

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FERNANDA MENDES GOMES

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Kosakonia* sp. EM BIOINOCULANTES
ENCAPSULADOS COM ALGINATO**

Uberlândia
2026

FERNANDA MENDES GOMES

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Kosakonia* sp. EM BIOINOCULANTES
ENCAPSULADOS COM ALGINATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Miriam Maria de
Resende

Coorientadora: Msc. Adrielle Aparecida
Paulista Ribeiro

Uberlândia

2026

FERNANDA MENDES GOMES

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Kosakonia* sp. EM BIOINOCULANTES
ENCAPSULADOS COM ALGINATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia

Uberlândia, 16/03/2026

Banca Examinadora:

Dra. Miriam Maria de Resende – Orientadora (UFU)

Msc. Adrielle Aparecida Paulista Ribeiro – Coorientadora (UFU)

Dra. Iara Gonçalves Rossi – Pós-Doc PPGEQ/UFU

Dra. Tais Magalhães Abrantes Pinheiro – Pós-Doc PPGEQ/UFU

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G633 Gomes, Fernanda Mendes, 2002-

2026 ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Kosakonia* sp. EM
BIOINOCULANTES ENCAPSULADOS COM ALGINATO [recurso
eletrônico] / Fernanda Mendes Gomes. - 2026.

Orientadora: Miriam Maria de Resende.

Coorientadora: Adrielle Aparecida Paulista Ribeiro.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Resende, Miriam Maria de, 1971-, (Orient.). II.
Ribeiro, Adrielle Aparecida Paulista, 1995-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em
Biotecnologia
IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Dedico este trabalho em memória aos
meus avós que onde quer que estejam estão
celebrando essa vitória comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente os meus guias e a minha ancestralidade, que iluminam toda a minha trajetória e me permitiram mais essa conquista.

Agradeço aos meus pais e irmãos, por todo amparo, amor, acolhimento e por mostrarem que a educação é a maior riqueza que podemos ter.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Miriam Maria de Resende pela oportunidade e orientação dos projetos de iniciação científica, juntamente à FAPEMIG pelo suporte financeiro concedido à pesquisa (Processo nº APQ-04349-22).

À Adrielle Aparecida Paulista Ribeiro pela coorientação, paciência, ensinamentos e amizade, e a toda a equipe do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO – FEQ/UFU), em especial Tais e Iara, por todos os conhecimentos e aprendizados repassados que me formaram como cientista e pesquisadora.

Agradeço aos meus colegas que tornaram esse período muito mais leve e divertido.

E agradeço, por fim, ao Instituto de Biotecnologia e à Universidade Federal de Uberlândia que me proporcionaram uma graduação enriquecedora em aspectos profissionais e pessoais.

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

(Marie Curie)

RESUMO

A agricultura é uma das atividades mais antigas da humanidade e, com as transformações sociais e econômicas, tem sido cada vez mais direcionada a práticas sustentáveis devido às preocupações ambientais. Nesse cenário, os biofertilizantes destacam-se como uma alternativa viável capaz de unir agricultura e preservação do meio ambiente. Uma das formas destes bioinsumos é desenvolvida pela fermentação de microrganismos encontrados em região de rizosfera, em diversos meios de cultura, os quais possuem alta gama de nutrientes que os tornam ideais para a análise de crescimento bacteriano. Além disso, a concentração e condição de cultivo influenciam diretamente a produção e a qualidade dos produtos obtidos. Neste contexto, o estudo tem como objetivo avaliar o potencial de crescimento de *Kosakonia* sp. em diferentes fontes de carbono (glicose, lactose e sacarose), investigar sua capacidade de produzir ácido indol-3-acético (AIA), fitormônio de crescimento, e analisar sua viabilidade quando encapsulada em alginato.

Palavras-chave: rizobactérias, substratos, potencial de crescimento microbiano, ácido indol-3-acético.

ABSTRACT

Agriculture is one of humanity's oldest activities; driven by social and economic changes and environmental concerns, it has increasingly shifted toward sustainable practices. In this context, biofertilizers stand out as a viable alternative that bridges agriculture and environmental preservation. One type of these bio-inputs is produced through the fermentation of microorganisms found in the rhizosphere using various culture media; these media contain a wide range of nutrients, making them ideal for analyzing bacterial growth. Furthermore, concentration and cultivation conditions directly influence the yield and quality of the resulting products. Accordingly, this study aims to evaluate the growth potential of *Kosakonia* sp. using different carbon sources (glucose, lactose, and sucrose), investigate its ability to produce indole-3-acetic acid (IAA) - a plant growth hormone - and analyze its viability when encapsulated in alginate.

