



Artículo de investigación

<https://doi.org/10.61767/mjte.001.2.2229>

Castillo-Castillo et al., 2022

Recibido: 09-09-2022

Revisado: 01-10-2022

Aceptado: 06-10-2022

Publicado: 11-10-2022

LOS TEXTURIZANTES INCREMENTAN LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae*

TEXTURIZERS INCREASE THE CONIDIA PRODUCTION OF *Metarhizium anisopliae*

H. Castillo-Castillo¹, L. Rojas-Gutierrez¹, J. Espitia-López², P. Garza-López², G. Martínez-de Jesús¹, I. Neria-González¹ y A. Angel-Cuapio^{1,3*}

¹Tecnológico Nacional de México/TES de Ecatepec, División de Ingeniería Química y Bioquímica, Av. Tecnológico s/n, Valle de Anáhuac, sección Fuentes, C.P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México.

²Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales, Rancho Universitario. Av. Universidad Km 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa, C.P. 43600, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

³AAC BIOLAB, Laboratorio de Investigación, Norte 8 #214, Santa Cruz, C.P. 56617, Valle de Chalco Solidaridad, Estado de México, México

*Correspondencia: rafaelangel@tese.edu.mx

Resumen

La producción de hongos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas se ha vuelto una alternativa para evitar la aplicación de insecticidas químicos, los cuales han generado contaminación al medio ambiente. El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* produce unidades infectivas denominadas conidios que son utilizados como ingrediente activo en formulaciones biológicas para regular poblaciones de insectos plaga, lo anterior representa una valiosa alternativa en la protección del ambiente y en el equilibrio de la flora y la fauna. El objetivo de esta investigación consistió en evaluar la porosidad del lecho de empaque modificada por la incorporación de agrolita (AG) y polietileno de baja densidad (PL) como agentes texturizantes mezclados con arroz precocido (AP) como sustrato, sobre la producción de conidios de la cepa *Metarhizium anisopliae* CP-OAX. La mayor producción de conidios sobre granos de arroz se alcanzó a los 12 días de cultivo. La adición de agrolita y el polietileno al lecho de cultivo es efectiva para aumentar la porosidad del lecho. Entre ambas estrategias, la adición de polietileno de baja densidad resultó más efectiva para la producción de conidios la cual resultó de 1.38×10^9 conidios por gramo de arroz seco inicial (conidios/gasi), con una porosidad de $\varepsilon=0.34$ (mezcla AP-PL: 50-50). El rendimiento alcanzado representó un incremento de 2 veces más la producción de conidios en comparación con el tratamiento sin texturizante (AP-PL = 6.3×10^8 conidios/gasi). El polietileno es un texturizante adecuado para ser utilizado en cultivo sólido, ya que incrementa la producción de conidios del hongo *Metarhizium anisopliae* CP-OAX



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

al modificar la porosidad de empaque, lo cual es un factor importante para considerar en la producción de unidades infectivas a gran escala.

Palabras clave: Porosidad, texturizante, *Metarhizium anisopliae*, cultivo sólido.

Abstract

The production of entomopathogenic fungi for the control of agricultural pests has become an alternative to avoid the application of chemical insecticides, which have generated environmental contamination. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* produces infective units called conidia that are used as an active ingredient in biological formulations to regulate populations of pest insects, which represents a valuable alternative in protecting the environment and in the balance of flora and fauna. The objective of this research was to evaluate the porosity of the packing bed modified by the incorporation of agrolite (AG) and low-density polyethylene (PL) as texturizing agents mixed with parboiled rice (AP) as a substrate, on the conidia production of *Metarhizium anisopliae* CP-OAX strain. The greatest conidia production on rice grains was reached at 12 days of cultivation. The addition of agrolite and the polyethylene to the culture bed is effective in increasing the porosity of the bed. Between both strategies, the addition of low-density polyethylene was more effective for the conidia production which resulted from 1.38×10^9 conidia per gram of initial dry rice (conidia/gidr), with a porosity of $\varepsilon = 0.34$ (AP-PL mixture: 50-50). The performance achieved represented an increase of 2 times more the conidia production compared to the treatment without texturizer (AP-PL = 6.3×10^8 conidia/gidr). Polyethylene is a suitable texturizer to be used in solid culture since it increases the conidia production of the *Metarhizium anisopliae* CP-OAX fungus by modifying the packing porosity, which is an important factor to consider in the production of large scale.

