alcantara-Vargas et al., 2020; Miranda-Hernández et al., 2017). Las unidades infectivas de los HE (conidios y blastoesporas) se producen alrededor del mundo en diferentes escalas (pequeña, mediana y gran escala) (Cherry et al., 1999; Méndez-González et al., 2018). Los conidios de los HE producidos en cultivo sólido presentan mayor periodo de latencia (Agosin et al., 1997; Jenkins and Grzywacz, 2000; Roussos et al., 2000), y tolerancia al estrés ambiental (deseccación y radiación solar) (Jenkins and Prior, 1993), en comparación de las blastoesporas (producidas en cultivo líquido). Además, las propiedades hidrofóbicas de los conidios les permiten incorporarse a suspensiones oleosas que prolongan su viabilidad y aumenta su resistencia a la radiación (Ibrahim et al., 1999; Inglis et al., 1995; Moore et al., 1993), contribuyendo a su efectividad en las aplicaciones en campo (Bateman et al., 1993). Por lo general, los conidios de los HE se producen sobre diferentes sustratos (regularmente granos de arroz) en biorreactores de bolsa de 1 kg de capacidad (Méndez-González et al., 2018a). Este proceso presenta algunos inconvenientes entre los que destacan su baja reproducibilidad, carencia de instrumentos de monitoreo del proceso y su requerimiento de extensas áreas de incubación e intensa mano de obra (Cherry et al., 1999; Méndez-González et al., 2018a, 2018b). Con la intención de mejorar este proceso, se ha evaluado la posibilidad de implementar biorreactores aireados (estáticos y agitados) que permitan la producción controlada de conidios a una mayor escala. Sin embargo, estos estudios han encontrado limitaciones asociadas al transporte de materia y energía (da Cunha et al., 2020; Dorta and Arcas, 1998; Méndez-González et al., 2018a; Van Breukelen et al., 2011); por lo que, las condiciones de proceso para la producción de conidios en estos biorreactores, aún no han sido establecidas para la mayoría de los HE. Lo anterior, incluye a los HE del género *Metarhizium*. Por lo tanto, este trabajo de tesis se orientó a establecer el tipo de biorreactor y las condiciones de operación adecuadas para la producción controlada de conidios de *Metarhizium robertsii* a escala piloto. Para ello, se seleccionó el mecanismo de aireación, se analizó el transporte de calor en el biorreactor y se evaluaron estrategias para mantener condiciones ambientales favorables para el cultivo de *M. robertsii* dentro del biorreactor.

4. Revisión bibliográfica

La sección de revisión bibliográfica está orientada primeramente a reconocer el daño que ocasionan las plagas agrícolas y las diferentes sustancias químicas utilizadas para su tratamiento. Posteriormente, se hablará del control biológico como una alternativa al uso de plaguicidas químicos y dentro de sus agentes, profundizaremos en las características de los hongos entomopatógenos (HE) y la producción de sus conidios en biorreactores de cultivo sólido. Por último, se realizará un análisis de las características de los HE del género *Metarhizium* y los retos que se enfrentan para utilizarlos como sustituto de los insecticidas químicos.

4.1. La problemática de las plagas agrícolas y su tratamiento químico

La agricultura es una actividad humana esencial (Lewandowski, 2018), la cual ha tenido que adaptarse a las demandas de la sociedad, variaciones climáticas, fertilidad de la tierra y la proliferación de plagas (Córdova-Albores et al., 2020). En particular, las plagas tienen un potencial dañino que afecta a diversas especies vegetales y se potencializa por factores como la variación climática (Comoé and Siegrist, 2015; Kreß et al., 2014; Méndez Encina et al., 2020; Ramírez-Guzmán et al., 2020) y la disponibilidad de infraestructura, insumos, servicios, capacitación y asistencia técnica para su combate. La acción de plagas genera pérdidas económicas anuales de miles de millones de dólares (Arredondo-Bernal and González-Cabrera, 2020; Ramírez-Guzmán et al., 2018). Entre los organismos más dañinos para los cultivos agrícolas se encuentran bacterias, hongos, nemátodos e insectos. Estos últimos son especialmente dañinos debido a que son capaces de proliferar rápidamente en grandes extensiones geográficas (Alto and Juliano, 2001; Porter et al., 1991) y pueden ser vector de agentes patógenos; por lo que, para su combate se han desarrollado gran variedad de insecticidas químicos (Gutiérrez-Ramírez et al., 2013). Entre las sustancias químicas más utilizadas para el combate de plagas se encuentran: el deltamethrin, permethrin y λ -cyhalothrin, DDT, lindano, toxafeno, dieldrin y malathion (Angelini et al., 2007; Basilua Kanza et al., 2013). Estas sustancias son plaguicidas de amplio espectro, por lo que, afectan tanto a la población de plagas como a especies de insectos benéficos (entomófagos, polinizadores, entre otros) (Carrieri et al., 2003; Lawler et al., 2007). Además, transportándose por vía difusiva (Bundschuh et al., 2014) son capaces de contaminar mantos acuíferos (Schulz, 2004) y suelo, presentando un efecto intrínseco negativo sobre los ecosistemas (Matthiessen et al., 1995) y ocasionando un desequilibrio ecológico. Además, este tipo de compuestos y sus productos de degradación son tóxicos (Bundschuh et al.,

2014), capaces de persistir activos por años y afectar a la salud humana (Gutiérrez-Ramírez et al., 2013). Los efectos negativos de estos compuestos se potencializan por el desconocimiento técnico de las aplicaciones, frecuencia de aplicación y manejo de grupos toxicológicos y químicos. Por lo que, los insecticidas químicos han ocasionado preocupación a nivel mundial y se les reconoce como un peligro latente para el medio ambiente y la salud humana y, en consecuencia, se ha tratado de evitar su uso (Arredondo-Bernal and González-Cabrera, 2020). Con este fin, han surgido varios modelos con un enfoque sustentable (Comoé and Siegrist, 2015; García-de-León and Mier, 2010). Dentro de estos modelos, se han ideado estrategias orientadas hacia el manejo integral de plagas (MIP), donde se llevan a cabo diversas acciones de carácter sustentable, no dañinas para el medio ambiente y que no representen una amenaza para la salud humana. Una de las alternativas que ofrece el MIP es el control biológico; el cual, por sus resultados, ha generado interés alrededor del mundo (Muñiz-Paredes et al., 2017).

4.2. El control biológico

La preocupación pública por el medio ambiente y la salud humana ha generado estrategias sostenibles para el combate de plagas. Dentro de ellas, el uso de plaguicidas naturales ha cobrado impulso (Arredondo-Bernal and González-Cabrera, 2020; Córdova-Albores et al., 2020; García-de-León and Mier, 2010; Ramírez-Guzmán et al., 2020). Una de estas estrategias es el control biológico; el cual, fue concebido a inicios del siglo XIX y se define como el estudio, importación, conservación y aumento de organismos benéficos para la supresión de plagas. Estos organismos llamados agentes de control biológico (ACB) pueden ser parasitoides, depredadores y patógenos (Tabla 1) (Badii and Abreu, 2006; Barrera, 2020). Los parasitoides son insectos entomófagos que, regularmente, atacan a una sola variedad de hospedero, desarrollándose sobre o dentro de él hasta su muerte (Bernal and España-Luna, 2020). Los depredadores son organismos (regularmente insectos) que se alimentan de insectos, algunos atacan a más de una variedad de presa. Los insectos depredadores cazan activamente a sus presas para alimentarse (Rodríguez-Leyva et al., 2020). Dentro de los patógenos (entomopatógenos) se incluyen virus, bacterias, nemátodos protozoarios y hongos que ocasionan enfermedades en insectos capaces de provocar la muerte, a excepción de los nemátodos los entomopatógenos no buscan a su presa de forma activa (Badii and Abreu, 2006). En el caso de hongos, bacterias, protozoarios y virus el mecanismo de infección comienza con la ingesta o con la adhesión (caso específico de los hongos) (Jefferies and Khachatourians, 1997; Kamp and Bidochka, 2002). Los diversos organismos utilizados en el control biológico presentan

diferentes mecanismos de acción y son capaces de reducir potencialmente las comunidades de plaga (Barrera, 2020), sin desarrollar resistencia natural de plaga (Heckel, 2012) y sin ser un riesgo de daño a la salud humana, seguridad alimentaria y al medio ambiente (Auld and Morin, 1995; Bateman et al., 1993; Henry et al., 2012; Whitehorn et al., 2012). La efectividad y seguridad de aplicación de los ACB, les ha permitido generar un mercado con ingresos superiores a los 1.8 mil millones de dólares (Muñiz-Paredes et al., 2017). Dentro de los organismos disponibles destacan hongos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Trichoderma*, *Lecanicillium* e *Isaria*; las bacterias *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; e insectos como *Chrysoperla carnea*, *Trichogramma pretiosum* y *Spalangia endius* (Cotes Prado et al., 2018; García-de-León and Mier, 2010; van Lenteren et al., 2018).

Por su naturaleza, los organismos parasitoides y depredadores son complicados de producir en grandes escalas. Sin embargo, esa no es una característica de los patógenos (hongos, bacterias y virus); por lo que, representan la mayoría de los ACB producidos, comercializados y aplicados en el mundo (Arredondo-Bernal and González-Cabrera, 2020). Entre ellos, los productos que incluyen unidades infectivas de HE (blastoesporas y conidios) permite controlar poblaciones de una amplia gama de especies de insectos (Tamayo-Mejía et al., 2020), en diversas zonas geográficas y condiciones climáticas (Kamp and Bidochka, 2002), por lo que han ganado popularidad.

Tabla 1. Relación de organismos más utilizados en el control biológico.

Clase de agente de control biológico	Tipo de organismos	Agentes más utilizados	Referencia
Parasitoide	Koinobiontes e idiobiontes	Familias e insectos como: <i>Trichogrammatidae</i> , <i>Tachinidae</i> , <i>Phoridae</i> , <i>Cryptochetidae</i> , <i>Cecidomyiidae</i> , <i>Acroceridae</i> , <i>Nemestrinidae</i> , <i>Bombyliidae</i> , <i>Phoridae</i> , <i>Pipunculidae</i> , <i>Conopidae</i> , <i>Pyrgotidae</i> , <i>Sciomyzidae</i> , <i>Cryptochetidae</i> , <i>Calliphoridae</i> , <i>Sarcophagidae</i> , <i>Diaeretiella</i> , <i>Cotesia flavepis</i> y <i>Spalangia</i> spp	Gutiérrez-Ramirez et al., 2013; van Driesche et al., 2008
Depredadores	Insectos polífagos y monófagos	Familias de insectos como: <i>Anthocoridae</i> , <i>Nabidae</i> , <i>Reduviidae</i> , <i>Geocoridae</i> , <i>Carabidae</i> , <i>Coccinellidae</i> , <i>Nitidulidae</i> , <i>Sraphylinidae</i> , <i>Chrysopidae</i> , <i>Formicidae</i> , <i>Cecidomyiidae</i> y <i>Syrphidae</i>	van Driesche et al., 2008
Patógenos (Entomopatógenos)	Virus	Familias de virus como: Iridoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Baculoviridae, Ascoviridae y Polydnviridae	del Rincón-Castro et al., 2020; Gutiérrez-Ramirez et al., 2013
	Bacterias	<i>Paenibacillus popilliae</i> , <i>Lysinibacillus sphaericus</i> , <i>Clostridium bravifasciens</i> , <i>C. malacosome</i> , <i>C. bifermetans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Yersenia entomophaga</i>	Gutiérrez-Ramirez et al., 2013; Ibarra y del Rincón-Castro, 2020
	Hongos	Hongos de los géneros: <i>Ascosphaera</i> , <i>Cordyceps</i> , <i>Gobellula</i> , <i>Nigela</i> , <i>Nomuraea</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Coniothyrium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Isaria</i> , <i>Lecanicillium</i> , <i>Pochonia</i> , <i>Purpureocillium</i> , <i>Simplicillium</i> , <i>Trichoderma</i> y <i>Metarhizium</i>	Corallo et al., 2019; De Vrije et al., 2001; Gutiérrez-Ramirez et al., 2013; Rajula et al., 2020; Sun et al., 2002
	Nematodos	Familias de nematodos como: <i>Mermithidae</i> , <i>Steinernematidae</i> , <i>Heterorhabditidae</i> , <i>Rhabditidae</i> , <i>Steinernematidae</i> , <i>Diplogasteridae</i> , <i>Tylenchidae</i> , <i>Aphelenchidae</i> , <i>Allantonematidae</i> , <i>Neotylenchidae</i> , <i>Oxyurida</i> , <i>Strongyloidae</i> , <i>Heterorhabditidae</i> y <i>Ascarida</i>	Alatorre-Rosas, 2020; Gutiérrez-Ramirez et al., 2013
	Protozoarios	Géneros como: <i>Nosema</i> , <i>Malameba</i> , <i>Malipighamceba</i> , <i>Malpighicella</i> y <i>Valhkampfia</i>	Alatorre-Rosas y Tamayo-Mejía, 2020; Gutiérrez-Ramirez et al., 2013

4.3. Los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son organismos heterótrofos, sus células están recubiertas de una pared compuesta con quitina, no son móviles y tienen la capacidad de provocar enfermedades en insectos (micosis) (Inglis et al., 2009). Las micosis en insectos son comunes y ampliamente distribuidas por el mundo; a menudo ocasionan una reducción significativa en poblaciones de insectos (Lacey et al., 2015; Tamayo-Mejía et al., 2020). Entre los géneros de HE más utilizados como ACB se encuentran *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria*, ya que tienen la capacidad de infectar insectos de diferentes órdenes bajo diversas condiciones climáticas (Kamp and Bidochka, 2002). Los HE tienen características que los hacen idóneos para su uso en cultivos agrícolas, entre ellas: su capacidad de persistir en el área agrícola diseminándose a partir de los cadáveres de los insectos infectados (Rangel et al., 2006; Sun et al., 2002), su pared celular les confiere estabilidad y resistencia ante factores ambientales (Jaronski and Jackson, 2012; Wraight et al., 2001) y, en el caso de los conidios, les permite adherirse al hospedero, por lo que, no es necesaria la ingesta para comenzar el ciclo infectivo (Jeffs and Khachatourians, 1997; Kamp and Bidochka, 2002).

El mecanismo de ataque de los HE sobre insectos consiste en dos fases: la infectiva y la reproductiva. En la fase infectiva, la espora se adhiere o es ingerida por el insecto (Jeffs and Khachatourians, 1997). Posteriormente, el hongo produce el tubo germinativo y las hifas de penetración (Holder and Keyhani, 2005). Durante la penetración el hongo utiliza un sistema enzimático que incluye proteasas, quitinasas y lipasas (Sabbour, 2002) que degradan componentes estructurales del cuerpo del insecto (Montesinos-Matías et al., 2011). Si la infección es exitosa, el hongo prolifera en la hemolinfa (crecimiento vegetativo) finalizando el proceso de infección con la muerte del hospedero (Holder and Keyhani, 2005) y diseminación de conidios sobre el cadáver del insecto.

Las unidades infectivas (esporas) de los HE se producen en procesos de cultivo líquido y sólido en diferentes escalas (pequeña, mediana y gran escala) (Cherry et al., 1999). Sin embargo, se ha reportado que los procesos en cultivo sólido presentan mayores rendimientos de producción esporas (Roberts and St. Leger, 2004; Wraight et al., 2001; Ye et al., 2006); las cuales, se conservan viables por un mayor lapso de tiempo (Agosin et al., 1997; Jenkins and Grzywacz, 2000; Roussos et al., 2000) y presentan mejor tolerancia a factores ambientales presentes en las aplicaciones en campo (deseccación y radiación solar) (Jenkins and Prior, 1993). Además, las esporas producidas por cultivo sólido (conidios aéreos) tienen propiedades hidrofóbicas que permiten que sean formuladas

en suspensiones oleosas para su aplicación en campo; las cuales, han resultado ser más efectivas para el control de plagas en comparación con suspensiones acuosas (Moore et al., 1993), ya que prolongan la viabilidad del conidio y aumentan su resistencia a radiación UV (Ibrahim et al., 1999; Inglis et al., 1995; Moore et al., 1993). Por ello, es que gran parte de los procesos de producción de esporas de HE se llevan a cabo por cultivo en sustratos sólidos. Entre ellos existen procesos simples como el realizado en biorreactores de bolsa o altamente tecnificados como el desarrollado por *Laverlam International Corporation* (Multinacional) en torres de cultivo sólido (Jaronski, 2014). Los diferentes procesos estudiados y establecidos para la producción de conidios de HE se estudiarán en la siguiente sección.

4.3.1. Procesos de producción de conidios de hongos entomopatógenos

Para cubrir la creciente demanda de productos formulados con HE, la mayoría de las empresas productoras han adoptado el sistema de producción en biorreactor de bolsa (Jaronski, 2014). Sin embargo, la necesidad de aumentar los rendimientos de producción y calidad de los conidios ha motivado la generación e implementación de nueva tecnología, usando biorreactores de cultivo sólido estáticos y agitados que permitan un proceso controlado y de mayor escala. Cada uno de los procesos disponibles tiene ciertas ventajas y desventajas que deben analizarse para poder diseñar un proceso adecuado para un HE. Las características y los avances en los diferentes procesos de producción de conidios de HE se analizarán a continuación.

4.3.1.1. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores de bolsa

Los biorreactores de bolsa (BB), utilizados para la producción de conidios de HE, generalmente están fabricados en polipropileno de alta densidad con dimensiones de 30 × 40 cm. El material de fabricación es semipermeable permitiendo el intercambio gaseoso por difusión a través de sus microporos (Durand, 2003; Jenkins and Goettel, 2011). Sin embargo, la baja velocidad del transporte gaseoso por los microporos puede ocasionar acumulación de CO₂ (>5% v/v) (Abalone et al., 2011; Arias Barreto et al., 2017); por lo que, en algunos casos, para facilitar el intercambio gaseoso las bolsas son cerradas parcialmente o se utilizan tapones porosos.

El proceso de cultivo en bolsa fue diseñado para cumplir con los requerimientos biológicos de hongos del género *Metarhizium*; sin embargo, se ha utilizado para producir otros agentes de control biológico como *Beauveria bassiana* (Hussey and Tinsley, 1981), *Lecanicillium lecanii* (Machado et al.,

2010), *Penicillium frequentans* (De Cal et al., 2002), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Adetunji and Oloke, 2013), entre otros (Tabla 2).

Para la producción de conidios a gran escala, el proceso implementa un sistema de cultivo bifásico que incluye la obtención de inóculo en medio líquido y la producción de conidios en medio sólido (Cherry et al., 1999). La producción del inóculo se realiza en matraces agitados (150 rpm) con un medio de cultivo con sacarosa como fuente de carbono (20 g/L). Esta etapa tiene una duración de 2 a 4 días. Posteriormente, las blastoesporas producidas se utilizan como inóculo para el cultivo en medio sólido; el cual, se lleva cabo en bolsas empacadas con ~1 kg de sustrato sólido estéril (regularmente granos de arroz) con un contenido de humedad entre 30 y 40%. Después del inóculo, las bolsas son cerradas e incubadas a una temperatura óptima para el microorganismo (Tabla 2). Durante el periodo de incubación, las bolsas con el cultivo son agitadas manualmente (cada 4 días) para desagregar el sustrato, lo que mejora las condiciones de aireación, remoción de calor y espacio para el desarrollo del micelio.

Este proceso presenta como ventajas una baja inversión inicial y puede implementarse independientemente del nivel de avance tecnológico de la región (Swanson, 1997), ya que requiere de poco equipo y los consumibles pueden ser adquiridos localmente (Cherry et al., 1999). Sin embargo, en términos de proceso, presenta variaciones productividad y calidad de los conidios (Jenkins and Grzywacz, 2000); las cuales son ocasionados regularmente por variaciones en las condiciones del proceso (temperatura, humedad del sustrato, nutrientes, luz, pH, concentraciones gaseosas, entre otros.) (Arthurs and Thomas, 2001; Luz and Fargues, 1998).

Por las características del biorreactor, el implementar instrumentos de monitoreo de los parámetros que permitan el control en el proceso es complicado. Eventualmente, la falta de control de estos parámetros afecta al costo de producción y precio de comercialización (Cherry et al., 1999). Por su capacidad limitada (~1 kg), es necesario utilizar un número considerable de biorreactores por lote, lo que ocasiona altos requerimientos de mano de obra y de área para incubación (Méndez-González et al., 2018a, 2018b). Estas limitaciones han motivado el desarrollo de procesos con otros tipos de biorreactores que permitan procesos controlados, escalables y con altos rendimientos de producción.

Tabla 2. Condiciones de proceso y rendimientos de producción de conidios de agentes de control biológico en biorreactores de bolsa.

Microorganismo	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación (d)	Producción de conidios (conidios × 10 ⁹ / gms)	Referencia
<i>Metarhizium anisopliae</i>	23 ± 2	13 - 18	0.90 - 0.96	Cherry et al., 1999
			10	Mendonca, 1992
	28	15	0.80 – 1.02	Alcantara-Vargas et al., 2020
	25	20	2.33 – 2.56	Barra-Bucarei et al., 2016
	27	9	0.88	Méndez-González et al., 2018b
<i>Metarhizium robertsii</i>	30	7	0.32 – 0.91	Méndez-González et al., 2018a
<i>Lecanicillium lecanii</i>	25 ± 0.5	15	0.32 – 1.45	Machado et al., 2010
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	25 ± 4	14	1.82 – 3.08	Adetunji y Oloke, 2013
<i>Beauveria bassiana</i>	25		6.0	Ferron, 1981
		15	0.8 - 4	Posada-Flórez, 2008
<i>Penicillium frequentans</i>	20-25	10 - 30	0.76- 1.07	De Cal et al., 2002

4.3.1.2. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores estáticos y agitados

Los biorreactores de fermentación sólida utilizados en la producción de conidios de HE involucran dos modos de operación: estáticos (charolas y columna) y agitados (tambor rotatorio y agitación interna). Estos biorreactores presentan diferentes parámetros de diseño y operación que, en algunos casos, han favorecido el desarrollo del microorganismo y la producción de conidios. A diferencia de los biorreactores de bolsa, estos biorreactores pueden operarse en escala banco (de 2 a 5 L de capacidad) (da Cunha et al., 2020; Lopes-Perez et al., 2021), piloto (de 5 a 50 L de capacidad) (Carboué et al., 2019; Lopes-Perez et al., 2021; Maïga et al., 2021) e industrial (más de 50 L de capacidad).

4.3.1.2.1. Biorreactor de charolas

Los biorreactores de charolas (BCh) se caracterizan por tener una capa delgada de sustrato extendida sobre un área horizontal (Lonsane et al., 1985; Mitchell et al., 1993); la cual, en procesos con HE tiene entre 2 y 10 cm de altura (Tabla 3). En su forma clásica (charolas sin perforación), el transporte de CO₂ y O₂ entre el lecho y la atmósfera gaseosa se realiza por mecanismos difusivos, sin embargo, en la remoción de CO₂ influye a la vez la convección natural (por gradiente de densidad) (Raghava Rao et al., 1993). Por otro lado, la remoción de calor se lleva a cabo por conducción (da Cunha et al., 2019) y evaporación (Figuroa-Montero et al., 2011). La velocidad de transporte gaseoso y de calor en el biorreactor limita la altura máxima del lecho de cultivo (da Cunha et al., 2019). En cultivos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se ha observado un gradiente de temperatura de hasta 4 °C al aumentar la altura del lecho de 2 a 8 cm y de 2 a 6 cm, respectivamente. Lo anterior, provoca una disminución de la producción de conidios del 63 y 76% para *Beauveria bassiana* (Xie et al., 2012) y *Metarhizium anisopliae* (da Cunha et al., 2019), respectivamente. Por lo que, para evitar el sobrecalentamiento y la formación de zonas anaerobias que afecten la esporulación, la altura de lecho para la producción de conidios en este tipo de biorreactor se encuentra entre 2 y 4 cm (Tabla 3). El uso industrial de los BCh para la producción de conidios de *B. bassiana* ha permitido obtener hasta 3.72×10^9 conidios/gms en aproximadamente 10 días (Alves and Pereira, 1989).

Tabla 3. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores de charolas.

Microorganismo	Altura del lecho (cm)	Tiempo de cultivo (d)	Producción de conidios (conid×10 ⁹ /gms)	Referencia
<i>B. bassiana</i>	2	8	2.7 ± 0.19	Xie et al., 2012
	4	7	2.4 ± 0.4	Ye et al., 2006
	10	10	3.72	Alves y Pereira, 1989
<i>M. anisopliae</i>	3	14	0.88 ± 0.12	Méndez-González et al., 2018a
	4	10	3.56	
<i>M. robertsii</i>	2	7	0.82 ± 0.13	Méndez-González et al., 2018a

Tradicionalmente, estos biorreactores se incuban en áreas con temperatura regulada (similar a los biorreactores de bolsa), donde las charolas se pueden acomodar en estantes, una sobre otra con unos centímetros de separación (Lonsane et al., 1985). Sin embargo, algunos sistemas los BCh se incuban en cámaras cerradas (Figura 1); en las cuales, se pueden implementar instrumentos para la medición de la temperatura, humedad, temperatura y composición de la atmósfera gaseosa (Figueroa-Montero et al., 2011; Ye et al., 2006). Además, a las cámaras de incubación se les puede suministrar aireación forzada, lo que favorece la eficiencia del transporte de O_2 , CO_2 y calor (Ye et al., 2006). Adicionalmente, la base de los BCh puede perforarse, de manera que la corriente de aire atraviese el lecho, suministrado O_2 y removiendo calor y CO_2 por convección forzada (Lonsane et al., 1985). En el cultivo de *B. bassiana* (usando arroz como sustrato) en lechos de 4 cm, incubados en cámaras cerradas (a 25 °C) con suministro de aireación forzada, el uso de charolas perforadas permite mantener la temperatura del lecho a ~28 °C (Ye et al., 2006), mientras que las charolas sin perforaciones alcanzan ~31 °C (Xie et al., 2012); por lo que, la aireación contribuye a mejorar el control de la temperatura. Por la dificultad de incrementar las dimensiones de las charolas por el riesgo al sobrecalentamiento, generación de zonas anaerobias y a comprometer la asepsia del cultivo (Pandey, 1991), el escalamiento de este biorreactor se lleva a cabo incrementando el número de charolas (Brand et al., 2010). Por lo que, se dificulta su automatización a gran escala y, similar al biorreactor de bolsa, requiere de intensa mano de obra (Pandey, 1991) y grandes áreas para el proceso (Lonsane et al., 1985).

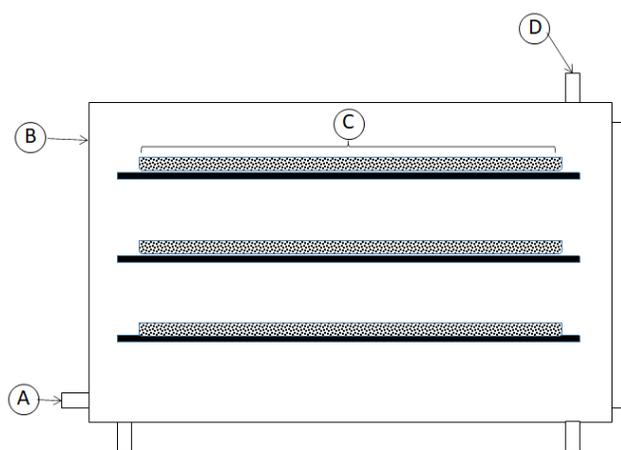


Figura 1. Biorreactor de charolas. (A) entrada de aire, (B) coraza, (C) charola empacada y (D) salida de aire.

4.3.1.2.2. Biorreactor de columna empacada

Los biorreactores de columna empacada (BCE) son sistemas cilíndricos en los que el sustrato permanece estático y, a través de él, se puede suministrar una corriente de aire forzado (Mitchell et al., 1993) (Figura 2). La aireación forzada en el BCE permite el intercambio gaseoso (suministro de O₂ y remoción de CO₂) y transporte de calor en el BCE por mecanismos convectivos (Casciotori et al., 2016; Casciotori and Thoméo, 2018; Lopes-Perez et al., 2019; Pianko-Oprych, 2011). Adicionalmente, se puede modificar el contenido de humedad del aire suministrado para mejorar la remoción de calor y/o mantener la humedad en el sustrato (Lonsane et al., 1985). El diseño de los BCE facilita el uso de instrumentación para la medición de diferentes variables de proceso (temperatura, humedad, pH, CO₂, O₂, entre otras), lo que permite el monitorear el desarrollo del cultivo (da Cunha et al., 2020; Lopes-Perez et al., 2021; Méndez-González et al., 2018b).

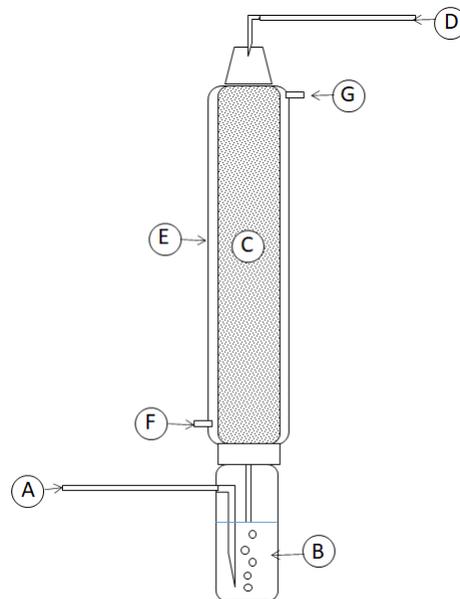


Figura 2. Biorreactor de columna empacada. (A) entrada de aire, (B) humidificador de aire, (C) empaque, (D) salida de aire, (E) chaqueta, (F) entrada de agua y (G) salida de agua.

En los BCE, las tasas de aireación bajas (<1 L/kgms) satisfacen los requerimientos de O₂ de HE como *M. anisopliae* y *B. bassiana*, permitiendo un buen desarrollo del microorganismo (estimado por la producción de CO₂) y esporulación (da Cunha et al., 2019; Dalla Santa et al., 2004; Méndez-González et al., 2018b; Van Breukelen et al., 2011). De hecho, la producción de conidios en los BCE (Tabla 4)

es mayor que la obtenida en los biorreactores de charolas (BCh) y bolsa (BB) (Tablas 2 y 3). Lo anterior, ha motivado estudios orientados hacia el aumento de escala de estos biorreactores. Sin embargo, el aumento dimensional de los BCE, ocasiona una mala distribución de aire lo que dificulta el suministro de O₂ y la remoción de calor y CO₂, afectando al desarrollo del microorganismo y su producción de conidios (da Cunha et al., 2020; Dorta et al., 1996; Van Breukelen et al., 2011). Estos problemas están fuertemente relacionados con las propiedades del empaque (Benenati and Brosilow, 1962); el cual, puede presentar variaciones de porosidad ocasionadas por la compactación y aglomeración del sustrato (Lopes-Perez et al., 2021). En la actualidad, la corporación *Laverlam International* produce conidios de *B. bassiana* en BCE con un volumen de operación de 6 m³ usando tabletas de arroz como sustrato; en este proceso, se controla la temperatura, humedad y aireación y, se producen $\sim 2.6 \times 10^{10}$ conidios/gms (Bradley et al., 1992). No obstante, se ha observado que existen gradientes de producción dentro del biorreactor (Jenkins and Goettel, 2011), posiblemente, ocasionados por la estructura de la matriz sólida. Por lo que, algunos estudios se han orientado a evaluar el uso de texturizantes (da Cunha et al., 2020) y de soportes y/o sustratos de baja densidad (Van Breukelen et al., 2011) como estrategias para mejorar la estructura de la matriz sólida y la producción de conidios de HE. En BCE modulares (módulos de 26 cm de altura) con capacidad de 4500 gms, utilizados para el cultivo de *M. anisopliae*, el uso de bagazo de caña como texturizante permite disminuir la compactación y aglomeración del sustrato y producir $3.62 \pm 0.22 \times 10^9$ conidios/gms ($\sim 43\%$ más que con lechos de arroz) (da Cunha et al., 2020). De forma similar, el uso de cáñamo impregnado de medio de cultivo (con glucosa y peptona), ha contribuido a disminuir la compactación del lecho, permitiendo producir conidios de *M. anisopliae* y *C. minutans* en biorreactores de 15 – 20 L de volumen de operación, alcanzando rendimientos de 4.6×10^9 /gms (Van Breukelen et al., 2011) y $12.8 \text{ conidios} \times 10^9$ /gms (De Vrije et al., 2001), respectivamente.