Keywords: rhizobacteria, substrates, microbial growth potential, indole-3-acetic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Área plantada e produção de grãos no Brasil.....	15
Figura 2: Morfologias de encapsulados.....	18
Figura 3: Encapsulamento por gelificação iônica.....	19
Figura 4: Metodologia do processo de fermentação.....	23
Figura 5: Metodologia de compostos indólicos.....	24
Figura 6: Metodologia de produção de grânulos de alginato com <i>Kosakonia</i> sp.....	25
Figura 7: Potencial de crescimento da <i>Kosakonia</i> sp. em meio LB com Glicose.	27
Figura 8: Potencial de crescimento da <i>Kosakonia</i> sp. em meio LB com Lactose.....	28
Figura 9: Potencial de crescimento da <i>Kosakonia</i> sp. em meio LB com Sacarose	29
Figura 10: Comparação do processo fermentativo para as três fontes de carbono utilizadas no decorrer do tempo: A variação da concentração de substrato e B variação da biomassa.....	30
Figura 11: Produção de ácidos indólicos.....	32
Figura 12: Variação de UFC por tempo. Os pontos seguidos por um asterisco (*) não apresentam diferença estatisticamente significativa a um nível de 5% de significância.....	33
Figura 13: Aspectos morfológicos dos grânulos. 1. Alginato 3%; 2. Alginato 4%. A. Esfera de controle; B. Esfera de teste; C. Superfície externa do controle; D. Superfície externa do teste, aumento de 100x; E. Superfície interna do controle; F. Superfície interna do teste, aumento de 5000x	34
Figura 14: Curva de calibração de massa seca em função da absorbância.....	42
Figura 15: Curva de calibração do AIA em função da absorbância.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos encapsulados e seus efeitos	20
Tabela 2: Composição da solução reagente de Salkowski.	23
Tabela 3: Dados Morfométricos e Rendimento de extrusão.	34
Tabela 4: Concentração celular em massa seca e absorbância.	41
Tabela 5: Concentração de ácido indol-3-acético.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NUCBIO	Núcleo de Processos Biotecnológicos
BDA	Batata Dextrose Ágar
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
FBN	Bactérias Fixadoras de Nitrogênio
AIA	Ácido indol-3-acético
NFMM	Meio Malato Livre de Nitrogênio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Introdução à agricultura sustentável e bioinsumos	14
3.2 Biofertilizantes	16
3.3 Bactérias promotoras de crescimento de plantas	16
3.3.1 <i>Kosakonia</i> sp. e seu potencial biofertilizante	17
3.4 Imobilização de microrganismos.....	17
3.4.1 Alginato de sódio como matriz de encapsulamento	18
3.4.2 Aplicações da imobilização de bactérias em biofertilizantes	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Microrganismo	22
4.2 Fermentação da <i>Kosakonia</i> sp.	22
4.3 Síntese dos compostos indólicos.....	23
4.4 Elaboração do bioinoculante	24
4.5 Avaliação de estocagem	25
4.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	26
4.7 Análise de dados.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Fermentação	26
5.2 Avaliação da produção de ácidos indólicos	31
5.3 Encapsulamento	32
6 CONCLUSÃO	35
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MASSA CELULAR.....	41
APÊNDICE B: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO	43

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das atividades mais longínquas e fundamentais da humanidade. Ao longo da evolução social, essa prática passou por profundas transformações econômicas e industriais, enfrentando atualmente um movimento crescente em direção a práticas mais sustentáveis — impulsionado pela preocupação da sociedade com o meio ambiente.

As técnicas convencionais, juntamente com as indústrias do setor primário, desencadearam diversos prejuízos ambientais, que podem ser exemplificados no estudo de distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil, realizados entre os anos de 2012 e 2016 por Pignati e colaboradores (2017). Os dados nessa pesquisa mostram a classificação da toxicidade dos agrotóxicos em que 15% são extremamente tóxicos, 25% altamente tóxicos, 35% mediantemente tóxicos e 25% pouco tóxicos.

Devido aos impactos ambientais e à crescente preocupação com a saúde pública decorrentes do uso indiscriminado de pesticidas, os bioinsumos emergem como alternativas sustentáveis, capazes de reduzir a dependência de compostos químicos nocivos ao meio ambiente (Vidal e Dias, 2023). Dentre os principais bioinsumos, os biofertilizantes se destacam por serem formulados com microrganismos naturais do solo, especialmente aqueles presentes na rizosfera (Miranda *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2023).

Entre as rizobactérias, destacam-se as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), amplamente estudadas por possuírem uma capacidade multifuncional, desde nutrição vegetal até a resistência de pragas. Gêneros como *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Kosakonia* demonstram resultados positivos quanto ao crescimento vegetal, fixação de nitrogênio e produção de compostos indólicos, que influenciam diretamente o crescimento radicular. (Beltrán-Pineda e Bernal-Figueroa, 2022; Matsumura *et al.*, 2015; Botelho e Brasil, 2023).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo analisar a cinética de crescimento de *Kosakonia* sp. e a produção de ácido indol-3-acético em meio fermentativo com diferentes fontes de carbono, visando otimizar a produção de biofertilizantes destinados ao setor agrícola.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo é desenvolver biofertilizantes encapsulados em alginato avaliando a cinética de crescimento da bactéria *Kosakonia* sp. Em diferentes meios fermentativos com variações de fontes de carbono, além de verificar a capacidade de produção de ácido indol-3-acético.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos a serem alcançados são:

1. Avaliar a cinética de crescimento de *Kosakonia* sp. em diferentes meios fermentativos com variações de fontes de carbono.
2. Determinar a capacidade de produção de ácido indol-3-acético pela bactéria.
3. Desenvolver formulações de bioinoculantes encapsulados à base de alginato.
4. Avaliar a viabilidade das células encapsuladas em alginato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Introdução à agricultura sustentável e bioinsumos

Inseridas no setor primário da economia, as atividades agrícolas se desenvolveram a partir da evolução da espécie humana e da fixação territorial. Definida de maneira geral como conjunto de técnicas para o cultivo de plantas, a agricultura se destacou por assegurar a alimentação e o fornecimento de matérias-primas e insumos para a produção em diversos setores industriais (Lima; Silva; Iwata, 2019).