Keywords: Porosity, texturizer, *Metarhizium anisopliae*, solid culture

1. Introducción

La presencia de insectos considerados plaga en el sector agrícola genera grandes pérdidas económicas en la producción, además desmejoran la calidad de los cultivos [1], una estrategia viable para protegerlos es mediante la aplicación de agentes microbianos como los hongos entomopatógenos ya que protegen los cultivos del ataque de varias plagas y resultan más seguros para el ser humano, el medio ambiente y no tienen problemas residuales [2]. Cabe resaltar que las unidades infectivas e ingrediente activo en la formulación de los micoinsecticidas son los conidios aéreos los cuales son producidos en cultivo sobre soporte

sólido [3], sin embargo, durante el cultivo se produce una elevación de la temperatura en los fermentadores como consecuencia de la actividad metabólica [4], aunado a este inconveniente es la contracción y compactación del sustrato lo cual limita la difusión de gases, en especial la transferencia de oxígeno que depende de la proporción de espacios vacíos en el lecho de empaque, para contrarrestar estos inconvenientes se ha estudiado la aireación forzada para disipar el calor [5], así como la incorporación de agentes texturizantes que mezclados con el sustrato evitan la compactación del mismo y modifican la porosidad del lecho, lo cual favorece el intercambio gaseoso y por consecuencia se obtienen mejores niveles de



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

producción de conidios [6], en ese sentido, se justifica el interés por los estudios que buscan encontrar medios de cultivo, sustratos y texturizantes eficientes para la multiplicación de los propágulos, dichos materiales sólidos deben de ser de bajo costo, de fácil preparación y eficientes en cuanto al desarrollo y esporulación de los hongos entomopatógenos [7]. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar residuos de agrolita y polietileno de baja densidad como agentes texturizantes en cultivo sólido, para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*, esto con el propósito de evaluar alternativas para la producción de hongos entomopatógenos a escala industrial, ya que han demostrado buenos resultados como insecticida biológico para el control de varias plagas agrícolas.

2. Materiales y métodos

2.1 Microorganismo

El estudio se realizó con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, perteneciente a la colección de hongos entomopatógenos del Colegio de Posgraduados (COLPOS, México). Esta cepa fue identificada como *Metarhizium anisopliae* var. lepidiotum mediante la amplificación de la región ribosomal usando los primers ITS5 y ITS4b, con número de acceso en el GenBank FJ876298. [8]. Como medio de cultivo para propagación se utilizó el medio avena cuya composición fue la siguiente (g/L): harina de avena 33.33 (Quaker®), peptona de carne 10 (Bioxón) y agar bacteriológico 15 (Marca Bioxón).

2.2 Producción de conidios en arroz precocido

Se realizó una cinética de producción de conidios en arroz (Verde Valle®) durante 15 días de cultivo, se utilizaron frascos de vidrio con un volumen de 80 mL, un diámetro interno de 5 cm y una altura de 4.7 cm, en los cuales se pesó la materia sólida (10 g de arroz). El sustrato previamente esterilizado (15 psi, 121°C, 20 min), se inoculó con 1 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^7 conidios/mL, se ajustó la humedad inicial al 40 %,

las unidades experimentales se incubaron 28 °C durante 15 días, cada 24 h a partir del tercer día de cultivo se realizó la extracción de los conidios utilizando los 10 g de sustrato a los cuales se les adicionó 20 mL de Tween 80 al 0.05%, con un agitador magnético se agitó durante 10 minutos a 300 rpm, posteriormente se filtró con un gasa para eliminar sólidos, en seguida se homogenizó la suspensión de conidios en tubos de centrifuga de 50 mL utilizando un vortex (VelaQuin), después se realizó el conteo de conidios en cámara de Neubauer (CIVEQ) y con un microscopio (BODECO) ocupando el objetivo 40x. La producción de conidios se reportó como conidios por gramo de arroz seco inicial; *Ca* (conidios/gasi) [8].