El proceso de producción de conidios de HE en BCE ha mostrado tener beneficios en términos de control de proceso, reproducibilidad y producción de conidios; sin embargo, aún se tienen que identificar las condiciones de proceso necesarias para el aumento de escala del biorreactor.

Tabla 4. Producción de conidios de hongos entomopatógenos en biorreactores de columna empacada.

Microorganismo	Sustrato	Tiempo de proceso (d)	Producción de conidios (conid×10 ⁹ /gms)	Referencia
<i>M. anisopliae</i>	Arroz	10	1.95 ± 0.24	da Cunha et al., 2020
	Arroz y bagazo de caña	10	3.47 ± 0.25	da Cunha et al., 2020
	arroz	7	6	Arzumanov et al., 2005
	Arroz con salvado	9	9.7	Dorta y Arcas, 1998
	Arroz	7	1.5	Méndez-González et al., 2018b
	Cáñamo, glucosa y extracto de levadura	12.5	8	Van Breukelen et al., 2011
	Salvado de trigo	12.5	5.6	Van Breukelen et al., 2011
	Salvado de arroz	12.5	3.4	Van Breukelen et al., 2011
	Granos de trigo	12.5	0.9	Van Breukelen et al., 2011
<i>B. bassiana</i>	Residuos de papa y bagazo de caña	10	9.8	Dalla Santa et al., 2004
<i>C. minitans</i>	Cáñamo, glucosa y extracto de levadura	18	12.8	De Vrije et al., 2001

4.3.1.2.3. Biorreactores agitados

Los biorreactores agitados incluyen dos configuraciones características: el tambor rotatorio y la agitación interna (aspas o tornillo sin fin) (De Vrije et al., 2001) (Figuras 3 y 4). La agitación puede ser continua o intermitente (De Vrije et al., 2001; Lonsane et al., 1992) y contribuye al transporte de

oxígeno, a la remoción de calor y de CO₂ (Brand et al., 2010). Además, a este tipo de biorreactores se les puede suministrar aireación forzada para mejorar el transporte de calor y masa. Los biorreactores agitados permiten procesos controlados y se han utilizado en escala industrial (hasta 25 t) para la producción de enzimas (Durand and Chereau, 1988) y alimento para ganado (Xue et al., 1992) en condiciones de baja asepsia. Los biorreactores de tambor rotatorio tienen forma cilíndrica, el cilindro gira sobre su eje horizontal y es posible suministrar aireación (Mitchell et al., 1992). El movimiento suave del tambor ocasiona poco daño mecánico al microorganismo o al sustrato, no obstante, puede presentar aglomeramientos del sustrato que ocasionan heterogeneidad en el lecho (Brand et al., 2010). Los biorreactores con agitación interna son cilíndricos (horizontales y verticales) y cuentan con un sistema de aspas que mezcla mecánicamente el sustrato (Durand, 2003). El movimiento de las aspas puede ocasionar daño mecánico al micelio (Van Breukelen et al., 2011) y al sustrato, pero contribuye a la uniformidad del lecho (Durand, 2003; Lonsane et al., 1992). El daño mecánico producido al micelio ha limitado el uso de los biorreactores agitados para la producción de conidios de HE (Méndez-González et al., 2018a; Van Breukelen et al., 2011). En cultivos de *M. anisopliae* en biorreactores de tambor rotatorio con una intensidad de rotación de 6 rpm por 30 s cada media hora, la agitación afectó el desarrollo del microorganismo (estimado por la producción de CO₂) a partir de las 50 h de cultivo, por lo que, los autores sugieren evitar la agitación en este género de hongos (Van Breukelen et al., 2011). Sin embargo, columnas empacadas aireadas, con agitación mecánica y capacidad de 50 L (Durand, 2003) se han utilizado industrialmente para la producción de conidios de *C. minutans* y *P. lilacinus*, alcanzado una producción de hasta 12.8×10^9 conidios/gms en un tiempo de cultivo de 13 días (De Vrije et al., 2001). Es posible que, ajustando debidamente la intensidad y periodo de agitación, este tipo de biorreactor pueda ser utilizado para la producción de conidios de otros HE, contribuyendo a la problemática de compactación y aglomeración del sustrato que presenta la columna empacada.

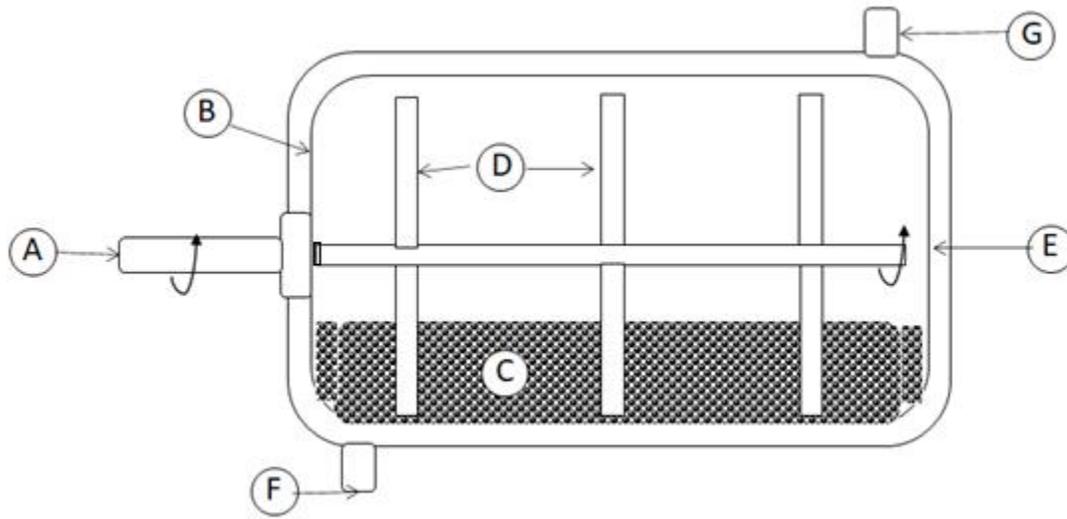


Figura 3. Biorreactor con agitación interna. (A) rotor, (B) coraza, (C) sustrato, (D) impulsor, (E) chaqueta, (F) entrada de agua y (G) salida de agua.

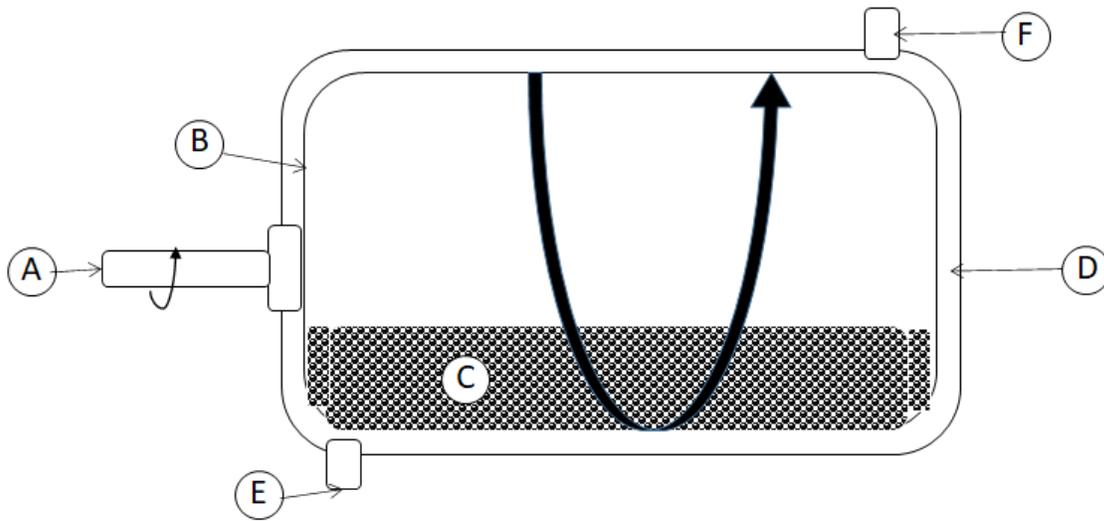


Figura 4. Biorreactor de tambor rotatorio. (A) rotor, (B) tambor, (C) sustrato, (D) chaqueta, (E) entrada de agua y (F) salida de agua.

El proceso de producción de conidios de HE en BB es viable, pero su carencia de monitoreo y control de las variables de proceso (Cherry et al., 1999; Méndez-González et al., 2018a), resulta en productos finales con bajos estándares de calidad (Jenkins and Grzywacz, 2000); lo cual, ocasiona variación entre lotes y ha sido un factor significativo que limita la exitosa comercialización de los ACB (Arredondo-Bernal and González-Cabrera, 2020), debido a que puede generar la percepción de que son pobres en eficacia y con calidad cuestionable (Montesinos-Matías et al., 2020). Para

solucionar esta limitante se han estudiado y desarrollado procesos de producción a escala industrial controlados con altos estándares de calidad. No obstante, en el caso específico de los hongos del género *Metarhizium*, los procesos alternativos al uso del BB, no se han establecido, por lo que, este proyecto estará orientado a establecerlo; por ello, en la siguiente sección se abordará su relevancia y características.

4.3.2. *Metarhizium* sp. como agente de control biológico

Los hongos de género *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales) han sido aislados de insectos infectados y suelo en todos los continentes (excepto en la Antártica) (Roberts and St. Leger, 2004; Roddam and Rath, 1997), en su mayoría, son organismos particularmente mesófilos que presentan buen desarrollo (Hallsworth and Magan, 1999; Ouedraogo et al., 1997) y actividad entomopatógena (Ekesi et al., 1999) en temperaturas entre 25 y 30 °C. Las colonias de estos microorganismos, exhiben diversas morfologías y matices de color verde (color característico de sus esporas) (Sun et al., 2002). Sus conidios son ovalados con dimensiones de 2 a 10 μm por 1 a 3.5 μm y un área superficial de $14.4 \pm 3.8 \mu\text{m}^2$ (Shan et al., 2010). Los conidios de estos microorganismos pueden ser obtenidos en una amplia variedad de sustratos húmedos (con actividad de agua de 0.97 a 0.99) (Hallsworth and Magan, 1999) como bagazo de caña de azúcar (Arzumanov et al., 2005), arroz, sorgo y cebada (Bhanu-Prakash et al., 2008) e incluso, en cadáveres de insectos (Sun et al., 2002). *Metarhizium* spp. ha sido utilizado para el control de plagas desde hace más de 100 años (Roberts and St. Leger, 2004), tiene un alto grado de especialización que ocurre en dos familias de coleópteros, *Elateridae* y *Curculionidae*. No obstante, se ha reportado que tiene actividad patógena sobre insectos pertenecientes a los órdenes *orthoptera*, *hemiptera*, *coleoptera* y *dermaptera* (Zimmermann, 1993). La enfermedad de los insectos causada por los hongos de este género se le denomina muscardina verde (Roberts and St. Leger, 2004). Durante el proceso de infección los hongos del género *Metarhizium* producen metabolitos secundarios como destruxinas (predominando A, B y E) (Krasnoff et al., 2006), ovalicina (Kuboki et al., 1999), metacitofinina (Iijima et al., 1992), swainsonina, y viridoxinas (A y B) (Roberts and St. Leger, 2004) que presentan diversos efectos tóxicos sobre el hospedero. Debido a sus propiedades hidrofóbicas, resistencia al estrés ambiental y persistencia en el área de aplicación, la unidad infectiva de estos HE es el conidio (Méndez-González et al., 2018a). La aplicación de conidios en campo es capaz de reducir significativamente las poblaciones de insectos plaga en un lapso de 10 a 20 días (Roberts and St. Leger, 2004). Sin

embargo, el éxito de aplicación de conidios de *Metarhizium* como método alternativo para los insecticidas químicos requiere de estudios relacionados con: 1) el aumento de la calidad de los propágulos (viabilidad, virulencia, resistencia al estrés ambiental, entre otros) y, 2) el diseño de procesos controlados con altos rendimientos de producción y calidad.

Actualmente, *Metarhizium* es uno de los géneros de hongos filamentosos mejor comprendidos a nivel molecular (Roberts and St. Leger, 2004); por lo que, algunos de los estudios orientados a mejorar la su calidad están relacionados con la regulación transcripcional y modificación de genes específicos involucrados en la interacción hospedero-patógeno (formación de estructuras de infección, secreción de enzimas y toxinas, entre otras) (Hajek and St. Leger, 1994). En *Metarhizium anisopliae*, la sobreexpresión del gen *Pr1* permite la sobreproducción de proteasas que solubilizan la fracción protéica en la cutícula del insecto, contribuyendo a la penetración del hongo y su asimilación de nutrientes. Esta modificación permitió aumentar la velocidad de muerte de larvas de *L. dispar* en un 25% (St Leger et al., 1996); sin embargo, disminuye significativamente su persistencia en suelo agrícola (Hu and St. Leger, 2002). Además de la modificación genética, se ha demostrado que los mecanismos de interacción hospedero-patógeno pueden ser inducidos por señales físicas y químicas (Hajek and St. Leger, 1994; Roberts and St. Leger, 2004). En *M. anisopliae*, el estrés físico ocasionado por una corriente eléctrica (0.09 mA/cm²), incrementa la mortalidad de los conidios sobre larvas de *Tenebrio molitor* en un 40% (Rodriguez-Gomez et al., 2020). De forma similar, en *M. robertsii*, el estrés causado por la luz azul (4.8 W/m²) incrementa la virulencia de los conidios, mientras que, la luz blanca (4.98 W/m²) mejora la velocidad de germinación (Oliveira et al., 2018). Por otro lado, el estrés generado por pulsos oxidantes (26% de O₂) permite mejorar la germinación (~22%) y la termotolerancia de los conidios de *M. robertsii* (Castillo-Minjarez et al., 2019). Lo anterior, demuestra que la resistencia y calidad de los hongos *Metarhizium* es susceptible de mejorarse; sin embargo, el aumento de temperatura (Ekesi et al., 1999), la deshidratación del sustrato (Bhanu-Prakash et al., 2008), la baja concentración de oxígeno (Garcia-Ortiz et al., 2015) y acumulación de CO₂ (Garza-López et al., 2011) durante el proceso de producción de conidios afectan sensiblemente el desarrollo y las características de resistencia y calidad del microorganismo.

Como se mencionó anteriormente (ver sección 3.3.1.1.), los conidios de *Metarhizium* spp., por lo general, se producen en biorreactores de bolsa (BB) con capacidad de ~1 kg de sustrato, donde las condiciones de proceso son difíciles de monitorear y controlar. Por ello, diferentes tipos de biorreactores (estáticos y agitados) susceptibles de aumentar de escala y de equipar con

instrumentos para el monitoreo y control de proceso, se han utilizado para la producción de conidios (da Cunha et al., 2019; Méndez-González et al., 2018b; Van Breukelen et al., 2011). No obstante, para los hongos del género *Metarhizium*, las condiciones de proceso no han sido establecidas y los esfuerzos por aumentar la escala los biorreactores acarrear problemas como sobrecalentamiento, deficiente suministro de oxígeno y pobre remoción de CO₂ (da Cunha et al., 2020; Dorta and Arcas, 1998; Van Breukelen et al., 2011). Por lo que, en este proyecto se estudiarán diferentes tipos de biorreactores y condiciones de operación que permitan un proceso controlado de nivel piloto para la producción de altas concentraciones de conidios de *M. robertsii* susceptibles de utilizarse como agentes de control biológico.

5. Justificación

Los hongos del género *Metarhizium* son importantes agentes de control biológico, sus conidios son el principio activo de numerosas formulaciones comerciales. Sin embargo, por lo general, la producción de los conidios se realiza en biorreactores de bolsa con baja capacidad y escaso control de las condiciones de proceso; por lo que, presentan alta variabilidad en términos de producción y calidad de los conidios. Este proceso representa una de las limitantes para la comercialización y aplicación de estos bioinsecticidas fúngicos. Por lo que, el diseño de procesos controlados que permitan la producción de conidios de calidad a gran escala es relevante. Los esfuerzos por mejorar el proceso han involucrado el uso de biorreactores aireados (estáticos y agitados), que presentan inconvenientes como la acumulación de calor, la deshidratación del lecho y la destrucción mecánica del micelio; las cuales, disminuyen la producción y/o calidad de los conidios. Por lo anterior, un estudio orientado a la selección del mecanismo de aireación y las condiciones de operación del biorreactor, que permitan obtener altas concentraciones de conidios ($\sim 1 \times 10^9$ conidios/gms) en una escala piloto, podría contribuir al desarrollo de procesos controlados a escala industrial.

6. Hipótesis

Biorreactores aireados de fermentación sólida pueden operarse a un nivel piloto para producir conidios de *M. robertsii* que, por su concentración, productividad y calidad puedan utilizarse como alternativa al uso de biorreactores de bolsa.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Establecer el tipo de biorreactor y sus condiciones de operación para la producción de conidios de *Metarhizium robertsii* a escala piloto que presente rendimientos de producción, productividad y calidad iguales o superiores a los obtenidos en biorreactores de bolsa.

7.2. Objetivos específicos

- Seleccionar el tipo de biorreactor en base a su mecanismo de aireación y su efecto sobre la producción y calidad de los conidios.
- Caracterizar el desarrollo del microorganismo mediante la medición de la producción de CO₂ y consumo de O₂ en biorreactores de escala experimental.
- Evaluar el efecto del tipo de material de fabricación del biorreactor en escala banco sobre la producción de CO₂ y conidios.
- Evaluar el efecto del incremento de la altura y el diámetro del biorreactor sobre las condiciones de proceso (temperatura y humedad), la producción de CO₂ y la producción de conidios de *M. robertsii*.
- Proponer estrategias para mantener las condiciones de cultivo favorables para el desarrollo y conidiación de *M. robertsii* al aumentar la escala del biorreactor.

8. Estrategia experimental

Para cumplir con el objetivo de la tesis, en una primera etapa, se llevaron a cabo experimentos en biorreactores de escala laboratorio para seleccionar el tipo de biorreactor (basado en su mecanismo de aireación) y sus condiciones de operación. Una vez seleccionado el tipo de biorreactor se realizó un análisis respirométrico del cultivo y, se incorporó a la producción de CO₂ como un parámetro de control de proceso para el cultivo de *M. robertsii* y su producción de conidios. Posteriormente, se realizaron experimentos en biorreactores de escala banco y piloto donde se seleccionó el material de fabricación y la altura del biorreactor y, se realizó un análisis de la densidad del empaque en función de las dimensiones del biorreactor. Subsecuentemente, se evaluó el efecto del aumento del diámetro del biorreactor sobre el cultivo de *M. robertsii* y la producción de conidios. Por último, se

evaluaron estrategias para mejorar las condiciones ambientales dentro del biorreactor favorables para el desarrollo y la producción de conidios de *M. robertsii* (Figura 5).

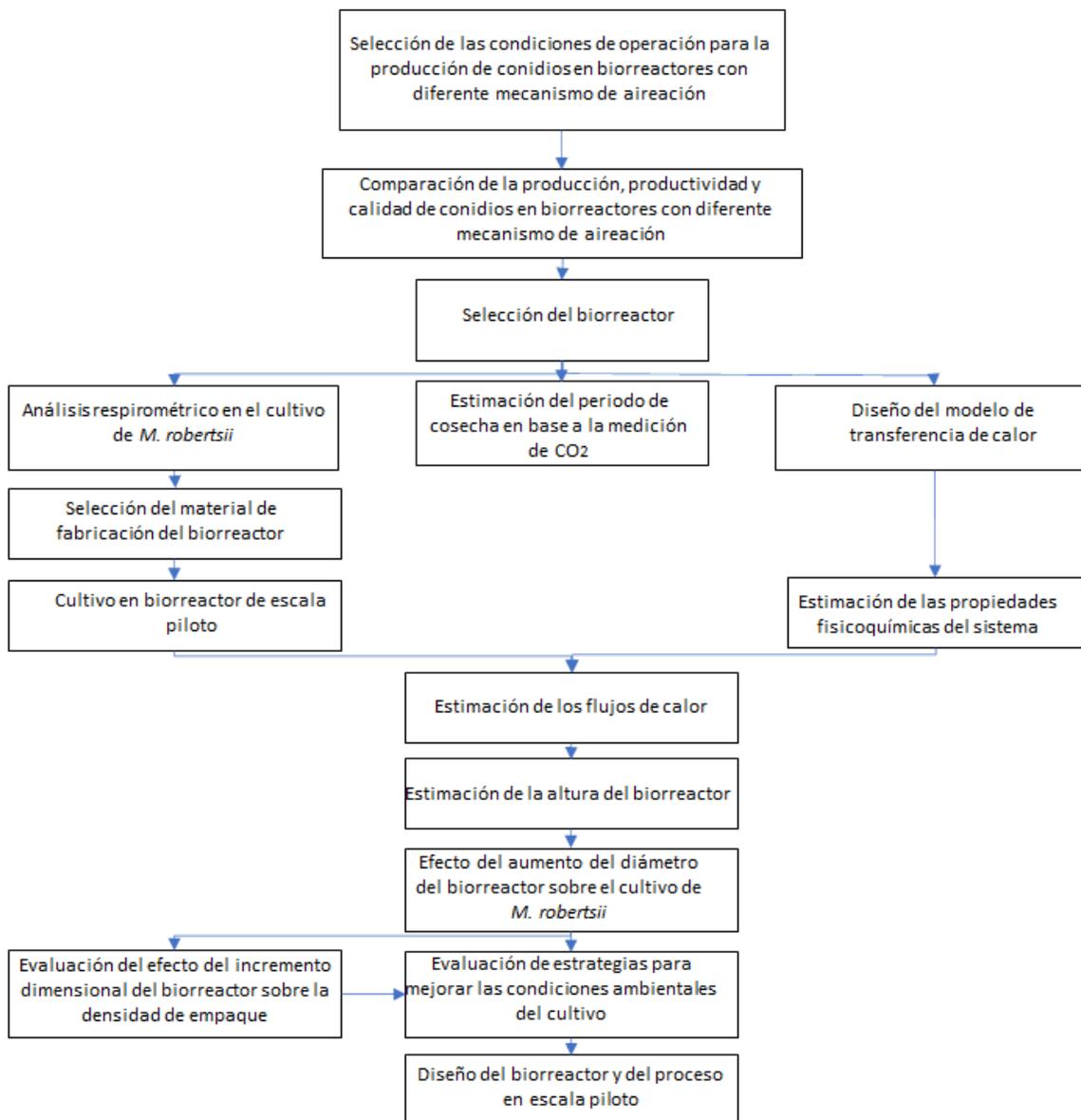


Figura 5. Estrategia experimental.

9. Materiales y métodos

La metodología empleada se dividió en dos secciones. En la primera, se utilizaron biorreactores estáticos de escala laboratorio (charolas y columnas empacadas) para seleccionar el tipo de

biorreactor con base al efecto de su mecanismo de aireación sobre la producción, productividad y calidad de los conidios. Después de seleccionar al biorreactor de columna empacada (BCE), se obtuvo el perfil respirométrico del cultivo de *M. robertsii* y se utilizó la producción de CO₂ como una herramienta para la estimación del tiempo de cosecha de los conidios. En la segunda parte, se utilizaron BCE de mayor escala (banco y piloto); en ellos, se seleccionó el material de fabricación del BCE, se estimaron las propiedades fisicoquímicas y la altura crítica del lecho y, se evaluó el efecto del diámetro del biorreactor sobre la densidad de empaque y el cultivo de *M. robertsii*. Finalmente, se estudiaron estrategias (agitación y adición de empaques esféricos) para mejorar las condiciones de cultivo y la producción de conidios en los biorreactores.

9.1. Microorganismo y su propagación

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizó la cepa de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1; la cual, es parte de la colección de hongos entomopatógenos de la UAM-Iztapalapa (número de identificación ENCB-MG-81) (Castillo-Minjarez et al., 2019). La cepa se propagó a partir de criopreservados en glicerol al 20% (4 °C); para ello, los conidios del conservado fueron suspendidos en una solución de Tween 80 al 0.05% (v/v), posteriormente se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio Agar dextrosa Sabouraud (ADS) (Bioxon) y se incubaron a 30 °C. Durante el proceso de propagación (24 días), la cepa se sembró a los 6, 12 y 18 días (Méndez-González et al., 2018b).

9.2. Sustrato e inóculo

Para la producción de conidios de *M. robertsii* en biorreactores de cultivo sólido, se utilizaron granos de arroz de primera calidad de la variedad "Morelos"; los cuales, se lavaron tres veces con agua y se acondicionaron a 30 % de humedad. Posteriormente, se empacaron en bolsas de polipropileno de alta densidad (polipapel) de 500 gramos de masa húmeda (gmh) de capacidad y se esterilizaron a 120 °C durante 15 min. Finalizado el periodo de esterilización, las bolsas se almacenaron a 4 °C durante 48 h. Pevio al empaque de los biorreactores, el sustrato se inóculo dentro de la bolsa con conidios suspendidos en una solución de Tween 80 al 0.05% v/v enriquecida con 500 mg/L de cloranfenicol (Sigma-Aldrich). La suspensión fue adicionada a cada bolsa con ayuda de una jeringa

estéril y se inocularon 2×10^6 conidios/gms (Méndez-González et al., 2018b). El inóculo se distribuyó en el sustrato agitando manualmente la bolsa.

9.3. Efecto del mecanismo de aireación sobre la producción de conidios

El efecto del mecanismo de aireación se evaluó en biorreactores de bolsa (BB), charolas (BCh) y columna empacada (BCE). Con ellos, se analizó el efecto de la difusión, difusión-convección natural y convección forzada, respectivamente. En una primera etapa, se determinó el flujo de aireación recomendable para la producción de conidios en BCh y BCE. Posteriormente, se determinó el tiempo de cultivo en los tres tipos de biorreactor (BB, BCh y BCE) a partir de cinéticas de producción de conidios y, finalmente, se evaluó la calidad (viabilidad e infectividad) de los conidios producidos en los tres tipos de biorreactor, bajo las condiciones de proceso (aireación y tiempo de proceso) determinadas anteriormente.

9.3.1. Efecto la tasa de aireación sobre la producción de conidios en biorreactores de columna y charolas

El efecto del flujo de aireación sobre la producción de conidios se evaluó en BCE y BCh a los que se les suministró diferentes flujos de aire. Los BCE que se utilizaron en esta sección fueron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y una altura de lecho de 20 cm (~30 gmh). Como BCh se usaron charolas de aluminio (cal. 28) con altura de lecho de 3 cm (~80 gmh); las cuales, se incubaron (a 30 °C) en una coraza metálica de 70 × 30 × 40 cm. Los tratamientos evaluados consistieron en el suministro de aire a 0.16, 0.33, 0.66, 0.96 y 1.28 L/kgmh min para los BCE y, 0.1, 0.5 y 1 L/kgmh min en BCh. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 7 y 13 d (para BCE y BCh, respectivamente). Al final del cultivo se determinó la humedad del sustrato y la producción de conidios. Para ello, el material fermentado proveniente de los diferentes tratamientos se transfirió a bolsas de plástico donde se homogenizó manualmente previo al muestreo. La humedad del sustrato se determinó por gravimetría; para ello, se tomó de cada unidad experimental tres muestras de ~1 gmh, las cuales se secaron a 90 °C hasta peso constante (~24 h). La producción de conidios se estimó por conteo en hematocitómetro Neubauer; para ello, del material homogenizado se tomaron muestras de ~1 gmh (3 por cada 50 gmh); las cuales, se suspendieron en 50 mL de solución de Tween 80 (0.05% v/v) y se sometieron a agitación mecánica por 5 min. La suspensión de conidios se diluyó apropiadamente (1:100) y se cuantificaron los conidios con ayuda de un microscopio óptico (40x).

9.3.2. Cinética de producción de conidios en biorreactores de bolsa, charola y columna

Los datos cinéticos de producción de conidios se obtuvieron en cultivos (incubados a 30 °C) en los tres tipos de biorreactores (BCE, BCh y BB). Como BB se utilizaron bolsas de polipropileno de alta densidad de 30 x 40 cm (~1 kgmh de capacidad). Los BCh y BCE que se utilizaron son similares a los descritos en la sección anterior (8.3.1.). A los BCE y BCh se les suministro aire saturado con un flujo de 0.66 y 0.1 L/kgmh min, respectivamente. Los BB se agitaron manualmente cada 4 días para deshacer los agregados de arroz. El contenido de humedad del sustrato y la producción de conidios se cuantificó en BCh y BB a los 7, 9, 11 y 13 d de cultivo y, en los BCE, a los 4.8, 5.4, 6.4, 8.6, 9.6 y 10.8 d. En cada tiempo de muestreo, se tomaron cuatro unidades experimentales al azar y sin reemplazo.

9.3.3. Comparación de la calidad de los conidios producidos en biorreactores de bolsa, charola y columna

La calidad de los conidios se evaluó en lotes producidos en los BCE, BCh y BB, incubados (a 30 °C) por 7.7, 13.2 y 10 d, respectivamente. Durante el cultivo, a los BCE y BCh se les suministró aire saturado con un flujo de 0.66 y 0.1 L/kgmh min, respectivamente. Al final de cada periodo de cultivo se determinó la humedad del sustrato y la producción, viabilidad e infectividad de los conidios.

Para determinar la calidad de los conidios producidos (viabilidad e infectividad), el material fermentado se deshidrató (HR > 5 %) y se resguardaron en bolsas de plástico con cierre hermético a 4 °C por dos días. La viabilidad de los conidios se estimó por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC); para ello, cajas de Petri (8 cajas por tipo de biorreactor) con 20 mL de agar dextrosa Sabouraud (ADS) y 0.5 g/L de desoxicolato de sodio (Montesinos-Matías et al., 2011) se inocularon con 30 µL de suspensión de conidios (1×10^4 conidios/mL). Las cajas de Petri se incubaron a 30 °C durante 96 h. Posteriormente, se realizó el conteo de UFC. La viabilidad de los conidios se expresó como el porcentaje del promedio de UFC por el número total de conidios inoculados. La infectividad de los conidios se evaluó sobre especímenes adultos de *Tenebrio molitor*. Para lo cual, se inocularon tópicamente grupos de treinta individuos con 10 µL suspensión de conidios (1×10^7 conidios/mL) (Robledo-Monterrubio et al., 2009) producidos en cada tipo de biorreactor (dos grupos por tipo de biorreactor). Adicionalmente, de forma similar, dos grupos de 30 insectos se trataron con una solución de agua y Tween 80 (0.05% v/v) como control. Después del inóculo, los diferentes grupos

de insectos se colocaron individualmente en cajas de plástico (20 × 40 × 15 cm) y se introdujeron a una cámara de temperatura regulada a 30 °C con luz natural, alimento y agua a disposición por 17 d. Durante ese tiempo, diariamente, se recolectaron los insectos muertos y se colocaron en cajas de Petri con un papel filtró húmedo y se incubaron a 30 °C para promover la micosis y, asimismo, confirmar que la infección por *M. robertsii* fue la causa de la muerte (Hegedus and Khachatourians, 1995).

9.4. Estudios cinéticos en biorreactores de columna empacada

En esta sección se presenta el análisis respirométrico del cultivo de *M. robertsii* y se establece el tiempo de cosecha utilizando la medición de CO₂ como una herramienta de monitoreo de proceso. Para ello, se utilizaron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro y 20 cm de altura del lecho (~30 gmh), empacadas con granos de arroz húmedos (H = 30%) previamente esterilizados (T = 120 °C, t = 15 min); los cuales, se inocularon con conidios de *M. robertsii* (2 × 10⁶ conidios/gms) suspendidos en una solución de Tween 80 al 0.05 % v/v y 500 mg de cloranfenicol/L de suspensión. Durante el cultivo, los BCE se incubaron a 30 °C, se les suministró aire húmedo (0.66 L/kgmh min) y se midió el contenido de O₂ y CO₂ en la corriente gaseosa de salida del biorreactor.

