

## Cápsulas de Alginato Suplementadas con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y Extracto de Raíz de Rábano (*Raphanus sativus* L.) para la Promoción del Desarrollo Vegetal en *Capsicum annuum* L. Alginate Capsules Supplemented with *Trichoderma harzianum* and Radish Root Extract (*Raphanus sativus* L.) for the Promotion of Plant Development in *Capsicum annuum* L.

Ángel Virgilio Cedeño-Moreira<sup>1†</sup> , Danilo Yáñez-Cajo<sup>1</sup> ,  
Ana Ruth Álvarez-Sánchez<sup>1</sup>  y Ítalo Fernando Espinoza-Guerra<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Av. Quito Km 1.5, Vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. 120501 Quevedo, Los Ríos, Ecuador; (A.V.C.M.), (D.Y.C.), (A.R.A.S.), (I.F.E.G.).

<sup>†</sup> Autor para correspondencia: acedenom@uteq.edu.ec

### RESUMEN

La formulación de bioinoculantes encapsulados representa una estrategia innovadora para aumentar la viabilidad, estabilidad y eficiencia de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, contribuyendo a sistemas agrícolas sostenibles. El presente estudio evaluó el efecto de cápsulas de alginato suplementadas con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y extracto de raíz de rábano (*Raphanus sativus* L.) sobre la viabilidad microbiana, las propiedades fisicoquímicas de la formulación y la promoción del crecimiento en plántulas de *Capsicum annuum* L. La cinética de crecimiento de los microorganismos fue determinada mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) para identificar las fases de crecimiento óptimas para la encapsulación. Las cápsulas fueron elaboradas mediante gelificación iónica utilizando alginato de sodio como matriz polimérica, evaluándose la viabilidad microbiana a los 5, 10 y 15 días de almacenamiento, así como el contenido de agua, tiempo de desintegración y estabilidad dimensional. Los resultados evidenciaron que la formulación combinada (*Trich+Bacill+Rab*) presentó mayor viabilidad microbiana durante el almacenamiento, alcanzando concentraciones superiores a  $1.0 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> al día 15, en comparación con las formulaciones individuales. Asimismo, la inclusión del extracto de rábano modificó las propiedades físicas de las cápsulas, favoreciendo una desintegración más rápida y potencial liberación controlada de los microorganismos. A nivel agronómico, las plántulas tratadas con la formulación combinada mostraron incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) en altura de plantula, diámetro de tallo, contenido relativo de clorofila, volumen radicular y acumulación de biomasa fresca y seca a los 21 días después de la emergencia. Estos resultados demuestran que la co-encapsulación en alginato representa una alternativa eficiente para el desarrollo de bioinoculantes funcionales orientados a mejorar el crecimiento vegetal temprano y promover prácticas agrícolas sostenibles.

**Palabras clave:** alginato de sodio, bioinoculantes, gelificación iónica, liberación controlada, viabilidad microbiana.

### SUMMARY

The development of encapsulated biological formulations represents an innovative strategy to improve the stability, viability, and efficiency of plant growth-promoting microorganisms, contributing to sustainable agricultural systems. The present study evaluated the effect of alginate capsules supplemented with *Trichoderma*



#### Cita recomendada:

Cedeño-Moreira, A. V., Yáñez-Cajo, D., Álvarez-Sánchez, A. R., & Espinoza-Guerra, I. F. (2026). Cápsulas de Alginato Suplementadas con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y Extracto de Raíz de Rábano (*Raphanus sativus* L.) para la Promoción del Desarrollo Vegetal en *Capsicum annuum* L. *Terra Latinoamericana*, 44, 1-12. e2540. <https://doi.org/10.28940/terralatinoamericana.v44i.2540>

Recibido: 18 de febrero de 2026.  
Aceptado: 24 de marzo de 2026.  
Artículo. Volumen 44.  
Junio de 2026.

Editor de Sección:  
Dr. Fernando Abasolo Pacheco



**Copyright:** © 2026 by the authors.  
Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC ND) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

*harzianum*, *Bacillus subtilis*, and radish root extract (*Raphanus sativus* L.) on microbial viability, physicochemical properties of the formulation, and growth promotion in *Capsicum annuum* L. seedlings. Microbial growth kinetics were determined through colony-forming unit counts (CFU mL<sup>-1</sup>) in order to identify optimal growth phases for encapsulation. Capsules were produced by ionic gelation using sodium alginate as the polymeric matrix, and microbial viability was evaluated at 5, 10, and 15 days of storage, together with water content, disintegration time, and dimensional stability. Results showed that the combined formulation (*Trich+Bacill+Rab*) exhibited higher microbial viability during storage, reaching concentrations above  $1.0 \times 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> at day 15 compared to individual formulations. Furthermore, the inclusion of radish extract modified the physical properties of the capsules, promoting faster disintegration and potential controlled release of microorganisms. At the agronomic level, seedlings treated with the combined formulation showed significant increases ( $p < 0.05$ ) in plant height, stem diameter, relative chlorophyll content, root volume, and fresh and dry biomass accumulation at 21 days after emergence. These findings demonstrate that co-encapsulation in alginate represents an efficient alternative for the development of functional bioinoculants aimed at improving early plant growth and promoting sustainable agricultural practices.

**Index words:** sodium alginate, bioinoculants, ionic gelation, controlled release, microbial viability.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la agricultura enfrenta numerosos desafíos relacionados con la sostenibilidad y la productividad, como la degradación del suelo, el cambio climático, el uso excesivo de fertilizantes químicos y la resistencia de los patógenos a los tratamientos convencionales (Rigobelo, Kandasamy y Saravanakumar, 2022). En este contexto, el uso de tecnologías innovadoras basadas en microorganismos benéficos ha emergido como una estrategia prometedora para mejorar el rendimiento de los cultivos, optimizar el uso de recursos y reducir la dependencia de insumos químicos (Ansabayeva *et al.*, 2025). Los microorganismos beneficiosos, tales como hongos y bacterias, desempeñan un papel crucial en la mejora de la salud del suelo, el control biológico de plagas y enfermedades, así como en la promoción del crecimiento vegetal mediante mecanismos como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y la competencia con patógenos (Andrade, Santos, Frezarin, Sales y Rigobelo, 2023).

Uno de los hongos más destacados en este contexto es *Trichoderma harzianum*, un agente biocontrolador ampliamente estudiado por su capacidad para suprimir una amplia gama de fitopatógenos del suelo, mejorar la absorción de nutrientes y promover el crecimiento de las plantas (Dos Santos *et al.*, 2021). *T. harzianum* ha demostrado su eficacia en diversos cultivos, incluida su aplicación en la mejora de la resistencia a enfermedades y el estrés abiótico, lo que lo convierte en una opción atractiva para su uso en prácticas agrícolas sostenibles (Tiberini *et al.*, 2022).

Por otro lado, el uso de extractos vegetales, como los derivados de la raíz de rábano (*Raphanus sativus* L.), también ha cobrado relevancia en la investigación agrícola debido a sus propiedades antioxidantes y estimulantes del crecimiento (Dechwongya *et al.*, 2020). Los compuestos bioactivos presentes en estas raíces pueden contribuir a mejorar la salud de las plantas al inducir la producción de fitoquímicos y mejorar la actividad metabólica (Faligowska *et al.*, 2022). Asimismo, el extracto de rábano ha mostrado potencial para fortalecer las plantas contra diversas condiciones ambientales, lo que lo convierte en un complemento valioso para los sistemas agrícolas integrados (Hiraoka, 2021).