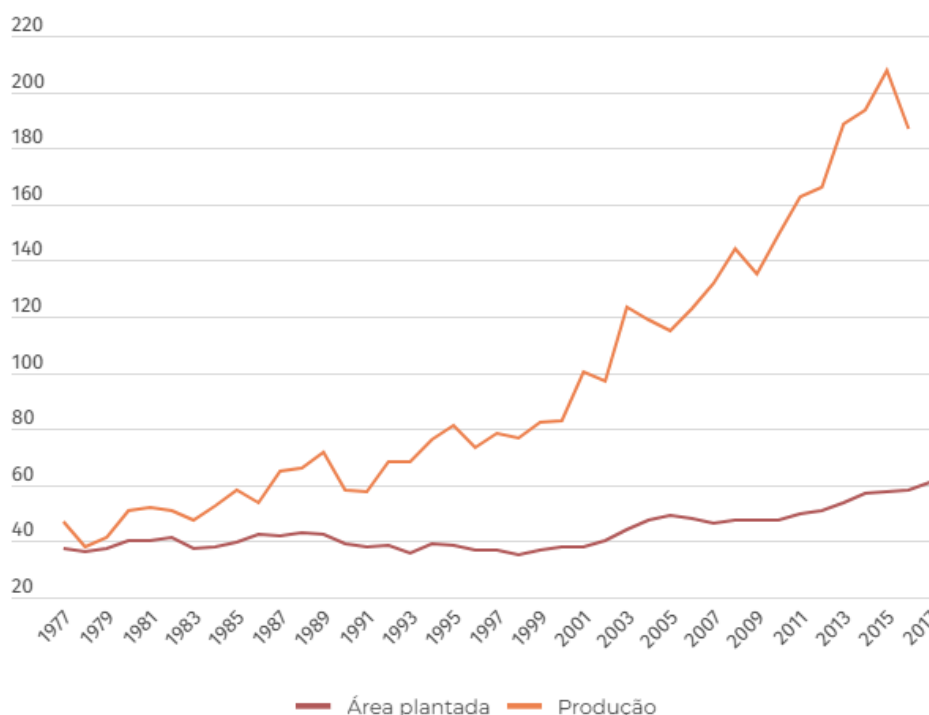
Segundo Mazoyer e colaboradores (2010), as práticas agrícolas variam entre as diferentes regiões do planeta, influenciadas por fatores como: clima, relevo, aspectos culturais e equipamentos utilizados. O avanço das técnicas de produção possibilitou o deslocamento dos campos e a formação das cidades e, posteriormente, a industrialização da agricultura com o desenvolvimento de indústrias e ampliação do mercado.

Atualmente, é considerada a principal atividade fomentadora da economia em escala global, e tem o Brasil como um dos destaques em produção e exportação de bens primários (Embrapa, 2018).

A mudança na agricultura é evidenciada a partir da década de 60, com um retorno de práticas agrícolas naturais, redução de agroquímicos, evolução de técnicas de plantio e cultivo

e, principalmente, com uma explosão de produtividade. Segundo a Embrapa (Embrapa, 2018), a produção de grãos cresceu seis vezes mais, enquanto a área plantada apenas dobrou, Figura 1. Esses dados corroboram com a crescente preocupação ambiental no Brasil e com os elevados índices de desmatamento, impulsionando estudantes, pesquisadores e empresários do agronegócio a buscarem alternativas mais sustentáveis para serem implementadas na agricultura brasileira e mundial.

Figura 1: Área plantada e produção de grãos no Brasil.



Fonte: Adaptado de Embrapa (2018)

Desde então, a agricultura sustentável tornou-se um tema de grande relevância na política ambiental brasileira. Essa sustentabilidade envolve a aplicação de técnicas adequadas e conscientes para conservação e preservação de solos, água e plantações. Foi a partir disso que se criou o Programa Nacional de Bioinsumo, pelo Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA) em 2020 (Brasil, 2020).

O termo bioinsumos é definido pela Embrapa como:

“Produtos ou processos agroindustriais desenvolvidos a partir de enzimas, extratos (de plantas ou microrganismos), microrganismos, macrorganismos (invertebrados), metabólitos secundários e feromônios, destinados ao controle biológico, sendo também ativos voltados à nutrição, promotores de crescimento vegetativo, mitigadores

de estresses bióticos e abióticos e substitutivos de antibióticos”. (Brasil, 2020)

Os bioinsumos são hoje, a nova promessa tecnológica que reconcilia interesses agropecuários e oferece soluções inovadoras, reduzindo o uso expressivo de compostos tóxicos e nocivos tanto ao ambiente quanto à saúde humana (Vidal e Dias, 2023).

Nota-se que estes produtos biológicos fazem parte de todos os sistemas produtivos, desde produção animal e vegetal até processos de pós-colheita e processamento (Vidal *et al.*, 2021). Ademais, o Brasil novamente se destaca na aplicação e exportação desse tipo de manejo, movimentando a economia com cerca de 1 bilhão de reais por ano e um crescimento anual superior a 10%.

3.2 Biofertilizantes

Um importante grupo de bioinsumos que têm se tornado uma realidade cada vez mais comum são os biofertilizantes. Sua aplicação é uma alternativa sustentável de substituir os fertilizantes convencionais do mercado, auxiliando no equilíbrio da plantação e resistência a pragas e doenças (Pereira *et al.*, 2010).

A Instrução Normativa nº MAPA 46/2011 (Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA, 2011) define biofertilizante como “produto que contém componentes ativos ou agentes biológicos, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção”.

Os biofertilizantes podem ser desenvolvidos pela introdução de comunidades microbianas antagonistas aos fitopatógenos do solo ou pela promoção de melhor desenvolvimento da planta. Dentre os microrganismos aplicados para a produção, se destacam aqueles com capacidades multifuncionais, isto é, capazes de produzir enzimas e/ou substâncias que favoreçam o crescimento e proteção das plantas (Jesus *et al.*, 2024).