9.4.1. Análisis respirométrico

Para el análisis respirométrico durante el cultivo, la corriente gaseosa de salida del biorreactor se deshidrató (con sílica) y, cada 75 min se midió la concentración de O₂ y CO₂ con un sistema de respirometría (Loera-Corral et al., 2016). Las tasas de consumo de O₂ y de producción de CO₂ se determinaron por el gradiente de concentración con respecto al contenido de cada gas en el aire alimentado al biorreactor, la masa de arroz seco inicial en el biorreactor y el flujo aire suministrado y, se expresó en mg/gmsi h. El consumo O₂ y la producción de CO₂ (en mg/gmsi) se estimaron evaluando el área bajo la curva de las tasas de O₂ y CO₂ con el método del trapecio (Griffiths and Smith, 2006). El coeficiente respiratorio instantáneo (CO₂/O₂) se determinó a lo largo del cultivo a partir de las tasas molares (mmol/gmsi h) de consumo de O₂ y producción de CO₂ (Torres-Mancera et al., 2018).

Los parámetros cinéticos de producción de CO₂ (μ , CO_{2o} y CO_{2max}) se determinaron por un ajuste de los datos experimentales con el modelo logístico (Ecuación 1) (Saucedo-Castañeda et al., 1990); para

ello, se empleó el algoritmo no lineal de reducción generalizada del gradiente (GRG) (Lasdon et al., 1978). Para determinar el consumo global de O_2 se utilizó el modelo de Soto-Cruz (2002) considerando al oxígeno como un sustrato (Ecuación 2) (Martínez-Ramírez et al., 2021). El rendimiento Y_{CO_2/O_2} y el coeficiente de mantenimiento (m_{O_2}) se determinaron por regresión lineal. Para ambos ajustes matemáticos (CO_2 y O_2) se calculó el coeficiente de determinación (R^2) con respecto a los datos experimentales. El tiempo *Lag* del cultivo se calculó por la intersección de la recta formada por el $\ln CO_2$ vs tiempo con el eje de las x (Pirt, 1975). La fase exponencial del cultivo y sus parámetros cinéticos (μ_{exp} , $CO_{2(0)}$) se estimaron con el modelo exponencial (Ecuación 3) (Méndez-González et al., 2020), utilizando el algoritmo GRG para el ajuste con los datos experimentales.

$$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + \left[\left(\frac{CO_{2max}}{CO_{2(0)}} \right) - 1 \right] e^{-\mu t}}$$

Ecuación 1. Producción de CO_2 por modelo logístico.

$$O_{2(0)} - O_2 = \left(\frac{1}{Y_{CO_2/O_2}} \right) (CO_2 - CO_{2(0)}) + \frac{m_{O_2} CO_{2max}}{\mu} \left[\ln \left(\frac{CO_{2max} - CO_{2(0)}}{CO_{2max} - CO_2} \right) \right]$$

Ecuación 2. Consumo de O_2 por el modelo de Soto-Cruz (2002).

$$CO_2 = CO_{2(0)} e^{\mu t}$$

Ecuación 3. Modelo exponencial para la producción de CO_2 .

9.4.2. Cinética de producción de conidios y CO_2

Para obtener los datos cinéticos de producción de conidios y CO_2 se utilizaron como unidades experimentales columnas empacadas (~30 gms), aireadas con 0.66 L/kgms min. Tres unidades experimentales fueron tomadas aleatoriamente (sin reemplazo) cuando la tasa de producción de CO_2 disminuyó 30, 40, 50, 60 y 70% con respecto a la tasa máxima obtenida en el cultivo. Para ello, durante el cultivo, se midió la concentración de CO_2 en la corriente gaseosa de salida de los

biorreactores cada 30 min. En cada etapa de muestreo, se determinó la humedad del sustrato y la producción de conidios. Este procedimiento se realizó por duplicado.

9.5. Efecto del aumento de escala sobre el cultivo de *M. robertsii*

Se utilizaron BCE de mayor escala (banco y piloto); por lo que, los estudios realizados están orientados a la determinación del efecto del aumento de las dimensiones del biorreactor sobre las propiedades fisicoquímicas del sistema, el cultivo de *M. robertsii* y su producción de conidios. Para ello, se seleccionó el material de fabricación de las unidades experimentales, se estimó la altura crítica del biorreactor y se evaluó el efecto del aumento de su diámetro. Finalmente, se evaluaron alternativas como la agitación mecánica y la adición de empaques plásticos para mejorar las condiciones ambientales para el cultivo de *M. robertsii* ante el aumento dimensional del biorreactor.

9.5.1. Efecto del material de fabricación del biorreactor sobre el cultivo de *M. robertsii*

Para evaluar el efecto del aumento de escala del BCE, en una primera etapa, se realizó un estudio de selección del material de fabricación del BCE para su uso en etapas posteriores. Para ello, se utilizaron cuatro unidades experimentales diferentes: columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno (CVE) (ver sección 8.3.1.) y columnas de vidrio (CV), acero inoxidable (CA) y PVC (CP) de 10 cm de diámetro (conductividad calorífica (k) de 1.16, 46 y 0.25 W/m k, respectivamente) y 25 cm de altura de lecho (capacidad ~650 gmh). Durante el cultivo (~200 h), a los BCE se les suministró un flujo de aire húmedo de 0.66 L/kgmh min y se midió en línea el contenido de CO₂ de la corriente gaseosa a la salida de los biorreactores. Además, utilizando termopares, se monitoreó la temperatura ambiental y, en los biorreactores CV y CA, se midió la temperatura en cuatro niveles axiales de la columna (3, 8, 13 y 18 cm; T1, T2, T3 y T4, respectivamente) (Figura 6) en intervalos de 10 min. Al final del cultivo, se cuantificó el contenido de humedad del sustrato y los conidios producidos. Para ello, en los biorreactores CV, CA y CP, el lecho de cultivo se dividió en tres sectores de 8 cm de altura: bajo (B), medio (M) y alto (A) (Figura 7). Posteriormente, los datos de humedad y producción de conidios de la tercia de sectores de cada biorreactor fueron unificados y comparados con los registrados en los biorreactores de CVE.

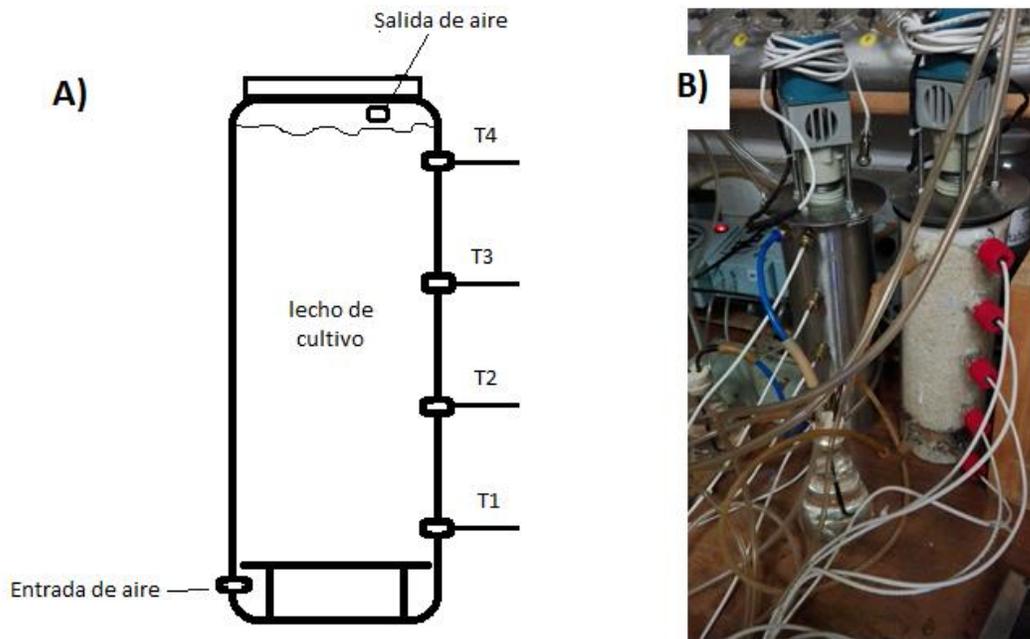


Figura 6. Ubicación de los termopares en A) Biorreactores de $D_i=10\text{cm}$; B) Biorreactores CA y CV.

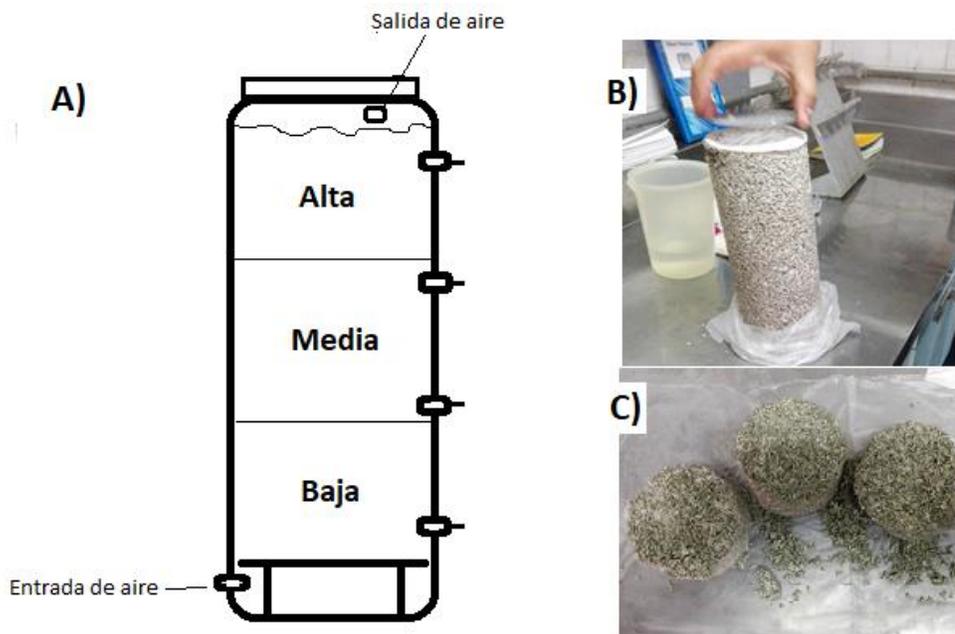


Figura 7. A) Distribución de las secciones de muestreo en los biorreactores CV, CA y CP; B) Imagen del lecho empacado; C) Imagen de los sectores de muestreo.

9.5.2. Determinación de la altura crítica del biorreactor

El estudio para estimar la altura crítica del biorreactor se realizó en cuatro etapas. En la primera, se desarrolló un modelo para estimar el transporte de calor en el BCE. En la segunda, se estimaron las

propiedades fisicoquímicas del sistema (asociadas al modelo). En la tercera, se realizó el cultivo de *M. robertsii* en un BCE de escala piloto, en el cual, se midieron variables como temperatura y humedad (del lecho y del aire suministrado) que permitieron el cálculo de los flujos de calor involucrados en el sistema. Finalmente, en la cuarta etapa se estimó (Comsol Multiphysics™ 4.4) el perfil axial de temperatura de la columna que permitió seleccionar la altura del biorreactor.

9.5.2.1. Construcción del modelo de transferencia de calor en columna empacada

El diseño del modelo de transferencia de calor para el BCE se realizó en geometría cilíndrica (z, r, θ) (Figura 8) y se consideró un balance general de calor compuesto de cinco términos (Ecuación 4); en los cuales se consideran: la tasa de acumulación de calor (q_{acum}), la tasa de generación de calor (q_{prod}) y las tasas de remoción de calor axial (q_z), radial (q_r) y por evaporación del agua (q_{vap}).

$$q_{acum} = q_{prod} - q_r - q_z - q_{vap}$$

Ecuación 4. Balance general de transferencia de calor en BCE.

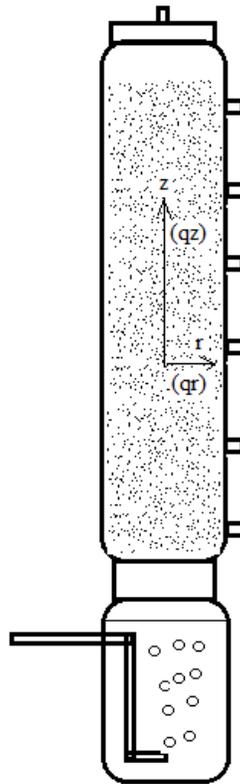


Figura 8. Esquema de la columna empacada con coordenadas cilíndrica.

La acumulación de calor se consideró como la relación del cambio de temperatura en el lecho de cultivo con respecto al tiempo ($\frac{dT_b}{dt}$), la capacidad calorífica (a presión constante) (Cp_b), la masa (m_b) y la porosidad del lecho (ε) (Ecuación 5).

$$q_{acum} = \frac{Cp_b m_b}{1 - \varepsilon} \frac{dT_b}{dt}$$

Ecuación 5. Acumulación de calor en el lecho de cultivo.

El calor generado se estimó como el factor de la tasa molar de producción de CO₂ en el cultivo (r_{CO_2}), la masa seca inicial del lecho (m_{bsi}) y el calor producido por mol de CO₂ producido (α) (Ecuación 6). El coeficiente α tiene un valor 903 kJ/mol_{CO2} (Erickson et al., 1978).

$$q_{prod} = m_{bsi} \alpha r_{CO_2}$$

Ecuación 6. Generación de calor por acción microbiana.

La disipación de calor en dirección radial se estimó en función del coeficiente radial de transferencia de calor (U_r), el área característica de transferencia de calor (A_c) y el gradiente de temperatura entre la sección externa de la pared del biorreactor y el centro del lecho de cultivo ($T_2 - T_0$) (Ecuación 7).

$$q_r = U_r A_c (T_2 - T_0)$$

Ecuación 7. Disipación de calor por conducción.

El coeficiente radial de transferencia de calor se estimó en función de las resistencias del aire que fluye dentro de la columna (convección forzada) ($\frac{1}{r_1 h_1}$), el lecho de cultivo ($\frac{\ln(r_1/r_0)}{k_b}$) (conducción), la pared del biorreactor ($\frac{\ln(r_2/r_1)}{k_{wall}}$) (conducción) y el aire que rodea al biorreactor (convección natural) ($\frac{1}{r_2 h_2}$) (Ecuación 8).

$$U_r = \frac{1}{\frac{1}{r_1 h_1} + \frac{\ln(r_1/r_0)}{k_b} + \frac{\ln(r_2/r_1)}{k_{wall}} + \frac{1}{r_2 h_2}}$$

Ecuación 8. Coeficiente radial de transferencia de calor.

Por lo que, sustituyendo la ecuación 8 en la 7 se obtuvo una expresión desarrollada para la determinación de q_r (Ecuación 9).

$$q_r = \left(\frac{1}{\frac{1}{r_1 h_1} + \frac{\ln(r_1/r_0)}{k_b} + \frac{\ln(r_2/r_1)}{k_{wall}} + \frac{1}{r_2 h_2}} \right) A_c (T_2 - T_0)$$

Ecuación 9. Ecuación desarrollada para la disipación radial de calor.

La disipación axial de calor se determinó como el producto del coeficiente convectivo de transferencia de calor (h), el área superficial de la partícula sólida por volumen unitario de lecho (a), el área de corte transversal vacía del lecho (S), la longitud del lecho (L) y el gradiente de temperatura axial ($T_{air_{z=L}} - T_{air_{z=0}}$) (Ecuación 10).

$$q_z = h a S L (T_{air_{z=L}} - T_{air_{z=0}})$$

Ecuación 10. Disipación de calor por convección.

La disipación de calor por efecto de la evaporación del agua se estimó como el producto del calor latente de vaporización del agua (λ_w) y, la densidad del aire húmedo (ρ_{air}), su flujo volumétrico (Q_{air}) y el gradiente del contenido de humedad ($H_{air}|_{z=L} - H_{air}|_{z=0}$) (Ecuación 11).

$$q_{vap} = \lambda_w \rho_{air} Q_{air} (H_{air}|_{z=L} - H_{air}|_{z=0})$$

Ecuación 11. Disipación de calor por evaporación.

Finalmente, los términos presentados en las ecuaciones 5, 6, 7, 10 y 11 se sustituyeron en la ecuación 1 para obtener el modelo experimental para el balance de la transferencia de calor en BCE (Ecuación 12)

$$\frac{Cp_b m_b}{1 - \varepsilon} \frac{dT_b}{dt} = m_{bsi} \alpha r_{CO_2} - U_r A_c (T_2 - T_0) - h a S L (T_{air_{z=L}} - T_{air_{z=0}}) - \lambda_w \rho_{air} Q_{air} (H_{air}|_{z=L} - H_{air}|_{z=0})$$

Ecuación 12. Modelo experimental para el balance de la transferencia de calor en BCE.

9.5.2.2. Estimación de las propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo

Para el uso del modelo se estimaron las propiedades fisicoquímicas asociadas al lecho de cultivo. Las propiedades térmicas del lecho de cultivo (Cp_b y k_b) se estimaron por cálculos matemáticos a

partir de la composición de los granos de arroz, y las propiedades asociadas a la geometría y gravimetría del lecho de cultivo (α , ϵ) por mediciones físicas y determinaciones teóricas.

9.5.2.2.1. Estimación de la composición elemental del arroz

A partir de los datos de composición química del arroz disponibles en el sitio web del Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de EUA (USDA) (Tabla 5), se estimó su composición elemental (C-mol), relacionando el contenido másico de cada uno de los compuestos (carbohidratos, proteínas, grasas y fibra) con su composición elemental (C-mol) (Smits et al., 1996).

Tabla 5. Composición química del arroz.

Compuesto	Contenido (g/100 gms)
Carbohidratos	81.6
Proteínas	6.7
Grasas	0.9
Fibra	1.4
Cenizas	9.4

Fuente: USDA (1986).

9.5.2.2.2. Estimación de la capacidad calorífica

Para estimar la capacidad calorífica de los granos de arroz húmedos, a partir de la composición química del arroz (Tabla 5), se calcularon las fracciones másicas (g de compuesto/g de masa total) de cada uno de sus componentes principales. Posteriormente, la capacidad calorífica a presión constante (C_{pb}) de los granos de arroz húmedos (H=30%) se determinó por la sumatoria de la fracción másica del agua (x_w), carbohidratos (x_c), proteínas (x_p), grasas (x_g), fibra (x_f) y cenizas (x_a) por su factor de correlación (Ecuación 13) (Singh and Heddman, 2014).

$$C_p = 1.424x_c + 1.549x_p + 1.675x_g + 0.837x_a + 1.42x_f + 4.187x_w$$

Ecuación 13. Correlación para la estimación de la capacidad calorífica.

9.5.2.2.3. Estimación de la conductividad calorífica de los granos de arroz

Para estimar la conductividad calorífica de los granos de arroz húmedos, primero se estimó su densidad (ρ_r) a partir de las densidades individuales (ρ_w , ρ_c , ρ_p , ρ_g , ρ_f y ρ_a para agua, carbohidratos, proteínas, grasas, fibra y cenizas, respectivamente) (Ecuaciones 15-20) y la fracción másica (determinada en 9.5.2.2.2.) de los componentes principales contenidos en los granos (Ecuación 14).

La densidad de cada uno de los componentes se calculó con correlaciones matemáticas (Toledo et al., 2018) a la temperatura de fermentación (30 °C) (Ecuaciones 15-20).

$$\rho_r = \sum \frac{1}{x_i/\rho_i}$$

Ecuación 14. Densidad del arroz húmedo.

$$\rho_w = 997.18 + 0.0031439 T - 0.0037574 T^2$$

Ecuación 15. Correlación para la estimación de la densidad del agua en una mezcla.

$$\rho_c = 1599.1 - 0.31046 T$$

Ecuación 16. Correlación para la estimación de la densidad de los carbohidratos.

$$\rho_p = 1329.9 - 0.51814 T$$

Ecuación 17. Correlación para la estimación de la densidad de las proteínas.

$$\rho_g = 925.59 - 0.41757 T$$

Ecuación 18. Correlación para la estimación de la densidad de las grasas.

$$\rho_f = 1311.5 - 0.36589 T$$

Ecuación 19. Correlación para la estimación de la densidad de la fibra.

$$\rho_a = 2423.8 - 0.28063 T$$

Ecuación 20. Correlación para la estimación de la densidad de las cenizas.

A partir de la fracción másica (x_i) y densidad de cada componente (ρ_i) y la densidad teórica de los granos de arroz, se determinó la fracción volumétrica (x_{vi}) (Ecuación 21).

$$x_{vi} = \sum \frac{x_i \rho_r}{\rho_i}$$

Ecuación 21. Estimación de la fracción volumétrica.

Finalmente, se estimó la conductividad calorífica de los gramos de arroz (k_r) a partir x_{vi} y la conductividad calorífica de cada uno de los componentes en el arroz húmedo (k_i) (Choi, 1986) (Ecuación 22). La conductividad calorífica del agua (k_w), carbohidratos (k_c), proteínas (k_p), grasas (k_g), fibra (k_f) y cenizas (k_a) a partir de las correlaciones desarrolladas por Choi (1986) (Ecuaciones 23-28), considerando la temperatura de cultivo (30 °C).

$$k_r = \sum (k_i x_{vi})$$

Ecuación 22. Conductividad calorífica del arroz húmedo.

$$k_w = 0.57109 + 0.0017625 T - 6.7306 \times 10^{-6} T^2$$

Ecuación 23. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica del agua.

$$k_c = 0.2014 + 0.0013874 T - 4.3312 \times 10^{-6} T^2$$

Ecuación 24. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de los carbohidratos.

$$k_p = 2.21196 + 0.0062489 T - 1.0154 \times 10^{-4} T^2$$

Ecuación 25. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de las proteínas.

$$k_g = 0.1807 + 0.0027604 T - 1.7749 \times 10^{-7} T^2$$

Ecuación 26. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de las grasas.

$$k_f = 0.18331 + 0.0012497 T - 3.1683 \times 10^{-6} T^2$$

Ecuación 27. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de la fibra.

$$k_a = 0.3296 + 0.001401 T - 2.9039 \times 10^{-6} T^2$$

Ecuación 28. Correlación para la estimación de la conductividad calorífica de las cenizas.

9.5.2.2.4. Estimación de la fracción vacía del lecho de cultivo

Para estimar la fracción vacía del lecho de cultivo (ϵ), se determinó su densidad (ρ_b) por la relación entre la masa empacada (m_b) y el volumen útil de la columna (V_b) (Ecuación 29). Posteriormente, ϵ se estimó a partir de los valores de ρ_b y ρ_r (Ecuación 30)(da Cunha et al., 2020).

$$\rho_b = \frac{m_b}{V_b}$$

Ecuación 29. Densidad del lecho.

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_r}$$

Ecuación 30. Fracción vacía del lecho.

9.5.2.2.5. Estimación de la conductividad calorífica del lecho de cultivo

La conductividad calorífica del lecho de cultivo (k_b) se estimó a partir de la magnitud de la fracción vacía, de la conductividad calorífica del aire saturado ($k_{air} = 0.110 \text{ W/m K}$), y de los granos de arroz húmedo (k_r) (estimada en la sección 8.5.2.2.2.) (Fanaei and Vaziri, 2009) (Ecuación 31).

$$k_b = \epsilon k_{air} + (1 - \epsilon)k_r$$

Ecuación 31. Capacidad calorífica del lecho de cultivo.

9.5.2.2.6. Estimación del área superficial de las partículas sólidas por volumen unitario de lecho

Para la estimación del área superficial de las partículas por volumen unitario de lecho (a) se midió el diámetro y longitud de los granos de arroz de 50 granos de arroz. Posteriormente, el promedio de ambas mediciones (longitud y diámetro) se utilizó para calcular el área superficial (S_p) y el volumen (V_p) de las partículas. Con ello, se determinó la superficie específica de la partícula (a_{part}) (Ecuación 32). Finalmente, se estimó a como el producto de la a_{part} y la fracción volumétrica de las partículas sólidas en el lecho de cultivo (Ecuación 33).

$$a_{part} = \frac{S_p}{V_p}$$

Ecuación 32. Superficie específica de la partícula de arroz.

$$a = a_{part}(1 - \epsilon)$$

Ecuación 33. Área superficial de las partículas por volumen unitario de lecho.

9.5.2.3. Cultivo de *M. robertsii* en biorreactor de columna empacada de escala piloto

Los datos experimentales asociados al modelo de transferencia de calor se obtuvieron con un cultivo de *M. robertsii* que se llevó a cabo en un BCE de PVC (Figura 9) de 80 cm de altura (70 cm de altura de lecho), con diámetro interno de 10.1 cm y espesor de pared de 0.2 cm. El biorreactor se empacó con 5445 g de arroz estéril (H = 30 %) inoculado con conidios de *M. robertsii* (2×10^6 conidios/gms). El cultivo se incubó a 30 °C durante 165 h. Durante ese tiempo se suministró aire húmedo (82.6%) con un flujo de 0.16 L/kgmh min y se monitoreó (cada 26 minutos) la producción de CO₂ y el consumo O₂. Además, cada 5 min se midieron la humedad y temperatura del aire a la entrada y salida del biorreactor con un termohigrómetro (mod. CEM DT-172) y, la temperatura del lecho de

cultivo en el centro y seis puntos axiales equidistantes (cada 10 cm) (Figura 9) con un equipo de escaneo de temperatura (Cole-Parmer, Digi-Sense EW-92000-00). Al final del cultivo, se cuantificó la humedad del sustrato en siete secciones de la columna de 10 cm de altura cada una.

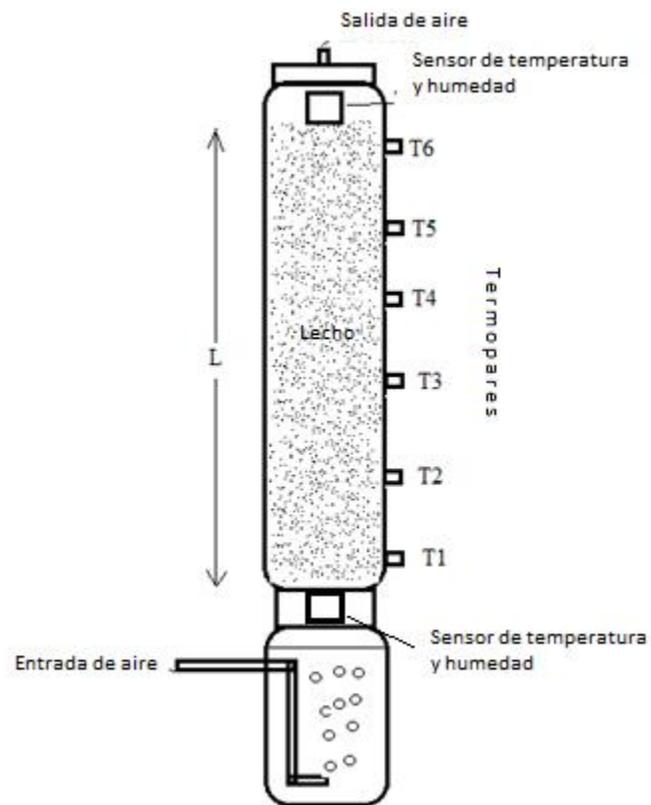


Figura 9. Biorreactor de columna empacada de escala piloto e instrumentación

9.5.2.4. Estimación de las tasas de flujo de calor y parámetros asociados

La estimación de las tasas de flujo de calor dentro del sistema (Ecuación 4) y la validación del modelo se realizó mediante mediciones experimentales (Figura 10) bajo las condiciones descritas en la sección 9.5.2.3.

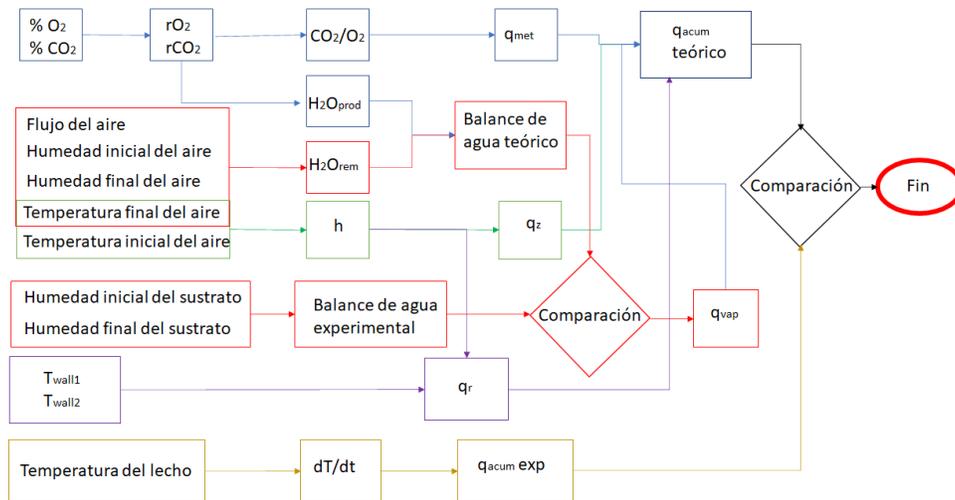


Figura 10. Algoritmo para la obtención de flujos de calor y validación del modelo.

El calor generado se estimó con la ecuación 6; para ello, se midió la producción de CO_2 a lo largo del cultivo. Para el uso del coeficiente α ($903,000 \text{ J/mol}_{\text{CO}_2}$), se consideró un coeficiente respirométrico (~ 1) (determinado en la sección 10.4.1.) (Erickson et al., 1978).

El calor removido por evaporación se estimó a partir de la medición de humedad de la corriente de aire a la entrada y salida del biorreactor (Ecuación 11). La cantidad de agua removida fue determinada por la medición de la humedad del aire (ver sección 9.5.2.3), la cual, se comparó con el valor obtenido mediante un balance de agua donde se consideró la humedad inicial y final de los granos de arroz y el agua producida por el proceso metabólico. Para los parámetros λ_w y ρ_{air} se consideraron valores de 2426.72 J/g y $8.6 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ (Perry and Green, 2008), respectivamente.

Para estimar el calor removido por la convección del aire midió la temperatura del aire a la entrada y salida del biorreactor. El valor del gradiente se multiplicó por el flujo másico de aire y su capacidad calorífica a presión constante ($C_{p\text{air}}$) (Ecuación 34). Posteriormente, se calculó el coeficiente convectivo de transferencia de calor (h) mediante el método numérico de reducción generalizada del gradiente (GRG) utilizando la igualdad mostrada en la ecuación 34.

$$q_z = haSL(T_{\text{air}_{z=L}} - T_{\text{air}_{z=0}}) = WC_p\Delta T$$

Ecuación 34. Igualdades para la estimación del calor removido por mecanismo convectivo.

Las resistencias asociadas con el coeficiente radial de transferencia de calor (U_r) (Ecuación 8) se determinaron por la geometría del biorreactor, parámetros estimados en la sección 9.5.2.3. y los valores del coeficiente convectivo (h) para la corriente de aire dentro del biorreactor y en el aire que rodea la pared del biorreactor ($h_2 \sim 5.8 \text{ W/m}^2 \text{ }^\circ\text{C}$). Una vez obtenido U_r , se estimó el calor removido por conducción utilizando el gradiente de temperatura entre el centro del lecho de cultivo y el aire que rodea la pared externa del biorreactor ($T_2 - T_0$) (Ecuación 9).

9.5.2.5. Simulación del perfil de temperatura en el BCE

La simulación de la transferencia de calor del sistema se realizó con el software Comsol Multiphysics™ 4.4. Para ello, se capturaron los parámetros geométricos y fisicoquímicos del medio externo, biorreactor, empaque y el fluido interno (Tabla 6). El perfil térmico de la columna empacada se estimó en el momento en el que se registró la temperatura máxima en el sistema.

Tabla 6. Propiedades del sistema ingresadas al software

Sector del sistema	Propiedad capturada
Medio externo	Temperatura
Pared del biorreactor	Espesor, diámetro interno, altura, conductividad calorífica, densidad, calor específico a presión constante
Empaque	Diámetro, altura, conductividad calorífica, densidad, calor específico a presión constante, porosidad, tasa de generación de calor por unidad de volumen
Fluido interno	Tipo de fluido, velocidad, humedad, temperatura inicial

9.5.3. Efecto del aumento de las dimensiones del biorreactor sobre la densidad de empaque

Para determinar la densidad de empaque en función del aumento de la altura y el diámetro de la columna empacada, se utilizaron columnas de plástico con un diámetro interno de 4, 5, 7, 10.1, 15.3 y 19.3 cm, las cuales, se pesaron y se aforaron con granos de arroz pretratado (ver sección 9.2) a diferentes alturas (10, 15, 20, 25 y 30 cm). La masa del empaque se determinó por diferencia de peso entre la columna vacía y con empaque. Posteriormente, la densidad del empaque se determinó

como el cociente entre la masa empacada y el volumen de aforo de la columna para cada una de las alturas de empaque analizadas.

