



## REVIEW

# Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe

## Alternatives for the production of microbial biopesticides based on fungi: the case of Latin America and the Caribbean

 Eddy J. Bautista<sup>1,\*</sup>; Leyanis Mesa<sup>1,2</sup>; Martha Isabel Gómez Álvarez<sup>1</sup>
<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA. Sede Central – km 14 Vía Mosquera - Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

<sup>2</sup> Programa doctoral de Ingeniería Química. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central de Las Villas. Cuba.

Received June 13, 2018. Accepted December 11, 2018.

### Resumen

La creciente conciencia del consumidor relacionada con el impacto negativo de los plaguicidas sintéticos sobre el medio ambiente y la salud humana ha aumentado las tasas de adopción de bioplaguicidas a nivel mundial. Sin embargo, actualmente los bioplaguicidas solo representan el 5% del mercado de productos para protección de cultivos, se espera que este segmento siga creciendo con una tasa de crecimiento anual de 15-20% para el 2020. Analistas del mercado consideran que este crecimiento será liderado por regiones como Europa debido a las nuevas legislaciones, y Latinoamérica donde han aparecido plagas más resistentes. Para responder a las necesidades de este creciente mercado, se debe contar con un proceso de producción a gran escala, con buenos rendimiento, y que proporcione un producto de calidad. Por lo tanto, el presente artículo ofrece una revisión crítica sobre aspectos técnicos de los diferentes procesos de fermentación utilizados en la producción de bioplaguicidas microbianos basados en hongos (micoplaguicidas), los sustratos comúnmente utilizados y el potencial uso de residuos agroindustriales. Adicionalmente, ofrece una visión general del panorama de la producción de micoplaguicidas en Latinoamérica y el Caribe, y algunas perspectivas futuras en el proceso de investigación y desarrollo de los mismos.

**Palabras clave:** micoplaguicidas; fermentación; bioplaguicidas; separación; sustratos.

### Abstract

The adoption rate of biopesticide worldwide has been increased because of the consumer's growing level of awareness about the negative impact of the synthetic pesticides over the environment and the human health. Nonetheless, biopesticides today hold just 5% of the total crop protection market. This segment would increase with a compound annual growth rate (CAGR) of 15-20% until 2020. Business analysts think that this growing will be guided by world regions such as Europe and Latin America driven by the new laws and the new resistant pests, respectively. The demand of this growing market requires a cost-efficient and reliable process of mass production, with good yield, and with a good quality product. Therefore, this article presents a critical review about technical points of the different kinds of fermentation systems, which are usually used in the production of microbial biopesticides with fungi as the active ingredient (mycoplaguicides). Also, it has a survey about the typical substrates used and the potential application of agroindustrial wastes as substrates. As well, a broad view is introduced about the mycopesticides production in Latin America and the Caribbean. Finally, the article shows future perspectives on research and development of mycopesticides production.

**Keywords:** mycopesticides; fermentation; biopesticides; separation; substrates.

### 1. Introducción

La producción agrícola ha aumentado gracias al crecimiento poblacional y a las exigencias actuales del mercado de consumo. Se estima que la población mundial será entre de 9,4 y 10 billones para

el 2050. Como respuesta a la creciente demanda de alimentos se ha venido usando frecuentemente fertilizantes y plaguicidas para aumentar la producción y protección. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos químicos ha tenido efectos secundarios

\* Corresponding author  
E-mail: [ebautista@corpoica.org.co](mailto:ebautista@corpoica.org.co) (E. Bautista).

que impactan negativamente el ambiente y la salud humana. La organización mundial de la salud (OMS) reporta de 2-5 millones por año de casos de envenenamiento por plaguicidas en el mundo, de los cuales 200000 casos terminan en muerte, y de estas muertes el 99% ocurre en las zonas rurales de países en desarrollo (UN Human Rights Council, 2017). También el aumento de algunas plagas en países como India han estado asociadas a la resistencia a los insecticidas químicos (Kumar *et al.*, 2018). La agroecología se plantea como una práctica segura para minimizar el uso de plaguicidas y fertilizantes de origen químico. La misma busca reemplazar los químicos con productos biológicos y promueve el uso de prácticas adaptadas a los ambientes locales. Asimismo, estimula las interacciones biológicas benéficas entre diferentes plantas y especies que favorezcan la fertilidad y salud de los suelos (UN Human Rights Council, 2017). El uso de bioplaguicidas se plantea como una alternativa viable y sostenible para el control de plagas en los cultivos, debido a que estos bioproductos no dejan residuos tóxicos y por lo general son específicos hacia su blanco biológico, reduciendo el riesgo de desarrollar de resistencia en las plagas. La incorporación de bioplaguicidas a un programa integrado de manejos de plagas disminuye la necesidad de empleo de plaguicidas sintéticos, y no afecta el rendimiento del cultivo (Arthurs y Dara, 2018).

Teniendo en cuenta las ventajas que conlleva el empleo de bioplaguicidas, en algunos países como los Estados Unidos, algunos miembros de la Unión Europea y otros de América Latina la legislación está favoreciendo un mayor desarrollo y utilización de estos bioproductos, por encima de los plaguicidas químicos (Marrone, 2014; Arthurs y Dara, 2018). De igual manera, las inversiones en este sector se están viendo favorecidas como respuesta a la tendencia en las ventas mundiales de bioplaguicidas. Dichas ventas se estimaron en 2,4 billones de dólares en 2014, con una tasa de crecimiento anual promedio de 15 % en esta década (Pelaez *et al.*, 2017). Actualmente, la composición del mercado global de bioplaguicidas microbianos se encuentra distribuido como se presenta en la Figura 1 (Mishra *et al.*, 2015), siendo las bacterias las que poseen el mayor mercado mundial, seguidos por los hongos. No obstante, el comportamiento del mercado en América Latina es un poco diferente. Según la bibliografía consultada (Mordor Intelligence, 2016; Pelaez *et al.*, 2017), el

consumo de bioplaguicidas en América Latina se concentra en los bioplaguicidas microbianos a base de *Bacillus turigensis* (Bt) y de hongos (micoplaguicidas), con un valor de 40,43% y 48,16%, respectivamente. Este comportamiento, puede deberse al uso extensivo de micoplaguicidas para los cultivos de alta predominancia en la región (Mordor Intelligence, 2016; Mascarín *et al.*, 2018). Por ejemplo, en los cultivos de soya y de caña de azúcar en Brasil, los cuales no cuentan con un plaguicida químico para el control de moho blanco y el barrenador de caña de azúcar (*Diatrea*). El aumento en área de estos cultivos y la falta de una solución química ha aumentado la demanda de bioplaguicidas en el país, lo que ha hecho que, por ejemplo, el área de cultivos tratados con *Trichoderma* en Brasil se duplicara en el periodo de 2008 a 2010 (Bettiol *et al.*, 2014; Mordor Intelligence, 2016; Mascarín *et al.*, 2018).

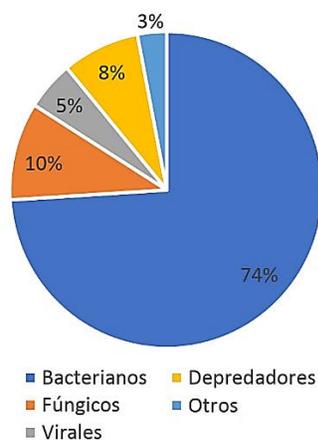


Figura 1. Composición del mercado global de bioplaguicidas (Adaptado de Mishra *et al.*, 2015).

Para responder al mercado creciente de bioplaguicidas se debe garantizar que estos, estén disponibles en cantidades suficientes, que mantengan la calidad y efectividad en el tiempo, lo cual requiere el desarrollo métodos de producción económicos y eficientes (Jaronski y Mascarín, 2016). Por lo tanto, durante el desarrollo del proceso de producción se deben cumplir diferentes etapas que resulten en la definición de los siguientes elementos: a) un medio de cultivo óptimo, c) un método de producción (fermentación sólida, líquida o bifásica), b) los procesos aguas abajo (secado, centrifugación, tamizaje), c) los parámetros del proceso a controlar, d) el mejor sistema para la obtención masiva de inóculo que permita una buena relación costo-beneficio en la producción, e) los métodos de control de calidad, y f) los costos de producción. Sin

embargo, el mayor desafío durante el desarrollo del proceso es llevar todas estas técnicas desde escala industrial. El escalamiento siempre presenta nuevos problemas que no fueron considerados a una escala menor. También, es importante validar los parámetros de procesos optimizados a escala de laboratorio en una escala mayor (Monzón, 2001; Ravensberg, 2011), con el fin de realizar los ajustes necesarios al proceso que garanticen mantener el rendimiento del proceso.

Otros factores importantes para tener en cuenta durante el desarrollo del proceso de producción son: el tipo de mercado al que está dirigido el producto, el tamaño del mercado, el capital disponible para invertir, y la cantidad de recurso humano disponible (Grzywacz *et al.*, 2014). Los métodos de producción desarrollados incluyen desde la multiplicación artesanal, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción industrial a gran escala que se realiza en empresas más grandes o compañías, para la cual se requiere de reactivos y equipos más especializados. En Latinoamérica mayormente se utiliza el mecanismo de baja tecnología, con alta demanda de mano de obra, y en algunos casos realizado por los mismos productores (Grzywacz *et al.*, 2014; Monzón, 2001). Teniendo en cuenta la importancia de la selección del proceso de producción de micopláguicidas, el presente artículo ofrece una revisión crítica sobre, los aspectos técnicos de los diferentes tipos de fermentación utilizados en producción de micopláguicidas, los sustratos que se utilizan en estas fermentaciones, aspectos claves de la producción masiva de micopláguicidas, las perspectivas de aplicación de los residuos agroindustriales para la producción de los mismos, y una visión general del panorama de la producción de micopláguicidas en Latinoamérica y el Caribe. Finalmente, trata sobre las perspectivas futuras en el proceso de investigación y desarrollo de micopláguicidas.

## 2. Principales hongos usados como compuesto activo en los micopláguicidas

De forma general, se puede identificar como biopláguicidas aquellos organismos vivos o productos naturales derivados de estos, que reducen las poblaciones de plagas (Thakore, 2006). Su mecanismo de acción está basado en los principios básicos de la patología vegetal y en sus interacciones con los agentes que causa daño directo, como las malas hierbas (bioherbicidas), las enfermedades de las

plantas provocadas por hongos (biofungicidas), o las plagas de insectos (bioinsecticidas).

La Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) clasifica los biopláguicidas para propósitos de registro en tres categorías. 1) biopláguicidas microbianos, 2) biopláguicidas bioquímicos, 3) plantas que incorporan en su ADN sustancias protectoras (Seiber *et al.*, 2014; Sullivan, 2015). Los productos microbianos incluyen productos derivados de microorganismos naturales o los propios microorganismos intactos.

La mayoría de los hongos producidos comercialmente para el control biológico pertenecen al orden de los Hypocreales. Estos incluyen *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium* spp. y se usan para el control de docenas de plagas en una variedad de cultivos (Lacey, 2017). Estos hongos son los microorganismos más importantes en el control de insectos chupadores como áfidos, mosca blanca, escamas, chicharritas y chinches (Nava-Pérez *et al.*, 2012). Una ventaja de los micopláguicidas en comparación con muchos de los biopláguicidas bacterianos y todos los virales es que no necesitan ser ingeridos para ejercer su acción biocontroladora. Sin embargo, son organismos vivos que a menudo requieren una estrecha gama de condiciones de humedad y temperatura para desencadenar su mecanismo de acción (Mishra *et al.*, 2015).