2.3 Producción de conidios con texturizantes

Se utilizó arroz precocido (Verde Valle®) como sustrato (AP) y se evaluaron residuos de polietileno de baja densidad (PL) y agrolita (AG) como agentes texturizantes. Los texturizantes fueron lavados, secados y tamizados, para homogenizar el tamaño de partícula se recolectaron partículas retenidas en un tamiz No. 10 (abertura 2 mm), se prepararon mezclas de sustrato-texturizante para realizar cultivos sólidos y evaluar la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, las mezclas fueron las siguientes (%) p/p: 100-0, 90-10, 80-20, 70-30, 50-50 y 0-100 [9].

Se utilizaron frascos de vidrio para la producción de conidios como se describió previamente, en los cuales se pesaron 10 g de cada mezcla sustrato-texturizante, los cultivos previamente esterilizados (15 psi, 121°C, 20 min), se inocularon con 1 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^7 conidios/mL, se adicionó agua destilada estéril para ajustar la humedad inicial al 40%, los frascos se incubaron a 28 °C durante 12 días. Se realizó la extracción de conidios cada 24 h a partir del tercer día de incubación, se utilizaron los 10 g de materia sólida de cada frasco para realizar la extracción mediante la adición de 30 mL de una solución de Tween 80 (0.05 %), se agitó durante 10 min con un agitador magnético a 350 rpm, se



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

filtró con una gasa para descartar los sólidos, se contaron los conidios por medio de una cámara de Neubauer (Marienfield, Germany), en un microscopio (BOECO) con un objetivo 40x. El conteo de conidios se realizó por triplicado para cada día y para cada tratamiento.

2.4 Determinación de la porosidad

Para determinar la porosidad de las mezclas antes mencionadas se pesaron 10 gramos totales de materia sólida de cada tratamiento, a cada unidad experimental se le añadió la cantidad necesaria de aceite mineral (REASOL), hasta cubrir la altura de lecho, las pruebas fueron realizadas por triplicado. Para determinar la fracción de espacio vacío (ϵ) se calculó con la expresión descrita por [10].

$$\epsilon = \frac{(V_t - V_m)}{V_t}$$

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

2.5 Análisis estadístico

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

3. Resultados y discusión

3.1 Producción de conidios sobre arroz

El perfil de producción de conidios de la cepa *Metarhizium anisopliae* CP-OAX sobre arroz se muestra en la Figura 1, se encontró la mayor producción de conidios ($C_a \approx 8.11 \times 10^7$ conidios/gasi), a los 12 d de cultivo la cual fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con los valores obtenidos en los

demás días. La producción de conidios de *M. anisopliae* usualmente se realiza en cultivo sobre soporte sólido, así como Méndez-González et al. [11], realizaron un estudio para la producción de conidios de *M. anisopliae* en reactores de charolas con convección natural, se alcanzó una producción de 9×10^8 conidios por gramo de arroz a los 12.79 d de cultivo. De manera análoga, da Cunha et al. [12] estudiaron la producción de conidios de *M. anisopliae* en reactores de charolas, se observó la mayor producción (8.52×10^{12} conidios) al utilizar 3 kg de arroz durante 10 d de cultivo. Por otro lado, Prakash et al. [13], realizaron una investigación para optimizar la producción de conidios de *M. anisopliae* en bolsas de polipropileno, se encontró un rendimiento de 6.2×10^{10} conidios por gramo de arroz el resultado fue superior al obtenido en cebada (4.9×10^{10} conidios/g sustrato) y en sorgo (4.5×10^{10} conidios/g sustrato). Por su parte, Angel-Cuapio y Loera [9], reportaron una producción de conidios de 5.5×10^8 conidios por gramo de arroz para *M. anisopliae* a 6 días de cultivo realizado en frascos de vidrio. Lo anterior indica que el tiempo de producción de este hongo es variable y los rendimientos alcanzados son dependientes de las variables del cultivo (pH, humedad, temperatura, aireación, sustrato, tipo de reactor, etc).

