

## Caracterización de Encapsulados de *Metarhizium anisopliae* y su Efecto Sobre el Crecimiento de Plantas de *Capsicum chinense* Jacq. Inoculadas con *Fusarium* Characterization of Encapsulates of *Metarhizium anisopliae* and its Effect on the Growth of *Capsicum chinense* Jacq. Plants Inoculated with *Fusarium*

Rosa Isela Cruz-Rodríguez<sup>1†</sup> , Michelle Ivonne Pereyra-Arroyo<sup>1</sup> ,  
Nancy Ruiz-Lau<sup>1,2</sup> , Víctor Manuel Ruiz-Valdiviezo<sup>1</sup> ,  
María Laura Porraz-Ruiz<sup>1</sup> y Jorge Armando Gómez-Salinas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tecnológico Nacional de México, I.T. de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km 1080, Boulevares. 29050 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; (R.I.C.R.), (M.I.P.A.), (V.M.R.V.), (M.L.P.R.), (J.A.G.S.), (N.R.L.).

<sup>2</sup> Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI). Av. Insurgentes Sur, Col. Credito Constructor. 03940 Benito Juárez, Ciudad de México, México; (N.R.L.).

<sup>†</sup> Autora para correspondencia: rosa.cr@tuxtla.tecnm.mx

### RESUMEN

En México, el chile (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo de importancia económica y alimentaria cuya producción se ve afectada por fitopatógenos del suelo, siendo el control biológico una herramienta benéfica para el ecosistema. En el caso de *M. anisopliae*, presenta como limitante su sensibilidad a factores ambientales que reducen su efectividad, por lo que una cobertura mediante una matriz polimérica es factible para brindarle protección. Por ello, se realizó la caracterización de encapsulados de esporas de *M. anisopliae* y su efecto en el crecimiento de plantas de chile inoculadas con *Fusarium oxysporum*. La encapsulación se hizo mediante gelificación iónica con alginato de sodio y cloruro de calcio, se analizó la capacidad de retención y absorción de agua de los encapsulados, así como la viabilidad de las esporas y su actividad antagonista *in vitro* por confrontación dual sobre *F. oxysporum*. También se comparó la capacidad del encapsulado y de la suspensión de esporas de *M. anisopliae* en el crecimiento de plantas de *C. chinense* Jacq. infectadas con *F. oxysporum*. El encapsulado CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ) con un 43.4% de humedad y 48.3% de hinchamiento, mostró la más alta supervivencia de esporas del 96% y viabilidad superior al 90% durante 75 días de almacenamiento a 37 °C. CEM2 evidenció su capacidad antagonista *in vitro* al inhibir el crecimiento radial y esporulación de *F. oxysporum* 62.9 y 60.5 %, respectivamente. La aplicación del encapsulado CEM2 y la suspensión de esporas de *M. anisopliae* redujeron el efecto de la aplicación de *Fusarium* en las plantas de chile, ya que los valores de altura, diámetro de tallo y clorofila fueron mayores que en plantas infectadas y demostró que promueve el crecimiento al aplicarlo en plantas sanas.

**Palabras clave:** alginato de sodio, antifúngico, control biológico, esporas, supervivencia.

### SUMMARY

In Mexico, chili (*Capsicum chinense* Jacq.) is a crop of economic and nutritional importance whose production is affected by soil phytopathogens, with biological control being a beneficial tool for the ecosystem; in the case of *M. anisopliae*, its limitation is sensitivity to environmental factors that reduce its effectiveness, so coverage using a polymer matrix is feasible to provide protection, for this reason, the characterization of encapsulated spores of *M. anisopliae* and its effect on the growth of chili plants inoculated with *Fusarium oxysporum* was carried out. The encapsulation was done by ionic gelation with sodium alginate and calcium chloride, the water retention and absorption capacity of the encapsulates was analyzed, as well as the viability of the spores and their antagonistic activity *in vitro* by dual confrontation



#### Cita recomendada:

Cruz-Rodríguez, R. I., Pereyra-Arroyo, M. I., Ruiz-Lau, N., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Porraz-Ruiz, M. L., & Gómez-Salinas, J. A. (2025). Caracterización de Encapsulados de *Metarhizium anisopliae* y su Efecto Sobre el Crecimiento de Plantas de *Capsicum chinense* Jacq. Inoculadas con *Fusarium*. *Terra Latinoamericana*, 43, 1-10. e2004. <https://doi.org/10.28940/terra.v43i.2004>

Recibido: 19 de junio de 2024.  
Aceptado: 12 de enero de 2025.  
Artículo. Volumen 43.  
Marzo de 2025.

Editor de Sección:  
Dr. Victor Manuel Ruiz Valdiviezo



**Copyright:** © 2025 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/>).

on *F. oxysporum*. The capacity of the encapsulation and the spore suspension of *M. anisopliae* for the control of *Fusarium* in *C. chinense* Jacq. plants was also compared. The encapsulate CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ) with 43.4% humidity and 48.3% swelling, showed the highest spore survival of 96% and viability of more than 90% during 75 days of storage at 37 °C. CEM2 demonstrated its antagonistic capacity *in vitro* by inhibiting the radial growth and sporulation spores of *F. oxysporum* 62.9 and 60.5% respectively. The application of the encapsulate CEM2 and the suspension spores of *M. anisopliae* reduced the effect of *Fusarium* inoculation in chili plants since the values of height, stem diameter and chlorophyll were higher than diseased plants and demonstrated that it promotes growth when applied to healthy plants.

**Index words:** *sodium alginate, antifungal, biological control, spores, survival*

## INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo que tiene una alta demanda en México y el mundo. Se cultiva principalmente en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco (Javier-López *et al.*, 2022) y ha mostrado ser vulnerable a diversos patógenos del suelo que disminuyen su producción y calidad, por lo que los agricultores aplican productos químicos para su protección debido a su efectividad; sin embargo, el uso excesivo y consecuente acumulación han generado afectaciones al medio ambiente y a la salud humana (Pathak *et al.*, 2022).