3.3 Bactérias promotoras de crescimento de plantas

As bactérias multifuncionais ou BPCP são microrganismos, comumente encontrados no solo, principalmente na região da rizosfera. Suas características de biofertilização como a fixação de N₂ e solubilização de fosfato pela produção de ácidos orgânicos são resultantes de diversas interações bioquímicas ocorridas nas raízes das plantas. Estas dependem de diversos fatores como: quantidade e qualidade do microrganismo; genótipo da planta; condições ambientais e práticas agrícolas (Matsumura *et al.*, 2015).

Estudos divulgados por Cattelan (1999) mostraram que espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* tiveram uma relação positiva entre crescimento vegetal e número de bactérias solubilizadas. Recentemente, foram identificados novas BPCP do gênero *Kosakonia*, como *Kosakonia oryzae*, *K. sacchari* e *K. cowanii*, pertencentes à ordem *Enterobacterales*. Pesquisas divulgaram que esses microrganismos têm potencial promotor de crescimento por melhorar a disponibilidade de nutrientes essenciais, além de produzir compostos como ácido indol-3-acético (AIA), citocininas e ácido giberélico, favorecendo o desenvolvimento das raízes e brotos (Narayanan *et al.*, 2022).

3.3.1 *Kosakonia* sp. e seu potencial biofertilizante

O crescente desenvolvimento nos estudos sobre BPCP, principalmente da espécie *Kosakonia* evidenciam que a inoculação destas rizobactérias como biofertilizantes, possuem a mesma eficácia e aplicabilidade que fertilizantes convencionais do mercado (Jan-Roblero, Cruz-Maya e Barajas, 2020). (Nakatani *et al.*, 2024)

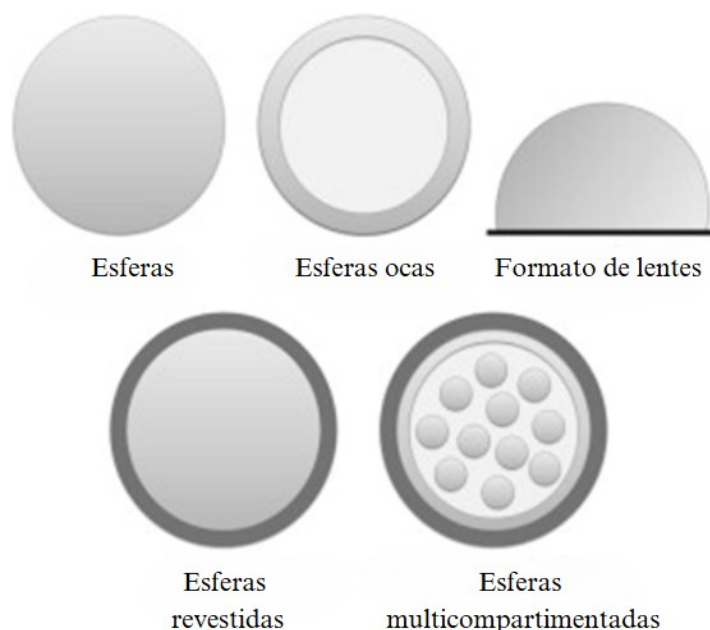
Comumente encontrada em raízes de leguminosas como soja, milho e feijão, *Kosakonia* sp. apresenta efeitos positivos para o crescimento dessas plantações. Pesquisas como as de Gonçalves e colaboradores (2023) mostraram que a aplicação do microrganismo melhora o desenvolvimento radicular e foliar, além da formação de mais nódulos nas raízes superiores, quando comparada a aplicação das técnicas convencionais.

Outros benefícios do uso de *Kosakonia* sp. como biofertilizantes são evidenciados nos estudos de Thanwisai e colaboradores (2024), em que os resultados comprovaram queda significativa na contaminação fúngica em culturas de arroz.

3.4 Imobilização de microrganismos

As definições e metodologias de imobilização e encapsulamento são diversas e distintas. Mitropoulou e colaboradores (2013) os definem como um revestimento de material, no qual a matriz se associa a parede da cápsula, enquanto Vemmer e Patel (2013) exemplificam as diferentes formas que uma cápsula pode assumir (Figura 2).

Figura 2: Morfologias de encapsulados



Fonte: Adaptado de Vemmer e Patel (2013)

O aperfeiçoamento desses protocolos adjunto de novas biotecnologias permite uma melhora dos processos com células imobilizadas.

A utilização de microrganismos imobilizados na agricultura surge como uma alternativa promissora para enfrentar os desafios impostos pelos fatores de estresse biótico e abiótico, garantindo maior estabilidade e eficiência na aplicação dos bioinsumos (Szopa *et al.*, 2022). No entanto, para que essa abordagem seja sustentável e ambientalmente segura, é fundamental selecionar materiais de encapsulamento que não causem impactos negativos ao meio ambiente (Martínez-Cano *et al.*, 2022). Nesse contexto, uma alternativa viável e em ascensão na aplicação de encapsulados são macromoléculas desenvolvidas a partir de matérias primas como milho, cana-de-açúcar, celulose e as algas marrons – fonte de produção do alginato - denominadas biopolímeros (Campos *et al.*, 2022; Farias *et al.*, 2016).