De forma general el modo de acción para el control de insectos se basa en que las esporas del hongo se depositan en la superficie del huésped adecuado, la cutícula y la espora se unen provocando la germinación de la espora e inician unas cascadas de reconocimiento y reacciones de activación enzimática tanto por el huésped como por el parásito fúngico. La invasión del cuerpo del insecto y del sistema circulatorio (hemolinfa) ocurre una vez que el hongo ha pasado a través de la cutícula del exoesqueleto del insecto, provocando la muerte del insecto por inanición fisiológica alrededor de 3-7 días después de la infección (Shah *et al.*, 2003). Por otra parte, los hongos antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños causados por enfermedades microbianas. Uno de los principales exponentes de esta acción son los hongos del género *Trichoderma*, antagonista de hongos como *Ceratobasidium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Phytophthora* spp (Infante *et al.*, 2009),

entre otros. Para lograr este objetivo, *Trichoderma* presenta diferentes modos de acción que les permite ejercer su efecto biocontrolador. Los principales mecanismos descritos son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis (Infante *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2015). También, se han sugerido otros mecanismos de acción indirecta, como la inducción de mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta, mediante la producción de compuestos que confiere resistencia a la planta y/o repelen plagas (Infante *et al.*, 2009).

La acción biocontroladora de los micoplaguicidas, puede ser ejercida por propágulos infecciosos basados en esporas (en sentido genérico) o por biomasa (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017; Shah *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de las formulaciones de los micoplaguicidas se basan en las esporas obtenidas a través de diferentes sistemas de fermentación, por presentar mayor adaptación a factores abióticos no controlados cuando se encuentran a campo abierto. Debido a esto, por lo general, los sistemas de fermentación para la producción de micoplaguicidas van dirigido a la obtención de esporas (en sentido genérico) (Jaronski y Mascarín, 2016; De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015).

### 3. Características de las tecnologías de producción

Para lograr el uso extensivo de micoplaguicidas dentro de programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), los agentes fúngicos deben ser susceptibles a una multiplicación masiva no dispendiosa y económicamente rentable con el fin de garantizar la disponibilidad a gran escala. Además, los micoplaguicidas deben tener estabilidad a largo plazo y una eficacia constante en condiciones ambientales y ecológicas típicas para el (los) insecto(s) objetivo(s) (Singh, 2017). También, se debe considerar el uso de materiales disponibles regionalmente y que sean residuos de otros procesos agroindustriales en los sistemas de producción de micoplaguicidas, cumpliendo de este modo con los requisitos de tecnologías verdes y contribuyendo al desarrollo de una sociedad ambiental y económicamente sostenible (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015). La eficiencia de la aplicación de los productos biotecnológicos en la agricultura depende de su diseño, optimización del proceso y minimización de costos (Rivero *et al.*, 2017).

La etapa de fermentación es la fase en la que las esporas se producen masivamente. Una vez producidas, se recogerán median-

te procesamiento aguas abajo donde se recuperan y se purifican. Durante la producción y los procesos aguas abajo se debe producir un rendimiento alto de las mismas, ya que estas son la base de la formulación y dan lugar al micoplaguicida final. El micoplaguicida generalmente consiste en las esporas puras, a veces con restos de componentes del proceso de producción y/o con metabolitos producidos durante la fermentación. También puede incluir componentes que se agregan durante el procesamiento aguas abajo. Este producto "intermedio" será formulado con coadyuvantes para obtener el bio-producto final (Ravensberg, 2011).

Los hongos se pueden producir masivamente mediante fermentación en estado sólido (FES), y fermentación sumergida (FS). Un tercer método es un sistema intermedio, llamado fermentación bifásica, donde intervienen ambas fases: el micelio, se produce en cultivo líquido para posteriormente realizar la esporulación usando un sustrato sólido (Feng *et al.*, 1994). La elección de cómo producir un hongo generalmente depende de la capacidad del microorganismo para producir un alto rendimiento de esporas de alta calidad en un sistema determinado.

Naturalmente, las esporas típicas de los hongos entomopatógenos son los conidios aéreos. Otras esporas de posible explotación son blastosporas, conidios sumergidos (microciclo), micelios esporogénicamente competentes y microesclerocios. La elección de la espora apropiada incluye la consideración del uso proyectado, buena virulencia, tolerancia a la desecación, tolerancia térmica, velocidad de germinación e infección, estabilidad y reproducción ambiental y tolerancia a los rayos UV, así como la capacidad inherente del hongo elegido para producir ese tipo de espora (Jaronski y Mascarín, 2016). Una revisión detallada de los tipos de esporas de varios hongos obtenidos por FS se presenta en la revisión de Jaronski y Mascarín (2016).

Las conidiosporas son preferibles a las blastosporas o hifas, debido a su mejor supervivencia en procesos posteriores y durante el almacenamiento, y por su persistencia superior después de la aplicación. La mayoría de los hongos producen conidiosporas solo cuando se producen por FES; aun así, algunos producen conidiosporas en FS, como *B. bassiana* y *T. harzianum*. Otros hongos como *I. fumosorosea* y *L. longisporum* (*V. lecanii*) producen blastosporas por FS (Ravensberg, 2011).

Dos especies de hongos entomopatógenos, como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, han sido

ampliamente estudiados. Ambos hongos tienen un amplio rango de hospedadores y son relativamente fáciles de producir. *B. bassiana* ha sido y sigue siendo producido a gran escala en muchos países mediante fermentación en estado sólido (FES), fermentación sumergida (FS), y fermentación bifásica (Ravensberg, 2011). *M. anisopliae*, usualmente se produce por FES, aunque la producción de blastosporas por FS también se ha estudiado (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017). La mayoría de los productos del mercado se basan en conidiosporas, y algunos en conidios e hifas en un sustrato granular. Según Ravensberg (Ravensberg, 2011), al 2011 en el mercado no existía un producto basado en blastosporas.

Los hongos utilizados para el control de las enfermedades de las plantas (hongos antagonistas), los nemátodos fitopatógenos y las malas hierbas, generalmente se producen masivamente de forma similar a los hongos entomopatógenos (Ravensberg, 2011). Los aspectos relevantes de la producción masiva considerados en esta revisión también son relacionados con estos hongos, independientemente de su uso en el campo.

### 3.1 Fermentación sumergida (FS)

La FS como su nombre lo indica, consiste en el crecimiento de microorganismos en sistemas totalmente líquidos. En la FS los procesos de transferencia de masa y la homogeneidad son superiores en comparación con los procesos de la FES, favoreciendo el control y el tiempo del proceso (Pandey *et al.*, 2000; Jaronski y Mascarín, 2016), así como la cantidad de inóculo y espacio requerido para la producción (Manan *et al.*, 2017). Adicionalmente, en este proceso se puede recuperar fácilmente tanto el propio microorganismo como los productos enzimáticos y metabolitos extracelulares que exhiben actividad biocontroladora. Utilizando sensores y controladores para el pH, la velocidad del agitador, la velocidad de aireación, la temperatura, y otros elementos de control, se puede prever con precisión el momento para la cosecha de esporas para el posterior proceso de formulación y también se puede realizar un mejor seguimiento y control del proceso en tiempo real (online). El atractivo de la FS es su capacidad de ampliación masiva, utilizando equipos de fermentación líquida comercial. No obstante, la producción a escala comercial requiere una inversión inicial considerable en equipos de fermentación y de separación, por ejemplo, grandes centrifugas para la separación de las esporas dejando

gran cantidad de agua residual. Otro problema encontrado en la FS, en algunos casos, dependiendo de la cepa, es la alta producción de espuma que disminuye la transferencia de oxígeno. Adicionalmente, los medios utilizados en FS pueden ser más costosos que en FES (Manan *et al.*, 2017).

La FS se puede clasificar en dos categorías: fermentación líquida sumergida, donde el hongo se sumerge en un medio líquido constantemente agitado y aireado para formar blastosporas, conidios de microciclo o microesclerocios, y fermentación líquida estacionaria, en la cual la esporulación tiene lugar en una superficie líquida e inmóvil, produciendo micelios y conidios aéreos (Jaronski y Mascarín, 2016).

Los productos finales de la fermentación líquida sumergida pueden ser blastosporas, conidios "microciclos", productos miceliales estabilizados o microesclerocios (*Metarhizium* y *Nomuraea* solamente) pero no conidios aéreos. La mayoría de los hongos anamórficos hipocreales crecen simultáneamente como blastosporas y filamentos de hifas, por lo que obtener concentraciones adecuadas de blastosporas puras o conidios de microciclo puros no han sido exitosas a nivel industrial (Jaronski y Mascarín, 2016). A pesar de las ventajas de FS, la producción de esporas en condiciones sumergidas para algunos agentes fúngicos, ha conseguido un éxito limitado; cuando el sistema es agitado la formación de esporas no ocurre en la superficie ya que se dispersan en el medio resultando en un rendimiento por unidad de volumen muy bajo; además, en la mayoría de los casos, se obtienen varios tipos de células que contribuye también al menor rendimiento de esporas, lo que provoca la utilización de un volumen de fermentación mayor para una cantidad dada de la espóra deseada (Jaronski y Mascarín, 2016).

La producción de una determinada espóra depende de la especie de microorganismo, la cepa, el medio de producción y los parámetros del proceso. La mayor parte de las investigaciones sobre la FS está dirigida a la producción de blastosporas (Ravensberg, 2011). No obstante, la conidiación de *Hirsutella thompsonii*, un patógeno de varios áfidos y ácaros, se obtuvo en condiciones sumergidas (Deshpande, 1999). Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 1987) reportaron la producción de conidios de *B. bassiana* en FS manipulando cuidadosamente la composición del medio. Aunque la superficie de los conidios producidos en el interior del medio era diferente a la de los conidios aéreos, estos exhibían un nivel similar de virulencia. Por otra parte,

Mascarin *et al.* (2015) consiguieron blastosporas de *B. bassiana* ARSEF 6444 e *I. fumosorosea* ARSEF 3581 resistentes a la desecación y con alta estabilidad de almacenamiento cuando fueron cultivadas en medio líquido que contenía harina de semilla de algodón, a una concentración  $>1 \times 10^9$  cc<sup>-1</sup> después de 3 días de fermentación y bajo condiciones de operación controladas. Adicionalmente, *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 produjo una alta concentración de conidios ( $9,55 \times 10^8$  conidios/cc) y microesclerocios ( $2,59 \times 10^4$  MS/cc) a los 7 días, con una relación C:N de 50:1 cuando creció en un medio líquido conteniendo melaza y harina de semilla de algodón, las hifas se agregaron a los 2 días de fermentación y a los 7 días las microesclerocios estaban completamente melanizadas (Kobori *et al.*, 2015). También tres especies de *Bauveria* produjeron exitosamente microesclerocios ( $6,18 \times 10^3$  MS/cc) en FS utilizando medios de cultivo con una relación C:N de 5:1 y 4:1 y la fuente de carbono era licor de maíz (Villamizar *et al.*, 2018). Shukla *et al.* (Shukla *et al.*, 2016) reportaron que *Trichoderma candidum* creció adecuadamente en FS obteniéndose  $94,7 \times 10^8$  ufc/cc, usando como medio de cultivo melaza de caña, extracto de levadura y salvado de trigo.

También fue investigada la producción potencial y la tolerancia a la desecación de microesclerocios por cepas brasileñas de *M. anisopliae* (Ma), *M. acridum* (Mc) y *M. robertsii* (Mr). Se demostró que estas cepas de *Metarhizium* spp fueron capaces de producir microesclerocios estables, tolerantes a la desecación en un medio líquido de bajo costo relativo (16 g de C dmc<sup>-1</sup>) después de 5 días (Mascarin *et al.*, 2014).