En búsqueda de mecanismos amigables con el ambiente, se ha recurrido al control biológico a través del empleo de microorganismos benéficos como los hongos entomopatógenos (Medo y Cagáñ, 2011; Razinger, Praprotnik y Schroers, 2020). Los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* han demostrado ser útiles en el control de plagas y enfermedades agrícolas, *Beauveria bassiana* se ha utilizado para el control de *Botrytis cinerea* en chile y tomate (Barra-Bucareí *et al.*, 2019), de *Verticillium dahlia*, causante del marchitamiento del algodón (Erdoğan y Sağlan, 2023) y de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol 17108) en tomate (López-López *et al.*, 2023), mientras que *Metarhizium anisopliae* ha demostrado efecto antifúngico *in vitro* ante cepas de *Fusarium oxysporum* y *Cladosporium herbarum* (Ravindran, Chitra, Wilson y Sivaramakrishnan, 2014), *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Picardal, 2019). Guigón-López *et al.* (2021) reportaron que *M. anisopliae* redujo la germinación de esporas (92%) y el crecimiento micelial (80%) de *B. cinérea*. Mimma *et al.* (2023) reportaron que la cepa *M. anisopliae* (MetA1) redujo hasta 58.33% la incidencia de la pudredumbre en raíz de plantas de *Abelmoschus esculentus* L. provocada por *Rhizoctonia solani*, no obstante, su desempeño en campo ha resultado inconsistente, ya sea por su vida útil corta, la presencia de agentes de estrés biótico y los niveles de carbono disponible en el suelo (Stevens, Sonderegger y Johnson, 2020). Algunas especies de *Metarhizium* como *M. anisopliae*, *M. brunneum* y *M. robertsii*, han demostrado en estudios en invernadero y semicampo su capacidad para colonizar la rizosfera y establecerse como endófitos en las raíces (Castro, *et al.*, 2016; Greenfield *et al.*, 2016; Krell, Jakobs, Vidal y Patel, 2018; Mimma *et al.*, 2023), contribuyendo al desarrollo y crecimiento de plantas.

La eficiencia de los hongos entomopatógenos para provocar infección en insectos y en hongos patógenos, así como colonizar la rizosfera, depende de que mantenga niveles elevados de propágulos (Kessler, Enkerl, Schweize y Keller, 2004); sin embargo, su viabilidad al aplicarlo en campo se ve reducida debido a la sensibilidad a temperaturas extremas, incidencia de radiación ultravioleta y la competencia con microorganismos propios del suelo (Jaronski, 2010; Maruyama, Bilesky, Lima y Fraceto, 2020; Felizatti *et al.*, 2021). das Chagas, Alves, Luz, Moura y Kamp (2020) y Corval *et al.* (2021) observaron que la exposición prolongada a la radiación UV-B disminuye la viabilidad de aislados de *Metarhizium* spp. Por lo que se requiere del desarrollo de estrategias que permitan la sobrevivencia de sus esporas al aplicarlas en suelo y con ello ofrecer una alternativa para reducir en un futuro el uso de plaguicidas.

La encapsulación es una de las técnicas que ha mostrado ser eficiente para proteger microorganismos de factores que producen estrés biótico y abiótico (Vemmer y Patel, 2013; Lei, Halim, Asib, Zakaria y Azmi, 2022), aumentando la estabilidad y el potencial de uso de las células encapsuladas que pueden liberarse lentamente y tener una efectividad prolongada (John, Tyagi, Brar, Surampalli y Prévost, 2010; Meirelles *et al.*, 2023). El alginato es uno de los principales biopolímeros que se ha destacado en procesos de encapsulación y se ha utilizado en diferentes áreas, incluyendo las industrias alimentaria, farmacéutica y agrícola, debido a que es un polisacárido no tóxico, que mediante un proceso simple de gelificación iónica en una sal como el cloruro de calcio forma una matriz polimérica que permite la encapsulación de células. Se ha reportado que conidios fúngicos encapsulados en una matriz polimérica conservan su viabilidad tras ser expuestos al calor y la radiación UV (Przyklenk, Vemmer,

Hanitzsch, y Patel, 2017; Locatelli, dos Santos, Botelho, Finkler y Bueno, 2018; Maruyama *et al.*, 2020) y de acuerdo con Qiu *et al.* (2019), los conidios encapsulados de *Metarhizium* spp. prolongan su vida útil en almacenamiento en comparación con los conidios libres. En un estudio reciente, Llerena-Ramos *et al.* (2025) destacan la relevancia de integrar prácticas agroecológicas como el uso de microorganismos benéficos como *Azotobacter chroococum* y *Metarhizium anisopliae* en combinación con abonos orgánicos como el compost líquido enriquecido con  $K_4SiO_4$ , para mejorar la sostenibilidad y la productividad.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue caracterizar encapsulados de esporas de *Metarhizium anisopliae* y evaluar su aplicación en el desarrollo de plantas de chile habanero criollo (*C. chinense* Jacq.) infectadas con *Fusarium oxysporum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

La cepa de *Metarhizium anisopliae* M20-CIDSM01 fue proporcionada por el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (GenBank KR998522) y la cepa de *Fusarium oxysporum* aislada de plántulas de *C. chinense* Jacq. ambas cepas se reactivaron en agar papa dextrosa.

### Material Vegetal

Las semillas de chile habanero fueron colectadas de frutos de un cultivo ubicado en Conkal, Yucatán.

