



## Use of agroindustrials waste as texturizers to entomopathogenic fungi production on solid-state culture

## Uso de residuos agroindustriales como texturizantes para la producción de hongos entomopatógenos en cultivo en estado sólido

Alejandro Angel-Cuapio<sup>1,2\*</sup>, Octavio Loera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico de Estudios Superiores del Oriente del Estado de México. División de Ingeniería Ambiental. Paraje de San Isidro S/N, Barrio de Tecamachalco, 56400, Los Reyes Acaquilpan, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340 Iztapalapa, Ciudad de México.

[\\*angelcuapio@yahoo.com.mx](mailto:angelcuapio@yahoo.com.mx)

### ABSTRACT

Myco-insecticides are used to control agricultural pests without damaging the environment and are prepared from conidia (infectious units) of entomopathogenic fungi (EF), as *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*, which are produced in solid-state culture (SSC). The objective was to evaluate the different proportions of parboiled rice (PR) with agro-industrials waste (texturizers), on the conidia production of entomopathogenic fungi in SSC. The incorporation of texturizers mixed with rice, increased significantly ( $p < 0.05$ ) the porosity ( ) of the bed, with a linear correlation. For strain *M. anisopliae*, conidia production ( $C_a$ ) reached  $C_a \approx 6 \times 10^8$  conidia per gram of initial dry rice (conidia/gidr), with a porosity = 0.43, using parboiled rice (PR) with wood chips (WC). Moreover, for strains *I. fumosorosea* ARSEF3302 y CNRCB1, the production reached  $C_a \approx 7 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  conidia/gidr, respectively, with a range of porosity = 0.39 to 0.45, using PR and corn stover (CS). In conclusion, wood chips and corn stover can be used as texturizers agents in SSC, to modify the porosity, resulting in increased conidia production of entomopathogenic fungi.

### RESUMEN

Los micoinsecticidas se utilizan para el control de plagas agrícolas sin deteriorar el medio ambiente y son elaborados a base de conidios (unidad infectiva) de hongos entomopatógenos (HE), como *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*, que se producen en cultivo en estado sólido (CES). El objetivo fue evaluar las diferentes proporciones de arroz precocido (AP) con residuos agroindustriales (texturizantes), sobre la producción de conidios de hongos entomopatógenos en CES. La incorporación de los texturizantes mezclados con arroz incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) la porosidad ( )

del lecho, con una correlación lineal. Para *M. anisopliae*, se alcanzó una producción de conidios ( $C_a$ ) de  $C_a \approx 6 \times 10^8$  conidios por gramo de arroz seco inicial (conidios/gasi), con una porosidad = 0.43, utilizando arroz precocido (AP) con viruta de madera (VM). Por otra parte, para las cepas de *I. fumosorosea* ARSEF3302 y CNRCB1, se alcanzó una producción de  $C_a \approx 7 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  conidios/gasi, respectivamente, con un intervalo de porosidad = 0.39-0.45, utilizando AP y rastrojo de maíz (RO). En conclusión, la viruta de madera y el rastrojo de maíz pueden ser utilizados como agentes texturizantes en CES, para modificar la porosidad, puesto que, se incrementa la producción de conidios de los HE.

Keywords: Conidia, Solid-State Culture, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, Porosity, Agro-industrials waste.

Palabras clave: Conidios, Cultivo en Estado Sólido, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, Porosidad, Residuos agroindustriales

## 1. INTRODUCCIÓN

El desconocimiento y mal uso de plaguicidas químicos afectan a todo el entorno, provocando un desequilibrio en el ecosistema. De esta manera, el control biológico es una herramienta sustentable, ecológica que bien operada evita esos desequilibrios reportados e involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plaga (de Faria y Wraight, 2007). El control biológico considera a los hongos entomopatógenos, los cuales tienen la capacidad de regular poblaciones de insectos considerados plaga en el sector agrícola. Los hongos *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*, tienen un amplio rango de hospederos que pueden infectar, los cuales perjudican cultivos de gran importancia económica en todo el mundo (Glare, 2004), además de que han sido inofensivos contra organismos benéficos (Zimmerman 2007; Zimmerman 2008). Para producir estos hongos a gran escala se requiere de unidades infectiva como los conidios aéreos, los cuales suelen ser producidos en cultivo en estado sólido (CES) y da lugar a la producción de conidios más resistentes a los factores abióticos comparado con el micelio y las blastosporas producidas en cultivo líquido (Jackson *et al.*, 2010). Por otro lado, es conocido que la actividad agroindustrial genera una gran cantidad de lo que hasta ahora se ha declarado como desechos, con importantes impactos negativos al medio ambiente, tales como generación de plagas, contaminación de aguas, malos olores, entre otros (Barragán-Huerta *et al.*, 2008). Ante esta preocupación, se ha despertado el interés por aprovechar lo que se había considerado desecho y enfocarlo como un residuo aprovechable en CES para la producción de nuevos productos. Por ésta razón, se propone utilizar la viruta de madera y el rastrojo de maíz (residuos agroindustriales) como agentes texturizantes en CES, ya que se ha demostrado que los texturizantes modifican la porosidad del lecho de empaque y en consecuencia la producción de conidios (Angel-Cuapio *et al.*, 2015). El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes proporciones de arroz con dos residuos agroindustriales (viruta de madera y rastrojo de maíz) sobre la producción de conidios de tres cepas de hongos entomopatógenos en CES.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Microorganismos y propagación