9.5.4. Efecto del aumento del diámetro del biorreactor sobre el cultivo de *M. robertsii*

El efecto del diámetro se evaluó usando BCE con 2, 4, 10.1 y 19.3 cm de diámetro interno (BCE₂, BCE₄, BCE₁₀ y BCE₁₉, respectivamente) (Figura 11). Los biorreactores BCE₂ y BCE₄, se fabricaron con vidrio con una altura de lecho de 15 cm y capacidad de 25 y 100 gms, respectivamente. Los BCE₁₀ y BCE₁₉ se fabricaron con PVC con una altura de lecho de 30 cm, y una capacidad aproximada de, 1400 y 4700 gms, respectivamente. Los biorreactores se empacaron con granos de arroz (contenido de humedad 30%) inoculado con conidios de *M. robertsii* y se incubaron a 30 °C durante 200 h. Durante el cultivo, se les suministró una corriente de aire húmedo de 0.66 L/kgmh min y, se monitoreo en contenido de CO₂ a la salida de los biorreactores. Al final del cultivo, se cuantificó el contenido de humedad del lecho y la producción de conidios en cada unidad experimental. En los BCE₁₀ y BCE₁₉, ambas mediciones se realizaron en el centro (C) (entre los radios de 0 a 5 cm y de 0 a 9.5 cm, respectivamente) y en la periferia (P) (entre los radios de 5 a 10 cm y de 9.5 a 19 cm, respectivamente) del empaque.



Figura 11. Biorreactores de columna empacada de diferentes diámetros.

9.5.5. Estrategias para el mejoramiento de las condiciones de cultivo de *M. robertsii*

Para evitar la compactación y aglomeración de los granos de arroz se evaluaron dos estrategias: 1) el uso de biorreactores agitados (con aspas y tambor rotatorio) y, 2) la adición de empaques esféricos en el lecho del BCE.

9.5.5.1. Producción de conidios en biorreactores de agitados

El efecto de la agitación sobre la producción de conidios de *M. robertsii* se evaluó en biorreactores de aspas (BA) y de tambor rotatorio (BTR) (Figura 12). El BA fue fabricado en acero inoxidable con una capacidad de 6 L (Lopez-Ramirez et al., 2018). Como BTR se utilizaron columnas de PVC de 15.2 y 19.1 cm de diámetro (BTR₁₅ y BTR₁₉, respectivamente). El BA se empacó con 2.5 kgmh (~50% de su capacidad) y se agitó a 2 rpm por 60 s cada 4 días. Los BTR₁₅ y BTR₁₉ con 3.8 y 6 kgmh, respectivamente (~90% de su capacidad) y se rotaron un cuarto de vuelta al día. Durante el cultivo (a 30 °C), a ambos tipos de biorreactores (BA y BTR), se les suministró una corriente de aire húmedo de 0.66 L/kgmh min. Como testigos se realizaron cultivos en BCE (bajo las mismas condiciones de aireación y temperatura) de 15.2 y 19.1 cm de diámetro interno (BCE₁₅ y BCE₁₉, respectivamente) y 30 cm de altura de lecho. Al final del cultivo (~200 h), se midió la humedad del empaque y la producción de conidios en cada unidad experimental.

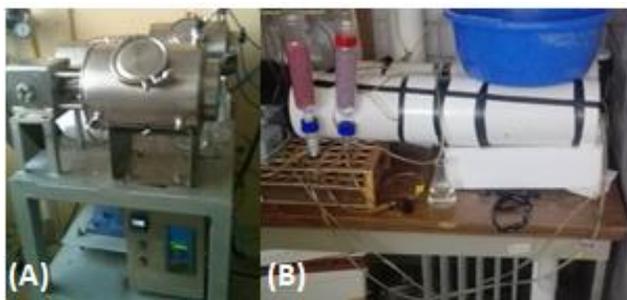


Figura 12. (A) Biorreactor de aspas y (B) biorreactor de tambor rotatorio.

9.5.5.2. Efecto del uso de empaques esféricos en el lecho de cultivo en biorreactores de columna empacada

Para disminuir la densidad de empaque en el biorreactor se utilizaron empaques esféricos plásticos (EEP) (Jaeguer Tri-Packs®) de dos pulgadas de diámetro. El efecto de la adición de EEP sobre el cultivo de *M. robertsii* se evaluó en BCE_{10EEP} empacados con arroz inoculado y 24 EEP (distribuidos al azar) y con una densidad de empaque de 0.79 g/cm³. Como control, se utilizó un BCE₁₀ sin EEP con una densidad de empaque de 0.82 g/cm³. Durante el cultivo, a ambos biorreactores se les suministró aire húmedo (0.66 L/kgmh min) y se monitoreo la producción de CO₂ y la temperatura del lecho. La medición de la temperatura se realizó en tres niveles axiales de la columna, ubicados a los 9, 18 y 27 cm de altura (Ax1, Ax2 y Ax3, respectivamente) y en el centro de la columna a una

altura de 27 cm (C). Al final del cultivo (~200 h), se cuantificó el calor generado ver sección 9.5.2.4.) el contenido de humedad del lecho y la producción de conidios. El contenido de humedad y la producción de conidios se cuantificó en 5 secciones axiales (~6 cm de altura) del lecho de cultivo.

9.6. Análisis estadístico

Los datos provenientes de los cultivos que corresponden a la relación de dos variables continuas se analizaron por medio del coeficiente de determinación (R^2). Aquellos conjuntos de datos que corresponden a la relación entre una variable continua y una nominal se analizaron con la prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se determinó la existencia de diferencias significativas; para ello, los datos que mostraron correspondencia con la distribución normal se analizaron usando un ANOVA ($\alpha = 0.05$), los conjuntos de datos que no corresponden a una distribución normal se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis. Finalmente, el conjunto de datos con diferencias significativas se analizaron con los análisis t de Student o Tukey (según corresponda con el número de tratamientos comparados y grado de libertad) con el mismo nivel de significancia.

10. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentarán en tres secciones. En las primeras dos secciones se utilizaron biorreactores de escala laboratorio y, en la tercera sección se realizaron estudios en biorreactores de escala banco y piloto. En la primera sección, se evaluó el efecto del mecanismo de aireación sobre la producción, productividad y calidad de los conidios de *M. robertsii*. En la segunda, se realizó el análisis respirométrico en el cultivo de *M. robertsii* y se acopló la medición de CO_2 como una herramienta de monitoreo en el proceso de producción de conidios. Finalmente, en la tercera sección se realizaron los estudios asociados con el material de fabricación del biorreactor y sus dimensiones (longitud y diámetro) y se evaluaron estrategias (agitación mecánica y adición de empaques) para mejorar las condiciones de cultivo para la producción de conidios.

10.1. Efecto del mecanismo de aireación sobre la producción de conidios

La producción de conidios sobre un sustrato sólido es un proceso aerobio estricto (Dalla Santa et al., 2004); por ello, el mecanismo de suministro O_2 y remoción de CO_2 es esencial. El tipo de mecanismo de aireación (difusión, convección natural y convección forzada) permite generar diferentes

condiciones de cultivo que podrían ser favorables o perjudiciales para el microorganismo. Por ello, en esta primera etapa experimental, se seleccionó el biorreactor en términos de su mecanismo de aireación.

10.1.1. Efecto de la tasa de aireación sobre la producción de conidios en biorreactores de columna y charolas

En estudios previos se ha demostrado que el suministro de aire en biorreactores de fermentación sólida contribuye al control de la temperatura y humedad del lecho de fermentación (Fanaei and Vaziri, 2009; Narahara et al., 1984), así como al transporte de O_2 y CO_2 (Mitchell et al., 2003). Un nivel adecuado de aireación podría mantener las condiciones ambientales favorables para la producción de biomasa. Por lo tanto, en esta sección se evaluó el efecto de la tasa de aireación sobre la producción de conidios en biorreactores de columna empacada (0.16, 0.33, 0.66, 0.96 y 1.28 L/kgmh min) y charolas (0.1, 0.5 y 1 L/kgmh min). En ninguno de los tratamientos se registró menor humedad del sustrato con respecto a la inicial (~30%) (Figuras 13A y 14A). Ambos biorreactores presentaron diferente comportamiento en función a la tasa de aireación. En el biorreactor de charolas la producción de conidios disminuyó de 1.19 a 0.43×10^9 conidios/gms al incrementar la tasa de aireación de 0.1 a 1 L/kgmh min (Figura 14B) y, en el biorreactor de columna empacada, en todos los tratamientos se registró una producción superior 1×10^9 conidios/ gms al suministrar aire con una tasa de 0.16 a 1.28 L/kgmh min (Figura 13B). Además, en este estudio se observó que los BCE requieren menor tiempo de proceso (7d) para alcanzar la producción de 1×10^9 conidios/ gms en comparación con los de charolas (13 d).

La producción de conidios en BCh mostró mayor sensibilidad al incremento de la tasa de aireación en comparación a la obtenida en los BCE. Además, comparando los tratamientos de mayor producción de conidios en ambos biorreactores, se observó que la productividad en BCE (1.69×10^8 conidios/gms d) fue 1.85 veces mayor que la obtenida en BCh (9.13×10^7 conidios/gms d). Estas diferencias podrían deberse a los diferentes mecanismos de aireación dentro de los biorreactores. Bajas tasas de aireación pueden causar acumulación del CO_2 producido por el microorganismo y, ésta afectar la producción de conidios (Garza-López et al., 2011). Sin embargo, en ambos tipos de biorreactor (BCh y BCE) se obtuvieron altos niveles de producción suministrando aireación entre 0.1 y 0.66 L/kgmh min (Figuras 13B y 14B); esto sugiere que esos niveles de aireación son suficientemente efectivos para la remoción del CO_2 . Debido a que no disminuyen el contenido de

humedad del lecho y permiten obtener una alta producción de conidios, se decidió utilizar la tasa de aireación de 0.1 y 0.66 L/Kgmh min para los BCh y los BCE en los próximos estudios.

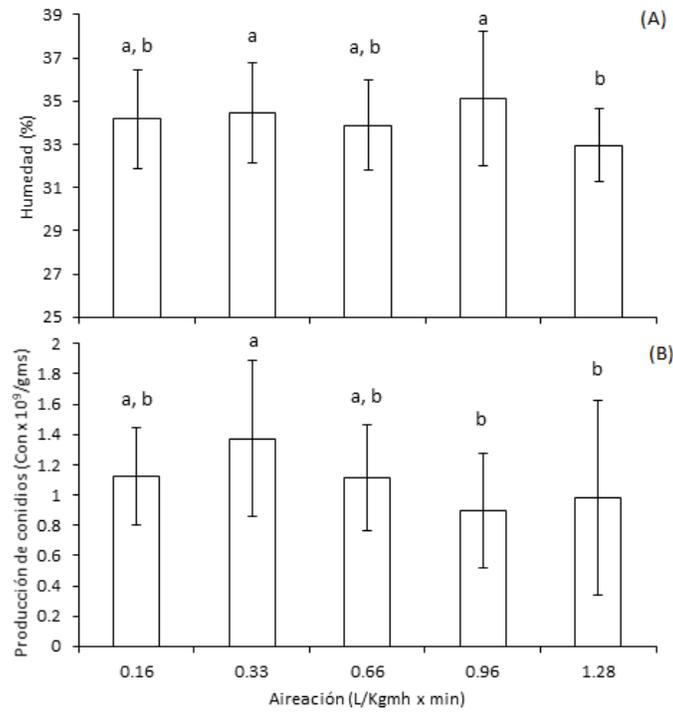


Figura 13. Humedad final del sustrato (A) y producción de conidios (B) en biorreactores de columna empacada con diferente tasa de aireación.

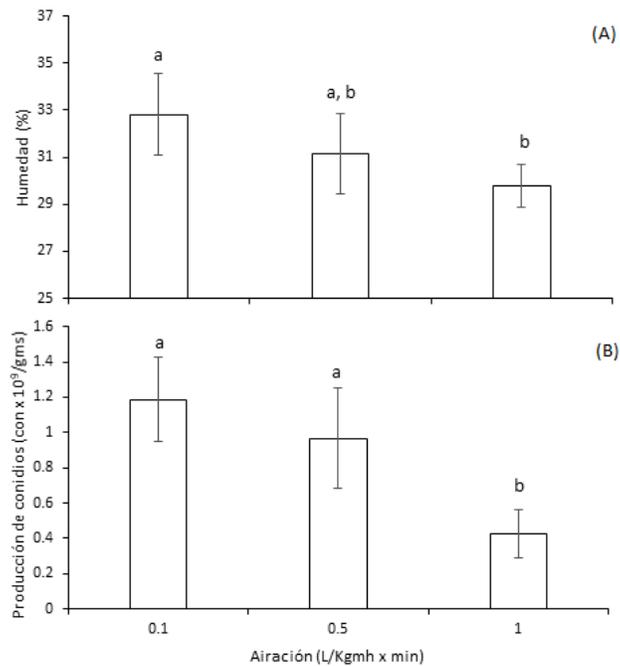


Figura 14. Humedad final del sustrato (A) y producción de conidios (B) en biorreactores de charolas con diferente tasa de aireación

10.1.2. Cinética de producción de conidios en biorreactores de bolsa, charola y columna

Los resultados mostrados en el apartado 10.1.1. muestran que es viable producir conidios de *M. robertsii* en BCE y BCh suministrando bajas tasas de aireación (0.1 y 0.66 L/kgmh min para BCh y BCE, respectivamente); además, se observó que el tiempo de cultivo (para producir de 1×10^9 conidios/gms) es dependiente del tipo de biorreactor y su mecanismo de aireación. Por ello, adicionalmente a las condiciones de operación, en cada biorreactor (BB, BCE y BCh) se determinó el tiempo de cultivo por medio de una cinética de esporulación. Durante las primeras 168 h de cultivo en los tres tipos de biorreactores se obtuvieron perfiles similares de producción de conidios; sin embargo, a las 205 h, en los BCE se produjeron hasta 60 % más conidios en comparación a los producidos en BB y BCh (Figura 15). Los valores más altos de producción (1.4×10^9 conidios/gms) y productividad (1.6×10^8 conidios/gms d) de conidios se obtuvieron en el BCE. La productividad obtenida en BCE fue superior 2.3 y 2 veces a la obtenida en los BCh y BB, respectivamente (Figura 16). El pH durante el proceso de cultivo en los tres tipos de biorreactor permaneció constante cerca de la neutralidad (6.8 ± 0.4). En los BCE, BCh y BB existen diferentes mecanismos de aireación: convección forzada (Ashley et al., 1999; da Cunha et al., 2020; Lopes-Perez et al., 2021), difusión-convección natural (Durand, 2003; Raghava Rao et al., 1993) y difusión (Abalone et al., 2011), respectivamente. En los BCE se obtuvo mayor producción y productividad de conidios; lo cual, podría deberse a que la convección forzada garantiza una atmósfera rica en O_2 , lo que contribuye a un mejor crecimiento de la biomasa y esporulación del microorganismo (García-Ortiz et al., 2015; Tlecuítl-Beristain et al., 2010). La producción de conidios de *M. robertsii* obtenida en los BCE es similar a la obtenida con otras cepas de *Metarhizium*; lo cual, refleja el potencial de producción en este tipo de biorreactor (Dorta and Arcas, 1998; Méndez-González et al., 2018b; Van Breukelen et al., 2011). La máxima producción de conidios en BCE, BB y BCh se alcanzó a los 8.5, 11 y 13 d de cultivo, respectivamente; por lo que, estos tiempos de proceso serán considerados en la siguiente sección donde se evaluará la calidad de los conidios producidos en los tres tipos de biorreactor.

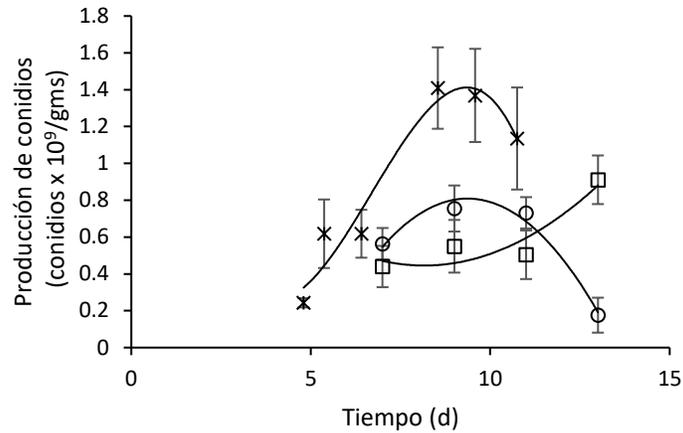


Figura 15. Producción de conidios en biorreactores de columna empacada (equis), charolas (cuadros) y bolsas (círculos).

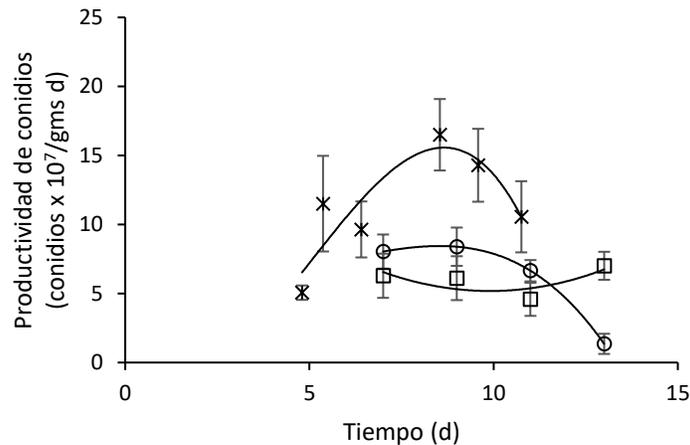


Figura 16. Productividad de conidios en biorreactores de columna empacada (equis), charolas (cuadros) y bolsas (círculos).

10.1.3. Comparación de la calidad de los conidios producidos en biorreactores de bolsa, charola y columna

Una vez que se establecieron las condiciones de operación en los tres tipos de biorreactor (1.1. y 1.2), se evaluó la calidad de los conidios producidos en términos su viabilidad y su capacidad infectiva sobre adultos de *T. molitor*. Los conidios producidos en los BCh mostraron la mayor de viabilidad (64.90 ± 8.54), mientras que los producidos en BB y BCE presentaron mayor efecto sobre la mortalidad de *T. molitor* (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de la fermentación y calidad de los conidios producidos en BCE, BCh y BB.

Biorreactor	Tiempo de fermentación (d)	Humedad final del sustrato (%)	Producción de conidios (conidios×10 ⁹ /gms)	Viabilidad de conidios (%) (96 h)	Mortalidad <i>Tenebrio molitor</i> (%) (17 d)
Columna	7.8	36.2 ± 0.9 ^a	1.6 ± 0.25 ^a	40.6 ± 5.6 ^c	33 ± 2.1 ^{a, b}
Charola	13.2	28.8 ± 0.7 ^b	0.9 ± 0.20 ^b	64.9 ± 8.5 ^a	33 ± 0.7 ^b
Bolsa	10.3	34.2 ± 2.4 ^a	1.1 ± 0.23 ^b	51.1 ± 10.5 ^b	40 ± 1.4 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

Los conidios producidos en los BCh presentaron mayor porcentaje de viabilidad en comparación a los producidos en BCE y BB; sin embargo, la máxima productividad de conidios viables se alcanzó en los BCE (8.2 conidios viables × 10⁷/gms d); la cual, fue 1.8 (4.6 conidios viables × 10⁷/gms d) y 1.5 (5.4 conidios viables × 10⁷/gms d) veces mayor a la obtenida en los BCh y los BB, respectivamente. El porcentaje de viabilidad de los conidios obtenido los BCh, BB y BCE es similar al presentado por Méndez-González et al. (2018) para conidios de *M. anisopliae* (CP-OAX) producidos en BCE y BB (46.67 – 61%). Algunos autores recomiendan un porcentaje de viabilidad de 80% para la formulación de bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos (Jenkins and Goettel, 2011; Miranda-Hernández et al., 2017); por lo que, la viabilidad de los conidios obtenida en este trabajo podría parecer baja. Sin embargo, hay que considerar que, en productos comerciales, la viabilidad reportada es resultante de la medición de la germinación, en lugar del resultado de las UFC de los conidios viables (Ibrahim et al., 2002); por lo que, el parámetro se sobrestima alrededor de un 30% (Alcantara-Vargas et al., 2020).

La mortalidad de *T. molitor* causada por los conidios de *M. robertsii* producidos en los tres tipos de biorreactor (después de 17 d) fue superior al 30%, este valor es similar al 32% ± 2.9 reportado por Robledo-Monterrubio et al. (2009) usando cepas nativas de *Beauveria bassiana* para infectar especímenes adultos de *T. molitor* (usando un bioensayo similar a este trabajo). Los estudios realizados en esta sección demuestran que, la convección forzada permite obtener la mayor productividad de conidios infectivos de *M. robertsii*, por lo que, entre los biorreactores analizados, se selecciona al BCE para los estudios posteriores.

10.2. Estudios cinéticos en biorreactores de columna empacada

La columna empacada presenta la posibilidad de medir la composición de la corriente gaseosa de salida del biorreactor. Este análisis permite monitorear el estado del cultivo durante la fermentación

y, en hongos entomopatógenos, ha servido como parámetro de control de proceso en la producción de conidios (Méndez-González et al., 2018b). Por lo que, en esta sección se presenta el análisis de los datos de consumo de O_2 y producción de CO_2 en el cultivo de *M. robertsii* en biorreactores isotérmicos de columna empacada y, la relación entre la producción de CO_2 y la producción de conidios. Para ello, se consideraron las condiciones de proceso determinadas en la sección anterior (9.1).

10.2.1. Análisis respirométrico del cultivo de *Metarhizium robertsii* en biorreactores de columna empacada de escala laboratorio

Durante el cultivo de *M. robertsii* en BCE (~30 gms) aireadas con 0.66 L/kgms min se midió el contenido de O_2 y CO_2 en la corriente gaseosa de salida del biorreactor durante 165 h. A las 100 h de cultivo se alcanzaron las tasas máximas de consumo de O_2 y producción de CO_2 ; las cuales, alcanzaron valores de 0.23 y 0.35 mg/gmsi h, respectivamente (Figura 17).

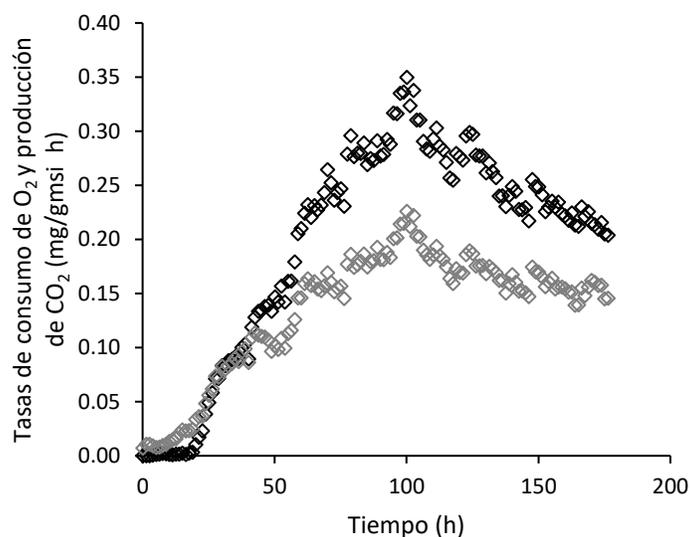


Figura 17. Perfil cinético de las tasas de consumo de O_2 y producción de CO_2 . Rombos grises representan la tasa de consumo de O_2 y los rombos negros la producción de CO_2 .

Al final del cultivo, se registró un consumo total de oxígeno de 23.81 mg/gmsi y una producción de CO_2 de 34.52 mg/gmsi (Figura 18). Los datos experimentales de producción de CO_2 se ajustaron al modelo logístico (Ecuación 1), con el cual, se estimó un valor de $0.039 h^{-1}$ para la tasa específica de

producción de CO_2 (μ) y se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.997 (Tabla 8). A partir de los parámetros del modelo estimados con el modelo logístico (CO_{20} , $\text{CO}_{2\text{max}}$ y μ) (Tabla 8), se realizó el ajuste matemático de los datos de consumo de O_2 (Ecuación 2); con el cual, se obtuvo un $R^2 = 0.993$ y se estimó un consumo global de O_2 de 22.05 mg/gmsi (Tabla 8). El valor de consumo global de O_2 que se obtuvo por el modelo es similar al obtenido con datos experimentales (23.81 mg/gmsi). La fase exponencial del cultivo se presentó entre las 36 y 67 h de proceso (Figura 19), con el logaritmo de los datos obtenidos de la producción de CO_2 , en esa fase del cultivo determinó que el tiempo *Lag*; el cual, tuvo una duración de 36.89 h (Figura 20). Además, durante la fase exponencial el coeficiente respiratorio alcanzó valores mayores a 1 (~48.8 h). A partir de ese momento, se registraron valores del coeficiente respiratorio ≥ 1 durante todo el cultivo (Figura 21).

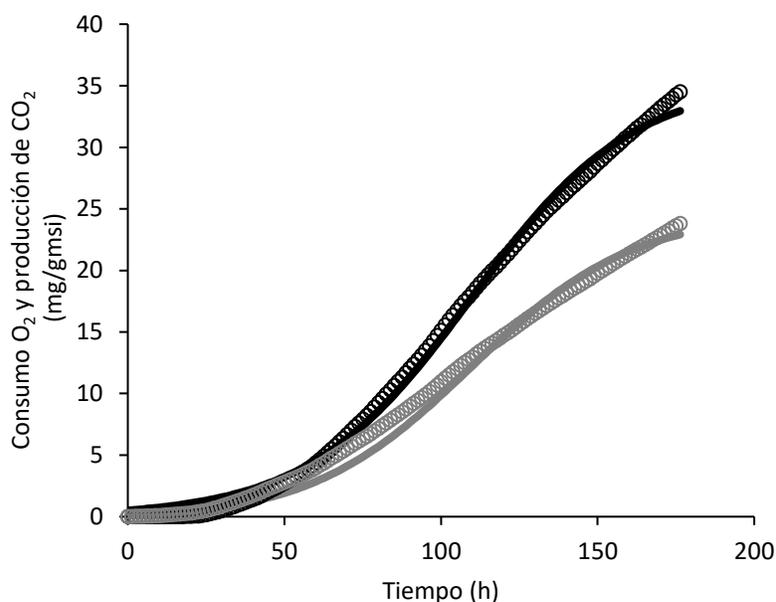


Figura 18. Perfil cinético del consumo de O_2 y producción de CO_2 . Círculos representan los datos experimentales de consumo de O_2 (grises) y producción de CO_2 (negros). Líneas continuas representan los perfiles de consumo de O_2 (gris) y producción de CO_2 (negra) estimados con los modelos de Soto-Cruz y logístico, respectivamente.

Diversos autores han medido la producción de CO_2 durante el cultivo de *M. anisopliae* en BCE aireados por convección forzada (Dorta et al., 1996; Méndez-González et al., 2018b; Van Breukelen et al., 2011) y BCh (da Cunha et al., 2019); similar a este trabajo, la máxima tasa de producción de CO_2 se obtiene alrededor de las 100 h de cultivo. Por lo que, en biorreactores estáticos, este parámetro podría ser asociado al tipo de microorganismo (hongos del género *Metarhizium*) y al

mecanismo de aireación. Además, bajo condiciones similares de cultivo (inóculo, tipo de biorreactor, aireación, humedad inicial del sustrato y temperatura), los valores obtenidos para la máxima tasa de producción de CO₂ (0.35 mg/gmsi h) y la producción global de CO₂ (34.52 mg/gmsi) para *M. robertsii* son similares a los reportados en cultivos de *M. anisopliae* (0.30 mg/gmsi h y 35.39 mg/gmsi, respectivamente) (Méndez-González et al., 2018b). El valor de la máxima tasa de producción de CO₂ es hasta 55 veces menor que la reportada para *Aspergillus niger* (~20 mg/gmsi h) (Figueroa-Montero et al., 2011; Saucedo-Castañeda et al., 1994); lo cual, representa una ventaja, debido a que suministrando hasta 2.5 veces menos aireación se puede mantener una atmósfera gaseosa con un contenido de CO₂ <2%, garantizando condiciones aerobias. A partir de los datos de producción de CO₂ se estimó el t_{lag} (36.89 h), el cual está dentro del rango reportado para otras especies de *Metarhizium* (25 – 55 h) (Loera-Corral et al., 2016; Méndez-González et al., 2018b). Se sabe que la producción de conidios de hongos del género *Metarhizium* es un proceso aerobio (Jaronski and Mascarin, 2017) que favorece la producción de biomasa (Dorta et al., 1996); lo anterior, se demostró al obtener valores del coeficiente respiratorio ~1 durante el cultivo (Manan and Webb, 2020; Torres-Mancera et al., 2018).

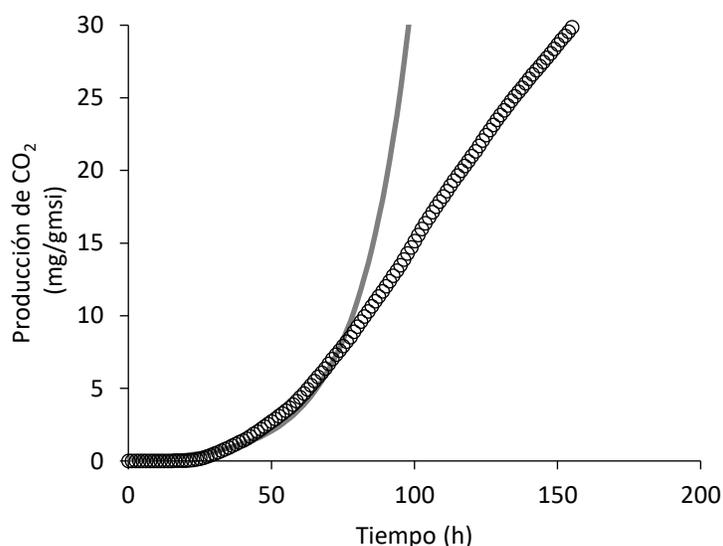


Figura 19. Ajuste de la producción global de CO₂ con el modelo exponencial. Los círculos representan la producción global de CO₂ y la línea gris representa los datos obtenidos por el modelo exponencial.

Los valores obtenidos para el coeficiente respiratorio durante el cultivo (≥ 1) (Figura 21) indican que la fracción de energía en el sustrato orgánico convertida a biomasa es ≤ 0.7 y que la producción de calor en el cultivo es de 903 kJ/mol_{CO2} (Erickson et al., 1978). Por lo que, la generación de calor del cultivo es ~ 708 kJ/kgmsi. Esta baja generación de calor, en comparación de otros procesos microbianos en cultivo sólido ($>10\ 000$ kJ/kgmsi) (Saucedo-Castañeda et al., 1990), representa alentadoras perspectivas para el aumento de escala del biorreactor debido a que, podría ser más sencillo mantener la temperatura en un rango favorable para *M. robertsii* (30-32 °C) (Méndez-González et al., 2020). Otro uso relevante para la medición de CO₂ durante el cultivo de *M. robertsii* es la posibilidad de implementarlo como un parámetro de control de proceso al relacionarlo con la producción de conidios; lo cual, se estudiará en la siguiente sección.