### Preparación de Encapsulados de *Metarhizium anisopliae*

La formación de encapsulados de esporas de *M. anisopliae* en alginato se realizó por gelificación iónica siguiendo la metodología propuesta por Meirelles *et al.* (2023) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de esporas de *M. anisopliae* a partir de un cultivo en caldo Czapek y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas  $mL^{-1}$ , que se mezcló con una solución de alginato de sodio al 4% (p/v) estéril en proporción 1:10. La mezcla homogénea se adicionó por goteo, empleando jeringas con diámetro interno del pivote de 1.2 y 1.5 mm, en soluciones de cloruro de calcio 0.5 M y 1 M durante 30 min en agitación a 7 rpm. Se obtuvieron encapsulados de 3000  $\mu m$  y 2000  $\mu m$   $\varnothing$ , las cuales se filtraron en papel filtro #1 (Whatman) y se lavaron con agua destilada estéril. Finalmente, fueron secados en un horno a 30 °C durante 48 horas.

### Humedad

El contenido de humedad de los encapsulados de *M. anisopliae* tras culminar el proceso de encapsulación se analizó por gravimetría (Tu, He, Yang, Wu y Yi, 2015). En una cápsula previamente tarada se depositó 1 g de encapsulados y se midió la masa en conjunto ( $m_1$ ), se llevó a una estufa y se mantuvo a 40 °C por 3 h; posteriormente, se dejó enfriar en un desecador y se midió la masa ( $m_2$ ). El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

### Hinchamiento

Después del proceso de secado en la preparación de encapsulados, se tomaron muestras de 50 unidades de cada uno de los encapsulados y se midió la masa (g) para cada tratamiento ( $M_d$ ). Se sumergieron en una solución buffer de fosfatos a pH 7.0 durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras se filtraron y se secaron con papel filtro para retirar el agua superficial; posteriormente se determinó la masa final ( $M_s$ ) (Raj-Singh, Woolfson y Donnelly, 2010). El hinchamiento expresado en porcentaje se calculó con la siguiente fórmula (Malektaj, Drozdov y deClaville, 2023):

$$H (\%) = \frac{M_s - M_d}{M_d} \times 100 \quad (2)$$

## Supervivencia y Viabilidad

Los encapsulados de esporas de *M. anisopliae* se depositaron en recipientes de vidrio sellados que se mantuvieron a 37 °C por un periodo de tres meses, durante el cual se realizaron muestreos de los encapsulados a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días para determinar el número de esporas viables. Para ello, se adicionó 1 g de cada encapsulado en 10 mL de una solución de citrato de sodio al 2% (p/v) con 0.01% de Tween, se depositaron 50 µL de la suspensión de esporas en cajas Petri de 6 mm Ø, y se les agregó 10 mL de agar papa dextrosa. Transcurridas 48 h de incubación a 28 °C, se realizó la cuenta en placa adaptado de Baldiviezo, Nieva, Pedrini y Marino (2023). El porcentaje de viabilidad se determinó con la fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{Nd}{N} \times 100 \quad (3)$$

Donde Nd, corresponde al número de unidades formadoras de colonias por gramo de encapsulado obtenido de cada muestra y N es el número de unidades formadoras de colonias obtenidas en el tiempo cero expresadas en UFC g<sup>-1</sup> que corresponde a la supervivencia de las esporas al proceso de encapsulación.

## Prueba de Antagonismo *in vitro*

Se analizó la actividad antagónica de los encapsulados de esporas de *M. anisopliae* contra *F. oxysporum*, mediante confrontación dual (Yadav, Adhikari, Kim, Kim y Lee, 2021), para lo cual se depositó en un extremo de la caja Petri con medio agar Czapek 1 g de encapsulados y en el extremo equidistante se inoculó con un disco micelial de Ø 5 mm de la cepa de *F. oxysporum*. Las cajas se incubaron a 28 °C ± 2°C, y cada 24 horas durante ocho días se midió el radio de crecimiento de *Fusarium* (R2). Como control negativo (R1), se inoculó a *Fusarium* únicamente en el extremo de la caja Petri. También se analizó la capacidad antagónica de esporas sin encapsular de *M. anisopliae*, utilizando un disco micelial de Ø 5 mm del entomopatógeno y se depositó en un extremo de la caja siguiendo el mismo proceso de los encapsulados. El efecto antagónico se calculó mediante la inhibición del crecimiento radial (ICR) expresado en porcentaje con la siguiente fórmula:

$$\text{ICR (\%)} = \left( \frac{R1 - R2}{R1} \right) \times 100 \quad (4)$$

El efecto de las esporas encapsuladas y esporas en disco de *M. anisopliae* sobre la esporulación de *F. oxysporum* se realizó mediante cuenta directa en cámara de Neubauer. Transcurridos 12 días de iniciada la confrontación, se obtuvieron de cada unidad experimental de los diferentes tratamientos evaluados 10 discos de micelio de *Fusarium* Ø 6 mm que se depositaron en tubos de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril adicionado con 0.05% de Tween 80, los tubos se agitaron por 60 s para desprender las esporas y se calculó el porcentaje de Inhibición de Esporulación (IE) usando la fórmula:

$$\text{IE (\%)} = \left( \frac{E1 - E2}{E1} \right) \times 100 \quad (5)$$

Donde E1= cantidad de esporas de *F. oxysporum* provenientes del tratamiento R1 y E2= cantidad de esporas de *F. oxysporum* provenientes de los diferentes tratamientos de confrontación.