La encapsulación de microorganismos y extractos vegetales en matrices biodegradables y biocompatibles ha sido propuesta como una estrategia efectiva para la liberación controlada de estos agentes biológicos (Rasouli *et al.*, 2022). El alginato, un polisacárido natural derivado de algas marinas, es ampliamente utilizado en aplicaciones biotecnológicas debido a su capacidad para formar geles estables y su biocompatibilidad (Krait *et al.*, 2021). Además de proporcionar una estructura adecuada para la encapsulación, las matrices de alginato favorecen la protección de los agentes biológicos y contribuyen a mantener su estabilidad y funcionalidad durante su aplicación, lo que puede incrementar la eficiencia de los sistemas de liberación controlada.

En este estudio, se propone la formulación de cápsulas de alginato suplementadas con *Trichoderma harzianum* y extracto de raíz de rábano para evaluar su impacto en el desarrollo de *Capsicum annuum* L. (pimiento). *Capsicum annuum* L. fue seleccionado por su importancia económica como cultivo hortícola y su reconocida sensibilidad a

condiciones de estrés biótico y abiótico, lo que lo convierte en un modelo adecuado para estudiar el efecto de estos agentes en el crecimiento vegetal. Se busca evaluar si la combinación de *T. harzianum* y el extracto de rábano encapsulados en alginato puede mejorar la germinación, el crecimiento inicial, la resistencia a enfermedades y el rendimiento de las plántulas de pimiento.

El objetivo principal de este trabajo es proporcionar una alternativa sostenible a los métodos convencionales de fertilización y control de plagas mediante el uso de agentes biológicos encapsulados. Además, se pretende explorar las sinergias potenciales entre *Trichoderma harzianum* y los compuestos bioactivos del rábano, con el fin de maximizar los beneficios para el crecimiento y la salud de las plantas. Este enfoque integral tiene el potencial de contribuir a una agricultura más sostenible, reduciendo la dependencia de productos químicos sintéticos y promoviendo prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis*

Se utilizó una cepa activa de *B. subtilis*, previamente reactivada en medio nutritivo sólido (agar nutritivo, NA) e incubada a  $30 \pm 2$  °C durante 24 h para obtener colonias jóvenes metabólicamente activas. El inóculo bacteriano se preparó suspendiendo colonias frescas en solución salina estéril (0.85 % NaCl), ajustando la concentración inicial a aproximadamente  $1.0 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> mediante medición de densidad óptica y verificación por recuentos preliminares en placa, con el fin de asegurar una concentración uniforme del cultivo inicial.

El inóculo ajustado se transfirió a matraces Erlenmeyer estériles de 250 mL que contenían 100 mL de medio nutritivo líquido estéril, los cuales se incubaron a 30 °C bajo agitación orbital constante (150 rpm) para garantizar una adecuada oxigenación y homogeneidad del cultivo. El crecimiento bacteriano se monitoreó durante un periodo total de 12 h, tomando alícuotas de 1 mL a intervalos de una hora bajo condiciones asépticas. Las muestras se sometieron a diluciones seriadas en solución salina estéril y las diluciones apropiadas se sembraron por el método de extensión en superficie sobre agar nutritivo. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h, tras lo cual se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), expresando los resultados como UFC mL<sup>-1</sup>. Los datos obtenidos permitieron construir la curva de crecimiento e identificar las fases de adaptación, crecimiento exponencial y fase estacionaria.

### Cinética de crecimiento de *Trichoderma harzianum*

Se utilizó una cepa viable del hongo, previamente reactivada en medio papa dextrosa agar (PDA) e incubada a  $28 \pm 2$  °C durante 7 días hasta obtener crecimiento micelial activo y esporulación homogénea. La suspensión de esporas se preparó mediante la adición de agua destilada estéril suplementada con 0.01 % (v/v) de Tween 80 sobre la superficie del cultivo, seguida de un raspado suave con espátula estéril. La suspensión resultante se filtró a través de gasa estéril para eliminar fragmentos miceliales y se ajustó a una concentración inicial aproximada de  $1.0 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, verificada mediante recuento en placa.

El inóculo se transfirió a matraces Erlenmeyer estériles de 250 mL que contenían 100 mL de papa dextrosa caldo (PDB), los cuales se incubaron a 28 °C bajo agitación orbital constante (120 rpm) para asegurar una adecuada oxigenación y crecimiento homogéneo. Se tomaron alícuotas de 1 mL a intervalos de una hora durante 12 h, bajo condiciones asépticas, y se sometieron a diluciones seriadas decimales en solución salina estéril (0.85 % NaCl). Las diluciones apropiadas se sembraron por el método de extensión en superficie sobre placas con Papa Dextrosa Agar (PDA), incubadas a  $28 \pm 2$  °C durante 72 h, tras lo cual se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), expresando los resultados como UFC mL<sup>-1</sup>. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se utilizaron para construir la curva de crecimiento e identificar las fases de adaptación, crecimiento exponencial y fase estacionaria.

### Elaboración de Cápsulas de Alginato con Microorganismos

La encapsulación de los microorganismos se realizó mediante el método de gelificación iónica utilizando alginato de sodio como matriz polimérica. Para ello, se preparó una solución de alginato de sodio al 2.0 % (p/v) disolviendo el polímero en agua destilada estéril bajo agitación constante y calentamiento suave hasta su completa solubilización. La solución fue esterilizada por autoclave a 121 °C durante 15 min y posteriormente enfriada a temperatura ambiente antes de su uso. Las suspensiones microbianas se prepararon por separado, ajustando la concentración de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a aproximadamente  $1.0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> mediante recuento en placa, garantizando una carga microbiana homogénea para el proceso de encapsulación.

Las suspensiones microbianas se incorporaron a la solución de alginato estéril bajo condiciones asépticas y agitación suave para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos en la matriz polimérica. La mezcla resultante se extruyó gota a gota mediante una jeringa estéril con aguja de calibre uniforme hacia una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 0.1-0.2 M, utilizada como agente reticulante. Las gotas se mantuvieron en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante 30 min para permitir la formación y estabilización de las cápsulas por gelificación iónica. Posteriormente, las cápsulas formadas se recuperaron mediante filtración estéril y se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de calcio no ligado.

### Evaluación de la Viabilidad de los Encapsulados

La viabilidad de los microorganismos encapsulados se evaluó en tres formulaciones experimentales: (i) cápsulas de alginato conteniendo *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* spp. y extracto de raíz de *Raphanus sativus* (Trich + Bacill + Rab), (ii) cápsulas formuladas únicamente con *T. harzianum* (Trich), y (iii) cápsulas formuladas únicamente con *Bacillus* spp. (Bacill). Las cápsulas se almacenaron en condiciones estériles a temperatura controlada y la viabilidad microbiana se determinó a los 5, 10 y 15 días posteriores a la encapsulación.

Para cada tiempo de evaluación, se tomaron muestras representativas de cápsulas ( $n = 10$ ), las cuales fueron pesadas y posteriormente desintegradas mediante inmersión en una solución de citrato de sodio estéril al 1.0 % (p/v), utilizada como agente quelante para liberar los microorganismos atrapados en la matriz de alginato. La suspensión resultante se homogenizó mediante agitación suave durante 20 min hasta la completa disolución de las cápsulas. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas decimales en solución salina estéril (0.85 % NaCl).