### 3.2 Fermentación en estado sólido (FES)

Los medios sólidos presentan el mejor lugar para la producción de esporas fúngicas, gracias a que la esporulación ocurre en la superficie y en las cavidades con espacios libres (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015). La literatura científica evidencia que existe amplio interés y conocimiento en el proceso de FES, ya que es utilizado en varias aplicaciones como la producción de biomasa, enzimas, metabolitos secundarios, y la producción de esporas (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2000). Las aplicaciones de FES a nivel industrial tienen un limitado espectro de uso, no obstante, el proceso de producción de micoplaguicidas ha sido exitoso (Pandey *et al.*, 2000).

Este sistema de fermentación para la obtención de micoplaguicidas se justifica

debido a que las esporas infecciosas, como las conidiósporas, de forma general, sólo pueden ser obtenidas de forma eficiente por FES; como se argumentó en la sección 3.1 muchos hongos en FS no esporulan bien. Otra ventaja es la posibilidad de utilizar como sustratos residuos sólidos provenientes de diferentes agroindustrias, lo cual se ha venido favoreciendo en algunos países donde el uso de residuos sólidos orgánicos se ha convertido en un imperativo por fuertes regulaciones ambientales (Pandey *et al.*, 2000).

La producción de micoplaguicidas por FES se puede llevar a cabo mediante métodos simples, p.e. creciendo sobre un soporte / sustrato, a menudo granos de cereal naturales o enriquecidos, en bolsas plásticas autoclavables o en bandejas. Este método se utiliza a menudo en países en desarrollo o en situaciones donde la mano de obra es relativamente barata o las inversiones son bajas (Mordor Intelligence, 2016; Ravensberg, 2011). Con la utilización de sistemas artesanales FES, los costos de puesta en marcha son bajos, la tecnología utilizada es relativamente simple y la mano de obra es alta; sin embargo, el proceso tecnológico puede ser exitoso como el proyecto Lubilosa (sección 3.6).

También pueden ser utilizados biorreactores más sofisticados para la FES. En estos reactores, las condiciones ambientales pueden regularse mucho mejor que en bolsas o bandejas, por ejemplo, mediante un flujo de aire acondicionado, calefacción o refrigeración. En estos casos, las inversiones son bastante altas y el aporte laboral es medio (Ravensberg, 2011).

Es necesario destacar que la FES presenta ventajas sobre la FS como: facilidad en la aireación y no es necesaria la agitación; el uso de reactores con volúmenes reducidos de medios de fermentación debido a la ausencia de fase líquida y a la baja humedad de los sustratos, lo que además conlleva a la minimización de los efluentes generados. Las materias primas utilizadas como sustratos son económicas y por lo general tienen alta disponibilidad e ingredientes esenciales para el desarrollo de los hongos, por lo que permite economizar reactivos; en ocasiones se puede usar la materia prima sin esterilizar lo que contribuye a la disminución del capital invertido y al gasto energético y, lo que es más importante, las esporas producidas como propágulos vivos tienden a ser más tolerantes a la desecación y más estables como preparación seca en comparación con las esporas producidas en FS (Deshpande, 1999).

La FES, también tiene algunos inconvenientes en comparación con la FS tales como: la generación de calor metabólico, difícil medición y control de parámetros de fermentación en tiempo real (pH, contenido de agua, biomasa), el pretratamiento de sustratos, el tamaño del inóculo es grande por lo general más del 10%, heterogeneidad en el sustrato lo que genera gradientes de concentraciones de los nutrientes, mantenimiento de la pureza del cultivo, largo tiempo del proceso, entre otros (Manan *et al.*, 2017). Sin embargo, este tipo de fermentación estimula las condiciones de crecimiento de varias cepas fúngicas y es el tipo de fermentación para seleccionar cuando la diferenciación metabólica o morfológica es innecesaria, como es el caso de la producción de esporas (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015).

### 3.3 Principales sustratos de producción en FES

Como se mencionó anteriormente, las esporas de los hongos entomopatógenos son la base de la mayoría de los micopláguicidas; por lo que la selección de sustratos para que estos microorganismos crezcan es muy importante para su producción. Debido a esto, una amplia variedad de sustratos ha sido utilizado, ya sean naturales, pretratados, subproductos agroindustriales, sustratos químicos definidos y/o la combinación de estos. Como requisito general estos sustratos deben garantizar la disponibilidad de los nutrientes necesarios para el crecimiento y esporulación de los microorganismos y al mismo tiempo no deben afectar la actividad biológica de los mismos. Los medios de producción diseñados deben contener una adecuada relación de carbono vs. Nitrógeno, adicionalmente, en algunos casos el medio debe suplementarse con sales, vitaminas, microelementos, cofactores y/o inductores que favorezcan el desarrollo y/o la eficacia biocontroladora de los microorganismos.

Una etapa importante en el desarrollo de los procesos de producción es el diseño y optimización del medio para crecimiento de los microorganismos a escala industrial. Durante esta etapa, se busca reducir los costos de los medios ya que estos pueden llegar a representar entre el 35 al 59% del costo de producción del biopláguicida (Rivero *et al.*, 2017). El objetivo es garantizar las cantidades necesarias de los compuestos que tiene efecto importante sobre el crecimiento de los microorganismos y en su actividad biocontroladora. Se debe determinar los compuestos limi-

tantes y eliminar o reducir las concentraciones de los compuestos que puedan tener un efecto inhibitor en el crecimiento del hongo. Por ejemplo, se ha observado que el fósforo puede modular la producción de metabolitos con actividad biológica en *Actinomicetos* (Grahovac *et al.*, 2014). En otro estudio, Morid *et al.* determinaron el efecto positivo de algunos micronutrientes como el manganeso sobre la producción de quitinas en algunas especies de *Trichoderma* (Morid *et al.*, 2013). Kim *et al.* (2014) aumentaron la virulencia y el rendimiento en la producción de los conidios de un aislamiento de *Isaria javanica* cuando utilizaron una mezcla de cebada, CaCO<sub>3</sub> y CaSO<sub>4</sub> al 2% en comparación del uso de arroz prieto como sustrato. Para el caso de *B. bassiana* BNBCRC por medio de un proceso de optimización se determinó que las variables importantes en la producción de esporas fueron el uso de urea, peptona y MgSO<sub>4</sub>, logrando una concentración de 4,71×10<sup>8</sup> esporas/g (Petlamul *et al.*, 2014)

Los medios con sustratos químicos definidos permiten procesos más reproducibles, sin embargo, sus altos costos comparados con los sustratos naturales podrían disminuir su aplicación en procesos de producción de esporas (Ooijkaas *et al.*, 2000). Generalmente los medios con sustratos químicos definidos son más utilizados en procesos de FS donde un ambiente nutricional homogéneo se puede mantener y monitorear más fácilmente comparado con la FES (Jackson, 1997).

Los sustratos naturales pueden ser granos, cereales, salvados (trigo, arroz, soja, cebada), tortas oleaginosas (soja, oliva, sésamo), entre otros. Estos suelen utilizarse en sistemas de producción en estado sólido, donde además de suplir los requerimientos nutricionales cumplen también una función de soporte para crecimiento del hongo (Ooijkaas *et al.*, 2000). Generalmente estos sustratos deben cumplir con ciertas características como la porosidad, mayor área superficial por unidad de volumen y buena capacidad de absorción de agua con el fin de garantizar la velocidad adecuada de los procesos bioquímicos en la interfase sólido/líquido (Grande-Tovar, 2016). Durante el desarrollo del biopláguicida Tricotec, a base del hongo *T. koningiopsis* Th003 se estudiaron diferentes cereales en grano entero o molidos, individuales o en combinación, como, por ejemplo: arroz, millo, trigo, cebada, y salvado de trigo. También, se probó un residuo agroindustrial (bagazo de caña de azúcar pretratado por hidrólisis ácida) (Cañón-Amaya, 2010). La combinación de arroz con salvado de

trigo resultó ser el mejor sustrato logrando concentraciones de  $8,4 \times 10^9$  conidios/g de sustrato (Cañón-Amaya, 2010; Peña, 2002). Otro ejemplo, es la producción de esporas de *B. bassiana* para diferentes cepas GHA-726, CA-603 y MCC0044 donde se probaron medios que contienen granos enteros de maíz, trigo, arroz, cebada, residuos agroindustriales como el bagazo de caña y el permeado de suero. La mejor producción ( $8,13 \times 10^9$  conidios / g de sustrato) se alcanzó con el uso de granos arroz (Kassa *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2016). Para la producción de esporas de *L. lecanii* se estudiaron diferentes combinaciones de sustratos y soportes. Los sustratos utilizados fueron sorgo, grano de arroz, grano de arroz partido, polvo de arroz, y como soporte se probaron bagazo de caña, cascarilla de arroz, y “olote” de maíz. El mejor resultado se obtuvo cuando se usó bagazo de caña como soporte y arroz como sustrato con una producción de  $8,4 \times 10^8$  conidios/g (Cortez-Madrigal, 2007).

No obstante, los sustratos naturales presentan ciertas desventajas, como es el deterioro de la estructura del material, debido a los cambios en sus características físicas y geométricas causados por el crecimiento de los hongos, reduciendo o haciendo poco eficientes los procesos de transferencia de calor y masa. Este problema, se puede resolver utilizando un soporte inerte con una estructura física constante, como la espuma de ambarlita o poliuretano, que puede mejorar la transferencia de calor y de masa (Cruz-Barrera, 2014; De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015; Ooijkaas *et al.*, 2000; L. Thomas *et al.*, 2013). El uso de soportes inertes, tiene otras ventajas como la recuperación de la biomasa es más fácil, se puede lograr un diseño adecuado del medio de producción y un mejor balance de masa para procesos avanzados de modelación y control (Cruz-Barrera, 2014; Ooijkaas *et al.*, 2000).

Los subproductos de las diferentes agroindustrias también se pueden utilizar como sustratos, ayudando a reducir los costos de los medios, valorizando un desecho, y disminuyendo el impacto ambiental de los mismos. Por lo general, estos residuos terminan siendo incinerados, llevados a rellenos sanitarios o vertidos en fuentes hídricas (Gonzalez *et al.*, 2017), desaprovechando el alto contenido de azúcares y proteínas que pueden ser usados en otros procesos como sustratos. En algunos casos estos residuos pueden necesitar pretratamiento (físico, químico o biológico) y/o acondicionamiento para liberar azúcares fermentables a partir de

los polisacáridos no degradables por los microorganismos. También es importante tener en cuenta la variabilidad en la composición de los residuos, su disponibilidad local dependiendo de la temporada del año (Jaronski y Mascarín, 2016). En la mayoría de los casos estos residuos son utilizados en FES, para la producción de biocombustibles, enzimas, vitaminas, antioxidantes, antibióticos y/o metabolitos, donde el valor potencial del producto soporta los costos asociados a los pretratamientos de los sustratos si son requeridos durante el proceso (Sadh *et al.*, 2018). Los residuos líquidos que se han utilizado provienen principalmente de las industrias lácticas y azucareras como son las melazas (Santis Navarro, 2014), los sueros (Bena-Molaei *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2014; Mourin *et al.*, 2015) y los desechos de las plantas de tratamiento de agua municipales (Latifian *et al.*, 2013; Yazid *et al.*, 2017; Zacharof *et al.*, 2015). Por ejemplo, como medio alternativo para la producción de esporas de *B. bassiana*, (Bena-Molaei *et al.*, 2015) utilizaron permeado de queso al 20%, obteniendo una concentración de  $3,3 \times 10^8$  blastosporas/cc a los siete días después de la inoculación. En la Tabla 1 se muestran algunas patentes de FES, FS y fermentación bifásica (líquido-sólido) para la obtención de micopláguicidas utilizando como sustratos subproductos agroindustriales.