## Experimento en Invernadero

Se aplicó un diseño experimental en bloques completamente al azar y se evaluaron siete tratamientos con seis réplicas: T1 = control (agua destilada); T2 = control químico (fungicida Mancozeb); T3 = *M. anisopliae* libre; T4 = *M. anisopliae* libre + *F. oxysporum*; T5 = *F. oxysporum*; T6 = encapsulados; T7 = encapsulados + *F. oxysporum*, se germinaron plántulas de chile habanero criollo (*C. chinense* Jacq.) en semilleros que contenían una mezcla de tierra negra y Peat moss (3:1 p/p), 30 días después de la germinación se trasplantaron a bolsas de vivero con capacidad para 5 kg de sustrato, los tratamientos T3 y T4 se inocularon el día del trasplante con la suspensión de *M. anisopliae* (20 mL a 1×10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup>), mientras que a los tratamientos T6 y T7 se les colocó 20 g de encapsulados en el suelo a una profundidad de 10 cm junto a la rizosfera de las plantas. Siete días después del trasplante se aplicó la suspensión de *F. oxysporum* en los tratamientos T4, T5 y T7 (20 mL a 1×10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) en la base del tallo. Durante el desarrollo del experimento (54 días) se realizaron mediciones de altura de planta (cm), longitud de raíz (cm), diámetro de tallo (cm), número de frutos y contenido de clorofila (unidades SPAD).

## Análisis Estadístico

Se determinó el valor promedio de los datos obtenidos de cada uno de los experimentos realizados y se realizó un análisis de varianza simple, seguida de una prueba de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

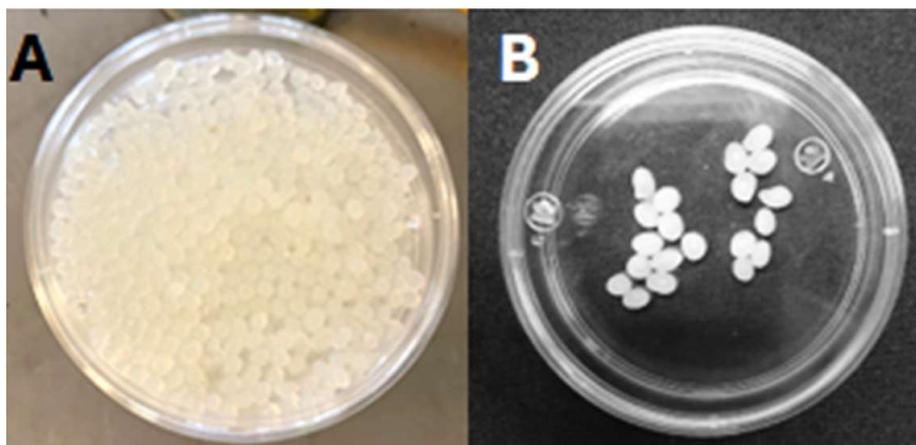
### Caracterización de los Encapsulados de Esporas de *M. anisopliae*

La apariencia de los encapsulados fue de textura lisa sin poros visibles, color blanco, ligeramente húmedas y predominantemente esféricas (Figura 1), con diámetros de 3000 y 2000  $\mu\text{m}$ , calculados por frecuencia relativa con  $N=100$ . Se agruparon en cuatro tipos que se denominaron CEM1 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM3 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ) y CEM4 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ).

En el Cuadro 1, se observa que no hubo diferencia estadística significativa en el porcentaje de humedad de los encapsulados después de la etapa de secado incluida en la preparación, se obtuvieron valores entre 42 y 52% de humedad. Por otro lado, la capacidad de hinchamiento nos indica la afinidad de la matriz polimérica de interactuar con las moléculas de agua y al respecto el análisis de los datos indicó que si hay diferencia estadística significativa entre los encapsulados de *M. anisopliae*, CEM3 presentó el valor más alto con  $55.1 \pm 1.7\%$  de hinchamiento, ya que su concentración de cloruro de calcio es baja y generó una red menos estable con el alginato, mientras CEM2 y CEM4 que se reticularon con una solución de  $\text{CaCl}_2$  1M mostraron menor capacidad de retención de agua, lo que se explica conforme a lo expuesto por Savić-Gajić, Savić, y Svirčev (2023), quienes indicaron que a mayor concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  se presenta una mayor reticulación de las cadenas de alginato modificando la densidad de la red y por tanto la matriz es menos permeable, por lo tanto los encapsulados con menor hinchamiento permitieron una liberación lenta de las esporas prolongando su actividad biológica.

### Eficiencia de la Encapsulación de Esporas de *M. anisopliae*

En la Figura 2A, se presenta la concentración de esporas que sobrevivieron a las condiciones de preparación del encapsulado y se observa que CEM2 mantuvo la mayor concentración con  $9.6 \times 10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  que corresponde al 96% del contenido de esporas en la mezcla inicial, seguido de CEM4 con 81%. Cabe destacar que tanto CEM2 como CEM4 mostraron menor hinchamiento y menor permeabilidad de la matriz debido a su alta concentración de cloruro de calcio.



**Figura 1. Encapsulados de esporas de *M. anisopliae* en alginato por gelificación iónica.**

A = microcápsulas de 2000  $\mu\text{m}$ ; B = microcápsulas de 3000  $\mu\text{m}$ .