El estudio se realizó con tres cepas de hongos entomopatógenos, obtenidas de la colección de hongos del laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de Hongos Filamentosos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se utilizaron dos cepas de *Isaria fumosorosea* y una de *Metarhizium anisopliae*. La cepa de *I. fumosorosea* CNRCB1 proporcionada por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) (Tecomán, Colima, México), con clave CHE-CNRCB 303; y la cepa *I. fumosorosea* ARSEF3302 obtenida del Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF) (Ithaca, New York, U.S.A.). Ambas cepas se identificaron como *Isaria fumosorosea* mediante la amplificación de la región ribosomal usando los primers ITS1 y ITS4 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), con los números de acceso en el GenBank HM209049 y HM209050, para *I. fumosorosea* CNRCB1 y *I. fumosorosea* ARSEF3302, respectivamente (Miranda-Hernández *et al.*, 2014). La cepa *M. anisopliae* CP-OAX obtenida del Colegio de Posgraduados (COLPOS) (Texcoco, Estado de México). Esta cepa fue identificada como *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* mediante la amplificación de la región ribosomal usando los primers ITS5 y ITS4b, con número de acceso en el GenBank FJ876298 (Tlecuil-Beristain *et al.*, 2010). Las cepas fueron propagadas por estría en Agar Dextrosa Sabouraud, ADS (Bioxon, México), se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo.

### 2.2. Condiciones de cultivo

El cultivo en estado sólido se realizó siguiendo la metodología descrita por Angel-Cuapio *et al.*, (2015); la cual consistió en utilizar frascos de vidrio sin tapa como unidades experimentales, con las siguientes características: un volumen (v) de 80 mL, un diámetro interno ( $\varnothing_i$ ) de 5 cm y una altura (L) de 4.7 cm, en los cuales se pesó la materia sólida. Se utilizó arroz precocido (AP) como sustrato (Verde Valle<sup>TM</sup>, Uruguay). Se utilizaron dos residuos agroindustriales (RA): viruta de madera (VM) y rastrojo de maíz (RO) como agentes texturizantes. El arroz y los residuos agroindustriales fueron pasados en tamices del No. 6, 7, 8, 10, 16 y 20; para experimentos posteriores, se seleccionaron partículas con 2 mm de ancho (tamiz No 10). Se probaron las siguientes mezclas de AP:RA expresadas en porcentaje, con un total de 10 g de materia sólida inicial (en peso seco) en cada frasco, las proporciones fueron AP:RA (% peso/peso): 100-0, 90-10, 80-20 y 70-30. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos a 15 PSI. El medio se inoculó con 1 mL de una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL. Se adicionó agua destilada estéril para ajustar la humedad inicial al 40%, en condiciones asépticas se mezcló con una espátula estéril y todas las unidades experimentales (frascos) fueron colocados en un recipiente con tapa hermética con las siguientes dimensiones: 26.6 cm x 11.5 cm x 20 cm, los contenedores tienen válvulas de entrada y salida de aire, se incubó a 28 °C con fotoperiodo 12:12 (h).