### 3.4 Factores que influyen en el proceso FES

Un microorganismo puede utilizar todos los nutrientes para el crecimiento micelial, y, sin embargo, la esporulación puede no ocurrir. De hecho, la esporulación puede estar dada por la influencia de factores nutricionales como las fuentes de carbono y nitrógeno, el inóculo, entre otros. Además, factores ambientales como la temperatura, la luz conjuntamente con el pH pueden afectar el crecimiento vegetativo, la esporulación, y la germinación de las esporas. Otro factor que puede influir en la esporulación es la agitación del medio sólido que puede destruir una parte de las formas reproductivas de los hongos, y como consecuencia, los índices de esporulación van a ser menores en comparación con los medios sin agitar.

Además, en el caso de la FES, se debe tener en cuenta la humedad del sustrato a utilizar porque cuando existe agua en exceso, el rendimiento de esporulación disminuye debido a que el agua pasa a ocupar las cavidades, lo que reduce los espacios libres para el desarrollo de las formas de reproducción del hongo (Priyanka-Dhar, 2011).

Tabla 1

Patentes de obtención de microplaguicidas a partir de subproductos agroindustriales\*

Título	Hongo	Sustrato	Tipo de fermentación	Resultado	Año
MX2013007218A-Method for producing <i>Trichoderma</i> spores by solid-state fermentation using mango residues	<i>T. asperellum</i> T8a	Residuos de mango	FES	76,3 ± 205 x 10 <sup>8</sup> esporas/g de sustrato seco	2014
US2002094563A1-A method of solid state fermentation for <i>Nomuraea</i> fungal spores demanding high nutrients	<i>Nomuraea rileyi</i>	Arroz mezclado con levaduras, miel, leche de pescado y agua	FES	2,6x10 <sup>10</sup> esporas/g seco de arroz	2002
CN106834136A- <i>Paecilomyces lilacinus</i> and large-scale preparation method thereof	<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain INTR-2	Pajas de maíz	Fermentación bifásica	7,2x10 <sup>12</sup> esporas/g de sustrato seco	2017
CN102696689A-Method for producing <i>Trichoderma</i> bio-control agent by utilizing fermentation of pseudo-ginseng dregs	<i>T. viride</i> 3.3711 y <i>T. koningii</i> 3.2774	Residuos de ginseng	FES	No reporta	2012
CN102613252A-Method for producing <i>Trichoderma</i> sp. biological control agent from potato starch waste water and mushroom residues	<i>Trichoderma harzianum</i>	Residuos acuosos de la obtención de almidón de papa y los residuos de producción de champiñones	Fermentación bifásica	3x10 <sup>9</sup> esporas/g de sustrato seco	2014

\* Patentes buscadas en www.patentinspiration.com con las palabras claves: production technology + nombre del microorganismo.

El efecto del estrés acuoso se manifiesta en un mayor índice de esporulación, este aspecto es importante a la hora de diseñar el proceso fermentativo (De la Cruz-Quiroz et al., 2015). Por ejemplo, se reportó un rendimiento de *B. bassiana* en el orden de 2,88x10<sup>10</sup> conidios/g de sustrato, usando una mezcla de arroz y salvado de trigo con un 35% de humedad y 1,5% de extracto de levadura (Priyanka-Dhar, 2011). En este reporte se evidenció que la humedad del sustrato es un parámetro que tiene gran influencia sobre el rendimiento de conidios de *B. bassiana*, al demostrar que usando una humedad superior al 60% el rendimiento de esporas disminuye en aproximadamente un 30%.

La concentración de conidiosporas de *M. anisopliae* fue determinada usando diferentes medios de cultivos, como son el arroz, cebada y sorgo (Bhanu-Prakash et al., 2008). En cada uno de estos sustratos se optimizó la producción de conidiosporas evaluando el pH, contenido de humedad, y la concentración de extracto de levadura. Estas tres variables resultaron significativas, en la producción de conidiosporas de *M. anisopliae*, aunque para cada sustrato evaluado, las tres variables estudiadas fueron diferentes en las zonas de óptimos resultados. Cuando el sustrato usado fue el arroz, la condición de humedad y pH donde se obtuvo el máximo de conidiosporas (5,25x10<sup>10</sup> conidiosporas/g) fue de 23% y 7,01, respectivamente. Para el sorgo y la cebada la producción óptima de conidios se obtuvo en un rango de humedad de 73-76%. En los tres sustratos usados, el rango

de pH óptimo estuvo entre 6,7 y 7,1 y el sustrato arroz fue que necesitó la menor concentración de extracto de levadura.

El efecto de la edad y tamaño de inóculo en los resultados de la fermentación ha sido menos abordado en la literatura, pero se encuentra muy bien argumentado en el artículo de revisión de Muñiz-Paredes et al. (2017). Como plantean los autores, en algunos casos, es recomendable un tamaño de inóculo alto (> 10% m/m) para minimizar el tiempo de fermentación.

Con respecto a la temperatura, los hongos entomopatógenos son microorganismos mesófilos y la temperatura óptima para la producción de conidios varía entre las diferentes especies y las cepas de la misma especie (Muñiz-Paredes et al., 2017). Para el caso de *N. rileyi* Nm006, después de 7 días de fermentación a 25 °C creciendo sobre una leguminosa en bolsas de polietileno, influyó positivamente un choque térmico a 5 °C durante 3,45 horas sobre el rendimiento, germinación y eficacia de los conidios (Santos-Díaz, 2014). También, la producción de conidios por *I. javanica* cultivada en arroz fue dos veces mayor cuando se cultivó a 25 °C en comparación con 20 °C (Xie et al., 2016).

La aireación es un factor muy importante que influye en el crecimiento y la esporulación, ya que los hongos entomopatógenos son organismos aeróbicos. Este parámetro puede ser optimizado en biorreactores de columna o bandeja. La aireación forzada, además de suministrar los requerimientos de oxígeno en el sistema de FES, permite el desplazamiento de CO<sub>2</sub> y calor producidos

por el metabolismo microbiano (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015). Van Breukelen *et al.* (2011) estudiaron el uso de varios tipos de medios, comparando dos bioreactores: lecho estático compacto con aireación y tambor rotatorio por rozamiento para el crecimiento de *M. anisopliae*. En el tambor rotatorio *M. anisopliae* fue incapaz de crecer, pero en el reactor de lecho empacado obtuvo un rendimiento de conidios de  $8 \times 10^9$  conidios/g usando cáñamo impregnado en una solución de glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica. Estos resultados fueron comprobados a en un reactor de lecho compacto con aeración con un volumen útil de 20 decímetros cúbicos (Van Breukelen *et al.*, 2011). En este estudio, las diferentes tasas de aireación no afectaron la producción de conidios de *M. anisopliae* IMI330189 en biorreactores de columna.

Recientemente, Liu *et al.* (2018) reportaron el crecimiento y producción de conidios basados en la formación de picnidios de *Conithyrium minitans* utilizando el sistema FES en un equipo con doble paso dinámico de gas diseñado por los propios autores. Este fue un proceso periódico de alternancia de alta y baja presión con el cual se incrementó la producción de biomasa en un 48,6% y la formación de picnidios.

Existen varios tipos de biorreactores disponibles para FES, entre ellos: reactores mixtos, reactores no mixtos con enfriamiento conductivo, reactores no mixtos con enfriamiento por evaporación. Varias compañías utilizan estos bioreactores para la producción de micopláguicidas, p.e. Koppert, Laberlam y Propytha, la cual desde el 2013 opera bajo el nombre de Bayer CropScience Biologics GmbH (Ravensberg, 2011; Farm Industry News, 2018). Sin embargo, para la mayoría de los procesos industriales existentes en la producción de hongos en los países en vías de desarrollo, se aplican extensivamente el sistema de bolsa de polietileno y camas rellenas aireadas (sistema de bandejas) (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2015; Van Breukelen *et al.*, 2011). Estos sistemas no requieren aireación forzada y el intercambio gaseoso natural con el ambiente es suficiente (Lopez-Perez *et al.*, 2015). Dentro de las ventajas de usar las bandejas y bolsas están la facilidad de implementación y la poca inversión.

El proceso en sistema de bandejas tiene algunas variables que pueden ser modificadas para mejorar los parámetros rendimiento y concentración de conidios. Por ejemplo, Xie *et al.* (2012) estudiaron la producción de conidios aéreos por *B.*

*bassiana* usando arroz como sustrato en un proceso de FES en bandejas. Se estudió la variación en el grosor y el área de superficie del sustrato en cada bandeja. Los resultados demostraron que usando un grosor del sustrato de 2 cm y cortándolo en varias piezas pequeñas (6 cm x 4 cm x 2 cm) aumenta el área superficial del sustrato, y la transferencia metabólica de calor y gas, podría mejorarse. Bajo estas condiciones, el rendimiento de los conidios se incrementó significativamente con respecto a la condición base. Adicionalmente, los cultivos de arroz al finalizar la FES se secaron más fácilmente. Esta variación en el proceso, que no requiere equipamiento complicado, aumentó el rendimiento de los conidios en un 45%.

Otro estudio reportó el uso de campos electromagnéticos para aumentar el rendimiento de conidios de *T. harzianum* Rifai cepa A34, crecidas en bandejas usando como sustrato bagazo de caña y cascarillas de arroz. Al aplicarle campos electromagnéticos por 15 minutos por día durante 14 días, el rendimiento se incrementó al orden de  $10^{11}$  conidios/g de sustrato en comparación con el control (sin aplicación de campo electromagnético) que fue del orden de  $10^9$  conidios/g de sustrato. También, con la aplicación de los campos electromagnéticos la densidad aparente de las partículas se incrementó lo que favorece el proceso de separación y formulación (Torres-Brizuela *et al.*, 2017).

Además, existen otros factores importantes para la producción óptima de conidios como el tamaño de partículas del sustrato, el uso de texturizantes y aditivos, y la modificación de la relación C/N, entre otros (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017). No obstante, si bien las variables específicas y sus valores están optimizados para algunas cepas, esta información debe ser considerada cuidadosamente para el estudio de cada cepa en particular.

### 3.5 Procesos de separación o cosecha

La recuperación de las esporas del sistema de producción en masa es una parte intrínseca del proceso. En la mayoría de los casos, las esporas deben separarse del medio y este proceso no debe influir negativamente en la calidad de las mismas y el porcentaje de recuperación debe ser tan grande como sea posible. Los métodos de cosecha dependen del sistema de producción ya sea de la FS o FES; los aparatos típicos son centrifugas, separadores, equipos de tamizado y molienda, y maquinaria para esporas secas o medio-transportador con esporas o micelio, como

un secador por pulverización, un secador de lecho fluidizado, un liofilizador o un sistema de forzado más simple, soplador de aire. Estos equipos son necesarios para concentrar las esporas de la fase de producción y en el proceso de formulación (Ravensberg, 2011).

Las esporas de los hongos son relativamente delicadas, por lo que su separación del sustrato debe ser un proceso seguro y eficiente. La cosecha a menudo significa un cambio repentino en las condiciones y se debe tener cuidado para evitar daños potenciales a las mismas por choque osmótico, temperaturas bajas o altas, desecación, fuerzas de corte o alta presión. Existen básicamente dos métodos de cosecha de las esporas en FES: por vía húmeda y por vía seca. La factibilidad de aplicación de cosecha de uno u otro método dependen de ciertas propiedades como: las características del microorganismo, propiedades del sustrato empleado, método de fermentación, y formulación final del producto a comercializar.