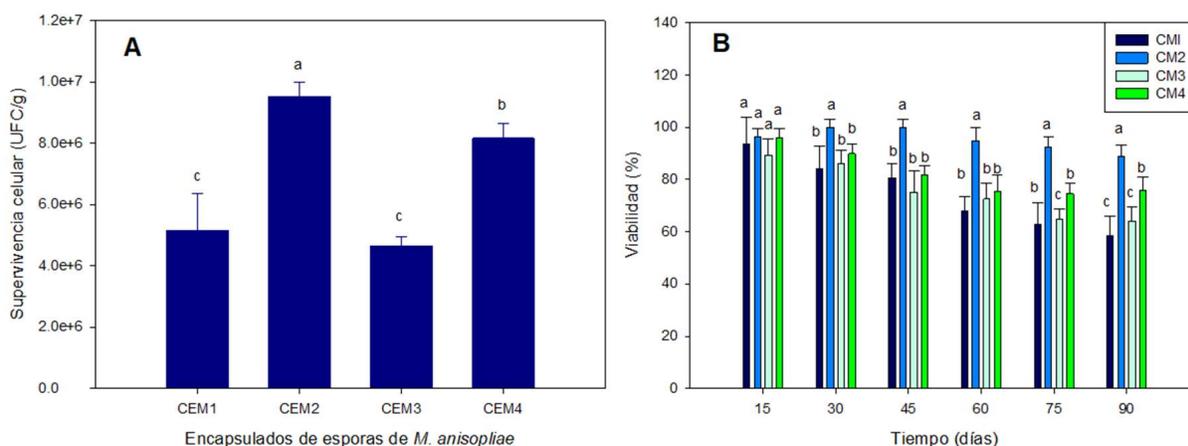
**Figure 1. Encapsulated of *M. anisopliae* spores in alginate by ionic gelation.** A = 2000  $\mu\text{m}$  microcapsules; B = 3000  $\mu\text{m}$  microcapsules.

**Cuadro 1. Contenido de humedad y tasa de hinchamiento de los encapsulados.**  
**Table 1. Moisture content and swelling rate of encapsulates.**

Encapsulados de esporas de <i>M. anisopliae</i>	Humedad	Hinchamiento
	----- % -----	
CEM1	42.74±3.44 a	52.48±0.78 b
CEM2	43.41±2.51 a	48.35±0.21 c
CEM3	52.27±8.81 a	55.10±1.70 a
CEM4	52.79±7.53 a	44.95±3.99 c

Valores promedio ± desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencia mínima significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). CEM1 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM3 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM4 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ).  
 Mean values  $\pm$  standard deviation. Same letters indicate that there is no significant minimum difference according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). CEM1 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM3 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM4 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ).

Fu y Chen (2011) reportaron que al almacenar conidios de *M. anisopliae* a 37 °C se afecta negativamente su viabilidad, por lo que se analizó la capacidad de protección de la matriz polimérica alginato-calcio durante 90 días; los datos de viabilidad se presentan en la Figura 2B y se observa que los valores obtenidos a los 15 días de almacenamiento no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ), pero a partir del muestreo del día 30 hasta concluir el periodo de almacenamiento, se observó que los porcentajes de viabilidad de CEM2 tuvieron diferencias estadísticas significativas con los demás encapsulados, esto se atribuyó a la mayor concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz (1 M  $\text{CaCl}_2$ ), lo que evitó que las esporas tuvieran exposición a los factores ambientales, manteniendo la viabilidad por arriba del 92%, mientras CEM1 y CEM3 con menor concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), presentaron una reducción significativa en la viabilidad de 58.5±7.3 y 63.9±5.6% respectivamente a los 90 días de almacenamiento. Debido a que durante la preparación de la encapsulación, las esporas no son expuestas a temperaturas elevadas, son mínimas las afectaciones que se provocan a la integridad y funcionamiento de las esporas. Aun en condiciones limitadas de nutrientes, los componentes de la matriz polimérica contribuyen significativamente a la retención de esporas (Rahman *et al.*, 2024), dado que la viscosidad del alginato genera mayor cohesión y el calcio regula el funcionamiento de proteínas fosfatasa como la calcineurina que modula la respuesta a estrés, la morfogénesis y homeostasis de iones (Fox y Heitman, 2002), además de inducir la formación de conidios (Juvvadi, Lamothe y Steinbach, 2014).



**Figura 2. Eficiencia del proceso de encapsulación de esporas de *M. anisopliae*.** A = supervivencia de las esporas expresados en UFC g<sup>-1</sup>; B = porcentaje de viabilidad de las esporas encapsuladas durante el almacenamiento.

**Figure 2. Efficiency of the *M. anisopliae* spore encapsulation process.** A = spore survival expressed in UFC g<sup>-1</sup>; B = percent viability of encapsulated spores during storage.

### Actividad Antagonista *in vitro* de los Encapsulados sobre *F. oxysporum*

El análisis estadístico ( $P \leq 0.05$ ), de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial (ICR) de *F. oxysporum* en presencia de los diferentes encapsulados de *M. anisopliae* (CEM) que se muestran en el Cuadro 2, indica que sí hay diferencias significativas en los datos obtenidos de ICR, siendo los mayores porcentajes la muestra de encapsulado CEM2 con  $62.98 \pm 3.43\%$  y la aplicación del disco micelial del entomopatógeno (DME), con  $63.57 \pm 3.27\%$  de ICR. En esta prueba de antagonismo, la forma y el tamaño de los encapsulados influyen en la actividad antagonista, ya que a mayor diámetro de las microcápsulas de forma esférica es mayor el área superficial para la liberación de esporas. Así también la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  influye directamente en la reducción significativa del crecimiento micelial de los hongos (Boumaaza, Benkhelifa y Belkhouja, 2015). Debido a que la esporulación es importante para la propagación e infección de las especies de *Fusarium*, se analizó el efecto de los encapsulados sobre la inhibición de esporulación (IE) y no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las muestras analizadas. Cabe destacar que los valores obtenidos de IE que se encuentran entre 50-65% son relevantes para el control de *Fusarium* debido a que, como han reportado Ajmal, Hussain, Ali, Chen y Lin (2022) al reducir el crecimiento micelial de este patógeno se induce su esporulación como mecanismo de supervivencia, por lo que es relevante que el antagonista tenga la capacidad de inhibir tanto el crecimiento como la esporulación del patógeno.