El recuento de microorganismos viables se llevó a cabo mediante el método de siembra en placa. Para *Bacillus* spp., las diluciones apropiadas se sembraron por extensión en superficie sobre agar nutritivo y se incubaron a  $30 \pm 2$  °C durante 24 h. Para *T. harzianum*, las diluciones correspondientes se sembraron sobre medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a  $28 \pm 2$  °C durante 48 h. Tras el periodo de incubación, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), expresando los resultados como UFC  $\text{mL}^{-1}$  de suspensión liberada.

### Determinación de las Propiedades Físicas de las Cápsulas de Alginato

El contenido de agua se determinó al momento de la formulación mediante un método gravimétrico. Para ello, se seleccionaron cápsulas representativas de cada tratamiento ( $n = 10$ ), las cuales se pesaron inmediatamente después de su obtención para registrar el peso fresco y posteriormente se secaron en estufa de convección forzada a 60 °C hasta alcanzar peso constante. El contenido de agua se calculó como el porcentaje de pérdida de peso respecto al peso seco. Este procedimiento permitió evaluar la capacidad de retención hídrica de la matriz polimérica de alginato en función de la composición microbiana y la inclusión de extractos vegetales.

El tiempo de desintegración se evaluó colocando cápsulas individuales en recipientes estériles que contenían agua destilada estéril a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), manteniéndolas en reposo y registrando diariamente la pérdida de integridad estructural, definida como la ruptura visible de la cápsula y la liberación completa del contenido interno; los resultados se expresaron en días. La estabilidad dimensional se determinó midiendo el diámetro de las cápsulas inmediatamente después de la formulación (día 0) y tras un periodo de almacenamiento de 15 días. Para ello, se seleccionaron cápsulas al azar ( $n = 10$  por tratamiento y tiempo) y se midieron utilizando un calibrador digital de precisión, expresando los valores en milímetros (mm).

### Características de Promoción de Crecimiento

El experimento se desarrolló bajo condiciones controladas de invernadero utilizando plántulas de *Capsicum annuum* L., establecidas en un sustrato previamente homogenizado y desinfectado, manteniendo condiciones uniformes de riego, fertilización y manejo agronómico. Se evaluaron cuatro tratamientos consistentes en cápsulas de alginato: Trich+Bacill+Rab, que contenían *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y extracto de raíz de rábano; Trich, formulado únicamente con *Trichoderma* spp.; Bacill, con *Bacillus* spp.; y un control sin aplicación. Las cápsulas fueron obtenidas mediante encapsulación en alginato de sodio al 2% (p/v) y gelificación en  $\text{CaCl}_2$  al 2%, aplicándose directamente en la zona rizosférica al momento de la siembra. El ensayo se condujo bajo un diseño completamente al azar con repeticiones independientes por tratamiento, realizándose las evaluaciones a los 21 días después de la emergencia.

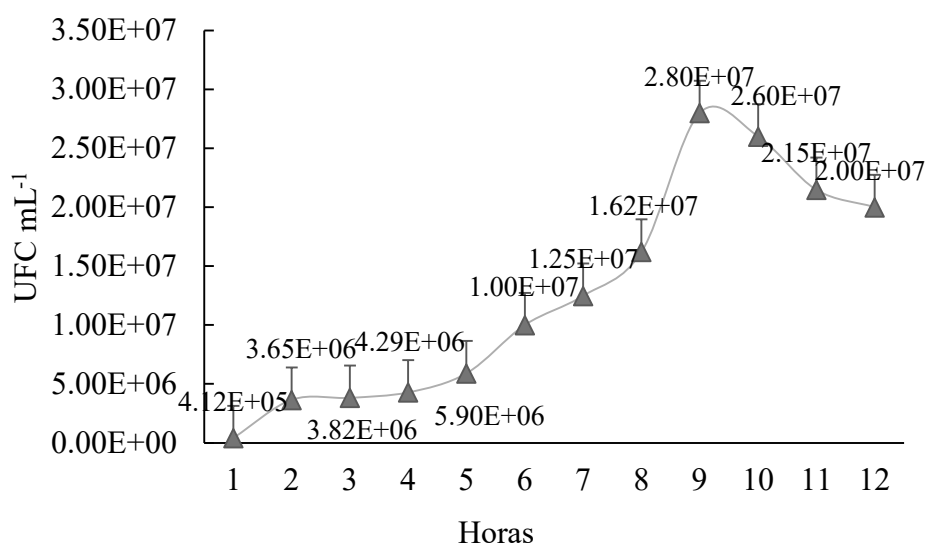
Las variables morfofisiológicas se evaluaron mediante procedimientos estandarizados empleados en estudios de fisiología vegetal. La altura de plantula se midió desde el cuello hasta el ápice utilizando una regla milimetrada; el diámetro de tallo se determinó a 2 cm sobre el nivel del sustrato mediante calibrador digital (Mitutoyo®, Japón). El contenido relativo de clorofila se registró con un medidor portátil SPAD-502 Plus (Konica Minolta®, Japón), realizando tres lecturas por plantula en hojas completamente expandidas y promediando los valores. El volumen radicular se determinó mediante el método de desplazamiento de agua en probetas graduadas de 100 mL, después del lavado cuidadoso de las raíces. El peso fresco se registró inmediatamente después del muestreo utilizando una balanza analítica (Ohaus® Pioneer, precisión 0,001 g), mientras que el peso seco se obtuvo tras el secado del material vegetal en estufa de circulación forzada (Memmert®, Alemania) a 65 °C durante 72 h hasta alcanzar peso constante. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), expresándose los resultados como media  $\pm$  desviación estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cinética de Crecimiento *Bacillus subtilis*

La cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* fue monitoreada en un cultivo durante 12 horas, registrando la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>). Durante las primeras 3 horas, se observó un incremento significativo en la población bacteriana, pasando de  $1.2 \times 10^5$  a  $3.65 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, correspondiente a la fase de adaptación y transición a la fase exponencial. Entre las 4 y 6 horas, la población continuó creciendo exponencialmente, alcanzando  $6.43 \times 10^6$  y  $1.00 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A partir de las 7 horas, el crecimiento comenzó a desacelerarse, alcanzando  $1.25 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, y estabilizándose entre las 8 y 9 horas en valores cercanos a  $2.80 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Finalmente, a partir de las 10 horas, se observó un leve descenso en la concentración de UFC mL<sup>-1</sup>, alcanzando un valor final de  $2.00 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> a las 12 horas, indicando el inicio de la fase estacionaria. Este comportamiento es característico del crecimiento microbiano de *Bacillus subtilis* bajo condiciones de cultivo controladas.

El incremento inicial de la población bacteriana durante las primeras horas de cultivo corresponde a la fase de adaptación (lag) y su transición hacia la fase exponencial (Figura 1; Hamill et al., 2020). En esta etapa, las células de *B. subtilis* activan rutas metabólicas primarias asociadas a la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, así como a la síntesis de enzimas hidrolíticas y sistemas de transporte de membrana (Yang et al., 2025). Paralelamente, ocurre una reorganización del metabolismo energético que permite la preparación celular para una división activa, lo que se traduce en un aumento progresivo de las unidades formadoras de colonias (Castillo-Alfonso et al., 2022).



**Figura 1** Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio de cultivo durante 12 horas. La concentración de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) se midió en intervalos de una hora. Las barras de error representan la desviación estándar en los puntos de medición.