### 2.3. Conteo de conidios

Se realizaron cinéticas de producción de conidios durante 8 días, para determinar la producción en cada mezcla de AP:RA se utilizaron 21 unidades experimentales para realizar el conteo de conidios y 3 unidades como control negativo (sin inóculo). Cada 24 h se tomaron tres frascos por tratamiento (replicas), además otros experimentos se realizaron en diferentes tiempos (tres experimentos). Los conteos de conidios se obtuvieron a partir de los 10 g de materia sólida inicial presente en cada frasco. De cada frasco se realizó la extracción de los conidios utilizando los 10 g de materia sólida contenida, la cual fue transferida a un vaso de precipitados con ayuda de una espátula, los conidios fueron cosechados adicionando un volumen correspondiente de una solución de Tween 80 (0.05 %) (Amresco, Ohio, USA), se agitó durante 10 min con un agitador magnético a 350 rpm (Angel-Cuapio *et al.*, 2015). Fue necesario adicionar diferentes volúmenes de Tween 80 para cada una de las composiciones de AP:RA debido a que la altura del lecho aumentó conforme se incrementó el porcentaje de texturizante en la mezcla; para los tratamientos AP:VM (%): 100:0 y 90:10, se utilizaron 60 mL, mientras que para las mezclas AP:VM (%)= 80:20 y 70:30, se utilizaron 70 y 80 mL, respectivamente. Análogamente, para las mezclas AP:RO (%): 100:0 y 90:10, se utilizaron 60 mL, mientras que para las mezclas AP:RO (%)= 80:20 y 70:30, se utilizaron 70 y 90 mL, respectivamente. Después de agitar, se filtró con una gasa estéril de 10 x 10 cm para eliminar los sólidos y así obtener una suspensión de conidios, se realizaron diluciones y se contaron los conidios por medio de una cámara de Neubauer (Marienfield, Germany), con un microscopio (BOECO) y un objetivo 40X. La producción de conidios ( $C_a$ ) se reportó como conidios por gramo de arroz seco inicial (conidios/gasi).

## 2.4. Porosidad

Para evaluar la porosidad se siguió la metodología descrita por Angel-Cuapio *et al.*, (2015), se utilizaron frascos de vidrio cuyas características fueron descritas anteriormente (sección 2.2), en donde se pesaron 10 gramos de materia sólida y se adicionó la cantidad de agua para obtener el 40% de humedad inicial en cada mezcla de AP:RA (por triplicado). Posteriormente cada frasco fue aforado con aceite mineral (REASOL®) para determinar la fracción de espacio vacío ( ) que se calculó con la expresión descrita por Mitchell *et al.*, (2006):

$$\varepsilon = \frac{V_t - V_m}{V_t}$$

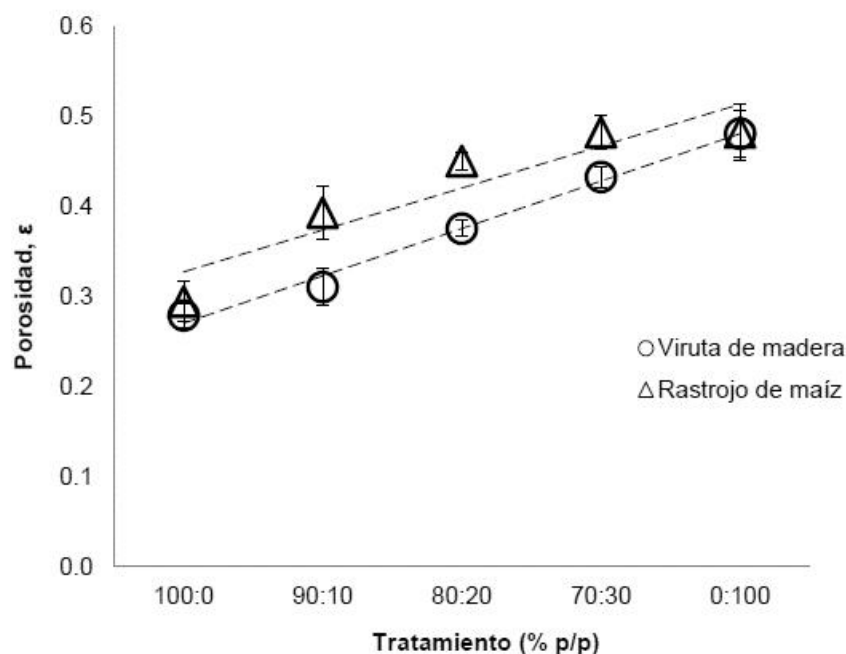
Donde,  $\varepsilon$  es la fracción de la porosidad (adimensional),  $V_t$  es el volumen total (mL), es decir, es el volumen que ocupa la muestra e incluye el volumen de espacio vacío;  $V_m$  es el volumen ocupado solo por la muestra (mL); la diferencia entre  $V_t$  y  $V_m$  es el volumen vacío (mL). El volumen de espacio vacío fue estimado por el volumen de aceite mineral necesario para cubrir la altura del lecho de empaque.