### Potencial Antifúngico *in vivo* de los Encapsulados sobre *F. oxysporum*.

Debido a la viabilidad y capacidad de inhibición *in vitro* del encapsulado CEM2, se eligió aplicarlo en el experimento *in vivo*, como pretratamiento para el control de *F. oxysporum* en plantas de Chile. En el Cuadro 3 se presentan los datos obtenidos del efecto de la aplicación de una suspensión de esporas libres de *M. anisopliae* (T4) y del encapsulado CEM2 (T7) sobre parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de Chile infectadas con *Fusarium*. El análisis ANOVA reveló que los efectos provocados de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la altura de planta, diámetro de tallo y número de frutos por planta, a los 54 días después de la inoculación, se redujeron significativamente con la aplicación de *M. anisopliae* (T4 y T7) en comparación con el tratamiento T5 inoculado únicamente con *F. oxysporum*. La altura fue de 44 cm con el tratamiento T5, mientras que las plantas con los tratamientos T4 y T7 alcanzaron 75.33 y 77.67 cm, respectivamente. Mientras que el valor del diámetro de tallo se duplicó con T4 y T7, alcanzando 0.64 y 0.58 cm respectivamente, cabe destacar que con ambos tratamientos se obtuvo mayor producción de frutos por planta. La aplicación de CEM2 en el tratamiento T6, plantas sin patógeno, elevó el contenido de clorofila a 11.08 SPAD, que refleja una mayor asimilación de nutrientes y, por consiguiente, un mejor crecimiento, superando hasta un 30% la altura del tratamiento T1, plantas sanas sin inocular.

Lo anterior comprueba que las esporas de *M. anisopliae* libres o encapsuladas son útiles para reducir el efecto de la presencia de *F. oxysporum* en el crecimiento de las plantas de Chile, debido a que este entomopatógeno posee mecanismos enzimáticos que le permiten colonizar las raíces de las plantas, mejorando así el crecimiento de su huésped y actuando como antagonista de patógenos (Sarven *et al.*, 2020). Cabe resaltar que la matriz polimérica semipermeable utilizada para la encapsulación de *M. anisopliae* reduce la pérdida de agua y solutos, permitiendo el equilibrio de gases y controlando cambios bioquímicos, de tal manera que no reduzca su efectividad por la exposición a factores ambientales como temperatura y humedad, además de mantener su viabilidad en almacenamiento.

**Cuadro 2. Efecto de los encapsulados sobre la inhibición del crecimiento radial y la inhibición de esporulación de *F. oxysporum*.**  
**Table 2. Effect of the encapsulates on the inhibition of radial growth and the inhibition of sporulation of *F. oxysporum*.**

Muestras	ICR	IE
	----- % -----	
CEM1	44.05±5.72 b	59.56±6.76 a
CEM2	62.98±3.43 a	60.49±4.96 a
CEM3	31.89±3.39 c	59.51±6.77 a
CEM4	33.54±5.11 c	53.57±2.81 a
DME	63.57±3.27 a	58.33±5.20 a

Valores promedio  $\pm$  desviación estándar. Letras iguales indican que no son significativamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey). CEM1 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM3 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM4 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ). DEM (Disco micelial del entomopatógeno-*M. anisopliae*) ICR = inhibición de crecimiento radial; IE = inhibición de esporulación.

Mean values  $\pm$  Standard deviation. Same letters indicate that they are not significantly different from  $P \leq 0.05$  (Tukey's Test). CEM1 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM2 (3000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM3 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 0.5 M  $\text{CaCl}_2$ ), CEM4 (2000  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$ ). DEM (Mycelial disk of the entomopathogen-*M. anisopliae*) ICR = radial growth inhibition; IE = sporulation inhibition.

**Cuadro 3. Efecto de la aplicación de esporas libres y encapsuladas de *M. anisopliae* sobre el crecimiento de plantas de Chile (*C. chinense* Jacq.) inoculadas con *Fusarium*.**

**Table 3. Effect of the application of free spores and encapsulated from *M. anisopliae* on the growth of chili plants (*C. chinense* Jacq.) with *Fusarium* inoculated.**

Tratamientos	Número de frutos	Longitud de raíz	Altura de planta	Diámetro de tallo	Clorofila Unidades SPAD
	----- cm -----				
T1	1.33±0.58 c	39.67±10.60 a	57.17±5.35 b	0.62±0.10 a	7.42±1.42 bc
T2	-	39.83±11.09 a	72.67±8.08 a	0.2±0 c	8.28±1.21 b
T3	3.0±1.15 bc	32.0±1.0 a	71.67±3.21 a	0.47±0.06 b	6.11±0.31 cd
T4	10.0±4.36 a	35.5±2.5 a	75.33±0.58 a	0.64±0.05 a	6.18±1.80 cd
T5	-	35.90±5.77 a	44.0±2.64 c	0.3±0.1 c	1.68±0.45 e
T6	3.33±0.58 b	35.5±10.0 a	74.17±3.25 a	0.66±0.05 a	11.08±0.99 a
T7	8.33±1.53 a	33.3±4.51 a	77.67±4.72 a	0.58±0.05 ab	4.59±1.72 d

Valores promedio ± desviación estándar. Letras iguales indican que no son significativamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey). T1 = control negativo (sin inoculación); T2 = químico (fungicida mancozeb); T3 = *M. anisopliae* libre; T4 = *M. anisopliae* libre + *F. oxysporum*; T5 = control positivo (*F. oxysporum*); T6 = CEM2; T7 = CEM2 + *F. oxysporum*.

Mean values ± Standard deviation. Same letters indicate that they are not significantly different from  $P \leq 0.05$  (Tukey's Test). T1 = negative control (without inoculation); T2 = chemical (mancozeb fungicide); T3 = *M. anisopliae* free; T4 = *M. anisopliae* free + *F. oxysporum*; T5 = positive control (*F. oxysporum*); T6 = CEM2; T7 = CEM2 + *F. oxysporum*.