Por vía seca tradicionalmente y de forma artesanal se ha logrado la colecta con tamices manuales, lo que permite obtener un polvo con determinado tamaño de partícula según el tamaño del poro de la malla. Este método es laborioso y consume mucho tiempo, además de formar muchos aerosoles de esporas con riesgo respiratorio para el personal expuesto, y la uniformidad de las partículas físicas no es homogénea, además de no tener alta eficiencia en la separación (Martínez *et al.*, 2013). También, se utilizan otras alternativas como la tecnología de lecho fluidizado y ciclón a partir de sustratos sólidos. Para este caso de separación de esporas a partir de sustratos sólidos, se ha sido diseñado y mejorado durante años, un equipo específico para la colecta de esporas de algunos hongos micopláguicidas, el Mycoharvester que consiste en la tecnología de ciclón dual (Mycoharvester, 2017). Entre las ventajas de usar el Mycoharvester para la separación de esporas están: 1) separación de las esporas con alta calidad, 2) seguridad del operador, 3) proceso rápido y efectivo económicamente y 4) mejoramiento de las técnicas de almacenamiento debido a la concentración de las esporas producto del secado. Esta tecnología se ha usado con éxito a nivel industrial para separar esporas de varios hongos entre ellos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Purpureocillium* spp., *Neurospora crassa* y *Trichoderma* spp. También, las esporas de *T. harzianum* Rifai cepa A34 creciendo sobre un sustrato

que mezcla arroz partido (de desecho de los molinos) y cáscara de arroz, fueron separadas por tamizaje vibratorio, que, si bien produjo un menor rendimiento de esporas en comparación con Mycoharvester debido a un mayor daño mecánico de las esporas, las esporas obtenidas fueron más estables al ser almacenadas por largos períodos de tiempo usando agentes desecantes como sílica gel y en refrigeración (Claro *et al.*, 2009).

La separación por vía húmeda es factible cuando la morfología y características propias del microorganismo y el sustrato lo permita, así como cuando la formulación final del producto lo requiera. Esta separación se hace a través de agitadores / separadores donde previamente se determina el tiempo y velocidad de agitación óptimos. En comparación a los métodos de separación en seco, en este método en húmedo, se le adiciona al sustrato con los conidios un determinado volumen de solución con tensoactivo para proceder a la separación (cuando es FES). A nivel de laboratorio y plantas piloto se utilizan lavadoras como aparatos de agitación. Luego, el líquido se pasa por filtros prensa para separar el sustrato sólido de la suspensión que contiene las esporas. Finalmente, la suspensión se centrifuga para precipitar las esporas y separarlas del sobrenadante.

Liu *et al.* (2015) compararon varios métodos de separación de las esporas de *B. bassiana*: ciclón dual (Mycoharvester), tamizaje y elución (separación en húmedo) usando una solución de tween 80 al 0,02%. El mejor resultado fue alcanzado cuando se usó la separación en seco con ciclón dual, alcanzando un rendimiento de esporas de 12,6 mg/g de biomasa y una concentración de  $1,8 \times 10^{10}$  esporas/g.

En general, existe poca información disponible para uso público de los métodos de separación de esporas a partir de sustratos sólidos y su eficiencia para productos usados en el biocontrol de plagas agrícolas. Además, la información disponible no brinda datos críticos del proceso, probablemente por constituir secretos industriales de los procesos de producción de biopláguicidas.

### 3.6 Producción de micopláguicidas a gran escala por FES

Diversas publicaciones (Castillo-Lopez *et al.*, 2014; Jenkins *et al.*, 1998; Kobori *et al.*, 2015; Mascarín *et al.*, 2014; Michel-Aceves *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2016) abordan la producción masiva de hongos para control biológico, aunque la

mayoría describe investigaciones sobre la optimización de la producción de conidios para una cepa específica en un determinado sustrato, pero pocas veces van más allá del nivel de laboratorio.

También se hace difícil la comparación entre los procesos de producción que se publican debido a las diferencias en la forma en que se reportan los resultados obtenidos. Esto hace que la comparación de la eficiencia y la capacidad de sistemas de producción similares sea complicada. Según Jenkins *et al.* (1998) para evaluar un sistema de producción de esporas, los siguientes parámetros son esenciales 1) Rendimiento que describe el número de conidios producidos por gramo o kilogramo de sustrato, tomado como el valor medio sobre un número de ciclos de producción, 2) concentración de conidios en el producto final, descrito como el número de conidios por gramo final de producto después de la extracción y formulación, 3) cantidad de sustrato usado para cada ciclo de producción, tomado como la media del número de ciclos, 4) rendimiento, que es descrito como el número máximo de ciclos de producción posibles por año (u otro intervalo de tiempo) y por ultimo 5) frecuencia de aplicación en campo que está medido como la dosis del producto por hectárea depende si el producto es para aplicación foliar, para tratamiento a la semilla o para usar en sistemas de trampas en los cuales las hectáreas protegidas pueden ser mayores que cuando es otro tipo de aplicación.

También se debe tener en cuenta que el sistema de producción es solo una parte del gran engranaje que las empresas productoras de bioproductos agrícolas deben cumplir. Es imperante considerar situaciones como la prevención de la contaminación, potencia de las formulaciones, atenuación de la actividad biológica, y/o el deterioro físico del producto formulado. Por lo tanto, se necesita experiencia, materiales, equipos, el capital humano para hacer frente a los inconvenientes que se pueden presentar. Por tal razón, se debe evaluar en detalles la economía de escala de las plantas productoras, ya que puede ser más eficiente financiar menos plantas, pero con mayor capacidad, ya que como se ha demostrado, la producción de bioproductos para control biológico no es barata, un hecho que limita aún más su rentabilidad y atractivo comercial (Skovmand, 2007).

La economía de escala podría proporcionar una forma de disminuir los costos en tres áreas: capital, trabajo y materiales. Las

mejoras en la tecnología de producción deberían ser un objetivo continuo de investigación, así como también reducir los costos de producción. Al diseñar una planta de producción y un proceso de producción, las posibilidades y ventajas de la ampliación deben ser parte del plan de negocios en caso de que aumente la demanda del mercado (Ravensberg, 2011). La optimización de las condiciones de fermentación y los componentes del medio pueden ser rápidamente alcanzadas a nivel de laboratorio, mientras que una fermentación a escala piloto ayuda a la verificación efectiva de los parámetros seleccionados. No obstante, las condiciones requeridas para alcanzar los rendimientos óptimos, costos asequibles y la eficiencia a escala industrial pueden ser más difícil de alcanzar. Entre los factores biológicos que son necesarios monitorear están la estabilidad del cultivo, el número de generaciones; y entre los parámetros físicos están el pH, la calidad del agua y del medio de fermentación. Estos factores, a escala de laboratorio, tienen una importancia limitada, pero al aumentar la escala de producción pueden tener un peso significativo sobre la operación y diseño del proceso de fermentación.

Un ejemplo de producción de bioplaguicidas a base de un aislamiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium* para el control de plagas de langostas y saltamontes, fue el programa Lubilosa (Bateman, 2004). Este programa comenzó en el año 1990 y culminó en el 2002, contando con 4 fases, desde la investigación a nivel de laboratorio hasta la comercialización del producto. Con la ejecución de este programa se evidenció que los sistemas de producción y aplicación de los micoplaguicidas requieren de un nivel de sofisticación similares al desarrollo de plaguicidas químicos convencionales. Además, se demostró que es necesario un buen prototipo para así demostrar la eficacia del producto a los agricultores. También, el compromiso de los científicos en los centros de investigación y de las pequeñas empresas fue imprescindible para lograr el desarrollo del bioproducto así como su comercialización (Thomas *et al.*, 2007). El legado de este programa, además de mostrar un flujo del desarrollo del bioproducto muy completo incluyendo la selección de las cepas, el desarrollo de la tecnología, la aplicación en campo y los aspectos regulatorios, mostró un camino a seguir y proporcionó una base sólida para el desarrollo de bioplaguicidas a base de hongos.

Para el desarrollo de un micopláguica, se requiere un enfoque pragmático, holístico y sistemático para seleccionar al microorganismo apropiado y debe considerarse una visión amplia entre los factores que influyen en el rendimiento en campo de los bioproductos fúngicos. Así como los factores nutricionales y físicos son importantes en la fermentación, los procesos aguas abajo son claves en un sistema eficiente de producción de biomasa, esporas, metabolitos secundarios y/o enzimas. Los procesos de fermentación influyen en la selección de una tecnología de formulación apropiada que puede estar basada en limitaciones críticas como vida útil y restricciones ambientales encontradas en el desarrollo del micopláguica (Boyetchko *et al.*, 1999). El sistema de producción de esporas incluyendo los procesos de aguas abajo, la formulación y la aplicación están interrelacionadas (Figura 2). Un cambio en una de esas etapas puede influir sobre las otras y sobre la actividad biológica del bioproducto.

#### 4. Desarrollo tecnológico de micopláguicas en Latinoamérica y El Caribe

En Latinoamérica y El Caribe la industria de biopláguicas en parte está apoyada por los gobiernos y organizaciones no gubernamentales, y por algunas inversiones por parte del sector privado. Las empresas

existentes se dedican mayormente al desarrollo y producción en pequeña escala de biopláguicas principalmente microbianos (Mordor Intelligence, 2016; Rivera-Méndez, 2016). No obstante, a esta situación, la investigación sobre agentes de control biológico ha tenido una dinámica creciente en los últimos años. Al realizar una búsqueda de documentos en la base de datos Scopus, utilizando como palabra de búsqueda “fungi biopesticidas” y seleccionando los campos de búsqueda “Article title, Abstract, Keywords”, se analizó la distribución de estas publicaciones dependiendo del país de origen de los autores entre los años 2000-2018 (Figura 3). Adicionalmente, los resultados fueron filtrados solamente para incluir los países de Latinoamérica y El Caribe. Brasil, México, Chile, y Colombia son los países con mayor número de documentos publicados con relación a micopláguicas durante este periodo. Sin embargo, la mayor parte de estas publicaciones se dedican a la búsqueda y selección de microorganismos con potencial controlador, pero pocos se refieren al desarrollo tecnológico de biopláguicas. De los 97 documentos encontrados en esta revisión en Scopus, solamente el 4,1% contiene palabras claves asociadas a desarrollo tecnológico (production, culture media, y culture medium).