## 2.5. Análisis estadístico

Para los resultados de porosidad y producción de conidios de las tres cepas estudiadas, se utilizó una ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para la comparación de todas las medias, usando el software SPSS 13.0 (2004), con un  $\alpha$  de 0.05,

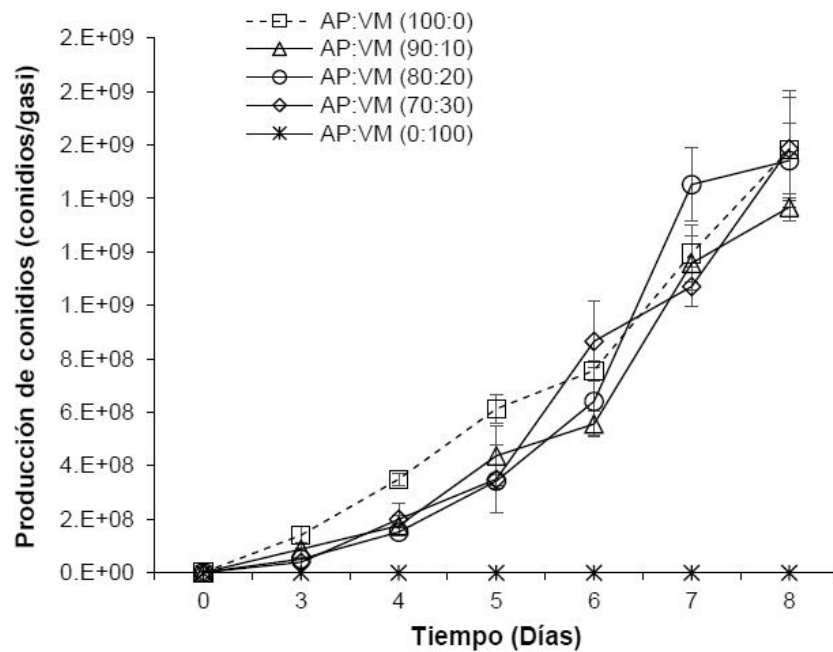
## 3. RESULTADOS

La incorporación de los residuos agroindustriales en mezclas con arroz incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) la porosidad ( $\epsilon$ ); en ambos residuos se encontró una correlación lineal cuyas ecuaciones y coeficientes de correlación fueron,  $Y = 0.0464 \cdot X + 0.2807$ ;  $R^2 = 0.858$  y  $Y = 0.0525 \cdot X + 0.2178$ ;  $R^2 = 0.990$ , para rastrojo de maíz y viruta de madera, respectivamente (Fig. 1.)

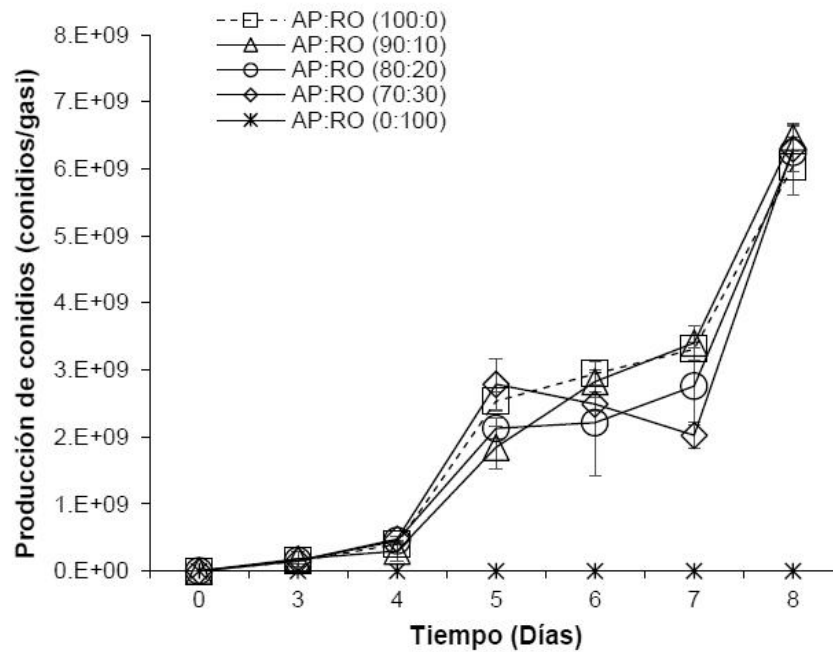


**Fig 1.** Porosidad en mezclas de AP:VM (círculos) y en mezclas de AP:RO (triángulos). La correlación lineal es indicada como línea punteada.