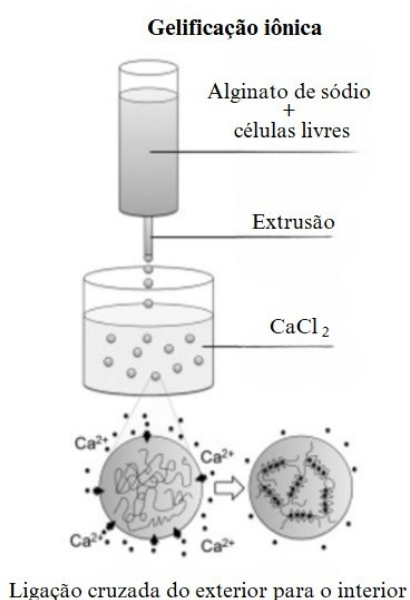
3.4.1 Alginato de sódio como matriz de encapsulamento

O alginato de sódio é um polissacarídeo de grande versatilidade, amplamente empregado em diferentes setores industriais devido às suas propriedades técnicas avançadas, baixo custo de produção e fácil obtenção em larga escala. Trata-se de um material não tóxico, com qualidade consistente, praticamente estéril e altamente biocompatível com microrganismos (Szczzech e Maciorowski, 2016). Suas características físico-químicas permitem

modificações que possibilitam a formação de diversas matrizes, como hidrogéis, microesferas, microcápsulas, esponjas e fibras, o que viabiliza sua aplicação nas indústrias alimentícias, têxtil, agrotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas (Pawar e Edgar, 2012).

Suas características positivas de resistência e biodegradação são acrescidas a uma ótima capacidade de formação de encapsulados por meio de gelificação iônica. O alginato, é caracterizado como um ácido poliurônico, que quando colocado em contato com uma solução de cátions divalentes, o cálcio (Ca^{2+}), por exemplo, consegue formar uma estrutura de hidrogel, como demonstrado na Figura 3 (Vemmer e Patel, 2013).

Figura 3: Encapsulamento por gelificação iônica



Fonte: Adaptado de Vemmer e Patel (2013)

Em concentrações ideais, as esferas conseguem ser fabricadas de maneira uniforme e homogênea, o que permite uma viabilidade celular estável e melhor controle biológico, crescimento e fixação de nitrogênio (Szopa *et al.*, 2022).

3.4.2 Aplicações da imobilização de bactérias em biofertilizantes

A imobilização de microrganismos em matrizes poliméricas tem se destacado como uma estratégia promissora na formulação de biofertilizantes, uma vez que proporciona uma maior resistência e estabilidade aos microrganismos. Costa (2023) e Santos e colaboradores (2023) demonstraram que a viabilidade celular dos microrganismos imobilizados é superior a 90%.

Além disso, a praticidade do método justifica sua aplicação em diversos setores e evidencia que na agricultura os benefícios são maiores que as dificuldades.

Rojas-Sánchez e colaboradores (2022) realizaram um estudo que destaca os diversos efeitos benéficos da encapsulação de microrganismos com o alginato em uma variedade de culturas de plantas e diferentes técnicas de aplicações, Tabela 1.

Tabela 1: Microrganismos encapsulados e seus efeitos

Microrganismo encapsulado	Polímero	Efeito
<i>Pseudomonas putida</i>	Alginato	Promoção do crescimento vegetal
<i>Azospirillum brasilense</i>		
<i>Burkholderia cepacia</i>		
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
<i>Bacillus megaterium</i>	Argila de alginato	Aumento da concentração de nitrato e fósforo na planta
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Bacillus subtilis</i> 1411		
<i>Trichoderma</i> sp.		
<i>Glomus</i> sp.	Alginato	Aumento da colonização radicular de plantas de milho e aumento da resistência ao estresse hídrico
<i>Acaulospora</i> sp.		
<i>Metarhizium brunneum</i> CB15	Pectina/amido, celulose e levedura	Aumento do comportamento endofítico
<i>Trichoderma viride</i>	Alginato em combinação com cálcio ou cobre	Aumento do rendimento e produção de metabólitos secundários

Fonte: Adaptado de Rojas-Sánchez *et al.* (2022)

A aplicabilidade do encapsulado, normalmente, é realizada no sulco do plantio em associação à aplicação das sementes, o que permite uma interação desde as primeiras etapas de crescimento, como analisado por Betiol e colaboradores (2021). Outra metodologia que pode

ser implementada, apesar de necessitar de estudos mais evidentes, é a imobilização conjunta da semente com o inóculo. Ambos os processos podem ser realizados da maneira habitual de plantio, sem a necessidade de gastos e especialidades adicionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A bactéria *Kosakonia* sp. foi obtida da coleção de culturas do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Universidade Federal de Uberlândia e identificada pelo método de identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA (16S) pela empresa GoGenetic. Para manutenção da cultura, repicou-se o microrganismo quinzenalmente e o manteve em placa de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA), pH 6,8.