**Figure 1.** Growth kinetics of *Bacillus subtilis* in culture medium over 12 hours. Colony-forming unit (CFU mL<sup>-1</sup>) concentration was measured at one-hour intervals. Error bars represent the standard deviation at the measurement points.

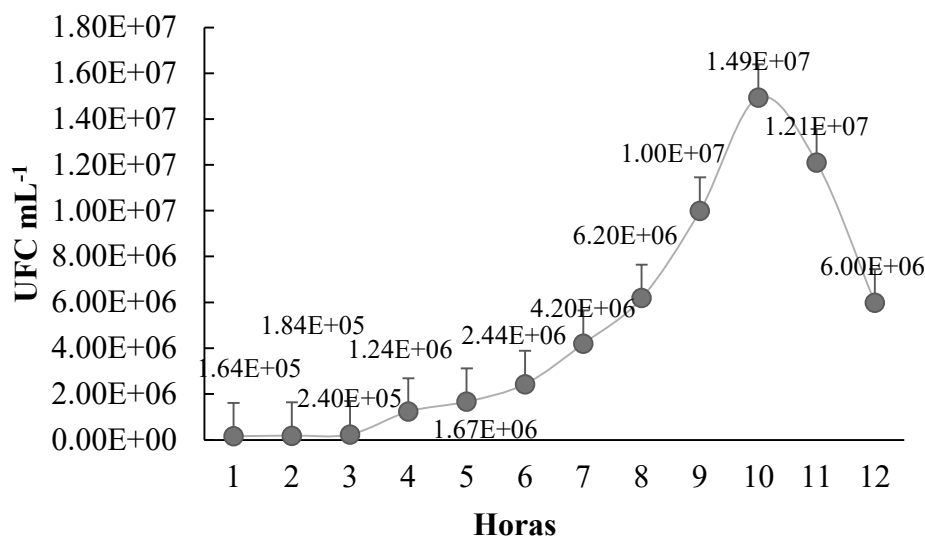
Entre las 4 y 6 h, el cultivo alcanza la fase exponencial, caracterizada por una elevada tasa de división celular y una duplicación constante de la biomasa (Nordholt, van Heerden y Bruggeman, 2020). Durante este periodo, *B. subtilis* presenta una intensa actividad biosintética, incluyendo replicación del ADN, síntesis proteica y formación de componentes estructurales de la pared celular (Galiniér, Foulquier y Pompeo, 2021). La eficiencia metabólica en esta fase está favorecida por condiciones ambientales óptimas y por la ausencia de factores limitantes, lo que explica el crecimiento sostenido y acelerado de la población bacteriana (García-Ortega *et al.*, 2025).

### Cinética de Crecimiento *Trichoderma harzianum*

El crecimiento de *T. harzianum* fue monitoreado durante 12 horas, observándose un incremento en la concentración de UFC mL<sup>-1</sup> a medida que avanzaba el tiempo. Inicialmente, en las primeras 3 horas, la concentración de *Trichoderma harzianum* se mantuvo baja, comenzando en 1.64×10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y aumentando ligeramente a 1.84×10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> a las 2 horas. Durante este tiempo, la población bacteriana permaneció en la fase de adaptación. A partir de las 4 horas, se registró un crecimiento más acelerado, alcanzando 1.24×10<sup>6</sup> y 2.44×10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> a las 4 y 5 horas, respectivamente. La fase exponencial se alcanzó entre las 6 y 7 horas, con un notable aumento en la población, alcanzando 4.20×10<sup>6</sup> y 6.20×10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. A las 8 horas, la población alcanzó su máximo de 1.49×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, luego de lo cual la concentración comenzó a disminuir. A las 10 horas, la población disminuyó a 1.21×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, y finalmente, a las 12 horas, se estabilizó en 6.00×10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, indicando el inicio de la fase estacionaria.

La baja variación en la concentración de UFC mL<sup>-1</sup> corresponde a la fase de adaptación, en la cual las esporas de *T. harzianum* experimentan procesos de hidratación, activación metabólica y germinación (Figura 2; Tamburini *et al.*, 2020). En esta etapa, el hongo prioriza la síntesis de ARN, proteínas y enzimas hidrolíticas necesarias para la degradación de sustratos y el establecimiento del crecimiento micelial, sin que ello se traduzca inmediatamente en un aumento significativo de unidades formadoras de colonias (Palma *et al.*, 2022).

A partir de las 4 h, el incremento progresivo en la población indica el inicio de una fase de crecimiento activo, asociada a la elongación de hifas y ramificación micelial (Contreras-Cornejo *et al.*, 2024). En este periodo, *T. harzianum* presenta una elevada actividad metabólica, con una eficiente asimilación de nutrientes y una intensificación de la respiración celular, lo que favorece la expansión del micelio y el aumento de la biomasa fúngica detectable como UFC mL<sup>-1</sup> (Yao *et al.*, 2023).



**Figura 2. Cinética de crecimiento de *T. harzianum* en medio de cultivo durante 12 horas.**

La concentración de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) se midió en intervalos de una hora. Las barras de error representan la desviación estándar en los puntos de medición.

**Figure 2. Growth kinetics of *T. harzianum* in culture medium over 12 hours.** Colony-forming unit concentration (CFU mL<sup>-1</sup>) was measured at one-hour intervals. Error bars represent the standard deviation at the measurement points.

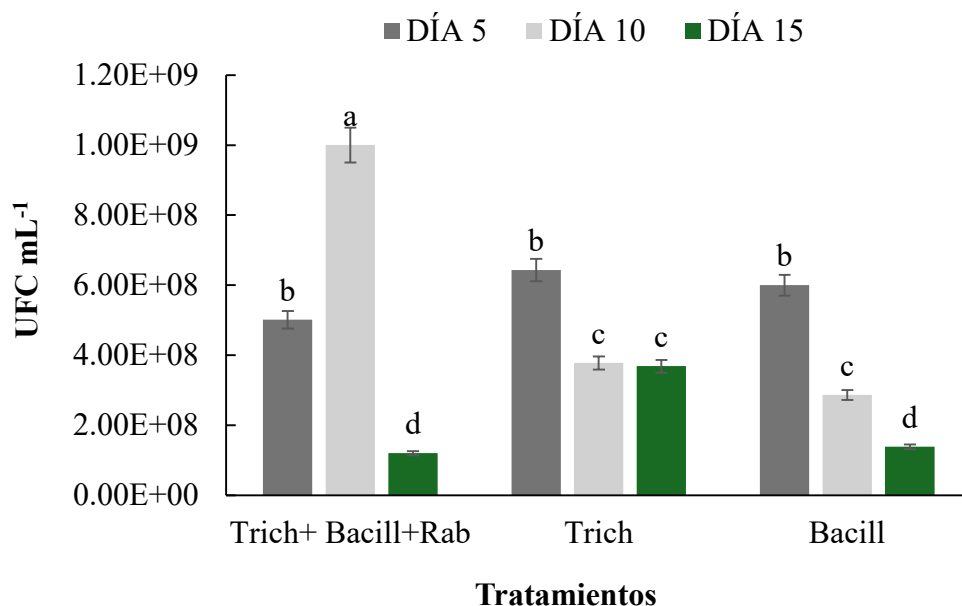
Posteriormente, la disminución gradual en la población fúngica registrada a partir de las 10 h sugiere la transición hacia la fase estacionaria, atribuida a la reducción de nutrientes disponibles, la competencia intracelular y la acumulación de metabolitos secundarios (Chen *et al.*, 2021). En respuesta a estas condiciones, *T. harzianum* modula su metabolismo, reduciendo la tasa de crecimiento micelial y activando mecanismos de supervivencia, tales como la formación de estructuras de resistencia o la redistribución de recursos energéticos (Tyśkiewicz, Nowak, Ozimek y Jaroszuk 2022).