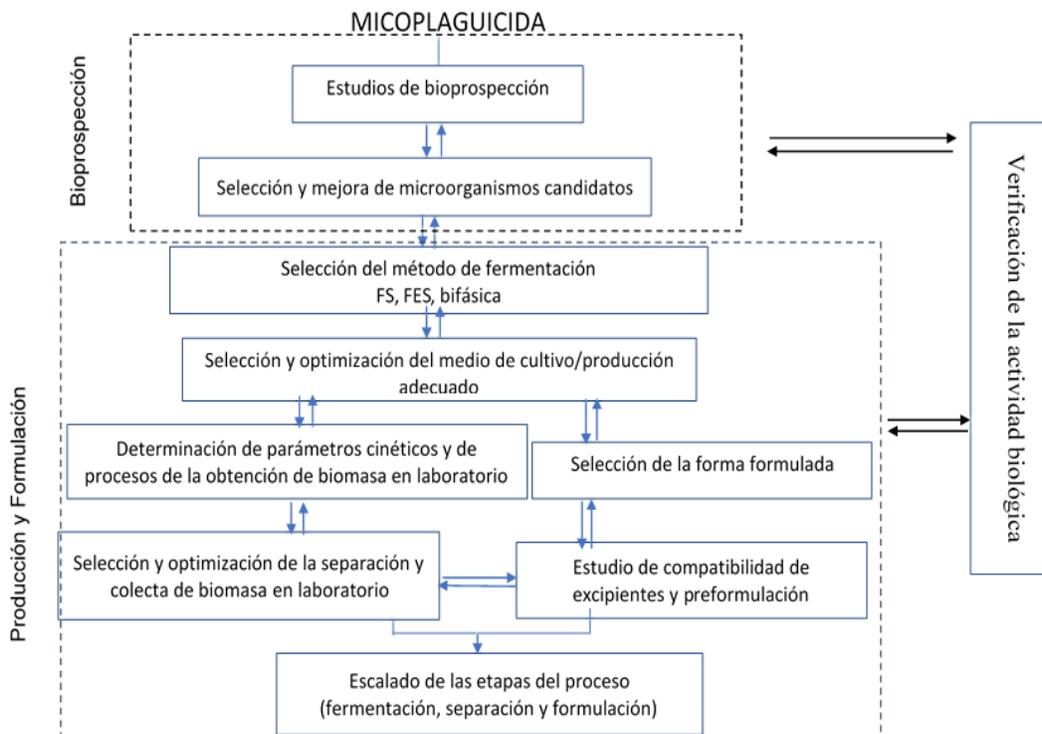
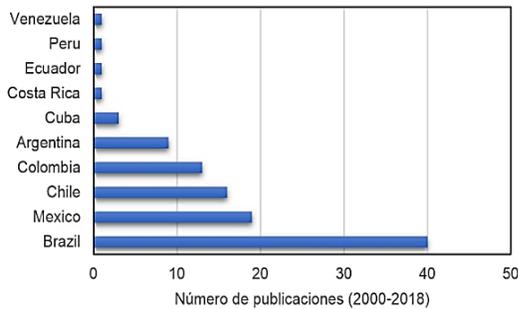


Figura 2. Flujo del proceso de desarrollo de micopláguicas.



**Figura 3.** Análisis de resultados de la búsqueda de documentos en la base de datos Scopus utilizando como palabra de búsqueda “fungi biopesticidas” y seleccionando los campos de búsqueda “Article title, Abstract, Keywords”, durante el periodo 2000-2018. Solo se analizó la información correspondiente a los 10 países de Latinoamérica y El Caribe.

En Centroamérica, la contribución económica al país de las empresas productoras de bioplaguicidas es muy pequeña al punto que en análisis macroeconómicos este sector aún no se considera (Rivera-Méndez, 2016). Principalmente, el desarrollo se realiza en universidades y algunas empresas técnicas apoyadas por los gobiernos y/o por asociaciones del sector agrícola. Un caso especial en Centroamérica es México, en donde durante los últimos años la investigación y desarrollo de bioplaguicidas ha tenido mayor expansión, debido a que muchos de los productos agrícolas son exportados bajo la denominación de alimentos orgánicos. Asimismo, el gobierno realiza campañas fitosanitarias para aplicación de bioplaguicidas como parte de programas de MIP en cultivos agrícolas extensivos de determinadas regiones del país. Para suplir la demanda interna de bioplaguicidas, México cuenta con alrededor de 68 pequeñas y medianas plantas de capital nacional que producen alrededor de 37 bioplaguicidas, 14 basados en hongos, 6 en bacterias, 15 en insectos, y 2 en nemátodos. Estas plantas están ubicadas principalmente en el centro del país, en el pacífico norte, y en el norte (Bettioli *et al.*, 2014; de León *et al.*, 2010).

El mayor desarrollo tecnológico en bioplaguicidas en el Caribe se ha dado en Cuba, donde en 1991 se incluyó en el Programa Alimentario la producción de bioplaguicidas y biofertilizantes como estrategia para enfrentar las necesidades de fertilización de los suelos y para el control de plagas de los cultivos, dada a la dificultad para importar insumos. La red de Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) se ha dedicado a la producción artesanal de bioplaguicidas basados en cinco líneas de producción;

tres de hongos (*B. bassiana*, *V. lecani*, *Trichoderma* spp), uno de bacterias (*Bacillus thuringiensis*) y uno de ácaros (*Phytoseiulus*) cubriendo principalmente la demanda local de los agricultores (Díaz *et al.*, 1994). Para realizar la transferencia tecnológica y comercialización del desarrollo científico de los distintos institutos de investigación, Cuba cuenta con el grupo empresarial LABIOFAM, donde se trabaja en conjunto para perfeccionar las tecnologías de producción de acuerdo a los estándares internacionales (Bettioli *et al.*, 2014) y para la comercialización de los productos tanto a mercados nacionales como internacionales.

En Sudamérica se destacan Brasil, Chile y Colombia como líderes en investigación de control biológico de plagas. Entre estos países, Colombia a 2010, era el país que contaba con mayor número de bioplaguicidas registrados (48). El contar con una regulación específica para el registro de bioplaguicidas ha favorecido el proceso de registro en Colombia (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2016), mientras que en Brasil y Chile SAG la regulación que se aplica es la misma que la utilizada con los plaguicidas químicos (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2016; Pelaez *et al.*, 2017). En Colombia, la Corporación de Investigación Agropecuaria de Colombia (Agrosavia) a partir de 1994 inicio un programa de investigación y desarrollo de bioplaguicidas que ha resultado en el registro ante el ICA de cinco bioplaguicidas. Dos de ellos basados en hongos (Moreno *et al.*, 2010) y tres en virus (Cubillos *et al.*, 2014, 2016; Gómez *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2014). Agrosavia cuenta con un modelo de investigación integral y un equipo de investigación multidisciplinario, que realiza desde la búsqueda de nuevos bioproductos, diseño y desarrollo de procesos de producción y formulación, hasta el licenciamiento y transferencia de la tecnología a otras empresas ya sean en Colombia o en otros países como Alemania, Brasil y Estados Unidos.

## 5. Desafíos actuales y futuros

Dentro de los productos potenciales que se encuentran actualmente en desarrollo se puede encontrar bioplaguicidas a base de las proteínas, metabolitos secundarios y enzimas producidas por hongos. Estos compuestos son secretados extracelularmente durante los procesos de fermentación, en algunos casos en pequeñas cantidades dependiendo de las especies, cepas y las condiciones de cultivo. Varios metabolitos secundarios han sido reporta-

dos como compuestos con actividad biocontroladora (Cotes, 2014, Leland, 2013; Lozano-Tovar *et al.*, 2017; Panpatte *et al.*, 2017; Patel, 2011), algunos de ellos son Beauvericina, Efraeptinas, Destruixinas, Leucinostatinas, Kantomicina, Bassiacridina, entre otros. Adicionalmente estos hongos cuentan con un poderoso sistema enzimático que incluye proteasas, lipasas, amilasas, glucanasa, quitinasas, y celulasas, que les permite convertir los tejidos de los insectos en nutrientes para su crecimiento. La **Tabla 2** presenta varios ejemplos de metabolitos secundarios y enzimas producidos por hongos entomopatógenos y con potencial biocontrolador. En muchas de las formulaciones actuales de bioplaguicidas solo se utilizan las esporas de los hongos y estos compuestos son desperdiciados en los medios usados después de la fermentación. Sin embargo, podrían ser agregados a la formulación de los bioplaguicidas actuales para mejorar su efectividad y agilizar su tiempo de acción (Deshpande, 1999). Por ejemplo, se necesitan aproximadamente 3 mg/kg de esterol fungitóxico, miconazol para destruir 50% de *Botrytis cinerea*. La inclusión de 10 mg/kg de endoquitinasa de *T. harzianum* disminuyó la cantidad de antibiótico a sólo 70 µg/kg (Deshpande, 1999).

Una nueva opción de bioplaguicidas que se encuentran bajo un rápido desarrollo son los basados en ARN de interferencia (ARNi). Este es un mecanismo biológico, que ha sido reportado en diferentes organismos eucariotas, en el cual se consigue silenciar genes mediante moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc). Por medio de este mecanismo se puede realizar silenciamiento selectivo de genes, con-

siderados esenciales para la sobrevivencia de los insectos plagas, concediendo una alta especificidad a esta tecnología (Noriega *et al.*, 2016; Seiber *et al.*, 2014). Christiaens *et al.* investigaron el uso de ARNi contra el gorgojo africano de la batata, utilizando dosis con concentraciones bajas alrededor de 1 µg ARNdc/cc agregándolo a la dieta, y lograron obtener mortalidades mayores al 50% (Christiaens *et al.*, 2016). El ARNi generalmente se aplica tópicamente a la planta o por modificación genética de la planta, sin embargo, Murphy *et al.* modificaron genéticamente levaduras para que exprese ARNdc con el objetivo de silenciar el gen *y-Tubulin* en *Drosophila suzukii*. Ellos aprovecharon la interacción simbiótica entre *Drosophila*, levadura, y plantaciones de frutas, obteniendo como resultado una disminución en la supervivencia de larvas y una reducción de la movilidad de los adultos (Murphy *et al.*, 2016).

Actualmente, el desarrollo de bioplaguicidas ha empezado a aprovechar las técnicas multiómicas de alto rendimiento, la integración computacional de los datos a través de biología de sistemas, y el uso de técnicas de recombinación de ADN, con el propósito de acelerar los procesos de bioprospección, el diseño y optimización de los procesos de producción (Trivedi *et al.*, 2017).

La búsqueda de nuevas moléculas, genes, y microorganismo se agilizará por el uso de las genomas de las plagas y hongos para mejorar el entendimiento de las interacciones que existen entre plagas-plantas-y enemigos naturales, que favorecerá el desarrollo de bioplaguicidas fúngicos más eficientes (Chandler *et al.*, 2011).

**Tabla 2**

Ejemplos de metabolitos secundarios y enzimas producidos por diferentes hongos y con varios blancos biológicos

Hongo	Producto	Blanco biológico	Referencia
<i>Metarhizium brunneum</i> Petch	Extractos crudos del hongo o parcialmente purificados	<i>Verticillium</i> causa marchitez en olivares	(Lozano-Tovar <i>et al.</i> , 2017)
<i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> y <i>V. Lecanii</i>	Combinación de esporas y extracto de enzimas, grasas y moléculas promotoras del crecimiento	Plagas de follaje e insectos de suelo	(Patel, 2011)
<i>M. anisopliae</i> F52	Combinación de esporas con proteasa comercial	Gusano de harina	(Leland, 2013)
<i>Hypocrella raciborskii</i> Zinn	ergosterol y dustanin	Ácaro araña	(Panpatte <i>et al.</i> , 2017)
<i>V. lecanii</i>	Vertilecanina A, B y c y sus ésteres de metilo	Gusano de maíz ( <i>Helicoverpa zea</i> K)	(Panpatte <i>et al.</i> , 2017)
<i>B. bassiana</i>	Basianólido	Gusano de seda ( <i>Bombix mori</i> )	(Borges <i>et al.</i> , 2010)
<i>Tolipocladium niveun</i>	Extracto lipídico	Escarabajo colorado de la papa	(Borges <i>et al.</i> , 2010)
<i>Myrothecium verucaria</i>	Producto DiTera contiene metabolitos fungicos	Nemátodos	(Twomey <i>et al.</i> , 2000)

El genoma de hongos es rico en metabolitos secundarios, y muchos de ellos aún no han sido caracterizados. Un análisis del genoma de *Metarhizium* y *Beauveria* identificó que alrededor del 80% de genes asociados a metabolitos secundarios aún no tienen un producto caracterizado (Gibson *et al.*, 2014).