## CONCLUSIONES

La efectividad de la encapsulación de esporas de *M. anisopliae* mediante gelificación iónica con alginato de sodio y cloruro de calcio varía según la concentración de iones de calcio y el tamaño de la microcápsula, los encapsulados CEM2 de 3000  $\mu\text{m}$  de diámetro y que se preparó con una solución 1 M de  $\text{CaCl}_2$  mostró una efectividad superior al 95%, manteniendo la viabilidad de las esporas por arriba del 90% durante 90 días almacenados a 37 °C. La permeabilidad de la matriz polimérica permite la liberación de las esporas sin afectar su actividad antagonista *in vitro* sobre *F. oxysporum*, inhibiendo su crecimiento y esporulación, mientras que al aplicarlo en plantas de Chile habanero criollo (*C. chinense* Jacq.) promueve el crecimiento vegetal y reduce el efecto de la infección por *Fusarium*, por lo que el empleo de estos encapsulados son una alternativa viable para reducir el uso de productos químicos en este cultivo.

## DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

## CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

## DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los conjuntos de datos utilizados o analizados durante el estudio actual están disponibles del autor correspondiente a solicitud razonable.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

## FINANCIACIÓN

No aplicable.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: R.I.C.R. y N.R.L. Metodología: R.I.C.R., N.R.L., y M.I.P.A. Software: R.I.C.R. y M.I.P.A. Validación: M.L.P.R., R.I.C.R., y N.R.L. Análisis formal: R.I.C.R. y V.M.R.V. Investigación: M.I.P.A. y M.L.P.R. Recursos: R.I.C.R. Curación de datos: V.M.R.V. Escritura, preparación del borrador original: R.I.C.R. y N.R.L. Escritura, revisión y edición: R.I.C.R. y N.R.L. Visualización: M.I.P.A. y J.A.G.S. Supervisión; R.I.C.R. y J.A.G.S. Administración del proyecto: R.I.C.R. Adquisición de fondos: R.I.C.R.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Cipriano García Gutiérrez del Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por proporcionar la cepa de *M. anisopliae*.

## LITERATURA CITADA

- Ajmal, M., Hussain, A., Ali, A., Chen, H., & Lin, H. (2022). Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* spp. *Journal of Fungi*, 9(10), 1-18. <https://doi.org/10.3390/jof9010010>
- Baldivieso, L. V., Nieva, L. B., Pedrini, N., & Marino, C. R. (2023). Microencapsulation of a Native Strain of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and Bioinsecticide Activity against Pyrethroid-Resistant *Triatoma infestans* to Vector Control of Chagas Disease in the Argentine Gran Chaco Region. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(245), 1-9. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050245>
- Barra-Bucareí, L., France-Iglesias, A., Gerding-González, M., Silva-Aguayo, G., Carrasco-Fernández, J., Franco-Castro, J., & Ortiz-Campos, J. (2019). Antifungal Activity of *Beauveria bassiana* Endophyte against *Botrytis cinerea* in Two Solanaceae Crops. *Microorganisms*, 8(65), 1-15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010065>
- Boumaaza, B., Benkhelifa, M., & Belkhouidja, M. (2015). Effects of two salts compounds on mycelial growth, sporulation, and spore germination of six isolates of *Botrytis cinerea* in the western north of Algeria. *International Journal of Microbiology*, 2015(1), 572626. <https://doi.org/10.1155/2015/572626>
- Castro, T., Mayerhofer, J., Enkerli, J., Eilenberg, J., Meyling, N. V., de Andrade Moral, R., ... & Delalibera Jr, I. (2016). Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.09.031>
- Corval, A. R., Mesquita, E., Corrêa, T. A., Silva, C. D. S., Bitencourt, R. D. O., Fernandes, É. K., ... & Gôlo, P. S. (2021). UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 61(1), 15-26. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000515>
- das Chagas, B. C., Alves, P. J. R., Luz, C., Moura, M. G., & Kamp, F. E. K. (2020). Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. *Fungal Biology*, 124(8), 714-722. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.003>
- Erdogan, O., & Saçlan, Z. (2023). Antifungal activity of local isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Verticillium dahliae* Kleb. causing wilt disease of cotton. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33(52), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00684-1>
- Felizatti, A. P., Manzano, R. M., Rodrigues, I. M. W., da Silva, M. F. D. G. F., Fernandes, J. B., & Forim, M. R. (2021). Encapsulation of *B. bassiana* in biopolymers: improving microbiology of insect pest control. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.704812>
- Fox, D.S., & Heitman, J. (2002). Good fungi gone bad: The corruption of calcineurin. *BioEssays*, 24(10), 894-903. <https://doi.org/10.1002/bies.10157>
- Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127-1149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.053>
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, 95, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>
- Guigón-López, C., Holguín-Ibarra, P. D., Torres-Zapien, J. H., García-Cruz, I., Villapando, I., & Salas-Salazar, N.A. (2021). *Metarhizium anisopliae* reduce la germinación de conidias y el crecimiento del micelio del mohó gris de la manzana *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 160, 104660. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104660>
- Jaronski, S. T. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biological Control*, 55, 159-185. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9248-3>
- Javier-López, L., Palacios-Torres, R. E., Ramírez-Seañez, A. R., Hernández-Hernández, H., Antonio-Luis, M. del C., Yam-Tzec, J. A., & Chaires-Grijalva, M. P. (2022). Producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en lombricomposta con fertilización orgánica. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 9(3), 1-10. <https://doi.org/10.19136/era.a9n3.3348>
- John, R.P., Tyagi, R., Brar, S., Surampalli, R., & Prévost, D. (2010). Bio-Encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211-226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
- Juvvadi, P. R., Lamoth, F., & Steinbach, W. J. (2014). Calcineurin as a multifunctional regulator: Unraveling novel functions in fungal stress responses, hyphal growth, drug resistance, and pathogenesis. *Fungal Biology Reviews*, 28, 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.02.004>
- Kessler, P., Enkerli, J., Schweize, C., & Keller, S. (2004) Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *BioControl*, 49, 563-581. <https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000036441.40227.ed>
- Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., & Patel, A. V. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*, 116, 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.004>
- Lei, C. J., Halim, N. A., Asib, N., Zakaria, A., & Azmi, W. A. (2022) Conidial emulsion formulation and thermal storability of *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). *Microorganisms*, 10(7), 1-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071460>
- Llerena-Ramos, L. T., Rodríguez-Rodríguez, S., Reyes-Pérez, J. J., López-Álvarez, S., Jiménez-Pizarro, M., & Espinosa-Palomeque, B. (2025). Microorganismos benéficos y compost líquido enriquecido con silicio: Alternativas para la producción agroecológica del cultivo de arroz. *Terra Latinoamericana*, 43, 1-15. <https://doi.org/10.28940/terra.v43i.2108>