3.2 Porosidad

La incorporación de materiales inertes (texturizantes) en mezclas con arroz incrementó significativamente ($p < 0.05$) la porosidad (ϵ); en ambos materiales se encontró una correlación polinómica de 4to grado cuyas ecuaciones y coeficientes de correlación fueron, $Y = -0.0027x^4 + 0.0416x^3 - 0.2297x^2 + 0.5434x - 0.1113$; $R^2 = 0.99$ y $Y = -0.002x^4 + 0.0286x^3 - 0.1421x^2 + 0.2962x + 0.0608$; $R^2 = 0.99$, para agrolita y polietileno de baja densidad, respectivamente (Figura 2). Muchas investigaciones se han enfocado en buscar las condiciones que conlleven a una alta producción de conidios, siendo estas las unidades infectivas y los ingredientes activos en la mayoría de las formulaciones de micoinsecticidas comercialmente disponibles en el mercado [14], en ese sentido surge el interés



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

de producirlos en grandes cantidades y la técnica más utilizada es el cultivo sobre soporte sólido.

Los resultados en esta investigación demuestran que el polietileno le confiere una porosidad de empaque que resulta con una alta producción de propágulos, lo cual es de gran importancia en el sector industrial. Esto concuerda con otros trabajos que han demostrado que la incorporación de agentes texturizantes en cultivo sólido promueve la producción de conidios de algunos hongos entomopatógenos [5,6,9]. Es importante mencionar que tanto la agrolita como el polietileno visualmente proporcionaron buena estructura al medio poroso tal como lo menciona Casciatori et al [15] ya que no se notó aglomeración ni compactación del arroz y el micelio fúngico se distribuyó uniformemente dentro del lecho de empaque, demostrando que los texturizantes estudiados permitieron una buena aireación del lecho. Se debe agregar que los texturizantes en cultivo sólido mejoran la transferencia de calor y oxígeno en cuanto mayor sea la porosidad del lecho, de esta manera se mejora la eliminación del calor convectivo y el espacio disponible para el crecimiento de hongos [5,15,16,17].

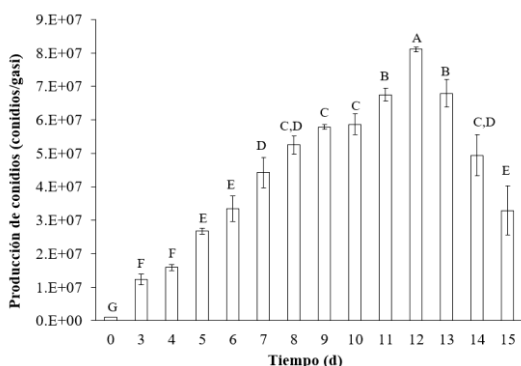


Figura 1. Cinética de producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX sobre arroz. Valores promedio seguidos de diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.

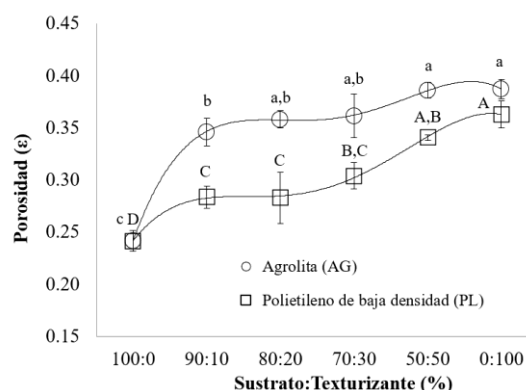


Figura 2. Porosidad en mezclas de arroz precocido con agrolita, AP-AG (círculos) y en mezclas de arroz precocido con polietileno, AP-PL (cuadros). la correlación lineal es indicada como línea punteada. Valores promedio seguidos de diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.