Los perfiles de producción de conidios de la cepa *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 en mezclas de AP:VM se muestran en la Fig. 2, se encontró que la mayor producción de conidios fue obtenida a los ocho días de cultivo en las cuatro mezclas de AP:VM y no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en los rendimientos obtenidos, con una producción promedio  $C_a \approx 2 \times 10^9$  conidios/gasi. Por otro lado, al utilizar rastrojo de maíz como texturizante se alcanzó la mayor producción de conidios a los ocho días (Fig. 3) sin encontrarse diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), por lo tanto el rendimiento promedio fue  $C_a \approx 6.5 \times 10^9$  conidios/gasi.



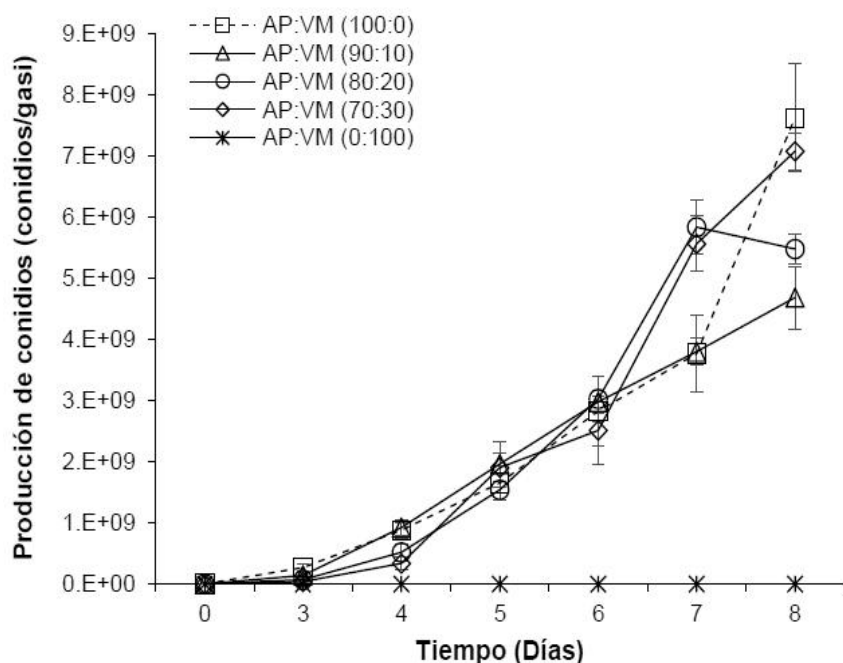
**Fig 2.** Producción de conidios de *Isaria fumosorosea* ARSEF3302, en mezclas de AP:VM.



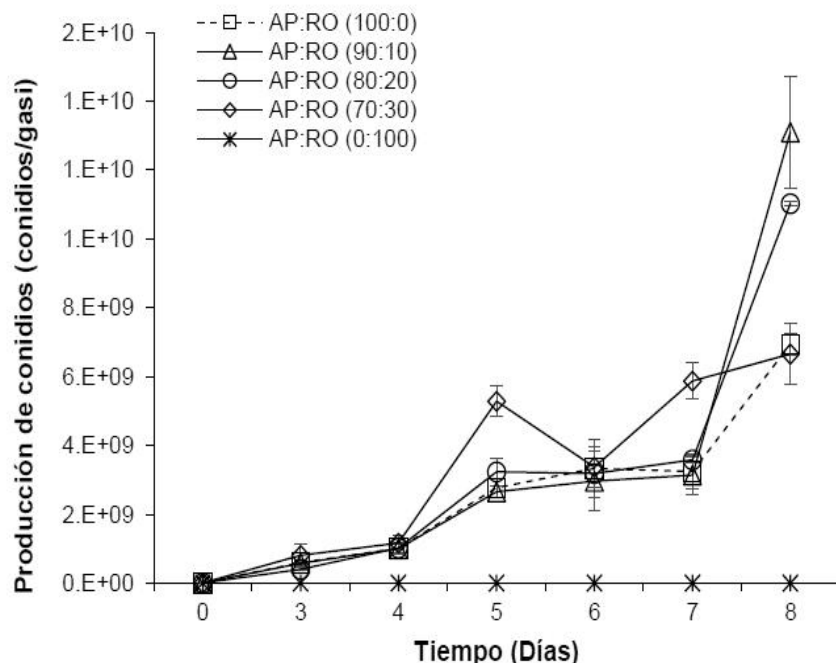
**Fig 3.** Producción de conidios de *Isaria fumosorosea* ARSEF3302, en mezclas de AP:RO.