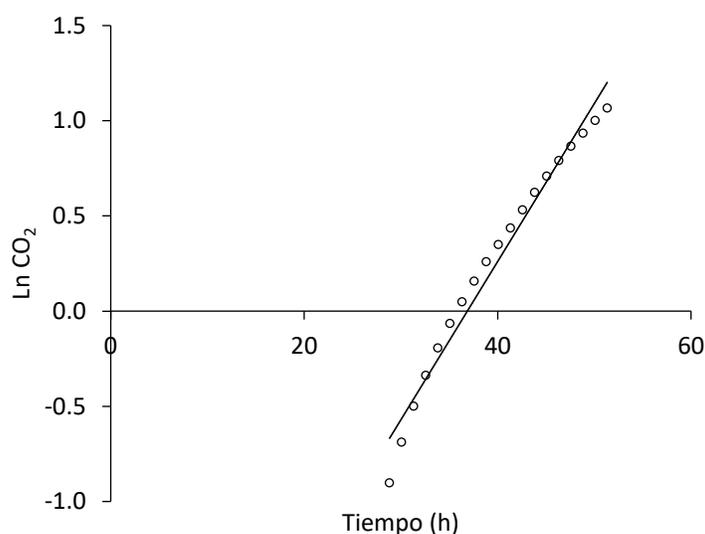


Figura 20. Estimación de la fase Lag. Círculos negros representan los datos experimentales y la línea continua representa la regresión lineal de los datos experimentales.

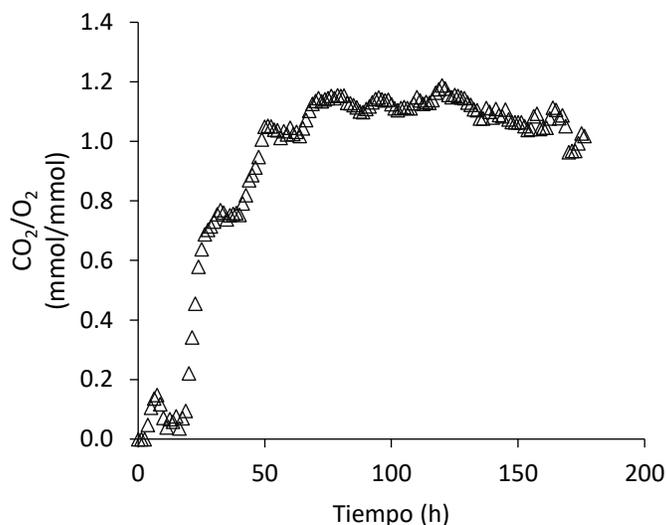


Figura 21. Perfil cinético del coeficiente respiratorio (CO_2/O_2).

Tabla 8. Parámetros estimados usando los modelos matemáticos

Modelo exponencial	Modelo logístico	Modelo de Soto-Cruz
$\mu = 0.056/h$	$\mu = 0.039/h$	$Y_{CO_2/O_2} = 1.4 \text{ mg}_{CO_2}/\text{mg}_{O_2}$
$CO_{20} = 0.127 \text{ mg/gmsi}$	$CO_{20} = 0.51 \text{ mg/gmsi}$	$m_{O_2} = 3 \times 10^{-5} \text{ mg}_{O_2}/\text{mg}_{CO_2} \text{ h}$
	$CO_{2max} = 35.43 \text{ mg/gmsi}$	$O_{2max} = 22.36 \text{ mg/gmsi}$
$R^2 = 0.988$	$R^2 = 0.997$	$R^2 = 0.993$

10.2.2. Cinética de producción de conidios y CO_2

La tasa de producción de CO_2 se ha utilizado como una herramienta para determinar el tiempo de cosecha de conidios de hongos entomopatógenos (Méndez-González et al., 2018b). Por ello, para determinar el tiempo de cosecha de los conidios de *M. robertsii*, se realizó un estudio cinético de producción de conidios y CO_2 en el cultivo; en el cual, se determinó la concentración de conidios en BCE cuando la máxima tasa de producción de CO_2 disminuye 30, 40, 50, 60 y 70% (Figura 22). La tasa máxima de producción de CO_2 del cultivo se registró a las 103 h (0.33 mg/gmsi h) (similar a la sección anterior). La máxima producción de conidios (1.4×10^9 conidios/gms) se alcanzó cuando la tasa de producción de CO_2 disminuye en 50 % con respecto a su valor máximo (~ 190 h). Valores similares de producción de conidios se obtuvieron al disminuir la tasa de producción de CO_2 60 y 70% (1.37×10^9 y 1.14×10^9 conidios/gms, respectivamente). Sin embargo, manteniendo el criterio de cosechar

cuando la tasa de producción de CO₂ disminuye 50% (con respecto a la máxima), la productividad de conidios es hasta 1.9 veces mayor que la obtenida en lotes industriales de *M. anisopliae* en BB (~ 8.7 conidios × 10⁷/gms d) (Cherry et al., 1999).

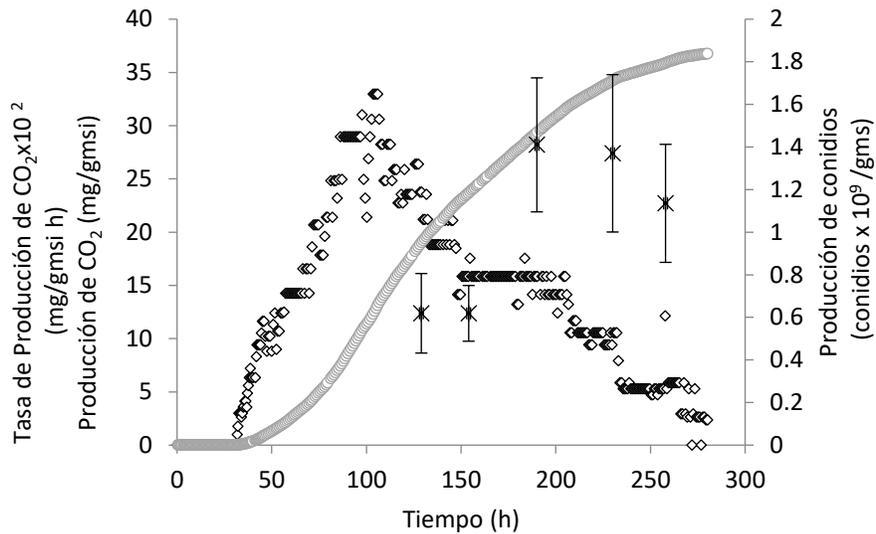


Figura 22. Cinética de producción de conidios y CO₂. Los rombos representan la tasa de producción de CO₂, los círculos la producción global de CO₂ y los asteriscos la producción de conidios.

El BCE permite realizar un proceso controlado con una alta producción y productividad de conidios infectivos. Además, la aireación por convección forzada inherente a este tipo de biorreactor es un mecanismo adecuado para el suministro de O₂ y, la remoción del CO₂ y calor generado por *M. robertsii*. Además, las bajas tasas de producción y calor presentadas por el cultivo de *M. robertsii* podrían facilitar el aumento de dimensiones del biorreactor, lo que, será estudiado en la próxima sección.

10.3. Efecto del aumento de la altura y diámetro del biorreactor sobre el cultivo de *M. robertsii*

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en biorreactores de escala banco y piloto; en los cuales, se determinaron propiedades del biorreactor como material de fabricación, altura y diámetro y, además, se evaluaron estrategias para evitar la contracción y aglomeración de las

partículas del lecho, como la agitación mecánica y la adición de empaques esféricos y, con ello, mejorar las condiciones de cultivo para *M. robertsii*.

10.3.1. Efecto del material de fabricación del biorreactor sobre el cultivo de *M. robertsii*

En la sección anterior (9.2) se demostró que el proceso de conidios de *M. robertsii* presenta bajos niveles de producción de CO₂ y calor metabólico en comparación a otros procesos microbianos aerobios. Por lo cual, se ha considerado que existen buenas perspectivas de aumentar las dimensiones del BCE para este proceso. Para evaluar el efecto del aumento dimensional del BCE se utilizaron biorreactores de 10 cm de diámetro interno y 20 cm de altura de lecho (operados bajo los parámetros determinados en secciones anteriores). Además, con el objetivo de seleccionar un material de fabricación para los BCE que facilite la experimentación en las etapas posteriores, se ocuparon BCE fabricados con vidrio (CV), acero inoxidable (CA) y PVC (CP). Adicionalmente, se incluyeron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno (CVE) como tratamiento testigo. Durante el cultivo se monitoreo la producción de CO₂ y la temperatura. Al final del cultivo, se cuantificó la humedad del sustrato y los conidios producidos. Ambas mediciones, se realizaron en los CV, CA y CP en tres sectores de 8 cm del lecho de cultivo (bajo, medio y alto; B, M y A, respectivamente).

En todos los biorreactores la tasa máxima de producción de CO₂ se alcanzó cerca de las 92 h de cultivo. Sin embargo, en CVE la tasa de producción de CO₂ (0.40 mg/gmsi h) y la producción global de CO₂ (48.28 mg/gmsi) fueron hasta 1.3 y 1.7 veces (respectivamente) mayores a las registradas en CV (0.23 mg/gmsi h y 29.31 mg/gmsi), CA (0.25 mg/gmsi h y 33.74 mg/gmsi) y CP (0.21 mg/gmsi h y 27.51 mg/gmsi) (Figuras 23 y 24). Durante el cultivo, se midió la temperatura en diferentes alturas del lecho de cultivo (3, 8, 13 y 18 cm; T1, T2, T3 y T4, respectivamente) en los biorreactores CV y CA (Figura 25). A partir de ~81 h de cultivo, se observó un aumento de la temperatura en diferentes regiones de los biorreactores; el cual, alcanzó valores máximos ~94 h (32.06 y 32 °C, CV y CA, respectivamente). Los valores máximos de temperatura se obtuvieron en la parte superior de la columna (T4). En ese momento, en la mayor parte del lecho (desde T2 hasta T4), se obtuvieron gradientes de temperatura con respecto a la T_{amb} de 0.63 hasta 1.44 °C para CV y de 0.5 hasta 1.38 para CA. En gran parte del tiempo de proceso, en la región de T2 (en CV y CA) se registraron temperaturas menores a T_{amb} (hasta 0.5 °C menos).

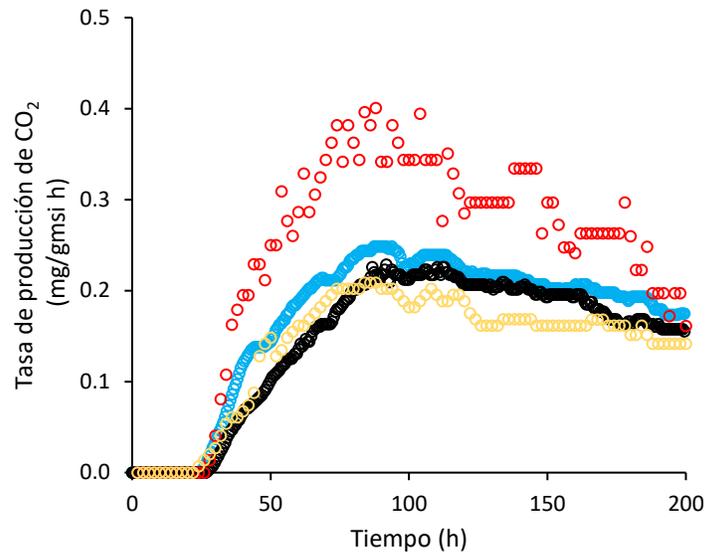


Figura 23. Tasa de producción de CO₂ en biorreactores de columna empacada de diferentes materiales. Círculos rojos representan a columna de vidrio de 2 cm de diámetro, negras a columnas de vidrio de 10 cm de diámetro, azules a columnas de acero inoxidable de 10 cm de diámetro y amarillos a columna de polivinil carbonato de 10 cm de diámetro.

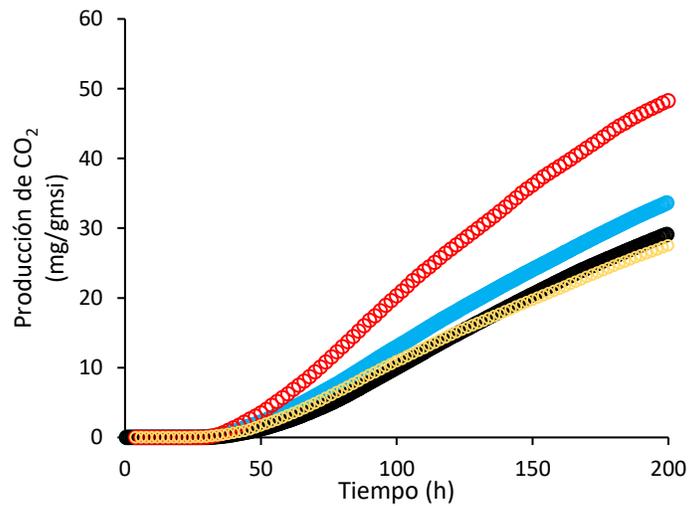


Figura 24. Producción global de CO₂ en biorreactores de columna empacada de diferentes materiales. Círculos rojos representan a columna de vidrio de 2 cm de diámetro, negras a columnas de vidrio de 10 cm de diámetro, azules a columnas de acero inoxidable de 10 cm de diámetro y cuadros amarillos a columna de polivinil carbonato de 10 cm de diámetro.

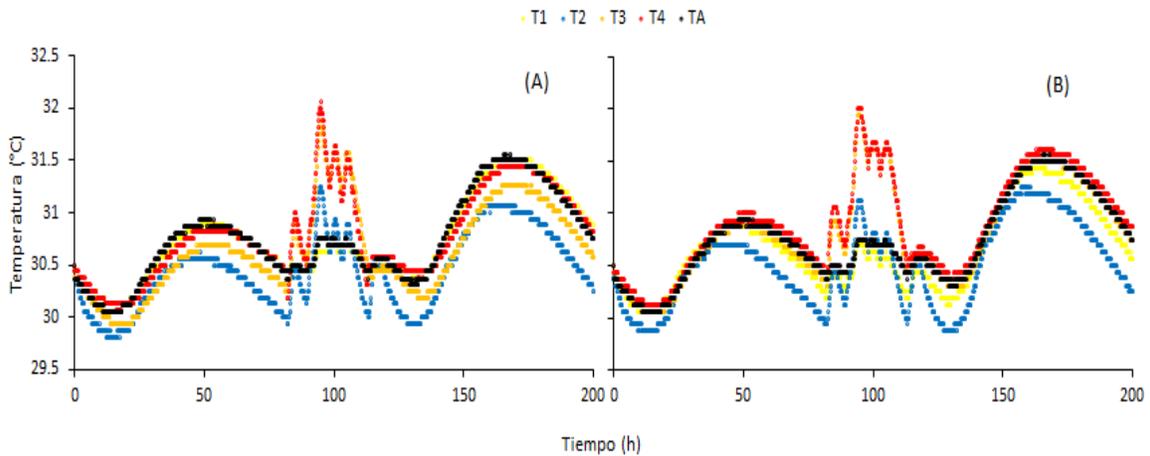


Figura 25. Cinética de temperatura en biorreactores de columna empacada de 10 cm de diámetro fabricados en vidrio (A) y acero inoxidable (B).

Al final del cultivo, el promedio del contenido de humedad de los lechos de cultivo en todas las unidades experimentales presentó valores similares entre ellas y superiores en comparación a los iniciales (30 %) (Figura 26B). En los biorreactores de CV, CA y CP, se observó que la humedad es mayor en la parte alta del lecho (Figura 26A). De forma similar al contenido de humedad, en esos biorreactores se observó que la producción de conidios asciende en relación con la altura del lecho (Figura 26C). En términos globales, en todos los biorreactores de $D_{in} = 10$ cm se obtuvo una producción promedio de conidios $\sim 1 \times 10^9$ conidios/gms; sin embargo, los rendimientos de producción son menores (hasta 30 %) en comparación con los producidos en CVE (Figura 26D).

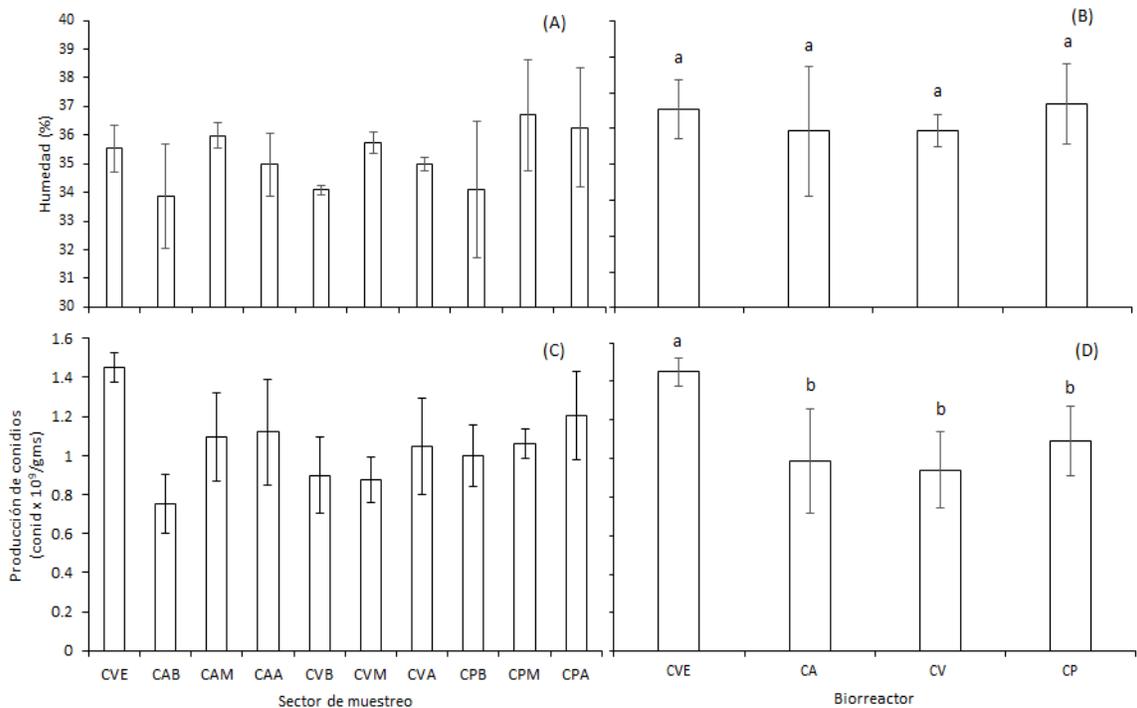


Figura 26. Comparación de la humedad y producción de conidios en biorreactores de 2 y 10 cm de diámetro interno. A y C, corresponden a valores sectoriales (bajo, medio y alto de la columna), representadas por las letras A, M y A después de cada nomenclatura del biorreactor y, B y D a valores promedio. Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

La producción de CO₂ y conidios en los biorreactores de CV, CA y CP fue significativamente menor que el obtenido en los CVE; lo cual, podría indicar que las condiciones de cultivo generadas en los biorreactores de D_{in} = 10 cm son desfavorables para el crecimiento del microorganismo (da Cunha et al., 2020). Sin embargo, la temperatura máxima alcanzada en esos biorreactores (~32 °C) es favorable para el crecimiento y esporulación de *M. robertsii* (Méndez-González et al., 2020). Lo anterior, se comprobó al obtener la máxima producción de conidios en la parte alta de los biorreactores. En contraste, la menor producción de conidios se obtuvo en la parte baja de los biorreactores, en esa sección existe menor contenido de humedad; sin embargo, éste no presenta valores críticos ($\leq 22.34\%$) (Bhanu-Prakash et al., 2008). Por lo que, podríamos considerar que ambas propiedades (temperatura y humedad) no afectaron el desarrollo del cultivo ni la producción de conidios. Al desempacar los biorreactores, visualmente, se percibió que los lechos de cultivo en CV, CA y CP son más densos que los obtenidos en las CVE, lo cual, podría estar afectando al microorganismo (da Cunha et al., 2020), ya que, el aumento de la densidad del empaque dificulta el transporte de oxígeno (Casciadori et al., 2014) y limita el espacio para la formación de los

conidióforos (Dorta and Arcas, 1998). Para comprobarlo, el cambio de la densidad del empaque en función de la altura y radio del biorreactor será estudiado en una sección posterior del documento.

Un resultado que resalta en términos de la producción de conidios en los biorreactores CV, CA y CP es que ésta aumenta con la altura de la columna. Al ser 30 °C la temperatura óptima para la esporulación de *M. robertsii* (Méndez-González et al., 2020), se pensaría que la máxima producción de conidios debió registrarse en otra sección del biorreactor. Lo anterior podría deberse a que, a medida que la corriente gaseosa recorre el lecho de cultivo, la concentración de CO₂ aumenta (Saucedo-Castañeda et al., 1992) y, ese aumento estimula la expresión de genes reguladores de la proteína G (Mitchell, 2005); la cual, se asocia con la reproducción celular (Hall et al., 2010) y la producción de conidios (Rodríguez-Gomez et al., 2015).

Los diferentes materiales de fabricación de los biorreactores CV, CA y CP presentan una drástica diferencia en términos de conductividad calorífica (1.16, 46 y 0.25 W/m k, respectivamente); sin embargo, en los tres materiales se obtienen rendimientos similares de producción de CO₂ y conidios. Por lo que, se considera que los mecanismos de remoción de calor por evaporación y convección forzada son suficientemente eficientes para el control de temperatura en el lecho (Sangsurasak and Mitchell, 1998) y que es posible utilizar biorreactores de PVC sin disminuir significativamente la remoción de calor. Además, el bajo costo de los biorreactores fabricados con PVC permitirá fabricar unidades experimentales de diferentes dimensiones que puedan ser utilizados en experimentos posteriores para determinar la altura y diámetro de BCE.

10.3.2. Estimación de la altura de operación del biorreactor

En la sección anterior se seleccionó al PVC para fabricar las unidades experimentales. A la vez, se observó que la temperatura aumenta en función de la altura del biorreactor. Por lo que, en esta sección, se determinará el efecto de la altura del biorreactor sobre la producción de CO₂ y conidios. Para ello, se estimarán las propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo, los flujos de calor en el sistema y el perfil de temperatura dentro de la columna (por software), utilizando datos provenientes del cultivo de *M. robertsii* en un BCE (fabricado con PVC) de 70 cm de altura.

10.3.2.1. Determinación de propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo

A partir de la composición química del arroz publicada por la USDA, se estimó que su composición elemental (C-mol) es CH_{1.99}O_{0.95}N_{0.02}. A partir de esa composición elemental y de mediciones físicas

realizadas a los granos de arroz húmedos y al lecho de cultivo se determinaron las propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo (Tabla 9); necesarias para la validación del modelo de transferencia de calor (Ecuación 12). La composición elemental de los granos de arroz obtenida en este trabajo es similar a la obtenida por métodos analíticos ($\text{CH}_{2.03}\text{O}_{0.67}\text{N}_{0.05}$) (Dorta et al., 1996, 1990). De igual forma, los parámetros C_{pb} , ρ_r , k_r y ε son similares a los valores reportados por da Cunha et al. (2019) (2.17 kJ/kg K, 1.19 g/cm³, 0.31 W/m K y 0.46, respectivamente). La correspondencia de los datos estimados en esta sección con los reportados en la literatura sugiere que son válidos y susceptibles de utilizarse para la validación del modelo.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas del lecho de cultivo.

Propiedad	Magnitud	Unidades
Capacidad calorífica (C_{pb})	2.25	kJ/kg K
Densidad de los granos de arroz (ρ_r)	1.35	g/cm ³
Conductividad calorífica de los granos de arroz (k_r)	0.50	W/m K
Densidad del lecho (ρ_b)	0.79	g/cm ³
Fracción vacía del lecho de cultivo (ε)	0.41	Adimensional
Conductividad calorífica del lecho de cultivo (k_b)	0.31	W/m K
Longitud de las partículas	0.7	cm
Diámetro de las partículas	0.16	cm
Superficie específica de la partícula (a_{part})	27.85	1/cm
Área superficial de las partículas por volumen unitario de lecho (a)	16.35	1/cm

10.3.2.2. Cultivo de *M. robertsii* en biorreactor columna empacada de escala piloto

Una vez obtenidas las propiedades fisicoquímicas del lecho, se realizó el cultivo de *M. robertsii* en un BCE con un lecho de 10 cm de diámetro y 70 cm de altura (5.4 kgmh de capacidad). Durante el cultivo, se midió la producción de CO₂ y consumo de O₂, la temperatura y humedad del aire (a la entrada y salida del biorreactor) y la temperatura del lecho de cultivo en 5 puntos axiales. Las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ se obtuvieron ~70 h de cultivo y alcanzaron valores de 1.22 y 0.92 mg/gmsi h, respectivamente. Durante el cultivo, se obtuvo una producción total de

CO₂ de 134.91 mg/gmsi, un consumo de O₂ de 103.91 mg/gmsi y, se registró un coeficiente respiratorio (CO₂/O₂) con un valor ~1 a partir de las 14 h de cultivo (Figura 27).

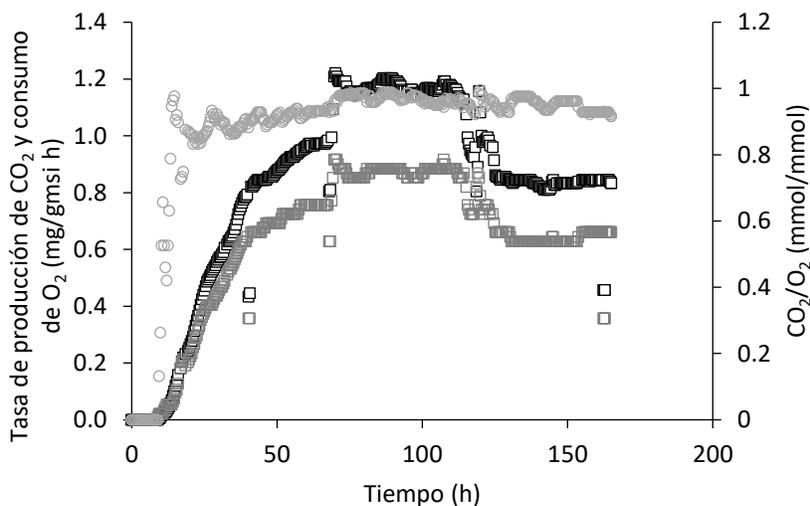


Figura 27. Cinética de la tasa de consumo de O₂ (cuadros grises), tasa de producción de CO₂ (cuadros negros) y coeficiente respiratorio (círculos grises) del cultivo en el biorreactor de columna empacada de escala piloto.

Durante el cultivo se monitoreó la humedad y temperatura de la corriente gaseosa de entrada y salida del biorreactor. Se registró un valor promedio de la humedad inicial del aire de 82.45% y, a partir de las 8 h de cultivo, a la salida del biorreactor se obtuvo un rango de humedad entre 95 y 100%. En la medición de temperatura del aire a la entrada del biorreactor se registró un valor promedio de 28.3 °C y se alcanzó un valor de salida de hasta 31.4 °C. A lo largo del cultivo, se registró un gradiente máximo de temperatura de la corriente gaseosa suministrada al biorreactor de ~3 °C (Figura 28).

La temperatura ambiental promedio durante el proceso fue de 29.8 °C. En el biorreactor se registraron las temperaturas más bajas en los extremos de la columna (T1 y T6, 10 y 60 cm, respectivamente). En el resto de la columna (T2, T3 y T4), se registraron las temperaturas más altas; las cuales, alcanzaron un rango máximo entre 35.2 y 35.5 °C. En T3 y T4 (30 y 40 cm, respectivamente), la máxima temperatura se alcanzó a partir de las 34 h de cultivo, mientras que en T2 (20 cm) se obtuvo a ~90 h (Figura 29).

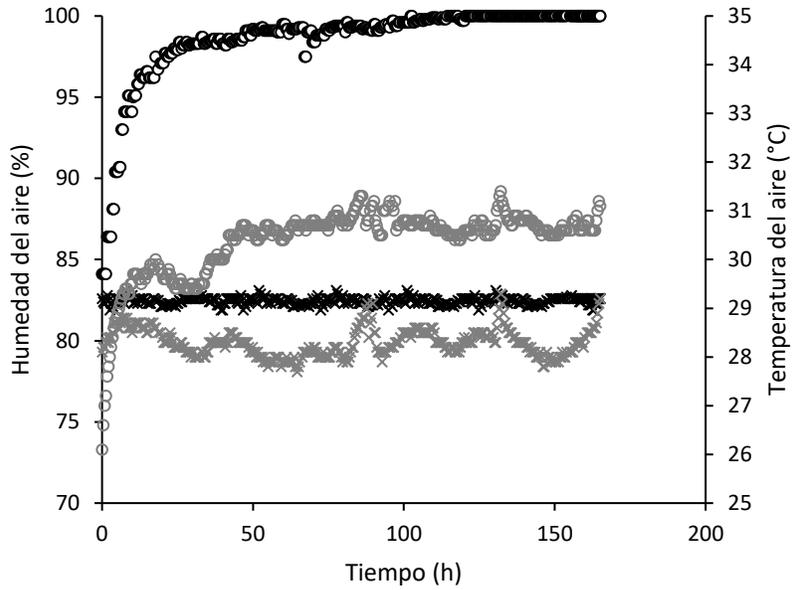


Figura 28. Humedad y temperatura del aire a la entrada y salida del biorreactor. Cruces negras y grises simbolizan la humedad y temperatura del aire a la entrada del biorreactor (respectivamente); círculos negros y grises simbolizan la humedad y temperatura del aire a la salida del biorreactor.

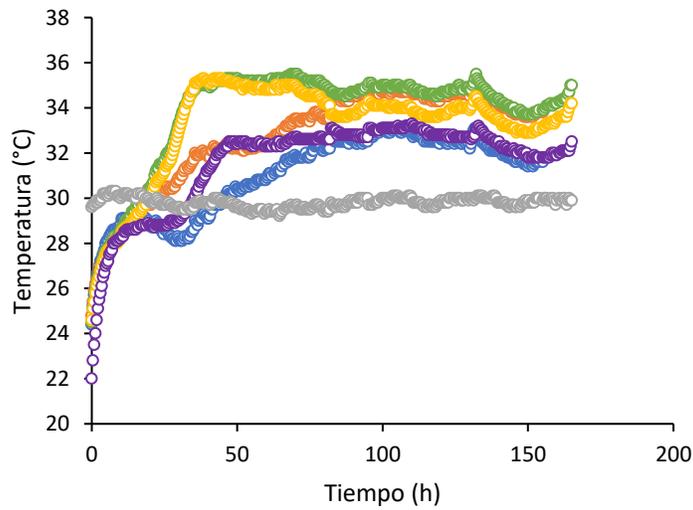


Figura 29. Perfil de temperatura ambiental y en diferentes puntos axiales del biorreactor de columna empacada de escala piloto. Círculos azules, naranjas, verdes, amarillos y morados, simbolizan la temperatura a los 10, 20, 30, 40 y 60 cm de altura, respectivamente. Los círculos grises simbolizan la temperatura ambiental.

Las tasas máximas de consumo de O_2 y producción de CO_2 obtenidas en este cultivo (0.92 y 1.22 mg/gmsi h, respectivamente) son hasta cuatro veces mayores que las obtenidas en un cultivo de *M. robertsii* en condiciones isotérmicas (0.23 y 0.35 mg/gmsi h, respectivamente) (ver sección 10.2.1).

Lo anterior, indica el desarrollo de al menos otro microorganismo dentro del biorreactor; sin embargo, los datos asociados al transporte de calor de este cultivo son útiles para caracterizar el sistema y, posteriormente, la generación de calor metabólico en este experimento puede reemplazarse por la producción típica de *M. robertsii* para estimar el perfil de temperatura en BCE. Por lo que, los datos obtenidos no fueron descartados. Durante el cultivo, se suministró al biorreactor aire no saturado, esta estrategia se implementó para regular la temperatura del lecho (Sangsurasak and Mitchell, 1998); a consciencia de que, la remoción de calor metabólico por el mecanismo de evaporación podría generar deshidratación en el lecho de cultivo (Casciatori et al., 2016). La disminución del contenido de humedad en el lecho podría ocasionar condiciones adversas para el microorganismo. Sin embargo, durante el cultivo, se removieron ~248 g de agua del lecho de cultivo y, por el proceso de oxidación de la fuente de carbono, se produjeron ~166 g de agua (Ghildyal et al., 1994; Raghavarao et al., 2003); por lo que, el sustrato mantuvo una humedad superior a 28%. Considerando que, en el cultivo, se produjo hasta cuatro veces más agua que en un cultivo axénico de *M. robertsii* (determinado por la producción de CO₂), el lecho podría presentar un contenido final de humedad de hasta 26%; por lo que, el flujo de aire suministrado (0.16 L/kgm^h min) y su contenido de humedad inicial (82.6%), permiten mantener el contenido de humedad en el lecho en un nivel aceptable para el cultivo de *M. robertsii* (>22.34%) (Bhanu-Prakash et al., 2008).