### Viabilidad de los Encapsulados

La viabilidad de los microorganismos encapsulados se evaluó en tres formulaciones: (i) *Trichoderma harzianum* + *Bacillus* spp. + extracto de raíz de *Raphanus sativus* (Trich+ Bacill + Rab), (ii) *Trichoderma harzianum* (Trich), y (iii) *Bacillus* spp. (Bacill), a los 5, 10 y 15 días posteriores a la encapsulación (Figura 3). Los resultados revelaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) tanto entre tratamientos como entre tiempos de almacenamiento.

El tratamiento Trich + Bacill + Rab presentó la mayor viabilidad microbiana al día 15, con una concentración promedio de  $1.1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Este valor fue significativamente superior a los observados en los tratamientos con *Trichoderma* o *Bacillus* por separado, y se mantuvo en aumento a lo largo del periodo evaluado, lo que sugiere una interacción sinérgica entre ambos microorganismos y el extracto vegetal. En contraste, los tratamientos individuales mostraron una tendencia decreciente en la viabilidad, con conteos que descendieron de  $\sim 6.0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> al día 5 a valores cercanos a  $4.0 \times 10^8$  y  $2.0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> al día 15 para *Trichoderma* y *Bacillus*, respectivamente.

La viabilidad de microorganismos encapsulados en matrices de alginato está determinada por una combinación de factores biológicos, fisicoquímicos y metabólicos que influyen directamente en la supervivencia celular durante el almacenamiento (Martínez-Cano *et al.*, 2022). El alginato forma una red polimérica semipermeable que protege a los microorganismos frente a condiciones externas adversas, pero al mismo tiempo limita el intercambio de nutrientes y la difusión de metabolitos, lo que puede generar estrés fisiológico en las células encapsuladas (Wu *et al.*, 2020).



**Figura 3. Viabilidad microbiana (UFC mL<sup>-1</sup>) de las cápsulas de alginato formuladas con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* spp. y extracto de raíz de *Raphanus sativus* L. evaluada a los 5, 10 y 15 días de almacenamiento.** Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempos (ANOVA, prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Figure 3. Microbial viability (CFU mL<sup>-1</sup>) of alginate capsules formulated with *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* spp., and *Raphanus sativus* L. root extract, evaluated at 5, 10, and 15 days of storage.** Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation. Different letters above the bars indicate significant differences between treatments and times (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ).

La co-encapsulación de microorganismos con diferentes estrategias metabólicas puede favorecer la supervivencia celular debido a interacciones complementarias (Hernando-Amado, Coque, Baquero y Martínez, 2020). En sistemas multiespecie, las bacterias pueden contribuir a la producción de metabolitos secundarios, enzimas extracelulares y compuestos antimicrobianos que reducen el estrés oxidativo y la acumulación de sustancias tóxicas dentro de la cápsula (Krawczyk, Wityk, Gałęcka y Michalik, 2021). Por su parte, los hongos filamentosos presentan una mayor tolerancia a condiciones de limitación nutricional y variaciones microambientales, lo que contribuye a la estabilidad biológica del sistema encapsulado (Gubarev *et al.*, 2022).

La incorporación de extractos vegetales en formulaciones encapsuladas puede favorecer la viabilidad microbiana (Huang, Zhang, Hu y Liu, 2023). Sus compuestos bioactivos actúan como fuentes adicionales de carbono o como protectores frente al estrés metabólico y oxidativo (Sinan *et al.*, 2021). Asimismo, estos compuestos pueden modular la actividad enzimática y favorecer la integridad de la membrana celular durante el almacenamiento (Bisz, 2021).

### Propiedades Físicas de las Cápsulas

Los valores del contenido de agua oscilaron entre 95 y 100 % al momento de la formulación (Figura 4-A). Las cápsulas que contenían únicamente *Trichoderma harzianum* mostraron el mayor contenido 98 % de agua, con diferencias significativas respecto al tratamiento combinado (Trich + Bacill + Rab), el cual presentó un valor inferior 90 % ( $p < 0.05$ ). La inclusión del extracto de rábano redujo la retención de humedad inicial, posiblemente por una mayor densificación de la matriz de alginato o un efecto higroscópico del extracto vegetal.

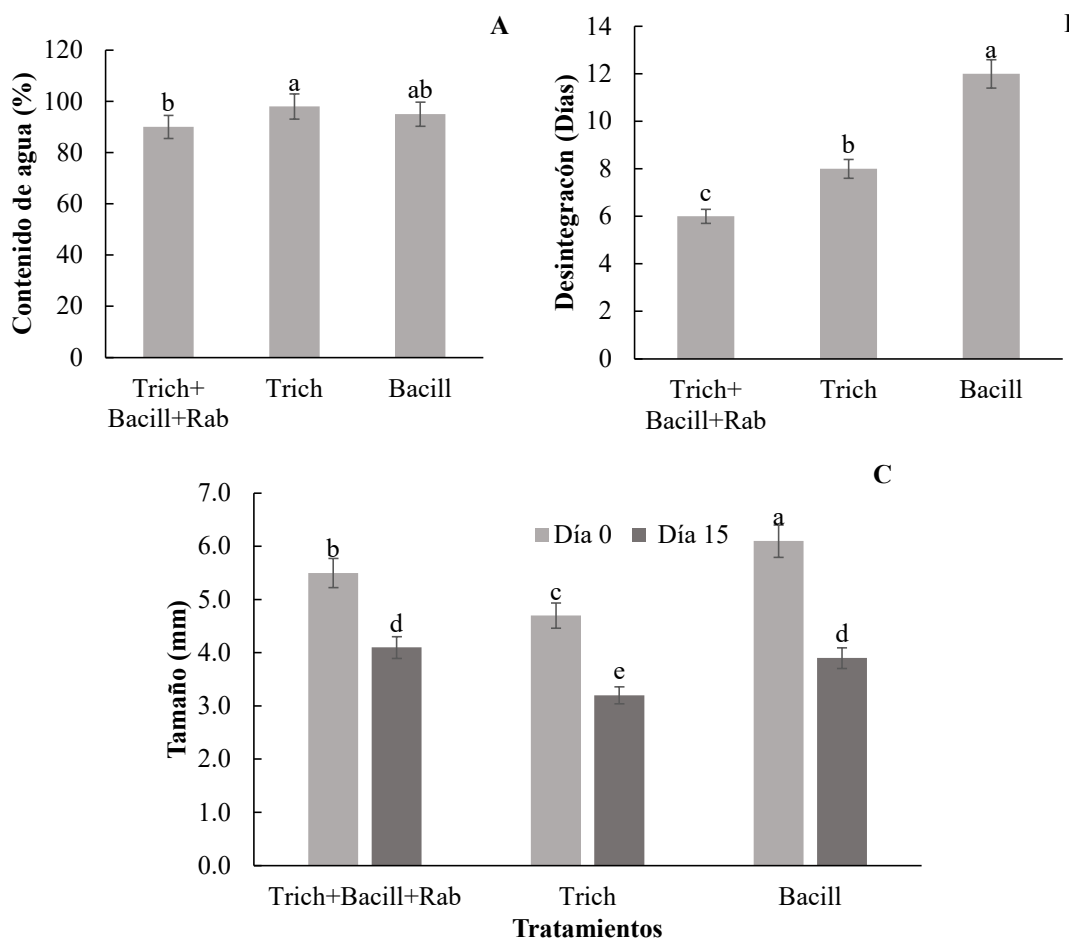
El tiempo de desintegración en condiciones controladas (Figura 4-B) varió significativamente entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Las cápsulas formuladas solo con *Bacillus* mostraron la mayor resistencia a la desintegración (12 días), seguidas de las de *Trichoderma* (8 días). En contraste, el tratamiento Trich + Bacill + Rab presentó la menor duración (6 días), lo que indica que la inclusión del extracto vegetal acelera la ruptura de la cápsula, por modificaciones en la red de gel del alginato y mayor actividad enzimática microbiana promovida por compuestos del extracto.