Para la cepa *Isaria fumosorosea* CNRCB1 se encontró en las mezclas de AP:VM la máxima producción de conidios en ocho días de cultivo para los cuatro tratamientos (Fig. 4), sin embargo, en las mezclas AP:VM= 100:0 y 70:30 se alcanzó la mayor producción  $C_a \approx 7.5 \times 10^9$  conidios/gasi, por lo que no se encontró diferencia estadísticamente significativa

( $p < 0.05$ ) entre estos tratamientos; mientras que en las mezclas AP:VM (90:10 y 80:20) la producción de conidios fue 0.6 veces significativamente menor ( $p < 0.05$ ) con un rendimiento de  $C_a \approx 4.6 \times 10^9$  conidios/gasi y  $5.4 \times 10^9$  conidios/gasi, respectivamente. Por otro lado, cuando se utilizaron mezclas de AP:RO se encontró la máxima producción a los ocho días (Fig. 5), siendo los tratamientos AP:RO= 90-10 y 80:20 en los cuales el rendimiento fue más alto con un valor de  $C_a \approx 1.3 \times 10^{10}$  conidios/gasi y  $1.1 \times 10^{10}$  conidios/gasi, respectivamente, se encontró un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de 0.85 y 0.57 veces, respectivamente, sin embargo, con el tratamiento AP:RO= 70:30 no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con lo obtenido en el tratamiento AP:RO= 100:0 ( $C_a \approx 7 \times 10^9$  conidios/gasi).



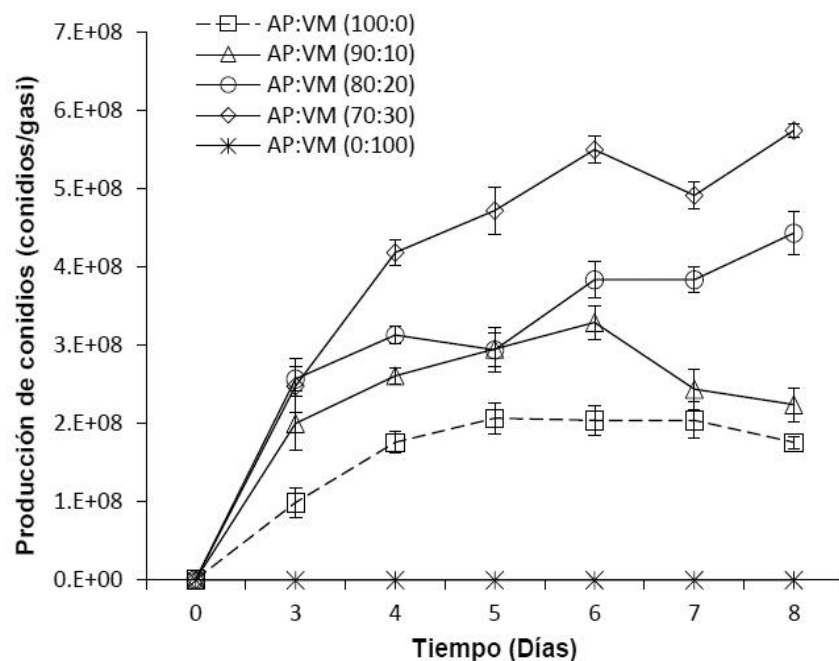
**Fig. 4.** Producción de conidios de *Isaria fumosorosea* CNRCB1, en mezclas de AP:VM.



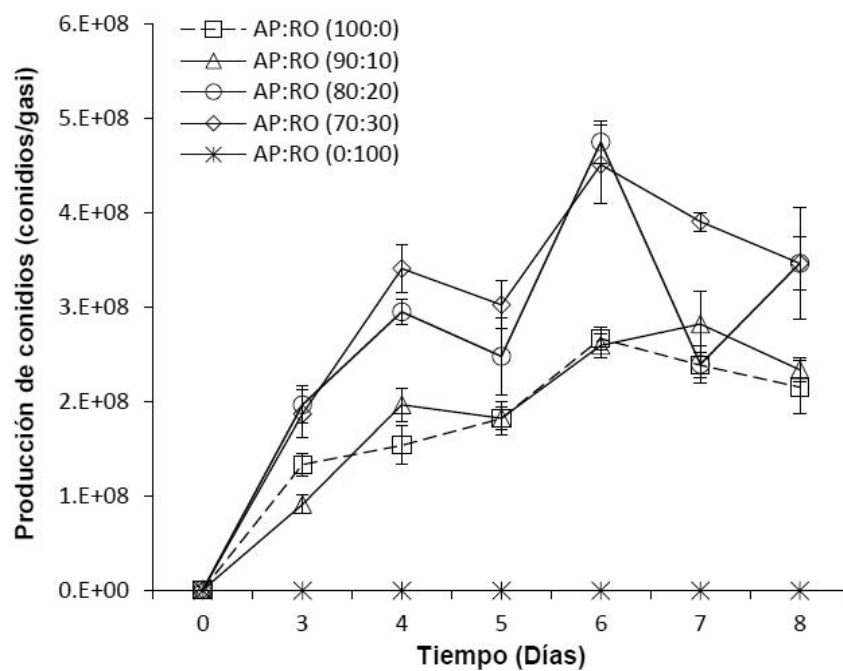
**Fig. 5.** Producción de conidios de *Isaria fumosorosea* CNRCB1, en mezclas de AP:RO.