El BCE presentó un perfil de temperatura típico donde la remoción efectiva de calor ocurre en la sección baja de la columna (hasta los 20 o 30 cm de altura) (Casciatori et al., 2016; Lopes-Perez et al., 2019; Saucedo-Castañeda et al., 1994). La temperatura global máxima alcanzada dentro de biorreactor (>33 °C) limita el desarrollo (Ekesi et al., 1999; Hallsworth and Magan, 1999) y la producción de conidios de hongos del género *Metarhizium* (da Cunha et al., 2019; Méndez-González et al., 2020); por lo que, considerando la excesiva generación de calor (por presencia de organismos contaminantes), no se realizó la cuantificación de la producción de conidios. Sin embargo, como ya se mencionó, los datos obtenidos en esta sección se utilizaron para la caracterización del sistema; la cual, se llevará a cabo en la siguiente sección.

10.3.2.3. Estimación de las tasas de flujo de calor

A partir de las mediciones realizadas en el sistema presentadas en la sección 10.3.2.2., se calcularon los flujos de calor correspondientes a la generación de calor (Ecuación 6) y la remoción por los mecanismos de conducción (Ecuación 9), evaporación (Ecuación 10) y convección (Ecuación 11) y, a

partir de ellos, se estimó la tasa de flujo de calor acumulado a lo largo del cultivo (Ecuación 4). La remoción de calor por los mecanismos de conducción (q_r), evaporación (q_{vap}) y convección (q_z) alcanzaron una tasa de flujo máxima de 238, 4080 y 26 377 J/h, respectivamente (Figura 30); las cuales, presentaron un coeficiente de variación de 9.29, 2.80 y 10.25 % (para q_r , q_{vap} y q_z , respectivamente) a partir de las 50 h de cultivo. Alrededor de las 70 h de cultivo, se alcanzó la tasa máxima de flujo de generación de calor (75 287 J/h) y, al final del cultivo, se produjeron $\sim 8.3 \times 10^6$ J. El calor acumulado (estimado como el gradiente entre el calor generado y el removido) alcanzó una tasa de flujo máxima de 52 737 J/h a las 70 h de cultivo y, durante el cultivo, se acumularon en el lecho $\sim 5.1 \times 10^6$ J.

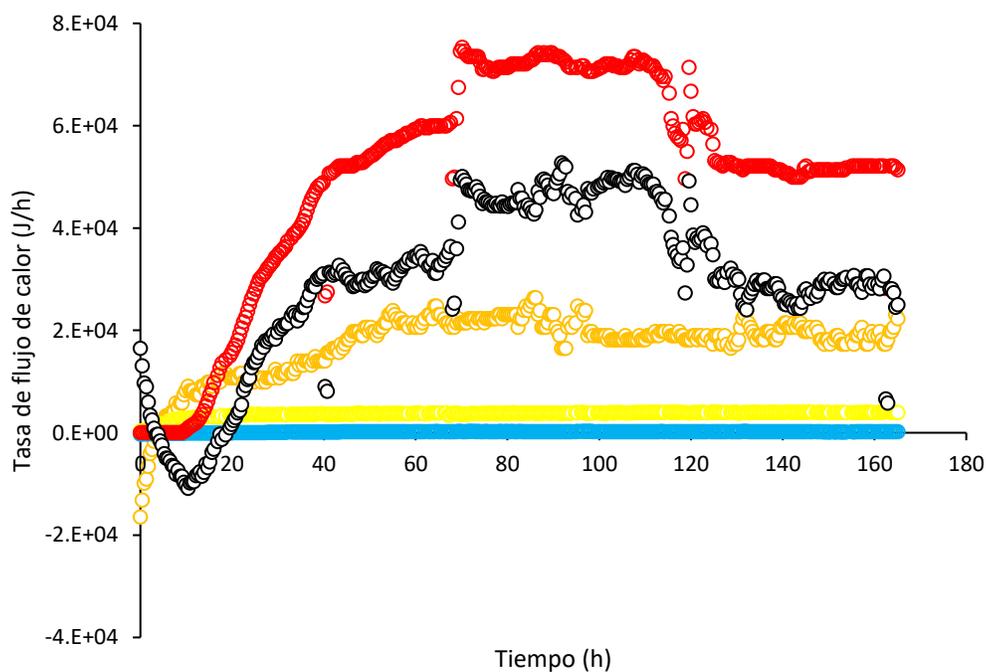


Figura 30. Cinética de las tasas de flujo de calor estimadas en el sistema. Los círculos rojos simbolizan la generación de calor; negros, la acumulación de calor; naranjas, la remoción de calor por convección; amarillos, la remoción de calor por evaporación; azules, la remoción de calor por conducción.

La tasa de flujo de calor acumulado calculada ($q_{acum\ cal}$) a partir de q_r , q_{vap} , q_z y q_{prod} , se comparó con la obtenida partir de las mediciones axiales de temperatura en el lecho de cultivo ($q_{acum\ exp}$) (Ecuación 5) (Figura 31). Y, a partir de los valores de $q_{acum\ cal}$ y $q_{acum\ exp}$, se estimó la temperatura global del lecho durante el cultivo (Figura 32). El valor máximo de $q_{acum\ exp}$ (43 449 J/h) fue 18 % menor al obtenido para $q_{acum\ cal}$ (Figura 31). En la cinética de temperatura global del lecho de cultivo, se

obtuvieron temperaturas máximas de 35.6 y 34.28 °C, respectivamente (Figura 32). Entre los valores de las cinéticas de la tasa de flujo de calor acumulado y temperatura global del lecho de cultivo existe un coeficiente de determinación (R^2) de 0.71.

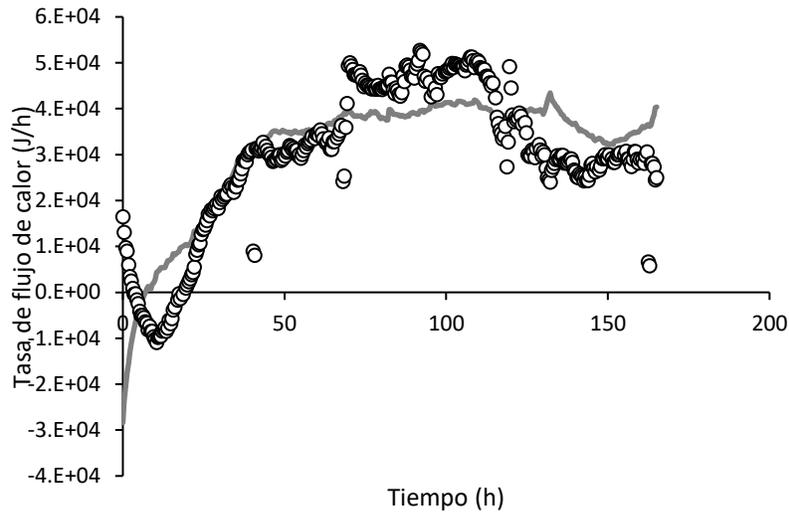


Figura 31. Cinética de tasa de flujo de calor acumulado experimental (círculos negros) y calculado (línea gris) en el biorreactor de columna empacada de escala piloto.

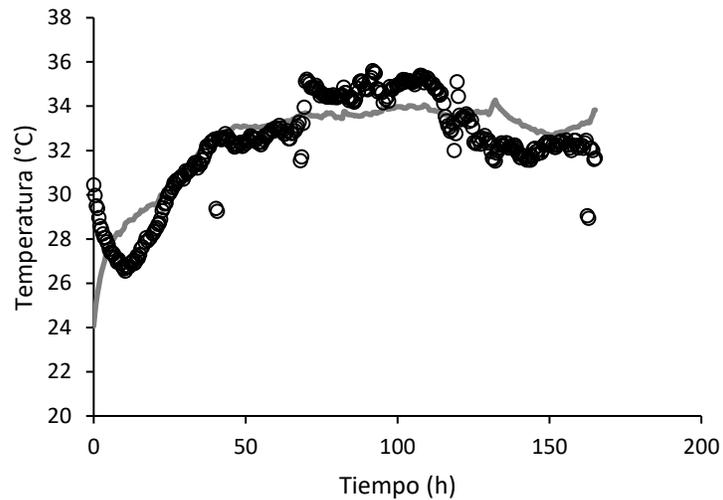


Figura 32. Perfil de temperatura global experimental (círculos negros) y calculada (línea gris) en el biorreactor de columna empacada de escala piloto.

La máxima capacidad de remoción de calor del sistema fue de $\sim 31\,000$ J/h, este valor permaneció constante a partir de las ~ 50 h de cultivo. Sin embargo, la generación de calor supera a la capacidad de remoción a las ~ 20 h (Figura 30), por lo que, a partir de ese momento, se observa un incremento de la temperatura en diferentes zonas del lecho (Figura 29). Para regular la temperatura en el BCE es necesario aumentar el flujo de al menos uno de los mecanismos de remoción de calor (q_r , q_{vap} o q_z). En la sección 10.3.1. se demostró que la remoción de calor por conducción es poco efectiva (en BCE de 10 cm de diámetro), por lo que, solo la remoción de calor por evaporación y por convección podrían ser modificadas. Para ello, se podrían implementar estrategias como incrementar el flujo de aire suministrado (Casciotori et al., 2016; Casciotori and Thoméo, 2018; Chandrasekar et al., 2020; Ghildyal et al., 1994) y/o disminuir su humedad inicial (Raghavarao et al., 2003; Sangsurasak and Mitchell, 1998). En la sección 9.1.1. se determinó que el suministro de aireación puede incrementarse de 0.16 a 0.66 L/kgmh min, sin afectar la producción de conidios, por lo que, en experimentos posteriores se suministrará el máximo flujo de aireación para remover la máxima cantidad de calor. El máximo flujo de acumulación de calor (52 737 J/h) se obtuvo al mismo tiempo que la máxima tasa de producción de CO_2 (~ 70 h) (Figura 27), ya que, en ese momento la generación de calor metabólico alcanza su punto máximo la máxima generación de calor metabólico (Figura 30) (Raghavarao et al., 2003; Saucedo-Castañeda et al., 1990). Los perfiles cinéticos de temperatura global del lecho (Figura 32) muestran entre sí, una correspondencia superior al 70% y un gradiente máximo de temperatura de 1.32 °C. El grado de error presentado es similar e incluso menor que el obtenido con otros métodos de estimación matemática (Casciotori et al., 2016; da Cunha et al., 2019; Fanaei and Vaziri, 2009). Por lo que, tanto la configuración del modelo como la estimación de sus parámetros relacionados (Ecuación 12) son válidos y útiles para la simulación del perfil de temperatura por software.

10.3.2.4. Simulación del perfil de temperatura en el biorreactor de escala piloto

A partir de los datos obtenidos (asociados al modelo, ecuación 12) en las tres secciones anteriores, se realizó la simulación del perfil de temperatura en el BCE con ayuda del software Comsol Multiphysics™ 4.4. La simulación se realizó para el instante en el que el lecho de cultivo alcanzó la máxima temperatura (~ 70 h). Posteriormente, se realizó una segunda simulación considerando la generación de calor (a las 100 h) en un cultivo axénico de *M. robertsii* en un BCE de 10 cm de diámetro (ver sección 10.3.1.). En la primera simulación, se observó que la temperatura del lecho

aumenta hasta 5 °C en los primeros 35 cm de altura y, en los 25 cm restantes, la temperatura alcanza ~36 °C (Figura 33A). En la segunda simulación, el gradiente de temperatura de extremo a extremo del BCE fue de ~4 °C, alcanzado una temperatura de ~34 °C (Figura 33B). En la primera simulación, únicamente en los primeros 18 cm de altura del BCE se registró una temperatura favorable para la esporulación de *M. robertsii* (entre 30 y 33 °C), mientras que, en la segunda simulación con el ajuste de generación de calor, esta zona aumentó hasta los ~30 cm de altura.

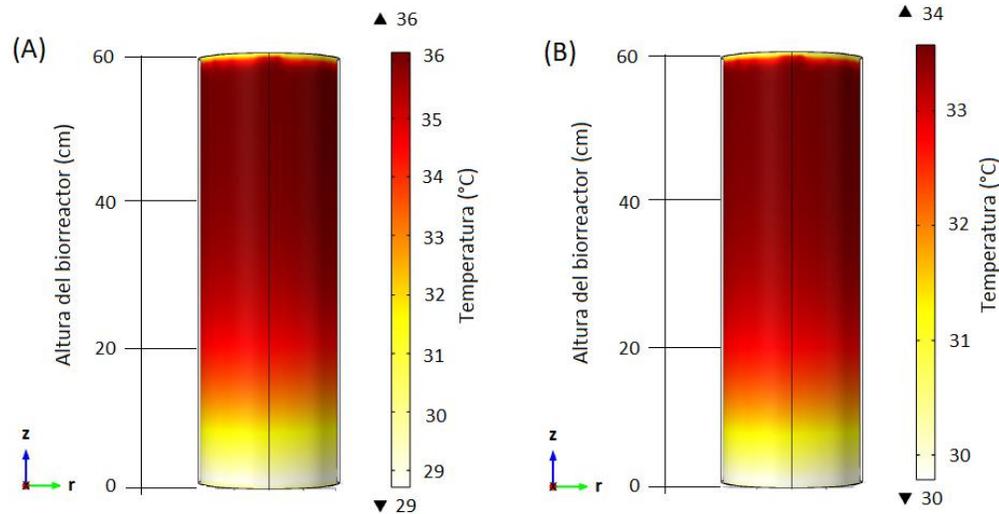


Figura 33. Distribución de la temperatura en el BCE de escala piloto. (A) Basada en los datos experimentales y (B) ajustada a la generación de calor de *M. robertsii*.

Como ya se mencionó, la generación de calor en la primera simulación fue hasta cuatro veces mayor que la utilizada en la segunda simulación (ambas estimadas por la producción de CO₂); sin embargo, el gradiente de la temperatura máxima entre ambas simulaciones fue de ~2 °C. La relación desproporcional entre el calor generado y la temperatura alcanzada es debido a que, la disminución de la generación de calor provoca que el equilibrio térmico entre el aire y el lecho se alcance más fácilmente; lo cual, disminuye la capacidad de remoción de calor por los mecanismos de convección y evaporación. En la segunda simulación (Figura 33B) se estimó que la temperatura óptima para la esporulación de *M. robertsii* (30 – 33 °C), se presenta en los primeros 30 cm de altura de la columna; por lo que, se determinó que 30 cm, es la altura crítica del BCE (bajo las condiciones estudiadas y microorganismo utilizado). Sin embargo, en la simulación, no se consideraron fenómenos que limitan el transporte gaseoso y de calor que ocurren durante el cultivo como el crecimiento del micelio y, la contracción y aglomeración del sustrato; lo cual, podría ocasionar que la temperatura se incremente sobre los 33 °C en algunas zonas de la columna (da Cunha et al., 2020; Manan and

Webb, 2017). En la sección 10.3.1. se mencionó que, al aumentar el diámetro del biorreactor, el lecho sufre compactación; lo que, podría ser una condición que se presenta desde el inicio del cultivo, debido al cambio de coeficientes de fricción y propiedades elásticas de los granos al aumentar las dimensiones del biorreactor y el número de partículas (Augier et al., 2010; Radjai et al., 1998). Por ello, en la siguiente sección, se estudiará el efecto del aumento dimensional del biorreactor sobre la densidad del empaque.

10.3.3. Efecto del aumento de las dimensiones del biorreactor sobre la densidad de empaque

Para determinar la densidad del empaque en función del aumento dimensional del biorreactor (altura y diámetro), se realizó un experimento abiótico; en el cual, se utilizaron columnas empacadas de diferentes diámetros internos (4, 5, 7, 10.1, 15.3 y 19.3 cm), que se aforaron con granos de arroz pretratados a diferentes alturas (10, 15, 20, 25 y 30 cm). Se observó que la densidad de empaque es más sensible al aumento del diámetro que al aumento de la altura (Figura 34). La densidad del empaque en BCE es prácticamente independiente de la altura del lecho de sustrato y presenta dos zonas características en relación del diámetro del BCE: Empaques de baja densidad ($0.56 \pm 0.03 \text{ g/cm}^3$) para BCE de 4 a 7 cm de diámetro y una zona de empaques de alta densidad ($0.84 \pm 0.07 \text{ g/cm}^3$) para BCE con un diámetro entre 10 y 30 cm (Figura 34). Da Cunha et al. (2019), reportó una densidad de empaque de 0.641 g/cm^3 , en lechos de granos de arroz de 6 cm de altura, empacados en charolas de 20 x 40 cm, los cuales, son similares a los obtenidos en columnas con un diámetro interno superior a 7 cm ($0.56 < \rho < 0.84$). El aumento de la densidad de empaque en función del diámetro de la columna (a partir de empaques de $D_{in} > 7 \text{ cm}$) puede deberse al inherente aumento en el número de partículas (Augier et al., 2010).

La densidad de empaque está directamente relacionada con la porosidad del lecho (da Cunha et al., 2020); la cual, disminuye en función del aumento de la distancia entre las partículas del empaque y la pared del biorreactor (Benenati and Brosilow, 1962). Lo anterior, es debido a que las partículas en contacto con la pared generan mayor espacio vacío que aquellas en contacto con otras partículas. De hecho, las capas sucesivas se acomodan de forma aleatoria generando una zona de mínima porosidad y máxima densidad (Mueller, 2010; Ridgway and Tarbuck, 1968). Además, el incremento de partículas modifica los coeficientes de fricción entre los granos, sus propiedades elásticas y las condiciones de contorno (Augier et al., 2010); lo anterior, permite que ocurran fenómenos como la contracción y aglomeración de las partículas durante el cultivo, modificando la estructura del lecho

y cerrando canales para la aireación (Lopes-Perez et al., 2019; Manan and Webb, 2017). El aumento de la densidad del lecho podría tener un efecto negativo en el desarrollo del microorganismo (estimado con la producción de CO_2) y su producción de conidios. Por lo tanto, ese efecto se evaluó en la siguiente sección.

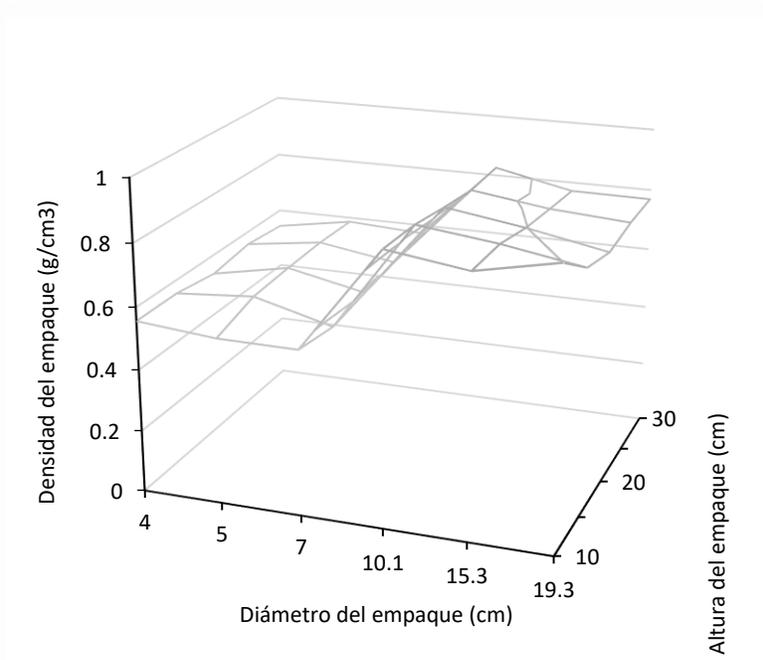


Figura 34. Densidad de empaque en función del diámetro y la altura del biorreactor del empaque.

10.3.4. Efecto del aumento del diámetro del biorreactor sobre el cultivo de *M. robertsii*

Una vez que se estableció una altura para el lecho empacado de 30 cm y se evaluó el efecto de las dimensiones del biorreactor sobre la densidad de empaque, se realizaron cultivos de *M. robertsii* en BCE de diferentes diámetros (2, 4.5, 10.1 y 19.3 cm; BCE₂, BCE₄, BCE₁₀ y BCE₁₉, respectivamente) y, en ellos, se evaluó la producción de CO_2 , el contenido final de humedad del sustrato y la producción de conidios. En la producción de CO_2 se observaron dos diferentes perfiles como función del diámetro del BCE: Diámetros bajos (BCE₂ y BCE₄) se produjo cerca de dos veces más CO_2 que el obtenido en los BCE de mayor diámetro (BCE₁₀ y BCE₁₉) (Figura 35). De manera similar, en los BCE₂ y BCE₄, la máxima tasa de producción de CO_2 fue dos veces más alta que la obtenida en los BCE₁₀ y BCE₁₉ (Figura 36). La pobre producción de CO_2 registrada en lo BCE₁₀ y BCE₁₉ podría deberse a que, al disminuir la porosidad del lecho, se generan condiciones adversas para el crecimiento del microorganismo, ya que, se limita el espacio para el crecimiento del micelio (Dorta and Arcas, 1998;

Sangsurasak and Mitchell, 1998) y se obstaculiza la transferencia de calor y masa (Lopes-Perez et al., 2021) por disminuir el área de transporte.

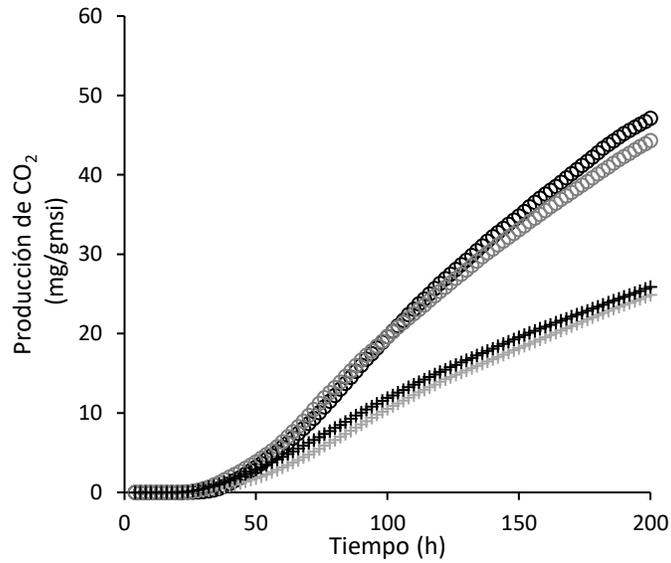


Figura 35. Producción de CO₂ en biorreactores de columna empacada de 2 (círculos negros), 4 (círculos grises), 10 (cruces grises) y 19 (cruces negras) centímetros de diámetro interno.

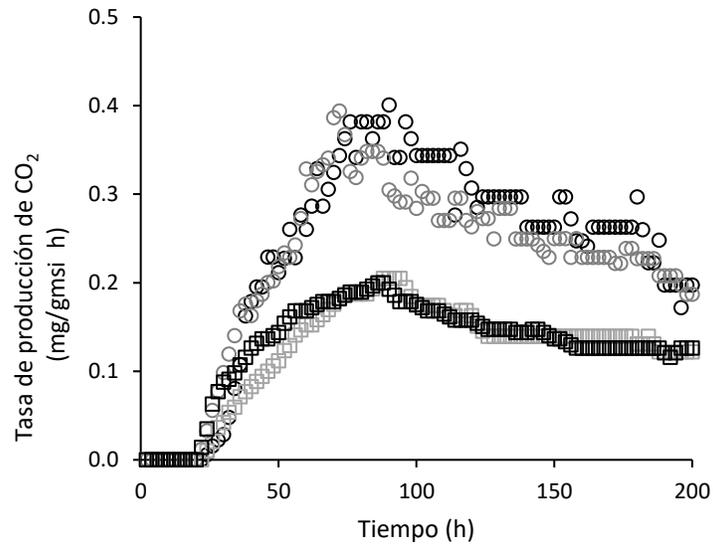


Figura 36. Tasa de producción de CO₂ en biorreactores de columna empacada de 2 (círculos negros), 4 (círculos grises), 10 (cuadros grises) y 19 (Cuadros negros) centímetros de diámetro interno.

El contenido de humedad del sustrato y la producción de conidios obtenida al final del cultivo dependen fuertemente del diámetro del BCE. Ambos parámetros disminuyen en función del aumento del diámetro del BCE (Tabla 10). La disminución de humedad es debido a la remoción de

calor metabólico por medio del mecanismo de evaporación. (Casciadori et al., 2016; Narahara et al., 1984). Por lo que, la acumulación de calor y la reducción de humedad en el lecho podrían ser responsables de la baja producción de conidios en BCE₁₀ y BCE₁₉. Lo anterior, se potencializa con el gradiente radial de humedad observado en esos biorreactores donde el contenido de humedad en la periferia es mayor al observado en la sección central (Figura 37A). La deshidratación en la sección central de ambos biorreactores se debe a que, en los BCE la temperatura es mayor en el centro del lecho (Dorta and Arcas, 1998; Lopes-Perez et al., 2021; Saucedo-Castañeda et al., 1990). Sin embargo, en el BCE₁₉, la deshidratación ocurre en ambas secciones (central y periferia). Se ha observado que la remoción de calor disminuye al aumentar el diámetro del biorreactor debido a la baja conductividad calorífica efectiva del lecho de cultivo (Casciadori et al., 2016; Casciadori and Thoméo, 2018; Lopes-Perez et al., 2021); por lo que, la deshidratación del sustrato en el BCE₁₉ podría deberse a ese efecto.

Al comparar la producción de conidios en los BCE₂, BCE₄, BCE₁₀ y BCE₁₉ (Figura 37B), se observa que, las condiciones de espacio vacío, temperatura y humedad generadas por el aumento de la densidad de empaque (al aumentar el diámetro del biorreactor) fueron perjudiciales para la esporulación. Al incrementar ~1.5 veces la densidad de empaque se reduce la producción de conidios hasta 65 %, lo cual, es similar a la disminución del 60% reportada por Dorta y Arcas (1998), quienes incrementaron la densidad de empaque de 0.357 a 0.496 g/cm³. En los BCE₁₀ y BCE₁₉, la mayor producción de conidios se alcanzó en la periferia del biorreactor, lo que podría deberse al efecto de la pared del biorreactor que ocasiona canalización y aumento de la porosidad (Rezendez-Tada et al., 2020). El aumento de la porosidad permite mejorar la disponibilidad de O₂ (Thibault et al., 2000), necesario para el crecimiento del microorganismo y su esporulación (Dalla Santa et al., 2004; Garcia-Ortiz et al., 2015), así como la disipación de calor, CO₂ (Lopes-Perez et al., 2021; Mitchell et al., 2003) y otras sustancias volátiles capaces de inhibir el crecimiento del micelio (Chitarra et al., 2005; Muñiz-Paredes et al., 2017), con lo que, se generan mejores condiciones para el cultivo y la producción de conidios. Los resultados obtenidos demuestran que, al aumentar el diámetro del biorreactor, la densidad de empaque debe ser considerada y debidamente ajustada evitando aglomeración y contracción del sustrato para obtener buenos rendimientos de producción de conidios. Para ello, se podrían implementar dos estrategias: La primera, el uso de biorreactores agitados (tambor rotatorio y aspas) (Lopez-Ramirez et al., 2018; Van Breukelen et al., 2011); la segunda, sería incorporar materiales inertes al lecho de cultivo (Sangsurasak and Mitchell, 1998). La agitación mecánica periódica podría deshacer los agregados de sustrato y micelio aumentando la fracción de espacios

vacíos en el lecho (Méndez-González et al., 2018a) y podría ser efectiva con bajas intensidades de agitación (para no dañar el micelio aéreo). La segunda estrategia de incorporar materiales inertes permite aumentar la porosidad del lecho y disminuye la contracción y aglomeración del sustrato durante el cultivo (da Cunha et al., 2020). Por lo anterior, ambas estrategias serán evaluadas en la sección posterior.

Tabla 10. Comparación de propiedades del sistema en biorreactores con diferentes diámetros.

Parámetro	BCE ₂	BCE ₄	BCE ₁₀	BCE ₁₉
Densidad de empaque inicial	0.54	0.56	0.83	0.81
Diámetro interno (cm)	2	4.5	10.1	19.3
t _{lag} (h)	38.37	35.23	43.15	38.51
Tasa específica de producción de CO ₂ (1/h)	0.047	0.046	0.039	0.037
Producción total de CO ₂ (mg/gmsi)	47.11	44.19	24.85	25.87
Tasa máxima de producción de CO ₂ (mg/gmsi h)	0.40	0.39	0.21	0.20
Humedad final del sustrato (%)	35.67 ± 1.21 ^a	33.40 ± 0.59 ^{a,b}	32.00 ± 3.52 ^{a,b}	27.90 ± 1.48 ^b
Producción de conidios (conidios × 10 ⁹ /gms)	1.44 ± 0.07 ^a	1.23 ± 0.15 ^{a,b}	1.03±0.11 ^b	0.50 ± 0.24 ^c

Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

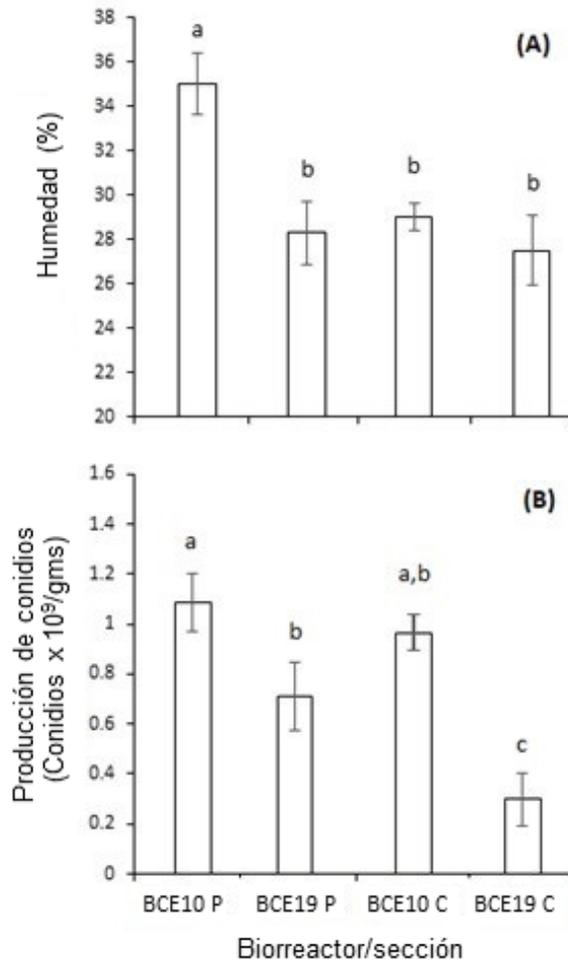


Figura 37. (A) Humedad final del lecho y (B) producción de conidios en secciones centrales y periféricas de biorreactores de columna empacada de 10 (BCE10) y 19 (BCE19) centímetros de diámetro. La letra C representa medición en el centro del biorreactor y P en la periferia. Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.5$).

10.3.5. Estrategias para el mejoramiento de las condiciones de cultivo de *M. robertsii*

En la sección anterior se comprobó que el aumento de la densidad del lecho, al aumentar el diámetro del biorreactor, es perjudicial para el desarrollo del microorganismo y la producción de conidios. Ese efecto, se potencializa con la aglomeración del sustrato y el crecimiento del micelio durante el cultivo. Por ello, para disminuir la aglomeración y compactación del sustrato y evitar la pérdida de espacios vacíos en el lecho de cultivo, en esta sección se implementarán dos estrategias: el uso de biorreactores agitados (tambor rotatorio y biorreactor de aspas) y la adición de empaques esféricos de plástico (EEP) al lecho dentro del BCE.