4.2 Fermentação da *Kosakonia* sp.

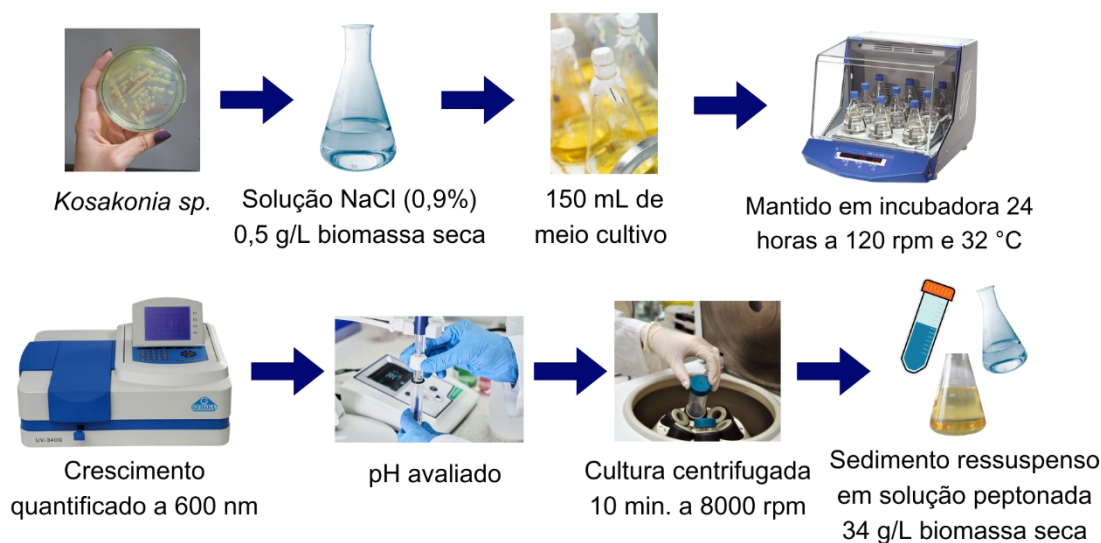
O meio de cultura utilizado para a fermentação fornece todos os nutrientes fundamentais para o crescimento bacteriano: carboidrato ($15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e cloreto de sódio ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). As fontes de carbono foram variadas em glicose, sacarose e lactose.

O pré-inóculo foi preparado adicionando-se os microrganismos à solução salina (0,9%) na concentração de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, seguindo a curva de calibração elaborada em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1280). Em seguida transferiu-se uma alíquota de 5 ml para um reator cônico de bancada consistindo em um frasco de Erlenmeyer de 500 ml, contendo 150 ml do meio Luria Bertani. Por fim, submetido à incubação a 30°C , 120 rpm por 24 horas em um incubador refrigerado com agitação (ETHINK, modelo 430, Brasil).

O crescimento celular foi quantificado ao decorrer do processo fermentativo, nos intervalos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, por turbidimetria a 600 nm em espectrofotômetro, seguindo a curva de calibração, (APÊNDICE A: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MASSA CELULAR). Além disso, o consumo de açúcar foi avaliado e quantificado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) – (Shimadzu LC-20^a, modelo Prominence) utilizando fase móvel ácido fosfórico 1% a $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com detecção por índice de refração, coluna Supelcogel C640H à temperatura de 32°C . O pH também foi avaliado ao longo do processo utilizando o pHmetro digital de bancada (El engineering, modelo w38).

Após o fim das fermentações, o volume final foi centrifugado por 10 minutos a 8000 rpm (Beckman Coulter, modelo Avanti™ J-25, Alemanha) e o decantado ressuspensão em solução peptonada (peptona $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 7,2) na concentração de $34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de célula em massa seca, para uso na formulação do bioinoculante. A Figura 4 apresenta o esquema geral de fermentação e obtenção de células.

Figura 4: Metodologia do processo de fermentação



Fonte: própria (2025).

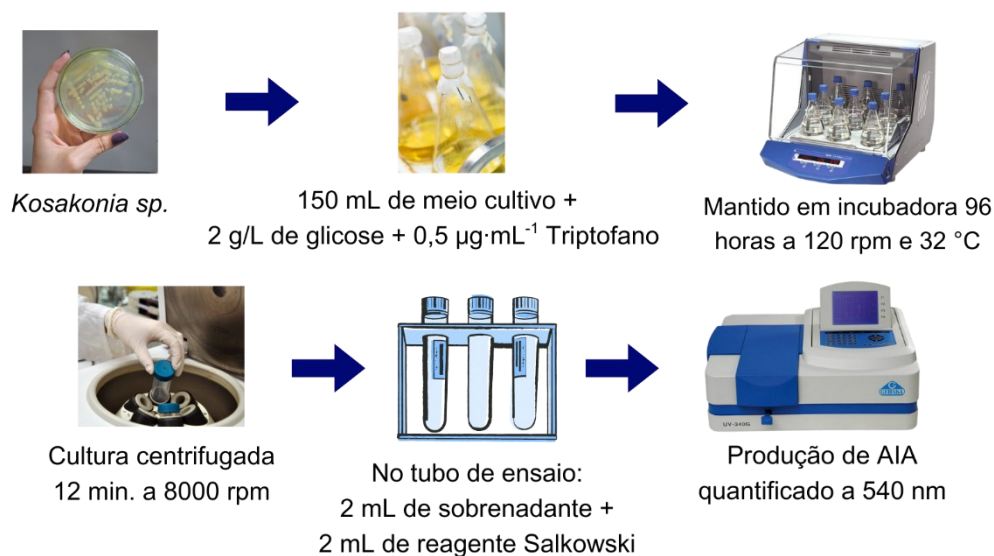
4.3 Síntese dos compostos indólicos

Para quantificar a produção de compostos indólicos, *Kosakonia* sp. foi inoculada em 150 ml do meio LB com 2 g.L⁻¹ de glicose, acrescido de triptofano (0,5 µg·mL⁻¹), e incubada sob agitação (120 rpm) por cinco dias a 32 °C. A seguir, a cultura é centrifugada a 8.000 rpm, por 12 min e 2 ml do sobrenadante são transferidos para tubos de ensaio, adicionando-se 2 ml do reagente de Salkowski (Tabela 2). O método utilizado é capaz de detectar os compostos indólicos em geral, incluindo o ácido indol-3-acético (AIA) adaptado de Vasques e colaboradores (2024). As análises foram realizadas em 0h, 24h, 48h, 72h e 96h, avaliadas em triplicata, no espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1280) a 540 nm (Figura 5) e padronizadas em curva de calibração (APÊNDICE B: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO).

Tabela 2: Composição da solução reagente de Salkowski.