El análisis del diámetro de las cápsulas al día 0 y día 15 (Figura 4-C) mostró una reducción significativa en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Las cápsulas con *Bacillus* presentaron el mayor tamaño inicial (6.1 mm), mientras que las formulaciones con Trich + Bacill + Rab mostraron diámetros intermedios tanto al inicio como al final del periodo con valores de 4.7 y 3.2 mm respectivamente, debido a la pérdida de humedad y al colapso parcial de la matriz polimérica durante el almacenamiento. El tratamiento combinado también mostró la menor variación de tamaño con estabilidad estructural.

El contenido de agua en cápsulas de alginato está estrechamente relacionado con la capacidad hidrofílica del polímero y con las interacciones entre los grupos carboxilato del alginato y los cationes divalentes utilizados en el proceso de gelificación (Radzlin *et al.*, 2022). La incorporación de microorganismos puede modificar la microestructura del gel debido a la ocupación de espacios por biomasa celular y a la producción de compuestos extracelulares, lo que influye en la retención de humedad (Zhang, Sun, Wang y Wang, 2023). Adicionalmente, la inclusión de extractos vegetales puede alterar el equilibrio hídrico del sistema, ya sea por efectos higroscópicos o por interacciones químicas entre metabolitos secundarios y la red polimérica, dando lugar a una matriz más compacta y con menor capacidad de retención de agua (Gzyra-Jagieta *et al.*, 2021).

El tiempo de desintegración de las cápsulas está condicionado por la estabilidad de la red de alginato y por los procesos de difusión y degradación que ocurren en el interior del gel (Lai *et al.*, 2024). La presencia de microorganismos con distinta actividad metabólica puede acelerar la ruptura de la matriz mediante la producción de enzimas, ácidos orgánicos u otros metabolitos capaces de debilitar los enlaces iónicos del alginato (Arntzen *et al.*, 2021). Asimismo, los compuestos bioactivos de origen vegetal pueden inducir modificaciones en la estructura del gel, afectando la resistencia mecánica y favoreciendo una desintegración más rápida bajo condiciones controladas (Weng *et al.*, 2023).

La variación del tamaño de las cápsulas durante el almacenamiento responde principalmente a la pérdida progresiva de agua y al reordenamiento de la red polimérica (Colin, Akpo, Perrin, Cornu y Cambedouzou, 2024). La deshidratación parcial provoca un colapso estructural del gel, reduciendo el diámetro de las cápsulas con el tiempo (Qosim, Dai, Williams y Edirisinghe, 2024). Este fenómeno puede verse modulado por la composición interna de la cápsula, ya que la biomasa microbiana y los metabolitos asociados pueden contribuir a una mayor estabilidad estructural al actuar como elementos de refuerzo dentro de la matriz polimérica (Almassri *et al.*, 2025).



**Figura 4. Caracterización fisicoquímica de cápsulas de alginato formuladas con *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* spp. y extracto de raíz de *Raphanus sativus* L. (A) Contenido de agua (%) en el momento de la formulación. (B) Tiempo de desintegración (días) bajo condiciones controladas. (C) Variación del tamaño (mm) de las cápsulas al día 0 y al día 15 de almacenamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ).**

**Figure 4. Physicochemical characterization of alginate capsules formulated with *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* spp., and *Raphanus sativus* L. root extract. (A) Water content (%) at the time of formulation. (B) Disintegration time (days) under controlled conditions. (C) Size variation (mm) of the capsules on day 0 and day 15 of storage. Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ).**

## Variables Agronómicas

A los 21 días después de la emergencia, se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en las variables morfofisiológicas analizadas (Cuadro 1) ( $p < 0.05$ ). El tratamiento Trich+Bacill+Rab, correspondiente a cápsulas de alginato que contienen *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y extracto de raíz de rábano, presentó los valores más altos en altura de planta ( $35 \pm 2.2$  cm), diámetro de tallo ( $0.8 \pm 0.1$  cm), contenido de clorofila ( $40 \pm 6.0$  unidades SPAD), volumen radicular ( $18 \pm 1.1$  cm<sup>3</sup>), peso seco ( $3.6 \pm 0.2$  g) y peso fresco ( $22 \pm 2.2$  g), diferenciándose estadísticamente del resto de tratamientos. Los tratamientos Trich (cápsulas con *Trichoderma* spp.) y Bacill (cápsulas con *Bacillus* spp.) mostraron respuestas intermedias, mientras que el tratamiento control registró los valores más bajos en todas las variables evaluadas. Estos resultados sugieren que la formulación combinada en cápsulas de alginato generó un efecto sinérgico sobre el crecimiento temprano de las plantas, favoreciendo el desarrollo vegetativo y radicular en comparación con la aplicación individual de los microorganismos y la ausencia de inoculación.

**Cuadro 1. Efecto de cápsulas de alginato que contienen *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. y extracto de raíz de rábano sobre variables morfofisiológicas de plántulas de *Capsicum annuum* L. evaluadas a los 21 días después de la emergencia.****Table 1. Effect of alginate capsules containing *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. and radish root extract on morphophysiological variables of *Capsicum annuum* L. seedlings evaluated 21 days after emergence.**

Tratamientos	Altura	Diámetro de tallo	Clorofila	Volumen radicular	Peso seco	Peso fresco
Trich+Bacill+Rab	35 ± 2.2 a	0.8 ± 0.1 a	40 ± 6.0 a	18 ± 1.1 a	3.6 ± 0.2 a	22 ± 2.2 a
Trich	28 ± 1.3 b	0.6 ± 0.1 b	38 ± 3.2 b	14 ± 2.0 b	3.4 ± 0.2 a	20 ± 1.8 b
Bacill	30 ± 2.8 b	0.9 ± 0.2 a	38 ± 2.8 b	13 ± 1.4 b	2.8 ± 0.1 b	18 ± 1.6 b
Control	26 ± 1.7 c	0.6 ± 0.1 b	36 ± 5.1 b	12 ± 1.0 c	2.5 ± 0.2 c	18 ± 1.4 c

Los valores corresponden a la media ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Values correspond to the mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences between treatments according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

La interacción entre microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) y hongos filamentosos genera un efecto sinérgico sobre la planta (Santoyo *et al.*, 2024). *Bacillus* spp. es reconocido por su capacidad de producir fitohormonas como ácido indolacético (AIA), citoquininas y giberelinas, además de solubilizar fósforo y mejorar la disponibilidad de nutrientes minerales (Lara-Capistrán *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2025). Paralelamente, *Trichoderma* spp. estimula el crecimiento radicular mediante la secreción de compuestos bioactivos, mejora la absorción de nutrientes y activa respuestas fisiológicas asociadas al metabolismo del nitrógeno y la fotosíntesis (Guzmán *et al.*, 2025). La combinación de ambos microorganismos favorece una colonización más eficiente de la rizósfera, incrementando la superficie radicular funcional y, por tanto, la absorción de agua y nutrientes, lo que se refleja en mayores valores de volumen radicular, biomasa fresca y peso seco (Sutthisa, Srilawong, Kliangros, Khankhum y Charirak, 2025).