Los perfiles de producción de conidios para la cepa de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX en mezclas de AP:VM se muestran en la Fig. 6, se encontró en los cuatro tratamientos la máxima producción de conidios en 6 días de cultivo, en la mezcla 70:30 se obtuvo el mayor rendimiento  $C_a \approx 5.5 \times 10^8$  conidios/gasi, que indica un incremento de 1.75 veces siendo estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ), comparado con lo obtenido en la mezcla AP:VM: 100:0 ( $2 \times 10^8$  conidios/gasi). Por otro lado, un comportamiento similar fue observado en las mezclas de AP:RO al encontrarse que la mayor producción de conidios se alcanzó en el día 6 y posteriormente disminuyó (Fig. 7). Sin embargo, en los tratamientos AP:RO: 80:20 y 70:30 se encontró el mayor rendimiento de  $C_a \approx 4.7 \times 10^8$  conidios/gasi que representó un incremento de 0.88 veces siendo estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ), a lo encontrado en el tratamiento sin texturizante AP:RO: 100:0 ( $2.5 \times 10^8$  conidios/gasi).





**Fig. 6.** Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, en mezclas de AP:VM.



**Fig. 7.** Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, en mezclas de AP:RO.

#### 4. DISCUSIÓN

Los residuos agroindustriales fueron incorporados como agentes texturizantes para evitar la compactación del sustrato y con ello incrementar la porosidad ( ) del lecho, tal como fue propuesto por Angel-Cuapio *et al.*, (2015). El impacto de estos texturizantes sobre la producción de conidios fue analizado. Para la cepa *I. fumosorosea* ARSEF3302, se encontró al utilizar mezclas de arroz con residuo agroindustrial, ya sea viruta de madera o rastrojo de maíz, en la producción de conidios por gramo de arroz no hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ), en comparación con el control (mezcla 100:0). Éste comportamiento ya fue observado con *Beauveria bassiana*, con altas proporciones de texturizante (bagazo de caña de azúcar), es decir, se reduce la producción de conidios por gramo de materia sólida total, sin embargo, no hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ) cuando la producción de conidios fue reportada por gramo de salvado de trigo, sustrato principal (Nuñez-Gaona *et al.*, 2009). En éste estudio, la cepa de *I. fumosorosea* creció principalmente sobre los granos de arroz (el arroz fue el único sustrato), ni crecimiento o conidiación fue observado sobre las partículas de los residuos agroindustriales, tal como ha sido reportado por otros autores (Arzumanov *et al.*, 2005; Angel-Cuapio *et al.*, 2015). Esto posiblemente se debe a la baja producción de enzimas lignocelulolíticas requeridas para hidrolizar los componentes de los residuos agroindustriales estudiados. Los resultados obtenidos con las cepas de *Isaria fumosorosea* parecen apoyar que los valores de porosidad obtenidos con viruta de madera son los menos favorables para la producción de conidios comparado con los valores obtenidos al utilizar rastrojo de maíz, mientras para la cepa de *Metarhizium anisopliae* le favorece la fracción de espacio vacío obtenida con rastrojo de maíz.