Componente	Quantidade
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,6 g
H ₂ SO ₄ [35%]	22 ml
H ₂ O	28 ml

Figura 5: Metodologia de compostos indólicos



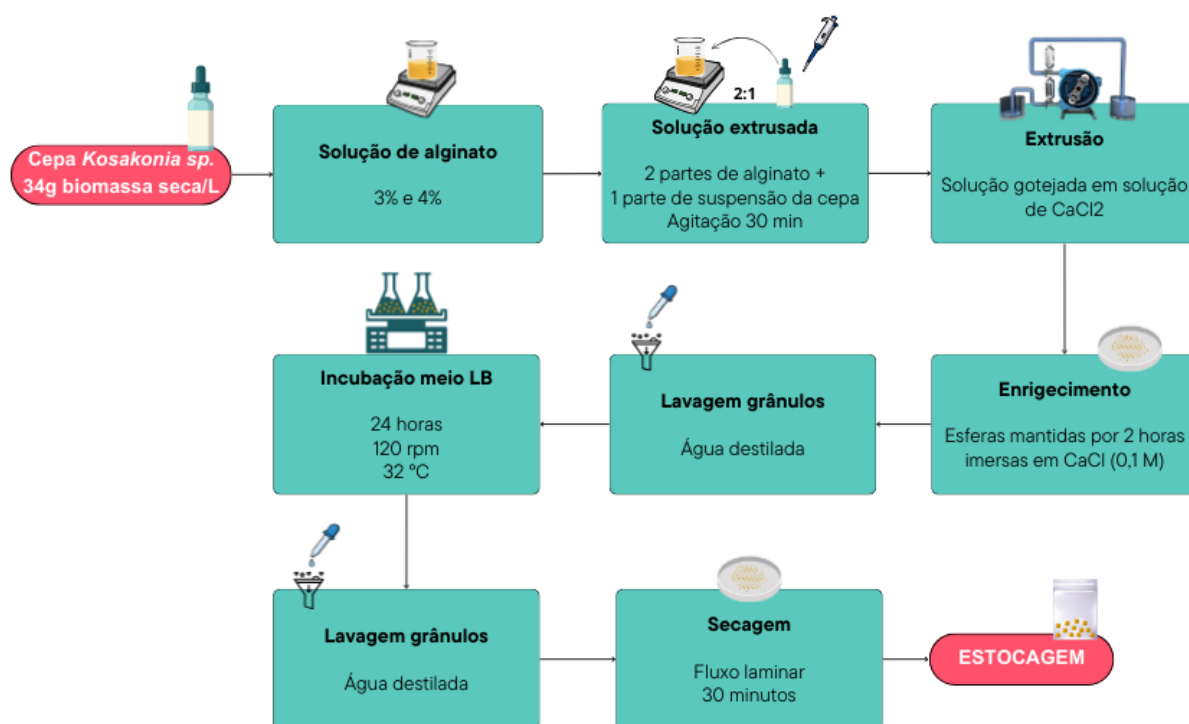
Fonte: própria (2025).

4.4 Elaboração do bioinoculante

O encapsulamento das células de *Kosakonia sp.* foi realizado de acordo com Reetha e colaboradores (2014) com modificações (Figura 6). Foram preparadas duas soluções variando a concentração de alginato de sódio (3% e 4%), ambas com a suspensão bacteriana com 34 g de biomassa seca·L⁻¹ na proporção de 2:1. Após as misturas serem homogeneizadas por 30 minutos, a solução é extrusada com o auxílio de uma bomba peristáltica e direcionada às placas contendo solução de CaCl₂ (0,1 M).

As esferas são mantidas na solução por duas horas e depois lavadas com água. Posteriormente, foram incubadas em meio LB por 24 horas a 120 rpm e 32 °C, em seguida são lavadas, coletadas e deixadas sob fluxo de ar por 30 minutos. Alíquotas de, aproximadamente, 5 g de esferas foram embaladas para cada tratamento. A solução de alginato foi extrusada e utilizada como controle. As embalagens contendo as diferentes formulações (controle 3%, biofertilizante-3%; controle 4% e biofertilizante- 4%) foram armazenadas sob refrigeração (7 ± 2 °C).

Figura 6: Metodologia de produção de grânulos de alginato com *Kosakonia* sp.



Fonte: própria (2025).

Os grânulos tiveram seus diâmetros medidos com um micrômetro eletrônico (Schut, modelo Filleteo 0-25mm) e foram pesados em balança analítica (Gehaka, modelo AG 200), ambas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 Avaliação de estocagem

A análise de contagem em placa de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi realizada para quantificar os microrganismos viáveis presentes nas amostras. Inicialmente, as amostras foram submetidas a diluições seriadas em solução salina estéril (0,9%), visando obter placas contendo entre 25 e 250 UFC, faixa considerada adequada para a contagem microbiológica. Em seguida, uma alíquota de cada diluição foi inoculada em placas contendo BDA, utilizando o método de espalhamento em superfície com auxílio de alça de Drigalski (Cappuccino e Welsh, 2019).

Após a inoculação, as placas foram incubadas a 30 °C por 12 horas em incubadora BOD (Nova Ética, modelo 430 RDB). Finalizado o tempo de incubação, foi realizada a contagem das colônias visíveis, utilizando contadores manuais. A determinação da concentração original de microrganismos é realizada através da Equação 1. Para cada tratamento, a sobrevivência

(UFC·g⁻¹) das células da cepa *Kosakonia* sp. foi avaliada em oito períodos diferentes de armazenamento (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ colônias}}{\text{volume inoculado (mL)} \times \text{diluição}} \quad \text{Equação 1}$$

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

As superfícies externas e internas das esferas foram analisadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As esferas foram fixadas com tampão de fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,2), seguido de desidratação em forno a 36 °C por três horas. Posteriormente foram direcionadas ao MEV (Tescan, modelo veja 3 LMU), colocadas no suporte de amostras, com fita adesiva de carbono dupla face, e em seguida secas e metalizadas com fina camada de ouro na superfície para permitir a captura da fotografia.