## CONCLUSIONES

La encapsulación de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus* spp. en alginato, con la incorporación de extracto de *Raphanus sativus*, permitió mejorar la estabilidad y viabilidad de las formulaciones microbianas mediante la generación de un microambiente favorable y la modulación de las propiedades fisicoquímicas del sistema.

Las propiedades físicas de las cápsulas estuvieron directamente influenciadas por su composición biológica, lo que confirma el potencial de los encapsulados de alginato como una alternativa sostenible y funcional para el desarrollo de bioinoculantes aplicables en sistemas agrícolas.

## DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

## CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

## DISPONIBILIDAD DE DATOS

No aplicable.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo contó con el financiamiento y respaldo del proyecto FOCICYT y de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), cuya contribución resultó fundamental para el desarrollo de las actividades experimentales, la adquisición de materiales y la organización de los resultados obtenidos.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: A.V.C.M., D.Y.C. y A.R.A.S.; Metodología: A.V.C.M. e I.F.E.G.; Validación: A.R.A.S. y D.Y.C.; Análisis formal: A.V.C.M. y A.R.A.S.; Investigación: A.V.C.M., D.Y.C. y A.R.A.S.; Recursos: A.V.C.M. e I.F.E.G.; Curación de datos: D.Y.C. y A.R.A.S.; Escritura – preparación del borrador original: A.V.C.M. y A.R.A.S.; Escritura – revisión y edición: A.V.C.M., D.Y.C. y A.R.A.S.; Visualización: A.V.C.M., D.Y.C. e I.F.E.G.; Administración del proyecto: A.V.C.M.; Adquisición de fondos: A.V.C.M.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por el apoyo otorgado a través del Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT) 9na Convocatoria, a través del proyecto PFOC9-07-2023 “Respuesta de cultivos hortícolas a la aplicación de selenio bajo condiciones controladas”

## LITERATURA CITADA

- Almassri, N., Trujillo, F. J., Klieve, A. V., Bell, R., Ying, D., & Shiferaw Terefe, N. (2025). Microencapsulation of  $\beta$ -Glucosidase in Alginate Beads for Post-Rumen Release in Ruminant Gut. *Bioengineering*, 12(12), 1341. <https://doi.org/10.3390/bioengineering12121341>
- Andrade, L. A., Santos, C. H. B., Frezarin, E. T., Sales, L. R., & Rigobelo, E. C. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 11(4), 1088. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>
- Ansabayeva, A., Makhambetov, M., Rebouh, N. Y., Abdelkader, M., Saady, H. S., Hassan, K. M., ... & Ebrahim, M. (2025). Plant growth-promoting microbes for resilient farming systems: mitigating environmental stressors and boosting crops productivity—a review. *Horticulturae*, 11(3), 260. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11030260>
- Arntzen, M. Ø., Pedersen, B., Klau, L. J., Stokke, R., Oftebro, M., Antonsen, S. G., ... & Eijsink, V. G. (2021). Alginate degradation: insights obtained through characterization of a thermophilic exolytic alginate lyase. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(6), e02399-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02399-20>
- Bisz, E. (2021). Iron-catalyzed cross-coupling reactions of alkyl grignards with aryl chlorobenzenesulfonates. *Molecules*, 26(19), 5895. <https://doi.org/10.3390/molecules26195895>
- Castillo-Alfonso, F., Quintana-Menéndez, A., Viguera-Ramírez, G., Sales-Cruz, A. M., Rosales-Colunga, L. M., & Olivares-Hernández, R. (2022). Analysis of the Propionate Metabolism in *Bacillus subtilis* during 3-Indolacetic Production. *Microorganisms*, 10(12), 2352. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122352>
- Chen, A., Wang, D., Ji, R., Li, J., Gu, S., Tang, R., & Ji, C. (2021). Structural and catalytic characterization of TsBGL, a  $\beta$ -glucosidase from *Thermofilum* sp. ex4484\_79. *Frontiers in Microbiology*, 12, 723678. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723678>
- Colin, C., Akpo, E., Perrin, A., Cornu, D., & Cambedouzou, J. (2024). Encapsulation in alginates hydrogels and controlled release: An overview. *Molecules*, 29(11), 2515. <https://doi.org/10.3390/molecules29112515>
- Contreras-Cornejo, H. A., Schmoll, M., Esquivel-Ayala, B. A., González-Esquivel, C. E., Rocha-Ramírez, V., & Larsen, J. (2024). Mechanisms for plant growth promotion activated by *Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystems. *Microbiological Research*, 281, 127621. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127621>
- Dechwongya, P., Limpisood, S., Boonnak, N., Mangmool, S., Takeda-Morishita, M., Kulsirirat, T., ... & Sathirakul, K. (2020). The intestinal efflux transporter inhibition activity of Xanthones from Mangosteen pericarp: an in silico, in vitro and ex vivo approach. *Molecules*, 25(24), 5877. <https://doi.org/10.3390/molecules25245877>
- Dos Santos, I. R., Abdel-Azeem, A. M., Mohesien, M. T., Piekutowska, M., Sheir, D. H., da Silva, L. L., ... & Xavier-Santos, S. (2021). Insights into the bioprospecting of the endophytic fungi of the medicinal plant *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae): Detailed biological activities. *Journal of Fungi*, 7(9), 689. <https://doi.org/10.3390/jof7090689>
- Faligowska, A., Kalembasa, S., Kalembasa, D., Panasiwicz, K., Szymańska, G., Ratajczak, K., & Skrzypczak, G. (2022). The nitrogen fixation and yielding of pea in different soil tillage systems. *Agronomy*, 12(2), 352. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020352>
- Galinier, A., Foulquier, E., & Pompeo, F. (2021). Metabolic control of cell elongation and cell division in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 697930. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.697930>
- García-Ortega, L. F., Quiroz-Serrano, I. N., Guzmán-Moreno, J., Pedraza-Reyes, M., Ramírez-Santoyo, R. M., & Vidales-Rodríguez, L. E. (2025). *Bacillus subtilis* Response to Mercury Toxicity: A Defense Mediated by Sulphur-Rich Molecules and Oxidative Prevention Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(20), 10179. <https://doi.org/10.3390/ijms262010179>
- Ge, M., Fang, T., Zhou, G., Li, C., Li, Y., & Liu, X. (2022). Insight into the dual effect of water on lignin dissolution in ionic liquids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 205, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.079>
- Gubarev, A. S., Lezov, A. A., Mikusheva, N. G., Perevyazko, I., Senchukova, A. S., Lezova, A. A., ... & Tsvetkov, N. V. (2022). Hydrodynamic characteristics and conformational parameters of ferrocene-terpyridine-based polymers. *Polymers*, 14(9), 1776. <https://doi.org/10.3390/polym14091776>
- Guzmán-Guzmán, P., Etesami, H., & Santoyo, G. (2025). *Trichoderma*: a multifunctional agent in plant health and microbiome interactions. *BMC Microbiology*, 25(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04158-2>
- Gzyra-Jagięła, K., Sulak, K., Draczyński, Z., Podzimek, S., Gałęcki, S., Jagodzińska, S., & Borkowski, D. (2021). Modification of Poly (lactic acid) by the Plasticization for Application in the Packaging Industry. *Polymers*, 13(21), 3651. <https://doi.org/10.3390/polym13213651>
- Hamill, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D., S. S., ... & Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1), 5948. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2020). Antibiotic resistance: Moving from individual health norms to social norms in One Health and Global Health. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1914. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01914>
- Hiraoka, M. (2021). Massive *Ulva* green tides caused by inhibition of biomass allocation to sporulation. *Plants*, 10(11), 2482. <https://doi.org/10.3390/plants10112482>