10.3.5.1. Producción de conidios en biorreactores agitados

Como se ha mencionado, los agregados de sustrato dificultan el crecimiento del microorganismo, la aireación y la remoción de calor. Para resolver el problema de la compactación y aglomeración del sustrato se han utilizado biorreactores agitados; los cuales, han sido efectivos en la producción de conidios de *Coniothyrium minutans* (De Vrije et al., 2001; Oostra et al., 2000) y *Paecilomyces lilacinus* (Durand, 2003; Méndez-González et al., 2018a). Sin embargo, se sabe que la agitación intermitente de alta intensidad (6 rpm por 30 s cada media hora) tiene efectos perjudiciales en los cultivos de *M. anisopliae* (Van Breukelen et al., 2011). Por lo que, para evaluar el efecto del uso de biorreactores agitados sobre la producción de conidios de *M. robertsii*, se utilizaron dos biorreactores de tambor rotario de diferente diámetro (BTR₁₅ y BTR₁₉) y un biorreactor de aspas (BA), operados con agitación intermitente de baja intensidad de agitación (ver sección 8.5.5.1.). Simultáneamente, se produjeron conidios en BCE de 15.2 y 19.1 cm de diámetro interno (BCE₁₅ y BCE₁₉, respectivamente). Durante el cultivo, los tres tipos de biorreactor (BTR, BA y BCE), se incubaron a 30 °C y se les suministró aireación (0.66 L/kgmh h). Al final del cultivo, se cuantificó el contenido de humedad en el lecho y los conidios producidos. En los BCE y BTR se observó que la humedad final del sustrato disminuye en función del diámetro. Sin embargo, con excepción del BCE₁₉, el contenido de humedad es similar en todos los biorreactores (Figura 38A). La menor producción de conidios ($>4 \times 10^8$ conidios/gms) se obtuvo en los BTR y BA. Entre los BCE y BTR del mismo diámetro, la producción de conidios desciende ~50%. En el BA, la producción de conidios (3.3 ± 0.69 conidios $\times 10^8$ /gms) fue 55 y 34% menor que la obtenida en los BCE₁₅ y BCE₁₉, respectivamente (Figura 38B).

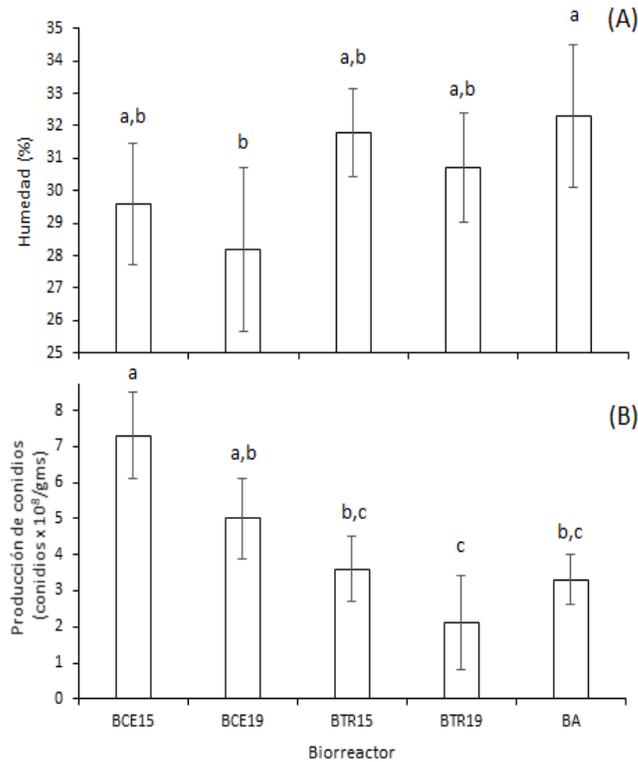


Figura 38. Comparación de la humedad final del lecho y la producción de conidios en biorreactores de columna empacada (BCE), tambor rotario (BTR) y aspas (BA).

Al final del cultivo, el lecho en los BTR tenía la apariencia de un cilindro compacto (similar a lo observado en los BCE) mientras que, en el BA, se observaron algunos agregados de sustrato con un diámetro entre 1 y 2.5 cm. Por lo que, la agitación provocada por el movimiento de las aspas es más eficiente para la desagregación del sustrato que la provocada por el giro del tambor. Sin embargo, en ninguno de los dos tipos de biorreactor, el nivel de agitación intermitente implementado fue eficaz para resolver el problema de la formación de agregados de micelio y sustrato. Los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* son sensibles a la agitación continua, por lo que, al suministrar agitación intermitente a los biorreactores se minoriza el daño mecánico al micelio; sin embargo, este tipo de operación conlleva a dos efectos: 1) Se disminuye el coeficiente de transferencia de calor del lecho a la pared del biorreactor (disminuyendo la remoción de calor) (Oostra et al., 2000) y 2) en los periodos en los que el lecho no recibe agitación, la aireación en el lecho se lleva a cabo por los mecanismos de difusión y convección natural (similar al biorreactor de charolas). En la sección 10.1. se demostró que biorreactores aireados por difusión y convección natural presentan menor producción de conidios que los aireados por convección forzada. Por lo

que, la acumulación de calor y la limitación de oxígeno ocasionadas por el mecanismo de aireación (Méndez-González et al., 2020), así como por la altura de lecho (>7 cm) (da Cunha et al., 2019) y, el posible daño mecánico al micelio (Pandey, 1991; Van Breukelen et al., 2011), podrían explicar que en los BTR y BA se produjeran menor cantidad de conidios que los obtenidos en los BCE. La incapacidad de agitar de forma continua y las desventajas analizadas en esta sección para la agitación intermitente, sugieren que implementar estrategias para mejorar la estructura del lecho de cultivo en los BCE como la adición de texturizantes podría ser una alternativa más efectiva, que permita aumentar las dimensiones del biorreactor, sin afectar la producción de conidios. La adición de bagazo de caña como soporte inerte ha sido efectivo para aumentar la porosidad del lecho (de 0.464 a 0.632) y la producción de conidios de *M. anisopliae* (de 1.95 a 3.47 x10⁹ conidios/gms) (da Cunha et al., 2020). Sin embargo, considerando que los equipos convencionales para la recuperación de conidios del sustrato utilizan la fluidización del lecho de cultivo (St. Leger, 2006; Ye et al., 2006), la diferencia de la velocidad terminal entre el bagazo de caña y los granos de arroz podría dificultar la recuperación de los conidios. Además, la adición de texturizantes de geometría variable podría generar condiciones anisotrópicas en el lecho de cultivo (Radjai et al., 1998). Por ello, en este trabajo, se decidió usar empaques esféricos de plástico de dimensiones estándar (Jaeguer Tri-Packs®) como texturizantes y, el efecto de adicionarlos se evaluará en la siguiente sección.

10.3.5.2. Efecto del uso de empaques esféricos en el lecho de cultivo en biorreactores de columna empacada

Los resultados anteriores demuestran que, el aumento del diámetro del BCE genera un aumento en la densidad del empaque, el cual, dificulta mantener las condiciones favorables para el cultivo y producción de conidios de *M. robertsii* (ver secciones 10.3.3. y 10.3.4.). Por ello, como estrategia para disminuir la densidad del empaque y mejorar las condiciones de cultivo del microorganismo, se implementó la adición de empaques esféricos de plástico (EEP) en el lecho de cultivo. Para evaluar el efecto de esta estrategia, se realizaron cultivos en biorreactores de 10.1 cm de diámetro interno sin y con adición de EEP (BCE₁₀ y BCE_{10EEP}, respectivamente). Durante el cultivo, se monitoreo la temperatura del lecho (en el centro y tres secciones axiales) y la producción de CO₂. Al final del cultivo, el lecho se dividió en cinco secciones para analizar el contenido de humedad y la producción de conidios. La adición de EEP permitió disminuir la densidad de empaque hasta 0.79 g/cm³. Los

perfiles cinéticos de la tasa de producción de CO₂ y la producción acumulada de CO₂ fueron significativamente más altos en el BCE con EEP (Figuras 39 y 40).

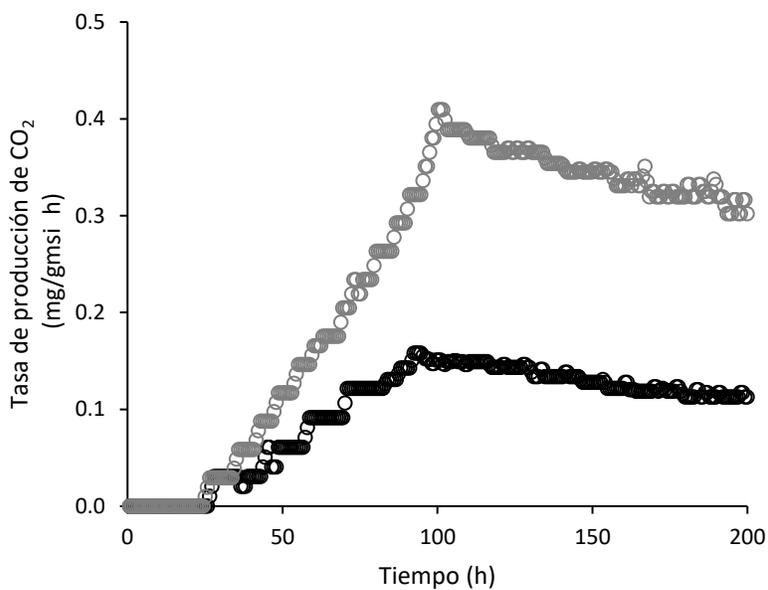


Figura 39. Tasa de producción de CO₂ en biorreactores de columna empacada con (círculos grises) y sin empaques esféricos (círculos negros).

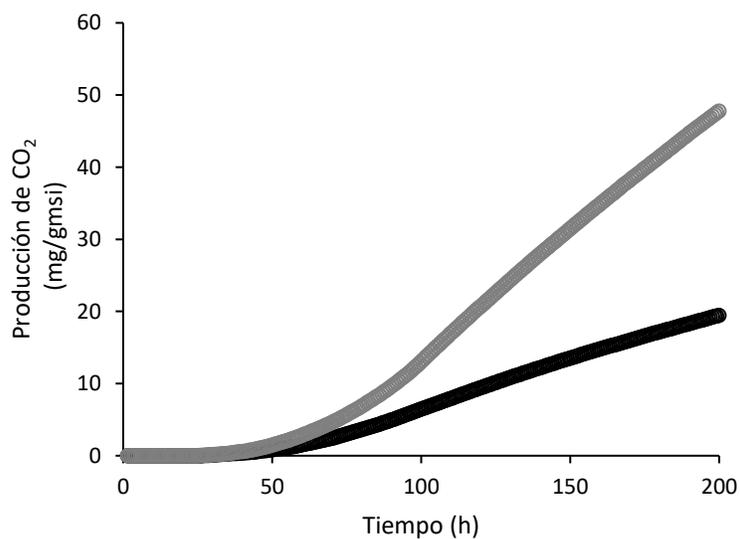


Figura 40. Producción de CO₂ en biorreactores de columna empacada con (círculos grises) y sin empaques esféricos (círculos negros).

Por medio de la medición en línea del CO₂, se determinó que el tiempo *lag* es 15% más bajo en el BCE_{10EEP}. Adicionalmente, en el BCE_{10EEP}, la tasa máxima de producción de CO₂ (0.41 mg/gmsi h) y la producción global de CO₂ (48 mg/gmsi) fueron hasta 2.5 veces mayores que las obtenidas en el BCE₁₀ (0.16 mg/gmsi h y 19.6 mg/gmsi, respectivamente) (Tabla 11). En la sección 9.2.1., se determinó que el proceso de producción de conidios de *M. robertsii* presenta un coeficiente respiratorio ~1, por lo que, la generación de calor está asociada directamente a la producción de CO₂ (Saucedo-Castañeda et al., 1990) y puede estimarse según lo recomendado por Erickson *et al.* (1978). Bajo esas consideraciones, se determinó que el calor generado en el BCE_{10EEP} (985 kJ/kgmsi) es hasta 2.5 veces mayor al obtenido en el BCE₁₀ (402 kJ/kgmsi). Al final del cultivo el contenido de humedad en ambos biorreactores fue similar y la producción de conidios fue hasta 1.35 veces más alta en el BCE_{10EEP}.

La adición de EEP al lecho de cultivo tuvo efectos importantes sobre la producción de CO₂ y conidios. La producción de CO₂ y sus parámetros asociados han sido relacionados con el crecimiento del microorganismo (da Cunha et al., 2020). Por lo tanto, al obtener en el BCE_{10EEP} un menor tiempo lag y valores superiores de la tasa específica de producción de CO₂, tasa máxima de producción de CO₂ y producción global de CO₂, en comparación a los obtenidos en el BCE₁₀, se puede suponer que, la adición de EEP mejora las condiciones para el cultivo de *M. robertsii*. Además, los valores de los parámetros asociados a la producción de CO₂ en el BCE_{10EEP} son similares a los obtenidos en los BCE₂ y BCE₄ (ver sección 9.3.4.), lo cual, podría indicar que rangos de densidad del empaque de 0.56 a 0.79 g/cm³ permiten alcanzar condiciones de cultivo óptimas el crecimiento de *M. robertsii*. Estos resultados corroboran el efecto negativo de la alta densidad de empaque sobre el desarrollo del microorganismo y su producción de conidios.

Durante el cultivo, la máxima temperatura registrada en el BCE₁₀ (33.3 °C) fue hasta 1 °C mayor que la obtenida en el BCE_{10EEP}. En ambos biorreactores se registró un aumento de temperatura en función de la altura del lecho; sin embargo, en BCE₁₀ el gradiente axial de temperatura (entre Ax1 y Ax3) fue de 1.4 °C, mientras que, en BCE_{10EEP} fue de 0.7 °C (Figura 41). Con base a la medición de CO₂, se determinó que el calor generado en el BCE_{10EEP} es hasta 2.5 veces mayor al obtenido en el BCE₁₀; sin embargo, durante todo el cultivo, los perfiles de temperatura en el BCE_{10EEP} fueron menores a los presentados en el BCE₁₀, incluso el gradiente axial de extremo a extremo es 50% menor en el BCE_{10EEP}. Lo anterior, indica que, la adición de EEP aumenta la eficiencia en la remoción de calor, ya que, esto evita la contracción y aglomeración del sustrato, mejorando la distribución del

aire en el empaque (Lopes-Perez et al., 2021) y la conductividad térmica efectiva dentro del biorreactor (Casciadori et al., 2016).

Tabla 11. Comparación de las propiedades en biorreactores de columna empacada con y sin empaques esféricos de plástico.

Parámetro	BCE ₁₀	BCE _{10EEP}
t_{lag} (h)	53.38	45.72
Tasa específica de producción de CO ₂ (1/h)	0.04	0.05
Producción de CO ₂ (mg/gmsi)	19.60	48.00
Tasa máxima de producción de CO ₂ (mg/cm ³ h)	0.13	0.32
Calor generado (kJ/kgmsi)	402.25	985.09
Humedad final del sustrato (%)	32.63 ± 2.83 ^a	31.20 ± 2.42 ^a
Producción de conidios (conidios × 10 ⁹ /gms)	0.91 ± 0.23 ^b	1.23 ± 0.16 ^a
Producción total de conidios (conidios × 10 ¹²)	1.27	1.63

Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

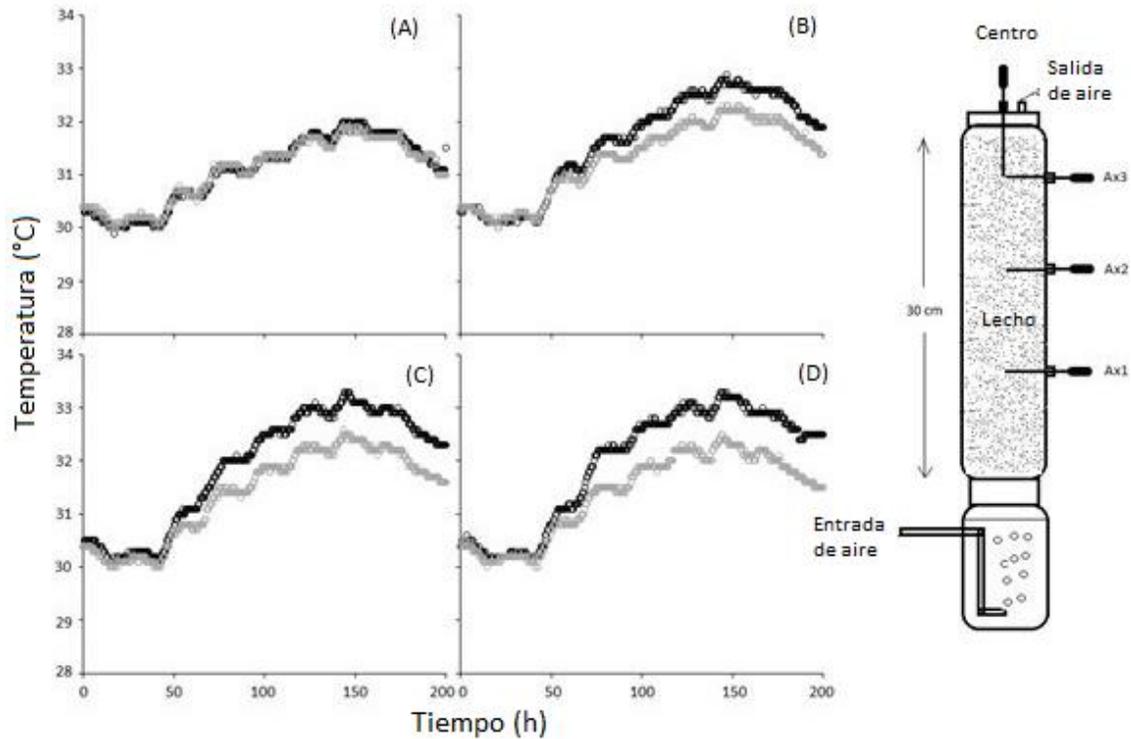


Figura 41. Perfiles de temperatura en Ax1 (A), Ax2 (B), Ax3 (C) y C (D), registrados en los biorreactores de columna empacada con (círculos grises) y sin empaques esféricos (círculos negros).

Como se mencionó anteriormente, el contenido de humedad del lecho de cultivo es similar en ambos biorreactores (Tabla 11); sin embargo, presentan gradientes axiales donde el contenido de humedad es más bajo en el fondo de la columna que en la parte superior (Figura 42A). El bajo contenido de humedad en el fondo de los BCE₁₀ y BCE_{10EEP} (secciones 1 y 2) se debió a la remoción de agua por la corriente de aire no saturado (HR = 83%) que se les suministró a ambos biorreactores. Sin embargo, el contenido de humedad de esas secciones no afectó a la producción de conidios (Figura 42B), ya que, el contenido de humedad fue mayor a 23.34% (valor crítico de humedad) (Bhanu-Prakash et al., 2008).

La producción de conidios en el BCE_{EEP} fue homogénea (Figura 42B). La adición de soportes inertes puede disminuir la productividad volumétrica del biorreactor (Lopes-Perez et al., 2021; Sangsurasak and Mitchell, 1998); sin embargo, la producción de conidios por unidad de volumen en el BCE_{10EEP} ($6.77 \pm 0.89 \times 10^8$ conidios/cm³) es hasta 22% mayor a la obtenida en el BCE₁₀ ($5.28 \pm 1.36 \times 10^8$ conidios/cm³). Por lo tanto, la adición de EEP permitió mejorar la estructura de la matriz sólida; en la cual, existe mayor eficiencia en la remoción de calor e intercambio gaseoso y, un mayor espacio intersticial para el desarrollo del microorganismo, sin comprometer la productividad volumétrica

del biorreactor. Lo anterior sugiere que, las nuevas condiciones físicas de la matriz sólida no sólo mejoran las condiciones para el cultivo de *M. robertsii*, sino que, abren la posibilidad de incrementar las dimensiones del BCE. Por ello, considerando estas nuevas condiciones, se realizará un nuevo análisis del transporte de calor que nos permita proponer el diseño de biorreactor para la producción de conidios.

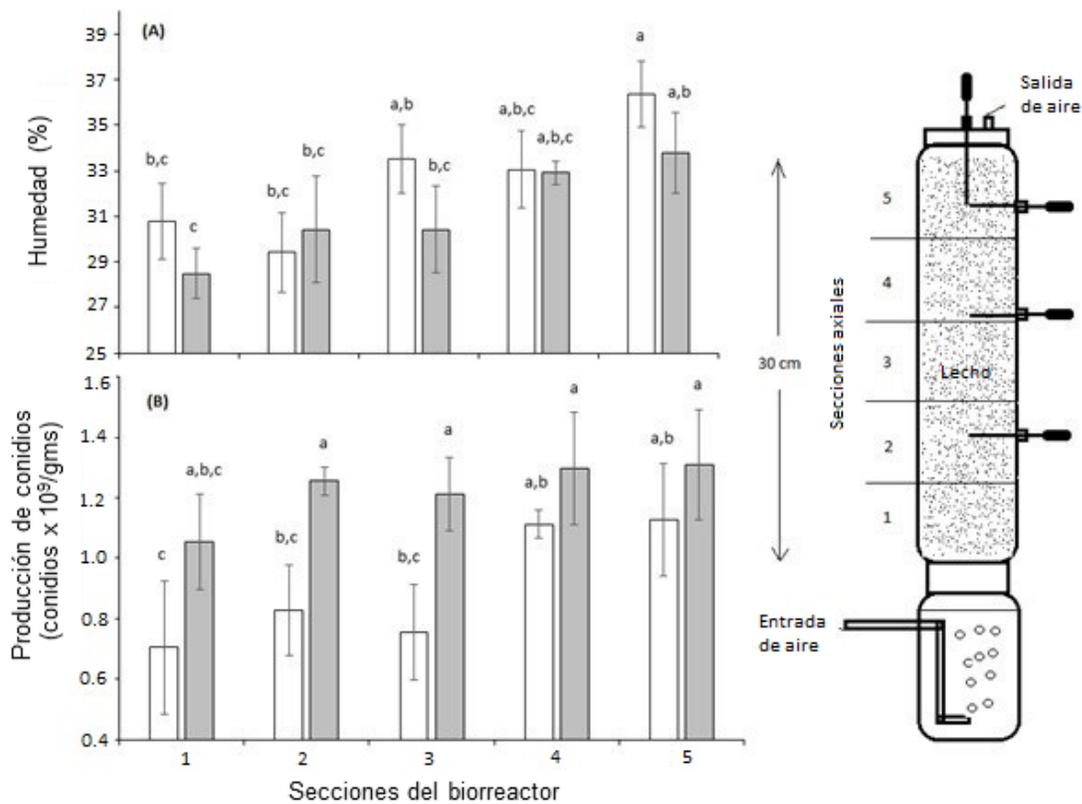


Figura 42. Contenido de humedad y producción de conidios en las diferentes secciones de los biorreactores de columna empacada con (gris) y sin empaques esféricos (blanco). Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.5$).

10.3.5.2.1. Análisis del transporte de calor y diseño del biorreactor

A lo largo de la sección de resultados se determinó que, *M. robertsii* presenta mejor desarrollo y la productividad de conidios infectivos en biorreactores de columna empacada con aireación forzada. Sin embargo, al aumentar del diámetro del biorreactor, se incrementó considerablemente la densidad del empaque y disminuyó su porosidad; lo anterior, tuvo un efecto significativamente negativo sobre desarrollo y producción de conidios de *M. robertsii*. Por ello, para mejorar la estructura de la matriz sólida, se evaluó el uso de biorreactores agitados y la adición de empaques

esféricos de plástico (EEP) como texturizante. La adición de EEP al lecho de la columna empacada, disminuyó su densidad y permitió mejorar significativamente la producción de CO_2 , la remoción de calor y la producción de conidios. Finalmente, considerando las nuevas propiedades del lecho de cultivo (con la adición de EEP) y con los datos de producción de CO_2 obtenidos en la sección anterior, se estimarán las dimensiones del biorreactor. Para ello, se determinó la altura y el diámetro críticos del biorreactor.

La altura crítica del biorreactor se obtuvo estimando la distribución axial de temperatura (usando Comsol Multiphysics 4.4.) obtenida en una columna de 60 cm de altura, en el instante en el que se alcanza la tasa máxima de producción de CO_2 (Figura 43). En el perfil de isotermas del BCE, se observó que en rango favorable de temperatura para la producción de conidios de *M. robertsii* (30 – 33°C) (Méndez-González et al., 2020), se obtiene en los primeros 30 cm de altura de la columna; por lo que, esa es la altura crítica de operación del biorreactor.

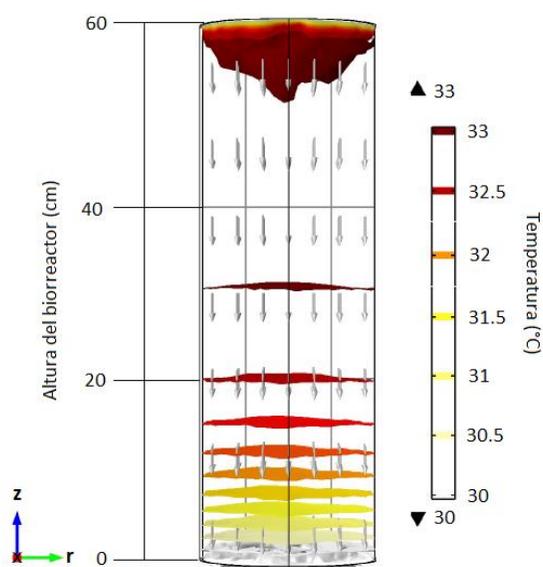


Figura 43. Distribución de temperatura axial en el biorreactor de columna empacada con empaques esféricos plásticos.

En lechos empacados de geometría cilíndrica, se ha observado que a medida que las partículas del empaque se alejan de la pared, éstas se acomodan con mayor aleatoriedad, disminuyendo gradualmente el espacio vacío entre ellas, hasta un punto mínimo que se alcanza a una distancia de cinco diámetros equivalentes de las partículas (Benenati and Brosilow, 1962; Ridgway and Tarbuck, 1968). El acomodo aleatorio de los EEP crearía zonas con baja concentración de sustrato (menor

cantidad de arroz), lo que podría afectar al rendimiento volumétrico de producción de conidios del biorreactor; por lo que, para mantener homogeneidad de la estructura del lecho de cultivo, se recomienda que el diámetro de operación del biorreactor sea de 45 cm (el equivalente de nueve EEP).

Las magnitudes sugeridas de altura (30 cm) y diámetro (45 cm) del biorreactor, permiten alcanzar un volumen de operación de 47.71 L (~25 kgms). Considerando la producción de conidios en el BCE_{10EEP} (1.23×10^9 conidios/gms), en este biorreactor se podría producir $\sim 3.1 \times 10^{13}$ conidios por lote. Además, esta columna podría acoplarse con otras en un biorreactor modular, suministrando aireación independiente a cada módulo, lo que, permitiría la producción controlada de conidios de *M. robertsii* a escala industrial (capacidad >50 L) disminuyendo las necesidades de intensa mano de obra y extensas áreas de proceso que presenta el biorreactor de bolsa.

11. Conclusiones

Los cultivos de *M. robertsii* en biorreactores de columna empacada con aireación forzada presentan mayores niveles de producción y productividad de conidios infectivos, que los obtenidos en biorreactores de bolsa y charola. Además, la aireación forzada permite la medición de la producción de CO_2 ; la cual, es útil para determinar el tiempo de cosecha de los conidios producidos.

Al aumentar las dimensiones del biorreactor se observó que, el incremento del diámetro de la columna aumenta la densidad del empaque, dificultando el transporte de masa y calor, afectando al desarrollo del microorganismo y su producción de conidios. Sin embargo, la adición de empaques esféricos de plástico como texturizante mejoró la estructura de la matriz sólida, el intercambio gaseoso y la remoción de calor. Los factores anteriores contribuyeron a generar apropiadas condiciones para el cultivo y la producción de conidios de *M. robertsii*.

Bajo las condiciones de operación estudiadas, se estima que el biorreactor de columna empacada puede alcanzar un volumen de operación de 47.71 L para obtener una producción de $\sim 3.1 \times 10^{13}$ conidios por lote. Además, esta columna podría acoplarse a otras similares en un esquema modular de biorreactores que puedan operar en un proceso controlado a nivel industrial, con mayores rendimientos de producción y, menores requerimientos de mano de obra y área de planta que el proceso tradicional en biorreactores de bolsa.