- Locatelli, G. O., Dos Santos, G. F., Botelho, P. S., Finkler, C. L. L., & Bueno, L. A. (2018). Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*, 117, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>
- López-López, H., Ruiz-Lau, N., Meza-Gordillo, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Robledo-Luchetti, J. G., Lecona-Guzmán, C. A., ... & Montes-Molina, J. A. (2023). Potencial antifúngico de *Beauveria bassiana* sobre *Solanum lycopersicum* L. infectado con *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici*. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 92(4), 1-21. <http://dx.doi.org/10.32604/phyton.2023.025716>
- Malektaj, H., Drozdov, A. D., & de Claville-Christiansen, J. (2023). Swelling of homogeneous alginate gels with multi-stimuli sensitivity. *International Journal Molecular Sciences*, 24(6), 1-12. <https://doi.org/10.3390/ijms24065064>
- Maruyama, C. R., Bilesky-José, N., Lima, R., & Fraceto, L. F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>
- Medo, J., & Cagáň, L. (2011). Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biological Control*, 59(2), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.020>
- Meirelles, L. N., Mesquita, E., Corrêa, T. A., Bitencourt, R. O. B., Oliveira, J. L., Fraceto, L. F., & Bittencourt, V. R. E. P. (2023). Encapsulation of entomopathogenic fungal conidia: evaluation of stability and control potential of *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(4), <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102184>
- Mimma, A. A., Akter, T., Haque, M. A., Bhuiyan, M. A. B., Chowdhury, M. Z. H., Sultana, S., & Islam, S. M. N. (2023). Effect of *Metarhizium anisopliae* (MetA1) on growth enhancement and antioxidant defense mechanism against Rhizoctonia root rot in okra. *Heliyon*, 9(8), e18978. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18978>
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., ... & Cunill, J.M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-29. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>
- Picardal, J. (2019). Antagonistic Activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) against phytopathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Schlecht.) as a Biological Control. *CNU Journal of Higher Education*, 13, 25-33.
- Przyklenk, M., Vemmer, M., Hanitzsch, M., & Patel, A. (2017). A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. *Journal of Microencapsulation*, 34(5), 498-512. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354941>
- Qiu, H. L., Fox, E. G., Qin, C. S., Zhao, D. Y., Yang, H., & Xu, J. Z. (2019). Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. *Biological Control*, 134, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.018>
- Rahman, A. M., Bedsole, C. O., Akib, Y. M., Hamilton, J., Rahman, T. T., Shaw, B.D., & Pei, Z. (2024). Effects of sodium alginate and calcium chloride on fungal growth and viability in biomass-fungi composite materials used for 3d printing. *Biomimetics*, 9(4), 1-16. <https://doi.org/10.3390/biomimetics9040251>
- Raj-Singh, T. R., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. (2010). Investigation of solute permeation across hydrogels composed of poly (methyl vinyl ether-co-maleic acid) and poly (ethylene glycol). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(7), 829-37. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.07.0003>
- Ravindran, K., Chitra, S., Wilson, A., & Sivaramakrishnan, S. (2014). Evaluation of Antifungal Activity of *Metarhizium anisopliae* Against Plant Phytopathogenic Fungi. In R. Kharwar, R. Upadhyay, N. Dubey, & r. Raghuvanshi, (Eds.). *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. (pp. 251-255). New Delhi: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_22)
- Razinger, J., Praprotnik, E., & Schroers, H. J. (2020). Bioaugmentation of entomopathogenic fungi for sustainable agriotes larvae (wireworms) management in maize. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.535005>
- Savić-Gajić, I. M., Savić, I. M., & Svirčev, Z. (2023). Preparation and characterization of alginate hydrogels with high water-retaining capacity. *Polymers*, 15(12), 1-13. <https://doi.org/10.3390/polym15122592>
- Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., & Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis Cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium Anisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
- Statgraphics Technologies (2009). *Statgraphics Centurion XVI User's Manual*. The Plains, VA, USA: Statgraphics Inc.
- Stevens, B. M., Sonderegger, D. L., & Johnson, N.C. (2020). Biotic and abiotic factors predict the biogeography of soil microbes in the serengeti. *BioRxiv*, 2020, 1-25. <https://doi.org/10.1101/2020.02.06.936625>
- Tu, L., He, Y., Yang, H., Wu, Z., & Yi, L. (2015). Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation. *Journal of Biomaterials Science, Edición de Polímeros*, 26(12), 735-749. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1056075>
- Vemmer, M., & Patel, A.V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380-389.
- Yadav, D. R., Adhikari, M., Kim, S. W., Kim, H. S., & Lee, Y. S. (2021). Suppression of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucaae* and Growth Promotion on Lettuce Using Bacterial Isolates. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1241-1255. <https://doi.org/10.4014/jmb.2104.04026>