3.3 Producción de conidios en mezclas de sustrato-texturizante

El perfil de producción de conidios en mezclas de arroz-agrolita se presenta en la Figura 3, se observó que la mayor producción de conidios fue obtenida en la mezcla AP-AG (70:30), el resultado fue significativo ($p < 0.05$) con una producción promedio de $C_a \approx 3.4 \times 10^8$ conidios/gasi, lo que representa un incremento de 4 veces la producción de conidios en comparación con el tratamiento sin texturizante ($C_a \approx 8.6 \times 10^7$ conidios/gasi). El perfil de producción de conidios en mezclas de arroz-polietileno se presenta en la Figura 4, se observó la mayor producción de conidios con la mezcla AP-PL (50:50) con una producción promedio de $C_a \approx 1.38 \times 10^9$ conidios/gasi, el resultado fue significativo ($p < 0.05$) el cual representa un incremento de 2 veces la producción de conidios en comparación con el tratamiento sin texturizante ($C_a \approx 6.3 \times 10^8$ conidios/gasi).

En esta investigación se encontró que la incorporación de materiales inertes en mezclas con arroz, evitan la compactación del sustrato y con ello se incrementa significativamente la porosidad de empaque (ϵ); además, se permite mejorar la eficiencia del proceso y la aireación,



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

esto hace que dichos texturizantes sean una alternativa recomendable para la producción de conidios. En los últimos años, Angel-Cuapio et al. [6] reportaron que la incorporación del lirio acuático es efectiva para incrementar el valor de la porosidad (ϵ), hasta alcanzar un nivel crítico entre 0.34 y 0.36 en donde se incrementó el área superficial y se mejoró el intercambio gaseoso, de

acuerdo con esto fue relacionado con la alta producción de conidios. Como consecuencia práctica, los presentes resultados indican la necesidad de medir la porosidad como un parámetro de fermentación que podría cambiar el rendimiento de conidios por gramo de sustrato inicial.

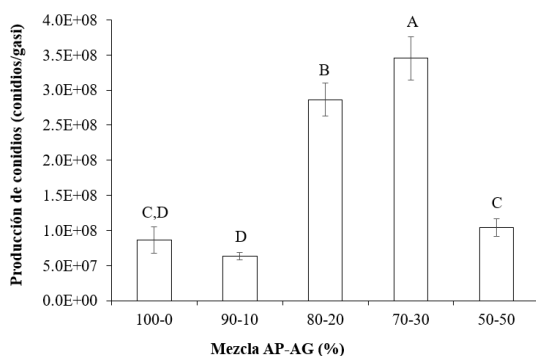


Figura 1. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX en mezclas de arroz-agrolita (AP-AG). Valores promedio seguidos de diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.

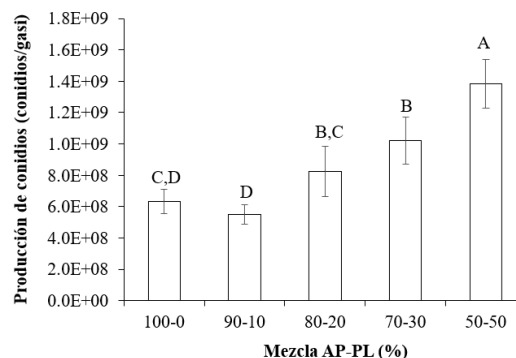


Figura 2. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX en mezclas de arroz-polietileno (AP-PL). Valores promedio seguidos de diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey al nivel de confianza del 95%.

4. Conclusión

La agrolita y el polietileno pueden ser utilizados para modificar la porosidad de empaque en cultivo sólido, sin embargo, el polietileno es un texturizante adecuado para ser utilizado en cultivo sólido, ya que incrementa la producción de conidios del hongo *Metarhizium anisopliae* CP-OAX al modificar la porosidad de empaque, lo cual es un factor importante para considerar en la producción de unidades infectivas a gran escala.

5. Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de maestría de la segunda autora (1033804), al

PRODEP por el Apoyo para Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2021 (ITSECA-CA-18) y a la empresa AAC BIOLAB por el financiamiento parcial de esta investigación.

6. Referencias

- [1] Lak F, Zandi-Sohani N, Ghodoum P MH, Ebadollahi A. Synergic effects of some plant-derived essential oils and Iranian isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* Sorokin to control *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Front. Plant Sci.* 2022;13.1075761. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1075761>



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

- [2] Deka B, Babu A, Pandey AK, Kumhar KCh, Rajbongshi H, Dey P, Arulmariathan JP, Amalraj ELD, Talluri VR. Potential of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for control of red spider mite, *Oligonychus coffeae* Nietner on tea crop. *Int. J. Acarology*. 2022; 48(2): 121-129. <https://doi.org/10.1080/01647954.2022.2041089>
- [3] Zhe-Yu P, Shu-Ting H, Jia-Ting Ch, Ni L, Yong W, Asad N, Sheng-Qun D. An update of a green pesticide: *Metarhizium anisopliae*. *All Life*. 2022; 15:1141-1159. <https://doi.org/10.1080/26895293.2022.2147224>
- [4] Figueroa-Montero A, Esparza-Isunza T, Saucedo-Castañeda G, Huerta-Ochoa S, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 2011; 86(10):1321–1331. <https://doi.org/10.1002/jctb.2637>
- [5] Méndez-González F, Figueroa-Montero A, Loera-Corral O, Saucedo-Castañeda G, Favela-Torres E. Addition of spherical-style packing improves the production of conidia by *Metarhizium robertsii* in packed column bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 2021; 97(6): 1517-1525. <https://doi.org/10.1002/jctb.6993>
- [6] Angel-Cuapio A, Figueroa-Montero A, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Perraud-Gaime I, Loera O. Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: effect on conidial yields and quality. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2015; 177(2): 446–457. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1754-4>
- [7] Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*. 2010; 55, 129–145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>
- [8] Tlecuitl-Beristain S, Viniegra-Gonzalez G, Díaz-Godínez G, Loera O. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*. 2010; 169(5): 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>
- [9] Angel-Cuapio A, Loera O. Use of agroindustrial waste as texturizers to entomopathogenic fungi production on solid-state culture. *Mex. J. Biotechnol*. 2016; 1(1): 21-33.
- [10] Mitchell DA, Meien OF, Luz LFL Jr, Berovič M. Substrate, air, and thermodynamic parameters for SSF bioreactor models. In: Mitchell DA, Berovič M, Krieger N. *Solid-state fermentation bioreactors: fundamental of design and operation*. Berlin: Springer; 2006.p. 265-278.
- [11] Méndez-González F, Loera O, Saucedo-Castañeda G, Favela-Torres E. Forced aeration promotes high production and productivity of infective conidia from *Metarhizium robertsii* in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J*. 2020; 156: 107492. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107492>
- [12] da Cunha LP, Casciatori FP, de Cenço Lopes I, Thoméo JC. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. *Bioprocess. Biosyst. Eng*. 2019; 42(11): 1757–1768. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02172-z>
- [13] Prakash GVS, Padmaja V, Kiran RRS. Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol*. 2008; 99(6): 1530–1537. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.031>
- [14] de Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*. 2007; 43(3): 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>



Artículo de investigación

Castillo-Castillo et al., 2022

[15] Casciatori FP, Laurentino CL, Taboga SR, Casciatori PA, Thoméo JC. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: experimental data and effects on process performance. Chem. Eng. J. 2014; 255: 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.040>

[16] Méndez-González F, Loera O, Favela-Torres E. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. Curr. Biotechnol. 2018; 7(1): 65-69. <https://doi.org/10.2174/2211550105666160926123350>

[17] Casciatori FP, Bück A, Thoméo JC, Tsotsas E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. Chem. Eng. J. 2016; 287: 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.108>