12. Bibliografía

1. Abalone, R., Gastón, A., Bartosik, R., Cardoso, L., Rodríguez, J., 2011. Gas concentration in the interstitial atmosphere of a wheat silo-bag. Part I: Model development and validation. *J. Stored Prod. Res.* 47, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.05.004>
2. Adetunji, C.O., Oloke, J.K., 2013. Effect of wild and mutant strain of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* mass produced on rice bran as a potential bioherbicide agents for weeds under solid state fermentation. 1, 18–23. <https://doi.org/10.7324/JABB.2013.1204>
3. Agosin, E., Cotoras, M., Muñoz, G., Martin, R.S., Volpe, D., 1997. Comparative properties of *Trichoderma harzianum* spore produced under solid state and submerged culture conditions, en: Roussos, S., Lonsane, B.K., Rimbault, M., Viniegra-González, G. (Eds.), *Advances in Solid State Fermentation*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 463–473. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0661-2_38
4. Alatorre-Rosas, R., 2020. Nematodos parásitos de insectos, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 271–310.
5. Alatorre-Rosas, R., Tamayo-Mejía, F., 2020. Protozoarios-microporidia y hongos entomopatógenos, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 187–238.
6. Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P.M., 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. *Rev. Mex. Biodivers.* 91, 912912. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.2912>

7. Alto, B.W., Juliano, S.A., 2001. Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): implications for range expansion. *J. Med. Entomol.* 38, 646–656. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.5.646>
8. Alves, S., Pereira, R., 1989. Production of *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in plastic trays. *Ecosistema* 14, 188–192.
9. Amerio, N.S., Castrillo, M.L., Bich, G.A., Zapata, P.D., Villalba, L.L., 2020. *Trichoderma* en la Argentina: Estado del arte. *Ecol. Austral* 30, 113–124. <https://doi.org/10.25260/EA.20.30.1.0.945>
10. Angelini, R., Finarelli, A.C., Angelini, P., Po, C., Petropulacos, K., Macini, P., Fiorentini, C., Fortuna, C., Venturi, G., Romi, R., Majori, G., Nicoletti, L., Rezza, G., Cassone, A., 2007. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Wkly. releases* 12. <https://doi.org/10.2807/esw.12.36.03260-en>
11. Arias Barreto, A., Abalone, R., Gastón, A., Ochandio, D., Cardoso, L., Bartosik, R., 2017. Validation of a heat, moisture and gas concentration transfer model for soybean (*Glycine max*) grains stored in plastic bags (silo bags). *Biosyst. Eng.* 158, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.03.009>
12. Arredondo-Bernal, H.C., González-Cabrera, J., 2020. El comercio del control biológico en México, en: Arredondo-Bernal, Hugo César, Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.Á. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. bba, México, pp. 599–629.
13. Arthurs, S., Thomas, M.B., 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisoplae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 59–65. <https://doi.org/10.1006/jjpa.2001.5050>

14. Arzumanov, T., Jenkins, N., Roussos, S., 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Process Biochem.* 40, 1037–1042. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.013>
15. Ashley, V.M., Mitchell, D.A., Howes, T., 1999. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid- state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 3, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00010-8)
16. Augier, F., Idoux, F., Delenne, J.Y., 2010. Numerical simulations of transfer and transport properties inside packed beds of spherical particles. *Chem. Eng. Sci.* 65, 1055–1064. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.09.059>
17. Auld, B.A., Morin, L., 1995. Constraints in the Development of Bioherbicides. *Weed Technol.* 9, 638–652. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00023964>
18. Badii, M.H., Abreu, J.L., 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Int. J. Good Conscienc.* 1, 82–89.
19. Barra-Bucarei, L., Vergara, P., Cortes, A., 2016. Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. *Chil. J. Agric. Res.* 76, 448–454. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392016000400008>
20. Barrera, J.F., 2020. Concepto, alcances e implicaciones del control biológico, in: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejia, F., Rodriguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 15–40.
21. Basilua Kanza, J.P., El Fahime, E., Alaoui, S., Essassi, E.M., Brooke, B., Nkebolo Malafu, A., Watsenga Tezzo, F., 2013. Pyrethroid, DDT and malathion resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* from the Democratic Republic of Congo. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107, 8–14. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trs002>

22. Bateman, R.P., Carey, M., Moore, D., Prior, C., 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Ann. Appl. Biol.* 122, 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04022.x>
23. Benenati, R.F., Brosilow, C.B., 1962. Void fraction distribution in beds of spheres. *AIChE J.* 8, 359–361. <https://doi.org/10.1002/aic.690080319>
24. Bernal, J.S., España-Luna, M.P., 2020. Biología, ecología y etología de parasitoides, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 139–154.
25. Bhanu-Prakash, G.V.S., Padmaja, V., Siva Kiran, R.R., 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 99, 1530–1537. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.031>
26. Bradley, C.A., Black, W.E., Kearns, R., Wood, P., 1992. Role of Production Technology in Mycoinsecticide Development, en: Leatham, G.F. (Ed.), *Frontiers in Industrial Mycology*. Springer US, Boston, pp. 160–173. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7112-0_11
27. Brand, D., Soccol, C.R., Sabu, A., Roussos, S., 2010. Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* againsts root-knot nematodes. *Micol. Apl. Int.* 22, 31–48.
28. Bundschuh, M., Goedkoop, W., Kreuger, J., 2014. Evaluation of pesticide monitoring strategies in agricultural streams based on the toxic-unit concept — Experiences from long-term measurements. *Sci. Total Environ.* 484, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.015>
29. Carboué, Q., Rébufa, C., Dupuy, N., Roussos, S., Bombarda, I., 2019. Solid state fermentation pilot-scaled plug flow bioreactor, using partial least square regression to predict the

- residence time in a semicontinuous process. *Biochem. Eng. J.* 149, 107248. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107248>
30. Carrieri, M., Bacchi, M., Bellini, R., Maini, S., 2003. On the competition occurring between *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Italy. *Environ. Entomol.* 32, 1313–1321. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.6.1313>
31. Casciotori, F.P., Bück, A., Thoméo, J.C., Tsotsas, E., 2016. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. *Chem. Eng. J.* 287, 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.108>
32. Casciotori, F.P., Laurentino, C.L., Taboga, S.R., Casciotori, P.A., Thoméo, J.C., 2014. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. *Chem. Eng. J.* 255, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.040>
33. Casciotori, F.P., Thoméo, J.C., 2018. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. *Chem. Eng. Sci.* 188, 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.05.024>
34. Castillo-Minjarez, J.M., Garza-López, P.M., Barrios-González, J., Loera, O., 2019. Free conidia of entomopathogenic fungi modify quality traits by changing glutathione levels after an oxidant stimulus. *Biol. Control* 137, 104011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104011>
35. Chandrasekar, V., Ganapathy, S., Karthikeyan, S., Nambi, E., Pandiselvam, R., 2020. Numerical modeling and simulation of temperature profiles in finger millet bed during solid state fermentation. *J. Food Process Eng.* 43, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13282>
36. Cherry, A.J., Jenkins, N.E., Heviefo, G., Bateman, R., Lomer, C.J., 1999. Operational and economic analysis of a west African pilot-scale production plant for aerial conidia of

Metarhizium spp. for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Sci. Technol.* 9, 35–51. <https://doi.org/10.1080/09583159929893>

37. Chitarra, G.S., Abee, T., Rombouts, F.M., Dijksterhuis, J., 2005. 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.013>
38. Choi, Y.-H., 1986. Effects of temperature and composition on the thermal conductivity and thermal diffusivity of some food components. *Korean J. Food Sci. Technol.* 18, 357–363.
39. Comoé, H., Siegrist, M., 2015. Relevant drivers of farmers' decision behavior regarding their adaptation to climate change: a case study of two regions in Côte d'Ivoire. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* 20, 179–199. <https://doi.org/10.1007/s11027-013-9486-7>
40. Corallo, B., Simeto, S., Martínez, G., Gómez, D., Abreo, E., Altier, N., Lupo, S., 2019. Entomopathogenic fungi naturally infecting the eucalypt bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), en Uruguay. *J. Appl. Entomol.* 143, 542–555. <https://doi.org/10.1111/jen.12624>
41. Córdova-Albores, L.C., Zelaya-Molina, L.X., Ávila-Alistac, N., Valenzuela-Ruíz, V., Cortés-Martínez, N.E., Parra-Cota, F.I., Burgos-Canul, Y.Y., Chávez-Díaz, I.F., Fajardo-Franco, M.L., De los Santos-Villalobos, S., 2020. Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.* 39. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-3>
42. Cotes Prado, A.M., Moreno-Velandia, C.A., Zapata, Y., Beltrán-Acosta, C., Kobayashi, S., Uribe Gutiérrez, L.A., Elad, Y., Bettiol, W., Jijakli, H., Wisniewski, M., Caro-Quintero, A., González Almarío, C., Balbín-Suárez, A., Berg, G., Smalla, K., Grijalba, E., Hurst, M., Ibarra, J., Jurat-Fuentes, J.L., Jackson, T., Espinel Correal, C., Torres Torres, L.A., Villamizar Rivero, L.F., Bustillo Pardey, A.E., Zuluaga Mogollón, M.V., Cuartas, P., Gómez Valderrama, J.A., Barrera Cubillos, G.P., López-Ferber, M., Borrero-Echeverry, F., Barreto-Triana, N., Aragón-

Rodríguez, S.M., Rivera-Trujillo, H.F., Oehlschlager, C., Kondo, T., Rincón, D.F., Pérez Álvarez, R., Vásquez Ordóñez, A.A., González, G., 2018. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: Agentes de control biológico (Volumen 1). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia).
<https://doi.org/10.21930/agrosavia.investigation.7402537>

43. da Cunha, L.P., Casciatori, F.P., de Cenço Lopes, I., Thoméo, J.C., 2019. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 42, 1757–1768. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02172-z>
44. da Cunha, L.P., Casciatori, F.P., Vicente, I.V., Garcia, R.L., Thoméo, J.C., 2020. *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. *Process Biochem.* 97, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.002>
45. Dalla Santa, H.S., Sousa, N.J., Brand, D., Dalla Santa, O.R., Pandey, A., Sobotka, M., Páca, J., Socol, C.R., 2004. Conidia production of *Beauveria* sp. by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* Caterpillars. *Folia Microbiol. (Praha)*. 49, 418–422. <https://doi.org/10.1007/BF02931603>
46. De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B., Melgarejo, P., 2002. Mass Production of Conidia of *Penicillium frequentans*, a Biocontrol Agent Against Brown Rot of Stone Fruits. *Biocontrol Sci. Technol.* 12, 715–725. <https://doi.org/10.1080/0958315021000039897>
47. De Vrije, T., Antoine, N., Buitelaar, R.M., Bruckner, S., Dissevelt, M., Durand, A., Gerlagh, M., Jones, E.E., Lüth, P., Oostra, J., Ravensberg, W.J., Renaud, R., Rinzema, A., Weber, F.J., Whipps, J.M., 2001. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: Production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 58–68. <https://doi.org/10.1007/s002530100678>
48. del Rincón-Castro, M.C., Rángel-Nuñez, J.C., Zanella-Sainz, I., 2020. Virus entomopatógenos, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.),

Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 251–270.

49. Dorta, B., Arcas, J., 1998. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 501–505. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00079-9)
50. Dorta, B., Bosch, A., Arcas, J.A., Ertola, R.J., 1990. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 712–715. <https://doi.org/10.1007/BF00604944>
51. Dorta, B., Ertola, R.J., Arcas, J., 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 434–439. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00017-8)
52. Durand, A., 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 113–125.
53. Durand, A., Chereau, D., 1988. A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 476–486. <https://doi.org/10.1002/bit.260310513>
54. Ekesi, S., Maniania, N.K., Among-Nyarko, K., 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci. Technol.* 9, 177–185. <https://doi.org/10.1080/09583159929767>
55. Erickson, L.E., Minkevich, I.G., Eroshin, V.K., 1978. Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1595–1621. <https://doi.org/10.1002/bit.260201008>

56. Fanaei, M.A., Vaziri, B.M., 2009. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 48, 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.06.001>
57. Ferron, P., 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*, en: Burges, H.D. (Ed.), *Microbial Control of Pest and Diseases 1970-1980*. Academic Press, Londres, pp. 465–483.
58. Figueroa-Montero, A., Esparza-Isunza, T., Saucedo-Castañeda, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E., 2011. Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1321–1331. <https://doi.org/10.1002/jctb.2637>
59. García-de-León, S., Mier, T., 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Soc. Rural. Prod. y Medio Ambient.* 10, 35–42.
60. Garcia-Ortiz, N., Tlecuítl-Beristain, S., Favela-Torres, E., Loera, O., 2015. Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2783–2791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6225-2>
61. Garza-López, P.M., Konigsberg, M., Saucedo-Castañeda, G., Loera, O., 2011. Differential profiles of *Beuveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. as a response to CO₂: Production of conidia and amylases. *Agrociencia* 45, 761–770.
62. Ghildyal, N.P., Gowthaman, M.K., Raghava Rao, K.S.M.S., Karanth, N.G., 1994. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 253–257. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90051-5)

63. Griffiths, D.V., Smith, I.M., 2006. Numerical Methods for Engineers, 2a edición, Numerical Methods for Engineers. Chapman and Hall/CRC, New York. <https://doi.org/10.1201/9781420010244>
64. Gutiérrez-Ramírez, A., Robles-Bermúdez, A., Santillan-Ortega, C., Ortiz-Catón, M., Cambero-Campos, O.J., 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Rev. Biociencias* 2, 102–112.
65. Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 293–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
66. Hall, R.A., De Sordi, L., MacCallum, D.M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J.W., Robinson, G.K., Levin, L.R., Buck, J., Wang, Y., Gow, N.A.R., Steegborn, C., Mühlischlegel, F.A., 2010. CO₂ Acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6, e1001193. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001193>
67. Hallsworth, J.E., Magan, N., 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 261–266. <https://doi.org/10.1006/jjpa.1999.4883>
68. Heckel, D.G., 2012. Insecticide Resistance After Silent Spring. *Science.* 337, 1612–1614. <https://doi.org/10.1126/science.1226994>
69. Hegedus, D.D., Khachatourians, G.G., 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.* 13, 455–490. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02006-O](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02006-O)
70. Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science.* 336, 348–350. <https://doi.org/10.1126/science.1215039>

71. Holder, D.J., Keyhani, N.O., 2005. Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* to Substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5260–5266. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005>
72. Hu, G., St. Leger, R.J., 2002. Field Studies using a recombinant mycoinsecticide *Metarhizium anisopliae* reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6383–6387. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6383-6387.2002>
73. Hussey, N.W., Tinsley, T.W., 1981. Impressions of insect pathology in the People's Republic of China, en: Burges, H.D. (Ed.), *Microbial Control of Pest and Diseases 1970-1980*. Academic Press, Londres, pp. 785–795.
74. Ibarra, J., del Rincón-Castro, M.C., 2020. Bacterias entomopatógenas con potencial como agentes de control biológico de insectos, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 239–250.
75. Ibrahim, L., Butt, T.M., Beckett, A., Clark, S.J., 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 103, 901–907. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007849>
76. Ibrahim, L., Butt, T.M., Jenkinson, P., 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 106, 705–715. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006044>
77. Iijima, M., Masuda, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Kurasawa, S., Okami, Y., Ishizuka, M., Takeuchi, T., Iitaka, Y., 1992. Metacytofilin, a novel immunomodulator produced by *Metarhizium* sp. TA2759. *J. Antibiot.* (Tokyo). 45, 1553–1556. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1553>

78. Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H., 2009. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests., en: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI, Wallingford, pp. 23–69. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0023>
79. Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L., 1995. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol. Control* 5, 581–590. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1069>
80. Jaronski, S.T., 2014. Mass production of entomopathogenic fungi: State of the art, en: Morales-Ramos, J.A., Rojas, G.M., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), *Mass Production of Beneficial Organisms*. Elsevier, pp. 357–413. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X>
81. Jaronski, S.T., Jackson, M.A., 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales, in: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Elsevier, pp. 255–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00008-7>
82. Jaronski, S.T., Mascarin, G.M., 2017. Mass production of fungal entomopathogens, in: Lacey, L.A. (Ed.), *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. Elsevier, pp. 141–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3>
83. Jeffs, L.B., Khachatourians, G.G., 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Can. J. Microbiol.* 43, 23–28. <https://doi.org/10.1139/m97-004>
84. Jenkins, N.E., Goettel, M.S., 2011. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Mem. Entomol. Soc. Canada* 129, 37–48. <https://doi.org/10.4039/entm129171037-1>
85. Jenkins, N.E., Grzywacz, D., 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of product performance. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 753–777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>

86. Jenkins, N.E., Prior, C., 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycol. Res.* 97, 1489–1494. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80223-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80223-2)
87. Kamp, A.M., Bidochka, M.J., 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 74–77. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01128.x>
88. Krasnoff, S.B., Sommers, C.H., Moon, Y.-S., Donzelli, B.G.G., Vandenberg, J.D., Churchill, A.C.L., Gibson, D.M., 2006. Production of Mutagenic Metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7083–7088. <https://doi.org/10.1021/jf061405r>
89. Kreß, A., Kuch, U., Oehlmann, J., Müller, R., 2014. Impact of temperature and nutrition on the toxicity of the insecticide λ -cyhalothrin in full-lifecycle tests with the target mosquito species *Aedes albopictus* and *Culex pipiens*. *J. Pest Sci.* (2004). 87, 739–750. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0620-4>
90. Kuboki, H., Tsuchida, T., Wakazono, K., Isshiki, K., Kumagai, H., Yochioka, T., 1999. Mer-f3, 12-Hydroxy-ovalicin, Produced by *Metarhizium* sp. f3. *J. Antibiot.* (Tokyo). 52, 590–593. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.590>
91. Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
92. Lasdon, L.S., Waren, A.D., Jain, A., Ratner, M., 1978. Design and testing of a generalized reduced gradient code for nonlinear programming. *ACM Trans. Math. Softw.* 4, 34–50. <https://doi.org/10.1145/355769.355773>

93. Lawler, S.P., Dritz, D.A., Christiansen, J.A., Cornel, A.J., 2007. Effects of lambda-cyhalothrin on mosquito larvae and predatory aquatic insects. *Pest Manag. Sci.* 63, 234–240. <https://doi.org/10.1002/ps.1279>
94. Lewandowski, I. (Ed.), 2018. *Bioeconomy*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68152-8>
95. 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, en: Travis, R.G., Moran-Diez, M.E. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Nueva York, pp. 61–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6_6
96. Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S., Ramakrishna, S.V., 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 258–265. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90083-3)
97. Lonsane, B.K., Saucedo-Castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniestra-González, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M.M., 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem.* 27, 259–273.
98. Lopes-Perez, C., Casciadori, F.P., Thoméo, J.C., 2021. Improving enzyme production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44, 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02466-7>
99. Lopes-Perez, C., Casciadori, F.P., Thoméo, J.C., 2019. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. *Chem. Eng. J.* 361, 1142–1151. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.169>
100. Lopez-Ramirez, N., Volke-Sepulveda, T., Gaime-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., 2018. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by

Trichoderma harzianum in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresour. Technol.* 265, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.015>

101. Luz, C., Fargues, J., 1998. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 97–103. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4774>
102. Machado, A.C.R., Monteiro, A.C., Almeida, A.M.B. de, Martins, M.I.E.G., 2010. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 45, 1157–1163. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001000015>
103. 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. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01210-2>
104. Manan, M.A., Webb, C., 2020. Newly designed multi-stacked circular tray solid-state bioreactor: analysis of a distributed parameter gas balance during solid-state fermentation with influence of variable initial moisture content arrangements. *Bioresour. Bioprocess.* 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00307-9>
105. Manan, M.A., Webb, C., 2017. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* 4, 511–532. <https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
106. Martínez-Ramírez, C., Esquivel-Cote, R., Ferrera-Cerrato, R., Martínez-Ruiz, J.A., Rodríguez-Serrano, G., Saucedo-Castañeda, G., 2021. Solid-state culture of *Azospirillum brasilense*: a reliable technology for biofertilizer production from laboratory to pilot scale. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44, 1525–1538. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02537-3>

107. Mascarin, G.M., Jaronski, S.T., 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
108. Matthiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C., Williams, R., 1995. Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 111–119. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1013>
109. Méndez-González, F., Loera-Corral, O., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., 2018a. Bioreactors for the production of biological control agents produced by solid-state fermentation, en: Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C.R. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 109–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00007-4>
110. Méndez-González, F., Loera, O., Favela-Torres, E., 2018b. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. *Curr. Biotechnol.* 7, 65–69. <https://doi.org/10.2174/2211550105666160926123350>
111. Méndez-González, F., Loera, 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. *Biochem. Eng. J.* 156, 107492. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107492>
112. Méndez Encina, F.M., Méndez González, J., Cerano Paredes, J., 2020. Distribución actual y potencial de *Dendroctonus mexicanus* Hopkins bajo dos escenarios de cambio climático. *Madera y Bosques* 26. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2622002>
113. Mendonca, A.F., 1992. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, Brazil, en: Lomer, C.J., Prior, C. (Eds.), *Biological Control of Locuts and Grasshoppers*. CABI, pp. 239–244.

114. Miranda-Hernández, F., Angel-Cuapio, A., Loera-Corral, O., 2017. Production of fungal spores for biological control, en: Pandey, A., Negi, S., Soccol, C.R. (Eds.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, pp. 757–779. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00033-6>
115. Mitchell, A.P., 2005. Fungal CO₂ sensing: A breath of fresh air. *Curr. Biol.* 15, R934–R936. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.064>
116. Mitchell, D.A., Lonsane, B.K., Reanud, R., Almanza, S., Maratray, J., Desgranes, C., Crooke, P.S., Hong, K., Tanner, R.D., Malaney, G.C., 1993. General principles of bioreactor design and operation for SSC, in: Doelle, H., Mitchell, D.A., Rolz, C.E. (Eds.), Solid State Cultivation. Elsevier Applied Science, Londres, pp. 115–136.
117. Mitchell, D.A., Von Meien, O.F., Krieger, N., 2003. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 13, 137–147. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00126-2)
118. Montesinos-Matías, R., García-Cancino, M.D., Castillo-Minjarez, J.M., Ordáz-Hernández, A., Sánchez-González, J.A., 2020. La calidad de los enemigos naturales en programas de control biológico, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 451–484.
119. Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R., Loera, O., 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2095–2102. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0672-z>
120. Moore, D., Bringe, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P., Prior, C., 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable

- and mineral oils and chemical sunscreens. *Ann. Appl. Biol.* 122, 605–616. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04061.x>
121. Mueller, G.E., 2010. Radial porosity in packed beds of spheres. *Powder Technol.* 203, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.07.007>
122. Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., Loera, O., 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 57–66. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>
123. Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Atthasampunna, P., Taguchi, H., 1984. Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Ferment. Technol.* 62, 453–459.
124. Oliveira, A.S., Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., 2018. *Metarhizium robertsii* illuminated during mycelial growth produces conidia with increased germination speed and virulence. *Fungal Biol.* 122, 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.009>
125. Oostra, J., Tramper, J., Rinzema, A., 2000. Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 652–663. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00261-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00261-1)
126. Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C.J., 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137, 37–43. <https://doi.org/10.1023/A:1006882621776>
127. Pandey, A., 1991. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Process Biochem.* 26, 355–361. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(91\)85026-K](https://doi.org/10.1016/0032-9592(91)85026-K)
128. Perry, R.H., Green, D.W., 2008. Perry's chemical engineers' handbook, 7a ed. McGraw-Hill, Nueva York.

129. Pianko-Oprych, P., 2011. Modelling of heat transfer in a packed bed column. *PJCT* 13, 34–41. <https://doi.org/10.2478/v10026-011-0046-1>
130. Pirt, S.J., 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications LTD, Londres.
131. Porter, J.H., Parry, M.L., Carter, T.R., 1991. The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. *Agric. For. Meteorol.* 57, 221–240. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(91\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0168-1923(91)90088-8)
132. Posada-Flórez, F.J., 2008. Production of *Beauveria bassiana* Fungal Spores on Rice to Control the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *J. Insect Sci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1673/031.008.4101>
133. Radjai, F., Wolf, D.E., Jean, M., Moreau, J.J., 1998. Bimodal character of stress transmission in granular packings. *Phys. Rev. Lett.* 80, 61–64. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.61>
134. Raghava Rao, K.S.M.S., Gowthaman, M.K., Ghildyal, N.P., Karanth, N.G., 1993. A mathematical model for solid state fermentation in tray bioreactors. *Bioprocess Eng.* 8, 255–262. <https://doi.org/10.1007/BF00369838>
135. Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T. V., Karanth, N.G., 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 127–135. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00125-0)
136. Rajula, J., Rahman, A., Krutmuang, P., 2020. Entomopathogenic fungi in Southeast Asia and Africa and their possible adoption in biological control. *Biol. Control* 151, 104399. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104399>
137. Ramírez-Guzmán, N., Chávez-González, M., Sepúlveda-Torre, L., Torres-León, C., Cintra, A., Angulo-López, J., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N., 2020. Significant

- advances in biopesticide production: Strategies for high-density bio-inoculant cultivation, en: Singh, J.S., Vimal, S.R. (Eds.), *Microbial Services in Restoration Ecology*. Elsevier, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819978-7.00001-4>
138. Ramírez-Guzmán, N.K., Torres-León, C., Martínez-Terrazas, E., De la Cruz-Quiroz, R., Flores-Gallegos, A.C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N., 2018. Biocontrol as an efficient tool for food control and biosecurity, en: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), *Food Safety and Preservation*. Academic Press, pp. 167–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00007-X>
139. Rangel, D.E.N., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.011>
140. Ravensberg, W.J., 2011. A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0437-4>
141. Rezendez-Tada, É.F., Bück, A., Tsotsas, E., Thoméo, J.C., 2020. Mass transport in a partially filled horizontal drum: Modelling and experiments. *Chem. Eng. Sci.* 214, 115448. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115448>
142. Ridgway, K., Tarbuck, K.J., 1968. Voidage fluctuations in randomly-packed beds of spheres adjacent to a containing wall. *Chem. Eng. Sci.* 23, 1147–1155. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(68\)87099-X](https://doi.org/10.1016/0009-2509(68)87099-X)
143. Roberts, D.W., St. Leger, R.J., 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects, en: Laskin, A., Bennett, J., Gadd, G. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 1–70. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54001-7)

144. Robledo-Monterrubio, M., Alatorre-Rosas, R., Viniestra-González, G., Loera, O., 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-d-glucose resistance and physiological analysis. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.007>
145. Roddam, L.F., Rath, A.C., 1997. Isolation and Characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 285–288. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.4644>
146. Rodriguez-Gomez, D., Garate-Velez, L., Morales-Piña, A.L., Gutiérrez-Rojas, M., Velasco-Alvarez, N., 2020. Increase in the mortality of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* due to the application of an electric field during conidiation. *Rev. Mex. Ing. Química* 19, 123–133. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1601>
147. Rodriguez-Gomez, D., Marcial-Quino, J., Loera, O., 2015. Modulation of conidia production and expression of the gene *bbrgs1* from *Beauveria bassiana* by oxygen pulses and light. *J. Invertebr. Pathol.* 130, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.004>
148. Rodriguez-Leyva, E., Lomelí-Flores, J.R., Gómez-Domínguez, E., 2020. Biología, ecología y comportamiento de insectos depredadores, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 155–170.
149. Roussos, S., Bagnis, C., Besnard, O., Sigoillot, C., Duponnois, R., Augur, C., 2000. Use of solid state fermentation for the production of fungal biopesticides spores for insect control, en: *Coffee Biotechnology and Quality*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 277–286. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1068-8_25
150. Sabbour, M.M., 2002. The role of chemical additives in enhancing the efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera:Gelechiidae). *Pakistan J. Biol. Sci.* 5, 1155–1159. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2002.1155.1159>

151. Sangsurasak, P., Mitchell, D.A., 1998. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 60, 739–749. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981220\)60:6<739::AID-BIT10>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981220)60:6<739::AID-BIT10>3.0.CO;2-U)
152. Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Bacquet, G., Raimbault, M., Viniegra-González, G., 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 802–808. <https://doi.org/10.1002/bit.260350808>
153. Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S., 1992. Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 580–582. <https://doi.org/10.1007/BF00240729>
154. Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M.R., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S., Dufour, D., Raimbault, M., 1994. On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem.* 29, 13–24. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80054-5](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80054-5)
155. Schulz, R., 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A Review. *J. Environ. Qual.* 33, 419–448. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.4190>
156. Shan, L.-T., Wang, Z.-L., Ying, S.-H., Feng, M.-G., 2010. Hydrophobicity-related protein contents and surface areas of aerial conidia are useful traits for formulation design of fungal biocontrol Agents. *Mycopathologia* 169, 483–494. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9283-8>
157. Singh, R.P., Heddman, R.D., 2014. *Introduction to Food Engineering*, 5a ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-06101-X>

158. Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., Schlösser, E.E., Knol, W., 1996. Accurate determination of process variables in a solid-state fermentation system. *Process Biochem.* 31, 669–678. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00019-2)
159. Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E., Saucedo-Castaneda, G., 2002. Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnol. Prog.* 18, 193–200. <https://doi.org/10.1021/bp010189y>
160. St. Leger, R.J., 2006. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions, en: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 179–204.
161. St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M.J., Roberts, D.W., 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 6349–6354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349>
162. Sun, J., Fuxa, J.R., Henderson, G., 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *J. Invertebr. Pathol.* 81, 78–85. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00152-0)
163. Swanson, D., 1997. Economic feasibility of two technologies for production of mycopesticide in Madagascar. *Mem. Entomol. Soc. Canada* 129, 101–113. <https://doi.org/10.4039/entm129171101-1>
164. Tamayo-Mejía, F., Alatorre-Rosas, R., Delgado-Fernández, S., Ocampo-Hernández, J.A., 2020. Principios de aplicación de entomopatógenos, en: Arredondo-Bernal, H.C., Tamayo-Mejía, F., Rodríguez-del-Bosque, L.A. (Eds.), *Fundamento y Práctica Del Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Colegio de Posgraduados, Texcoco, pp. 405–426.

165. Thibault, J., Pouliot, K., Agosin, E., Pérez-Correa, R., 2000. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_{La} in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 36, 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00156-4)
166. Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., Loera, O., 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. lepidiotum conidial production and quality. *Mycopathologia* 169, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>
167. Toledo, R.T., Singh, R.K., Kong, F., 2018. *Fundamentals of Food Process Engineering, Food Science Text Series.* Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-90098-8>
168. Torres-Mancera, M.T., Figueroa-Montero, A., Favela-Torres, E., Rosales-Zamora, G., Nampoothiri, K.M., Saucedo-Castañeda, G., 2018. Online monitoring of solid-state fermentation using respirometry, en: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.* Elsevier, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00006-2>
169. Van Breukelen, F.R., Haemers, S., Wijffels, R.H., Rinzema, A., 2011. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* 46, 751–757. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.11.023>
170. van Driesche, R.G., Hoddle, M.S., Center, T.D., 2008. *Control of pest and weeds by natural enemies: An introduction to biological control*, 1st ed. Wiley-Blackwell, Washington.
171. van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A., 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63, 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>

172. Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* (80). 336, 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.1215025>
173. Wraight, S.P., Jackson, M.A., Kokc, S.L. de, 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents., in: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI, Wallingford, pp. 253–287. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0253>
174. Xie, L., Chen, H.M., Yang, J. Bin, 2012. Conidia production by *Beauveria bassiana* on rice in solid-state fermentation using tray bioreactor. *Adv. Mater. Res.* 610–613, 3478–3482. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.610-613.3478>
175. Xue, M., Liu, D., Zhang, H., Qi, H., Lei, Z., 1992. A pilot process of solid state fermentation from sugar beet pulp for the production of microbial protein. *J. Ferment. Bioeng.* 73, 203–205.
176. Ye, S.D., Ying, S.H., Chen, C., Feng, M.G., 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnol. Lett.* 28, 799–804. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9004-z>
177. Zimmermann, G., 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic. Sci.* 37, 375–379. <https://doi.org/10.1002/ps.2780370410>

13. Lista de productos académicos

Artículos

- 2021-11-24 **Méndez-González, Fernando**; Figueroa-Montero, Arturo; Loera-Corral, Octavio; Saucedo-Castañeda, Gerardo; Favela-Torres, Ernesto. Addition of spherical-style packing improves the production of conidia by *Metarhizium robertsii* in packed column bioreactors. Doi: [10.1002/jctb.6993](https://doi.org/10.1002/jctb.6993)
- 2020-01-07 **Méndez-González, Fernando**; Loera-Corral, Octavio; Saucedo-Castañeda, Gerardo; Favela-Torres, Ernesto. Forced aeration promotes high production and productivity of infective conidia from *Metarhizium robertsii* in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. Doi: [10.1016/j.bej.2020.107492](https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107492)

Capítulos de libro

- 2018-01-12 **Méndez-González, Fernando**; Loera-Corral, Octavio; Saucedo-Castañeda, Gerardo; Favela-Torres, Ernesto. Bioreactors for the production of biological control agents produced by solid-state fermentation. En Current developments in biotechnology and Bioengineering. Current advances in solid-state fermentation. Doi: [10.1016/B978-0-444-63990-5.00007-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00007-4)

Conferencias

- 2020-12-08 Análisis respirométrico en cultivos de *Metarhizium robertsii* en biorreactores isotérmicos de columna empacada. VII Encuentro Internacional sobre Biotecnología. Tlaxcala, México.
- 2019-08-16 Bioinsecticides production in bioreactors of solid-state fermentation. 2° Congreso de bioprospección. Universidad Autónoma de Morelos. México.
- 2018-11-15 Bioinsecticides production in bioreactors of solid-state fermentation. 8° Congreso Universitario. Universidad Autónoma de Tamaulipas. México.

Resúmenes de congreso

- 2020-12-08 **Méndez-González, Fernando**; Chávez-Escalante, Geovanni; Loera, Octavio y Favela-Torres, Ernesto. Respirometric analysis in *Metarhizium robertsii* cultures in isothermal packed column bioreactors. VII encuentro Internacional sobre Biotecnología. Tlaxcala, Mexico.

- 2018-11-8 Rivera-Martínez, Juan; Martínez-de-Jesús, Margarita; Moreno-Antillon, Izau; Rojas-Caballero, Israel; Loera-Corral, Octavio y **Méndez-González, Fernando**. Pathogenicity tests of *Metarhizium robertsii* on the insect *Metamasius spinolae*, prickly pear weevil (*Opuntia ficus-indica* L). XLI Congreso Nacional de Control Biológico, Puerto Vallarta, Mexico.
- 2018-07-11 Martínez, Margarita; Rojas, Israel; Moreno, Izau; Rivera, Juan; Loera, Octavio y **Méndez, Fernando**. Virulence tests of *Metarhizium robertsii* on the insect *Metamasius spinolae*, prickly pear weevil (*Opuntia ficus-indica* L). 45 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, Colombia.
- 2017-12-05 Camacho-Gloria, Andrés; Correa-Aguilar, Giovanna; Martínez-Valdez, Francisco; Rodríguez-Durán, Luis; **Méndez-González, Fernando**; Loera-Corral, Octavio; Favela-Torres, Ernesto. Evaluation and comparison of the efficiency of removal and recovery of conidia of entomopathogenic fungi with the DIRECO prototype. IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx. Tlaxcala, México.
- 2017-07-25 **Méndez-González, Fernando**; Loera-Corral, Octavio; Martínez-Valdez, Francisco; Favela-Torres, Ernesto. Scale-up of packed column bioreactors for the conidia production from *Metarhizium robertsii*. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, México.



Producción de condios de *Neckarsiaue robertsif* en biorreactores de fermentación en medio sólido de escala laboratorio a piloto

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 30 del mes de marzo del año 2021 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. OCTAVIO LOEZA CORRAL
- DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
- DRA. ANNE CLAIRE TEXIER
- DR. ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA MONTERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuyo denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: JOSE FERNANDO MENDEZ GONZALEZ

y de acuerdo con el artículo 75 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

JOSE FERNANDO MENDEZ GONZALEZ
ALUMNO

REMSO

MTRA. ROSALIA FERRERO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CEG

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. OCTAVIO LOEZA CORRAL

VOCAL

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

VOCAL

DRA. ANNE CLAIRE TEXIER

SECRETARIO

DR. ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA MONTERO