- Huang, Y., Zhang, L., Hu, J., & Liu, H. (2023). Improved loading capacity and viability of probiotics encapsulated in alginate hydrogel beads by in situ cultivation method. *Foods*, 12(11), 2256. <https://doi.org/10.3390/foods12112256>
- Krait, S., Salgado, A., Peluso, P., Malanga, M., Sohajda, T., Benkovic, G., ... & Scriba, G. K. (2021). Complexation of daclatasvir by single isomer methylated  $\beta$ -cyclodextrins studied by capillary electrophoresis, NMR spectroscopy and mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118486>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The many faces of *Enterococcus* spp.-commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 9(9), 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Lai, J., Azad, A. K., Sulaiman, W. M. A. W., Kumarasamy, V., Subramanian, V., & Alshehade, S. A. (2024). Alginate-based encapsulation fabrication technique for drug delivery: an updated review of particle type, formulation technique, pharmaceutical ingredient, and targeted delivery system. *Pharmaceutics*, 16(3), 370. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030370>
- Lara-Capistrán, L., Zulueta-Rodríguez, R., Murillo-Amador, B., Romero-Bastidas, M., Rivas-García, T., & Hernández-Montiel, L. G. (2020). Agronomic response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) to application of *Bacillus subtilis* and vermicompost in greenhouse. *Terra Latinoamericana*, 38(3), 693-704. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.737>
- Martínez-Cano, B., Mendoza-Meneses, C. J., García-Trejo, J. F., Macías-Bobadilla, G., Aguirre-Becerra, H., Soto-Zarazúa, G. M., & Feregrino-Pérez, A. A. (2022). Review and perspectives of the use of alginate as a polymer matrix for microorganisms applied in agro-industry. *Molecules*, 27(13), 4248. <https://doi.org/10.3390/molecules27134248>
- Nordholt, N., van Heerden, J. H., & Bruggeman, F. J. (2020). Biphasic cell-size and growth-rate homeostasis by single *Bacillus subtilis* cells. *Current Biology*, 30(12), 2238-2247. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.030>
- Palma, M., Mondo, S., Pereira, M., Vieira, É., Grigoriev, I. V., & Sá-Correia, I. (2022). Genome sequence and analysis of the flavinogenic yeast *Candida membranifaciens* IST 626. *Journal of Fungi*, 8(3), 254. <https://doi.org/10.3390/jof8030254>
- Qosim, N., Dai, Y., Williams, G. R., & Edirisinghe, M. (2024). Structure, properties, forming, and applications of alginate fibers: A review. *International Materials Reviews*, 69(5-6), 309-333. <https://doi.org/10.1177/09506608241280419>
- Radzlin, N., Yaakop, A. S., Goh, K. M., Liew, K. J., Zakaria, I. I., & Kahar, U. M. (2022). Genome analysis of *Celeribacter* sp. PS-C1 isolated from Sekinchan Beach in Selangor, Malaysia, reveals its  $\beta$ -glucosidase and licheninase activities. *Microorganisms*, 10(2), 410. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020410>
- Rasouli, F., Asadi, M., Hassanpouraghdam, M. B., Aazami, M. A., Ebrahimzadeh, A., Kakaei, K., Dokoupil, L., & Mlcek, J. (2022). Foliar application of ZnO-NPs influences chlorophyll fluorescence and antioxidants pool in *Capsicum annuum* L. under salinity. *Horticulturae*, 8(10), 908. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100908>
- Rigobelo, E. C., Kandasamy, S., & Saravanakumar, D. (2022). Plant growth-promoting microorganisms for sustainable agricultural production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 842533. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.842533>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M., Afridi, M. S., Mitra, D., Valencia-Cantero, E., & Macías-Rodríguez, L. (2024). *Trichoderma* and *Bacillus* multifunctional allies for plant growth and health in saline soils: recent advances and future challenges. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1423980. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1423980>
- Sinan, K. I., Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Gevrenova, R., Picot-Allain, M. C. N., Dall'Acqua, S., ... & Mahomoodally, M. F. (2021). Exploring the chemical profiles and biological values of two *Spondias* species (*S. dulcis* and *S. mombin*): Valuable Sources of Bioactive Natural Products. *Antioxidants*, 10(11), 1771. <https://doi.org/10.3390/antiox10111771>
- Sutthisa, W., Srilawong, J., Kliangros, N., Khankhum, S., & Charirak, P. (2025). Development and application of a *Trichoderma*-PGPR bioformulation to enhance rice growth. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 19(1), 296-306. <https://doi.org/10.22207/jpam.19.1.21>
- Tamburini, E., Doni, L., Lussu, R., Meloni, F., Cappai, G., Carucci, A., ... & Vitali, F. (2020). Impacts of anthropogenic pollutants on benthic prokaryotic communities in Mediterranean touristic ports. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01234>
- Tiberini, A., Manglli, A., Taglienti, A., Vučurović, A., Brodarić, J., Ferretti, L., ... & Mehle, N. (2022). Development and validation of a one-step reverse transcription real-time PCR assay for simultaneous detection and identification of tomato mottle mosaic virus and tomato brown rugose fruit virus. *Plants*, 11(4), 489. <https://doi.org/10.3390/plants11040489>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek-Ścisiel, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Weng, Y., Yang, G., Li, Y., Xu, L., Chen, X., Song, H., & Zhao, C.-X. (2023). Alginate-based materials for enzyme encapsulation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 318(102957), 102957. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102957>
- Wu, X., Liu, Y., Jia, B., Tao, L., Li, H., Wang, J., ... & Yao, Y. (2025). Four decades of *Bacillus* biofertilizers: Advances and future prospects in agriculture. *Microorganisms*, 13(1), 187. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010187>
- Wu, Z., Li, X., Liu, X., Dong, J., Fan, D., Xu, X., & He, Y. (2020). Membrane shell permeability of Rs-198 microcapsules and their ability for growth promoting bioactivity compound releasing. *RSC Advances*, 10(2), 1159-1171. <https://doi.org/10.1039/c9ra06935f>
- Yang, Z., Zhang, Q., Fu, B., Zhang, T., Feng, Y., Zhao, S., & Wang, H. (2025). A multi-enzyme producing *Bacillus subtilis* YCXW-01: Isolation, genomic characterization, and potentials in tobacco stem degradation. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1717865. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1717865>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>
- Zhang, P., Sun, X., Wang, F., & Wang, J. (2023). Mechanical properties and durability of geopolymer recycled aggregate concrete: A review. *Polymers*, 15(3), 615. <https://doi.org/10.3390/polym15030615>