Los resultados obtenidos en esta investigación para las cepas *I. fumosorosea* ARSEF3302 y CNRCB1, han sido en un intervalo de  $C_a \approx 2 \times 10^9$  a  $6 \times 10^9$  conidios/gasi y de  $C_a \approx 8 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  conidios/gasi, respectivamente. Sin embargo, se ha reportado la producción de conidios de cepas *Isaria fumosorosea* del orden de  $1 \times 10^9$  conidios por gramo de sustrato solido inicial (Kim *et al.*, 2010; Moura-Mascarin *et al.*, 2010), y recientemente Angel-Cuapio *et al.*, (2015) reportaron una producción de  $C_a \approx 7 \times 10^9$  y  $1 \times 10^9$  conidios/gasi, para las cepas *I. fumosorosea* ARSEF3302 y CNRCB1, respectivamente. Esto es un resultado interesante, considerando que el método de producción propuesto permitió la obtención de altos rendimientos mediante el aprovechamiento de residuos agroindustriales como agentes texturizantes en cultivo en estado sólido y por consiguiente la elaboración de productos de interés comercial, tal como fue reportado recientemente por Angel-Cuapio *et al.*, (2015), al incorporar lirio acuático como texturizante se modificó la porosidad del lecho de empaque y con ello se incrementó la producción de conidios de dos cepas de *Isaria fumosorosea*. Por otra parte, la producción obtenida en esta investigación para la cepa de *M. anisopliae* CP-OAX fue en promedio de  $C_a \approx 5 \times 10^8$  conidios/gasi, considerada baja comparado con otros reportes realizados en cultivo en estado sólido con cepas de *M. anisopliae*, se han obtenido rendimientos entre  $1 \times 10^9$  y  $2 \times 10^{10}$  conidios por gramo de sustrato seco inicial, tanto con diferentes cepas de *M. anisopliae* como sustratos (Arzumanov *et al.*, 2005; Dorta & Arcas, 1998). No obstante, se recomienda utilizar el sistema de producción propuesto, empleando residuos agroindustriales como texturizante, debido a que resultó ser una alternativa novedosa, ya que al modificar la porosidad del lecho de empaque la producción de conidios

se incrementó desde 0.6 hasta 3.3 veces. Por otro lado, debido a que no se encontró crecimiento ni conidiación en las mezclas AP:VM (0:100) y AP:RO (0:100), probablemente se debió a que las cepas estudiadas tienen una capacidad limitada para producir enzimas lignocelulolíticas, que le permitan degradar la lignina y aprovechar la viruta de madera y el rastrojo de maíz como fuente de nutrientes; tal como ha sido reportado en otras investigaciones para hongos entomopatógenos (Arzumanov *et al.*, 2004; Angel-Cuapio *et al.*, 2015).

Como parte complementaria y una perspectiva, se recomiendan hacer pruebas de calidad como la germinación y viabilidad (Borman *et al.*, 2006 Ibrahim *et al.*, 2002), así como las pruebas de infectividad (Fang *et al.*, 2009), que reflejan la efectividad de los conidios producidos en CES. La viruta de madera y el rastrojo de maíz pueden ser utilizados como agentes texturizantes en cultivo en estado sólido, para modificar la porosidad del lecho de empaque y en consecuencia, incrementar la producción de conidios de los hongos entomopatógenos estudiados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento (clave 390.15-PD), al Tecnológico de Estudios Superiores del Oriente del Estado de México y a la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Angel-Cuapio A., Figueroa-Montero A., Favela-Torres E., Viniegra-González G., Perraud-Gaime I. & Loera O. 2015. Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: effect on conidial yields and quality. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 177: 446-457.

Arzumanov T., Jenkins N. & Roussos S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*. 40: 1037-1042.

Barragán-Huerta B., Téllez-Díaz Y. A. & Laguna-Trinidad A. 2008. Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*. 2: 44-50.

Borman A. M., Szekely A., Campbell C. K. & Johnson E. M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*. 161: 362-368.

De Faria M. R. & Wraight S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*. 43:237-256.

Dorta B. & Arcas J. 1998. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 501-505.

Fang W., Pava-Ripoll M., Wang S. & St Leger R. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 277–285.

Glare T. R. 2004. Biotechnological potencial of entomopathogenic fungi. In: Arora DK (ed). *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*. Marcel Dekker Inc, New York. pp. 79-90.

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*. *Mycological Research*. 106: 705-715.

Jackson M. A., Dunlap C. A. & Jaronski S. T. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*. 55: 129–145.

Kim J. S., Je Y. H. & Roh J. Y. 2010. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 419-423.

Moura-Mascarin G., Alves S. B. & Lopes R. B. 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53: 753–761.

Miranda-Hernández F., Saucedo-Castañeda G., Alatorre-Rosas R. & Loera O. 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*. 70: 661–666.

Mitchell D. A., Meien O. F., Luiz F. L., Luz Jr. & Berovi M. 2006. Substrate, air, and thermodynamic parameters for SSF bioreactor models. In: Mitchell D. A., Berovi M. & Krieger N. (Eds.), *Solid-state fermentation bioreactors: fundamental of design and operation*. Berlin, Springer. pp. 265–278.

Núñez-Gaona O., Saucedo-Castañeda G., Alatorre-Rosas R. & Loera O. 2010. Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53: 771–777.

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.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science Technology*. 17(9): 879-920.

Zimmermann G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 18: 865–901.