Hasta hace poco muchas de las técnicas de ingeniería genética eran difíciles de aplicar en la mayoría de hongos filamentosos, principalmente se aplicaban a hongos modelos, de los cuales se tenía más conocimiento sobre su estructura molecular y bioquímica (Nødvig *et al.*, 2015). Adicionalmente debido al tamaño de los genomas de los hongos, y que muchos de los compuestos bioactivos son codificados por clúster de genes largos, la manipulación genética de los hongos era una tarea ardua y con resultados variables. Principalmente se han utilizado técnicas de mutagénesis, transformación usando plásmidos, y fusión de protoplastos para aumentar la virulencia y estabilidad en campo (Arora *et al.*, 2014). Para facilitar la manipulación genética de los hongos filamentosos, se ha desarrollado un sistema basado CRISPR-Cas9 que ha sido aplicado en diferentes especies de *Aspergillus* (Katayama *et al.*, 2016; Nødvig *et al.*, 2015), *B. bassiana* (Chen *et al.*, 2017) y *T. reesei* (Liu *et al.*, 2015). El uso del sistema CRISPR-Cas9 para la edición de genomas facilitará knock-out y/o knock-in de genes específicos (Donohoue *et al.*, 2017). Esta técnica de alta precisión ayuda en el descubrimiento de las funciones de los genes, también favorece la creación de cepas más robustas y estables y con mayor productividad mediante delección de genes no esenciales (Santero *et al.*, 2016). Por ejemplo, el rol esencial de la proteína methyltransferasa (*lae1*) en la regulación de la capacidad celulolítica en *T. reesei* fue verificado utilizando un sistema CRISPR-Cas9 para crear un mutante  $\Delta lae1$  que poseía una actividad enzimática más baja que la cepa madre (Deng *et al.*, 2017). También, CRISPR-Cas9 fue utilizado en hongos termófilos de la especie *Myceliophthora* para crear cepas hiperproductoras de celulasas, fue reportado un aumento hasta de 13 veces la actividad enzimática comparada con la cepa madre (Liu *et al.*, 2017).

Finalmente, el diseño y optimización de bioprocesos utilizando biología de sistemas ayudará a reducir los costos y el tiempo en experimentación. Utilizando modelos matemáticos de los microorganismos se logra integrar la información generada por técnicas ómicas (genómica, transcriptó-

mica, proteómica, metabolómica, y fluxómica), y se podrá predecir el comportamiento de los mismo con respecto al crecimiento y producción de subproductos deseados ante perturbaciones en el ambiente (modificaciones en los medios de cultivos), modificaciones genéticas (gene knock-out/knock-in), y cocultivo de microorganismos (Chubukov *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2017).

## 6. Conclusiones

Las tecnologías de fermentación, son fundamentales para determinar si el microorganismo seleccionado, en teoría altamente eficaz, pueda convertirse en un micoplaguicida económicamente viable. En esta etapa de desarrollo, es clave lograr el escalado eficiente del proceso basado en los elementos fundamentales de requerimientos nutricionales y físicos de cada microorganismo, teniendo en cuenta no solo la cantidad de biomasa a obtener sino también la producción de metabolitos secundarios y/o enzimas, para dar un valor agregado al bioplaguicida final. Un área clave del desarrollo de proceso es combinar los agentes de control biológico con enzimas u otros componentes derivados del metabolismo de los microorganismos, así como mayor aplicación de las técnicas ómicas para la selección, desarrollo y optimización del proceso fermentativo. Finalmente, a pesar de existir un enorme potencial para utilizar residuos agroindustriales como medio de cultivo, aún este recurso no es explotado de manera eficiente en los procesos de fermentación para obtener micoplaguicidas. Por lo tanto, es importante desarrollar investigación aplicada que resulte en el uso de estos residuos como fuente nutricional para los microorganismos.

## Referencias bibliográficas

- Arora, R.; Shera, P.S. 2014. Genetic Improvement of Biocontrol Agents for Sustainable Pest Management. En K. Sahayaraj (Ed.), Basic and Applied Aspects of Biopesticides. Springer India. Pp. 255-285.
- Arthurs, S.; Dara, S.K. 2018. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. Journal of Invertebrate Pathology (In press).
- Bateman, R. 2004. Constraints and enabling technologies for mycopesticide development. Outlooks on Pest Management 15(2): 64-69.
- Farm Industry News. 2018. Bayer CropSciences Complete Acquisition of Prophyta Gmb. Disponible en: <https://www.farmindustrynews.com/crop-protection/bayer-cropsciences-completes-acquisition-prophyta-gmbh>
- Bena-Molaei, P.; Talaei-Hassanloui, R.; Askary, H. 2015. Comparison of some natural broth media for production and virulence of *Beauveria bassiana* blastospores against the browntail moth, *Euproctis*

- chrysorrhoea* (Lep.: Lymantriidae). Journal of Crop Protection 4(3): 313-320.
- Bettiol, W.; Rivera, M.C.; Mondino, P.; Montealegre, J.R.; Colmenarez, Y. (Eds.). 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE). [Montevideo]: Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 404 pp.
- 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. Bioresource Technology 99(6): 1530-1537.
- Borges, D.; Diaz, A.O.; San Juan, A.N.; Gomez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar 44(3): 49-55.
- Boyetchko, S.; Pedersen, E.; Punja, Z.; Reddy, M. 1999. Formulations of Biopesticides. En F.R. Hall and J. J. Menn (Eds). Biopesticides: Use and Delivery vol. 5, Pp. 487-508.
- Cañón-Amaya, E. del P. 2010. Producción masiva de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) utilizando como soporte de crecimiento bagazo de caña de azúcar. Universidad Javeriana. 47 pp.
- Castillo-Lopez, D.; Zhu-Salzman, K.; Ek-Ramos, M.J. uliss.; Sword, G.A. 2014. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. PLoS one 9(8): e103891.
- Ceballos-Vázquez, M.; Montes de Oca; Martínez, N. 2016. Registro sanitario de bioplaguicidas microbianos en América Latina y Cuba. Caso de estudio: bionematicida cubano Klamic®. Revista de Protección Vegetal 31(2): 120-133.
- Chandler, D.; Bailey, A.S.; Tatchell, G.M.; Davidson, G.; Greaves, J.; Grant, W.P. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 366(1573): 1987-1998.
- Chen, J.; Lai, Y.; Wang, L.; Zhai, S.; Zou, G.; Zhou, Z.; ... Wang, S. 2017. CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Scientific Reports 8: 45763.
- Christiaens, O.; Prentice, K.; Pertry, I.; Ghislain, M.; Bailey, A.; Niblett, C.; Gheysen, G.; Smaghe, G. 2016. RNA interference: a promising biopesticide strategy against the African Sweetpotato Weevil *Cylas brunneus*. Scientific reports 6: 38836.
- Chubukov, V.; Mukhopadhyay, A.; Petzold, C.; Keasling, J. 2016. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals: from target selection to scale-up. Systems Biology and Applications 16009: 1-11.
- Claro, O.; Fernández-Larrea Vega, O.; Ponce Grijuela, E.; Borges Marín, G.; Rovesti, L.; Jiménez Ramos, J. 2009. Colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A34 por lecho fluidizado y ciclón dual. Fitosanidad 13(4): 265-269.
- Cortez-Madrigal, H. 2007. Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. Agricultura técnica en México 33(1): 83-87.
- Costa, S.D.; Grassano, S.; Li, J. 2014. U.S. Patent No. US8623420B2. Washington, DC: U.S. Sweet whey based biopesticide composition. Google Patents.
- Cotes, A.M. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en Colombia. En Bettiol, W.; Rivera, M.C.; Modino, P.; Montealegre, J.; Colmenárez, Y. (Eds.). Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. Pp. 169-179.
- Cruz-Barrera, F.M. 2014. Desarrollo de un proceso de fermentación sólida para el hongo *Trichoderma asperellum* Th204 en un fermentador de lecho fijo. Universidad Nacional. Tesis de maestría, Universidad Nacional. Bogotá. Colombia. 117 pp.
- Cubillos, G.P.B.; Gómez, J.; Cuartas, P.; León, G.; Rivero, L.F.V. 2014. Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento colombiano de granulovirus de *Erinyis ello* (L.) (Lepidoptera: *Sphingidae*). Revista Colombiana de Biotecnología 16(2): 129.
- Cubillos, G.P.B.; Rivero, L.F.V.; Otorola, P.E.C.; Valderrama, J.A.G. 2016. U.S. Patent No. 20170172154. Washington, DC: U.S. Virus-based biopesticide. Google Patents.
- De la Cruz-Quiroz, R.; Roussos, S.; Hernández, D.; Rodríguez, R.; Castillo, F.; Aguilar, C.N. 2015. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. Critical Reviews in Biotechnology 35(3): 326-333.
- De la Cruz-Quiroz, R.; Roussos, S.; Hernández, D.; Rodríguez, R.; Castillo, F.; Aguilar, C.N. 2015. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. Critical Reviews in Biotechnology 35(3): 326-333.
- De León, S.G.; Mier, T. 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. Sociedades rurales, producción y medio ambiente 10(20): 37-63.
- Deng, H.; Gao, R.; Liao, X.; Cai, Y. 2017. CRISPR system in filamentous fungi: Current achievements and future directions. Gene 627: 212-221.
- Deshpande, M.V. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. Critical reviews in microbiology 25(3): 229-243.
- Diaz, B.; Muñoz, M.R. 1994. Biotecnología agrícola y medio ambiente en el periodo especial cubano. En XVIII International Congress de Latin American Studies Association. Atlanta, Georgia. March 10-12, 1994. Pp. 77-90.
- Donohoue, P.D.; Barrangou, R.; May, A.P. 2017. Advances in Industrial Biotechnology Using CRISPR-Cas Systems. Trends in Biotechnology 36(2): 134-146.
- Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Science and Technology 4(1): 3-34.
- Gibson, D.M.; Donzelli, B.G.G.; Krasnoff, S.B.; Keyhani, N.O. 2014. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. Nat. Prod. Rep. 31(10): 1287-1305.
- Gómez, J.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Cotes, A.M. 2009. Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 10(2): 152-158.
- Gonzalez, L.V.P.; Gómez, S.P.M.; Abad, P.A.G. 2017. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 8(2): 141-150.
- Grahovac, J.; Grahovac, M.; Dodić, J.; Bajić, B.; Balaž, J. 2014. Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*. Crop Protection 65: 143-152.
- Grande-Tovar, C.D. 2016. Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales. Editorial Bonaventuriana. Cali, Colombia. 180 pp.
- Grzywacz, D.; Moore, D.; Rabintra, R.J. 2014. Chapter 15 - Mass Production of Entomopathogens in Less Industrialized Countries A2 - Morales-Ramos, Juan A. En J. A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens. San Diego: Academic Press. Pp. 519-561
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a

- hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24: 14-21.
- Jackson, M. a. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19(February): 180-187.
- Jaronski, S.T.; Mascarin, G.M. 2016. Chapter 9 – Mass Production of Fungal Entomopathogens. En L. A. Lacey (Ed.), *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Academic Press. Pp. 141-155.
- Jenkins, N.E.; Heviefo, G.; Langewald, J.; J, A.; Lomer, C.J.; Park, S.; Sl, B. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *BioControl* 19(1): 21-32.
- Kassa, A.; Brownbridge, M.; Parker, B.L.; Skinner, M.; Gouli, V.; Gouli, S.; Gou, M.; Lee, F.; Hata, T. 2008. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 112(5): 583-591.
- Katayama, T.; Tanaka, Y.; Okabe, T.; Nakamura, H.; Fujii, W.; Kitamoto, K.; Maruyama, J. 2016. Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology letters* 38(4): 637-642.
- Kim, H.U.; Charusanti, P.; Lee, S.Y.; Weber, T. 2016. Metabolic engineering with systems biology tools to optimize production of prokaryotic secondary metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 33(8): 933-941.
- Kim, J.J.; Xie, L.; Han, J.H.; Lee, S.Y. 2014. Influence of additives on the yield and pathogenicity of conidia produced by solid state cultivation of an *Isaria javanica* isolate. *Mycobiology* 42(4): 346-352.
- Kobori, N.N.; Mascarin, G.M.; Jackson, M.A.; Schisler, D.A. 2015. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 119(4): 179-190.
- Kumar, K.K.; Sridhar, J.; Murali-baskaran, R.K.; Senthilnathan, S.; Kaushal, P.; Dara, S.K.; Arthurs, S. 2018. Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. *Journal of Invertebrate Pathology*. May: 0-1.
- Lacey, L.A. 2017. Entomopathogens Used as Microbial Control Agents. En L. A. Lacey (Ed.), *Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice*. Academic Press. Pp. 3-12.
- Latifian, M.; Rad, B.; Amani, M.; Rahkhodaei, E. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid-solid diphasic method for date palm. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5(19): 2337-2341.
- Leland, J.E. 2013. European Patent Application No. EP 3 172 966 A1. Munich: Germany.
- Liu, H.; Wang, P.; Hu, Y.; Zhao, G.; Liu, H.; Li, Z.; Wu, H.; Wang, L.; Zheng, Z. 2015. Optimised fermentation conditions and improved collection efficiency using dual cyclone equipment to enhance fungal conidia production. *Biocontrol Science and Technology* 25(9): 1011-1023.
- Liu, Q.; Gao, R.; Li, J.; Lin, L.; Zhao, J.; Sun, W.; Tian, C. 2017. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hypercellulase production strain engineering. *Biotechnology for biofuels* 10(1): 1-14.
- Liu, R.; Chen, L.; Jiang, Y.; Zhou, Z.; Zou, G. 2015. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*. 1: 15007.
- Liu, Y.; Wang, L.; Chen, H.Z. 2018. Two-steps gas double-dynamic solid-state fermentation enhances growth and spore production of *Conithyrium minitans*. *Bioresource Technology* 262: 235-241.
- Lopez-Perez, M.; Rodriguez-Gomez, D.; Loera, O. 2015. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* 35(3): 334-341.
- Lozano-Tovar, M.D.; Garrido-Jurado, I.; Quesada-Moraga, E.; Raya-Ortega, M.C.; Trapero-Casas, A. 2017. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. *Crop Protection* 100: 186-195.
- Manan, M.A.; Webb, C. 2017. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *J Appl Biotechnol Bioeng* 4(1): 91.
- Marrone, P.G. 2014. The market and potential for biopesticides. En A.S. Series (Ed.), *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*. Vol. 1172, American Chemical Society. Pp. 245-258.
- Martínez, B.; Infante, D.; Reyes Ii, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* 28(1): 1-11.
- Mascarin, G.M.; Lopes, R.B.; Delalibera, I.; Fernandes, É.K.K.; Luz, C.; Faria, M. 2018. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* (In press).
- Mascarin, G.M.; Jackson, M.A.; Kobori, N.N.; Behle, R.W.; Delalibera Júnior, I. 2015. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology* 127: 11-20.
- Mascarin, G.M.; Kobori, N.N.; de Jesus Vital, R.C.; Jackson, M.A.; Quintela, E.D. 2014. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5): 1583-1590
- Michel-Aceves, A.C.; Otero-Sánchez, M.A.; Martínez-Rojero, R.D.; Rodríguez-Morán, N.L.; Ariza-Flores, R.; Barrios-Ayala, A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 14(2): 185-191.
- Mishra, J.; Tewari, S.; Singh, S.; Arora, N.K. 2015. Biopesticides: Where We Stand? En N. K. Arora (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India. Pp. 37-75
- Mishra, S.; Kumar, P.; Malik, A. 2016. Suitability of agricultural by-products as production medium for spore production by *Beauveria bassiana* HQ917687. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 5(2): 179-184.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica). 63: 95-103.
- Mordor Intelligence. 2016. Biopesticides Market-Latin America Biopesticides Market (2016-2021).
- Moreno, C.A.; Cotes Prado, A.M.; Raúl Iván Valbuena, B. 2010. Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de la lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*). CORPOICA. Bogotá, Colombia. 94 pp.
- Morid, M.; Zafari, D. 2013. Evaluation of micronutrients effects on production and activity of chitinase enzyme of some *Trichoderma* species. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(3): Pe335-Pe341.
- Mourin, M.; Shishir, A.; Khan, S.N.; Hoq, M.M. 2015. Regulation of major cultural components for designing a cost effective medium to increase  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology* 14(16): 1379-1386.
- Muñiz-Paredes, F.; Miranda-Hernández, F.; Loera, O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J. of Microbiology and Biotechnology* 33(3): 57.
- Murphy, K.A.; Tabuloc, C.A.; Cervantes, K.R.; Chiu, J.C. 2016. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. *Scientific reports*. 6.

- Mycoharvester. 2017. Enabling Technology for product development. Disponible en: <http://www.dropdata.net/mycoharvester/>
- Nava-Pérez, E.; García-Gutiérrez, C.; Camacho-Báez, J.R.; Vázquez-Montoya, L. 2012. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* 8(3): 17-29.
- Nielsen, J.C.; Nielsen, J. 2017. Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2(1): 5-12.
- Nødvig, C.S.; Nielsen, J.B.; Kogle, M.E.; Mortensen, U.H. 2015. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10(7): e0133085.
- Noriega, D.; Valencia, A.; Villegas, B. 2016. ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 19(1): 25-35.
- Ooijkaas, L.P.; Weber, F.J.; Buitelaar, R.M.; Tramper, J.; Rinzema, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology* 18(8): 356-360.
- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35(10): 1153-1169.
- Panpatte, D.G.; Jhala, Y.K.; Vyas, R. V; Shelat, H.N. 2017. *Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production*. Springer Singapore. 443 pp.
- Patel, C.S. 2011. Composition and method of preparation of fungal based bioinsecticide from combination of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* fungus with enzymes, fats and growth promoting molecules for controlling various foliage pest and soil borne insect. World Intellectual Property Organization No. WO2011099022 A1.
- Pelaez, V.; Mizukawa, G. 2017. Diversification strategies in the pesticide industry: from seeds to biopesticides Estratégias de diversificação na indústria de agrotóxicos: de sementes a biopesticidas. *Ciência Rural* 47(2): 1-7.
- Peña, V. 2002. Efecto de Diferentes Sustratos Sobre la Producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Trabajo de Grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 148 pp.
- Petlamul, W.; Prasertsan, P. 2014. Spore production of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: Response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 57(2): 201-208.
- Priyanka-Dhar. 2011. Response surface methodology for optimizing process parameters for the mass production of *Beauveria bassiana* conidiospores. *African Journal of Microbiology Research* 5(17): 2399-2406.
- Ravensberg, W.J. 2011. A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Springer Netherlands. 376 pp.
- Reddy, G.B.; Vijayavani, S.; Swarnabala, G.; Reddy, K.V. 2016. Evaluation of locally available substrates for conidial biomass production of *Beauveria bassiana* MCC0044 employing Solid Substrate Fermentation. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* Ver. 19(7): 2319-2372.
- Rivera-Méndez, W. 2016. Control microbiológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centroamericana. *Tecnología en Marcha. Edición Especial Biocontrol*: 31-40.
- Rivero, C.P.; Hu, Y.; Kwan, T.H.; Webb, C.; Theodoropoulos, C.; Daoud, W.; Lin, C.S.K. (Eds.). 2017. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Wastes management*. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V. 534 pp.
- Sadh, P.K.; Duhan, S.; Duhan, J.S. 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5(1): 1.
- Santero, E.; Floriano, B.; Govantes, F. 2016. Harnessing the power of microbial metabolism. *Current Opinion in Microbiology* 31: 63-69.
- Santis Navarro, A.M. 2014. Estudio de la producción de lipasas por fermentación en estado sólido a partir de residuos ricos en grasas. Impacto ambiental y posibles usos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 203 pp.
- Santos, A.M.; Uribe, L.A.; Ruiz, J.C.; Tabima, L.; Gómez, J.A.; Villamizar, L.F. 2014. Nucleopolidiovirus de Spodoptera frugiperda SfNPV003: compatibilidad con agroquímicos y estabilidad en condiciones de almacenamiento. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 15(2): Art. 361.
- Santos-Díaz, A.M. 2014. Potenciación ecofisiológica de conidios de *Nomuraea rileyi* mediante factores abióticos de estrés. Tesis de maestría. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.
- Seiber, J.N.; Coats, J.; Duke, S.O.; Gross, A.D. 2014. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(48): 11613-11619.
- Shah, P.A.; Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology* 61(5): 413-423.
- Shukla, V.; Devi, P.; Baghel, S. 2016. Isolation, characterization and biomass production of *Trichoderma* spp. - A review. *Research in Environment and Life Sciences* 9(7): 889-894.
- Singh, R.P. (Eds.). 2017. *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Springer Science + Business Media Singapore. 487 pp.
- Skovmand, O. 2007. Microbial control in Southeast Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* 95(3): 168-174.
- Sullivan, S. 2015. Greener chemistry for sustainable agriculture: biopesticides. *Chimica Oggi-Chemistry Today* 33(4): 46-47.
- Thakore, Y. 2006. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology* 2(3): 194-208.
- Thomas, K.C.; Khachatourians, G.G.; Ingledew, W.M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian journal of microbiology* 33(1): 12-20.
- Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81: 146-161.
- Thomas, M.B.; Read, A.F. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology* 5(5): 377-383.
- Torres-Brizuela, L.; Rodríguez-Rico, C.I.L.; Martínez-Manrique, C.E.; Lobaina-Lobaina, E. 2017. Caracterización del producto de la fermentación sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña. *Tecnología Química* 37(3): 453-469.
- Trivedi, P.; Schenk, P.M.; Wallenstein, M.D.; Singh, B.K. 2017. Tiny Microbes, Big Yields: enhancing food crop production with biological solutions. *Microbial Biotechnology* 10(5): 999-1003.
- Twomey, U.; Warrior, P.; Kerry, B.R.; Perry, R.N. 2000. Effects of the biological nematicide, DiTera, on hatching of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematology* 2(3): 355-362.
- UN Human Rights Council. 2017. *Report of the Special Rapporteur on the right to food*, Olivier De Schutter. United Nation.
- 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 Biochemistry* 46(3): 751-757.

- Villamizar, L.F.; Nelson, T.L.; Jones, S.A.; Jackson, T.A.; Hurst, M.R.H.; Marshall, S.D.G. 2018. Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology* 28(12): 1097-1113.
- Xie, L.; Chen, H.M.; Yang, J. Bin. 2012. Conidia production by *Beauveria bassiana* on rice in solid-state fermentation using tray bioreactor. *Advanced Materials Research* 610-613: 3478-3482.
- Xie, L.; Han, J.H.; Kim, J.J.; Lee, S.Y. 2016. Effects of culture conditions on conidial production of the sweet potato whitefly pathogenic fungus *Isaria javanica*. *Mycoscience* 57(1): 64-70.
- Yazid, N.A.; Barrena, R.; Komilis, D.; Sánchez, A. 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. *Sustainability* 9(224): 1-28.
- Zacharof, M.-P.; Lovitt, R.W. 2015. Adding value to wastewater by resource recovery and reformulation as growth media: current prospects and potential. *Journal of Water Reuse and Desalination* 5(4): 473-479.