4.7 Análise de dados

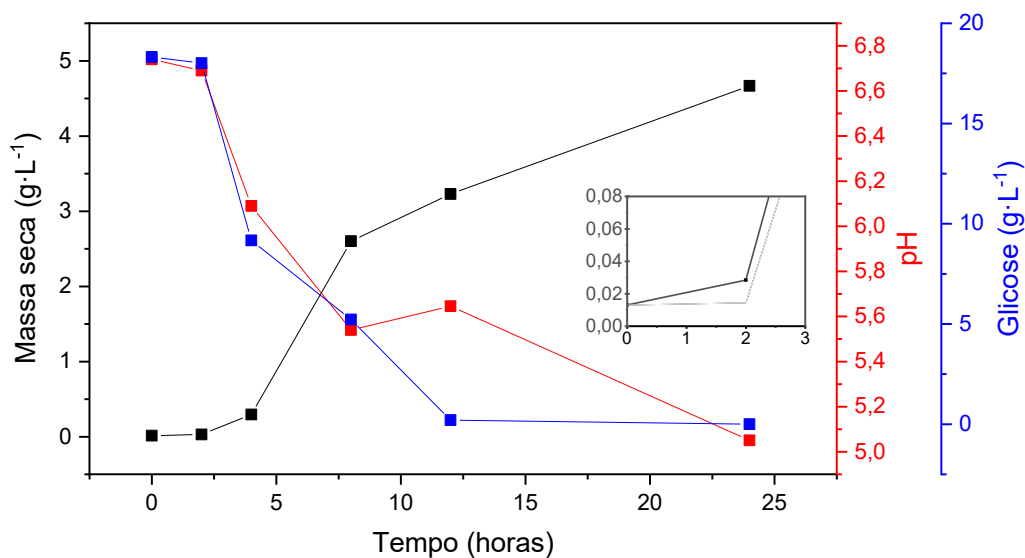
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas, com o teste de Tukey ($P < 0,05$) usando o software Statistic 7. Os gráficos foram construídos através do software Origin®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fermentação

Neste estudo, verificou-se um bom índice de crescimento do microrganismo no meio de cultivo com glicose (Figura 7). O início do crescimento celular ocorreu aproximadamente 4 horas após o início do processo fermentativo, com pico máximo de crescimento em 24 horas. Notou-se também um declínio significativo do substrato no meio a partir de 4 horas de fermentação, juntamente com a queda no índice de pH. É possível afirmar que o esgotamento do açúcar ocorre após 12 horas de fermentação, com células ainda em potencial de crescimento e pH estável na faixa de 5 a 6.

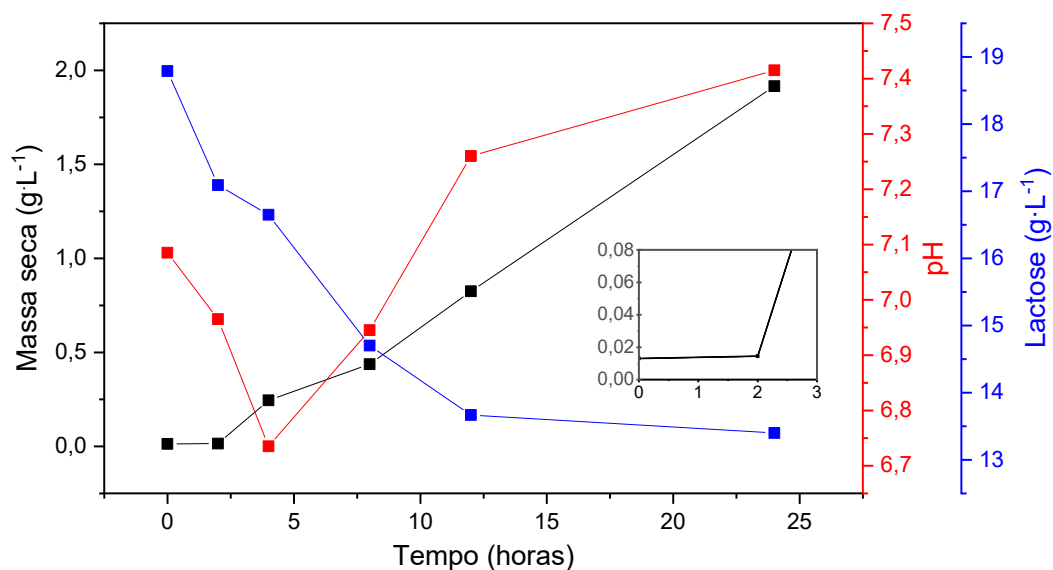
Figura 7: Potencial de crescimento da *Kosakonia* sp. em meio LB com Glicose.



Fonte: própria (2025).

O meio com lactose revelou um menor crescimento celular quando comparado ao meio com glicose, como mostra a Figura 8. Os índices de pH mostram uma pequena queda de 7,5 para 6, indicando a produção de compostos ácidos durante o processo fermentativo. As células tiveram pequena variação de crescimento, o qual é iniciado no período de 4 horas, mas sem valor significativo. Seu alto índice de expansão é visualizado no fim da fermentação (24 horas). A redução do substrato no meio é notória, porém baixa – apenas 30% – o que evidencia a dificuldade do microrganismo em consumir essa fonte de carboidrato.

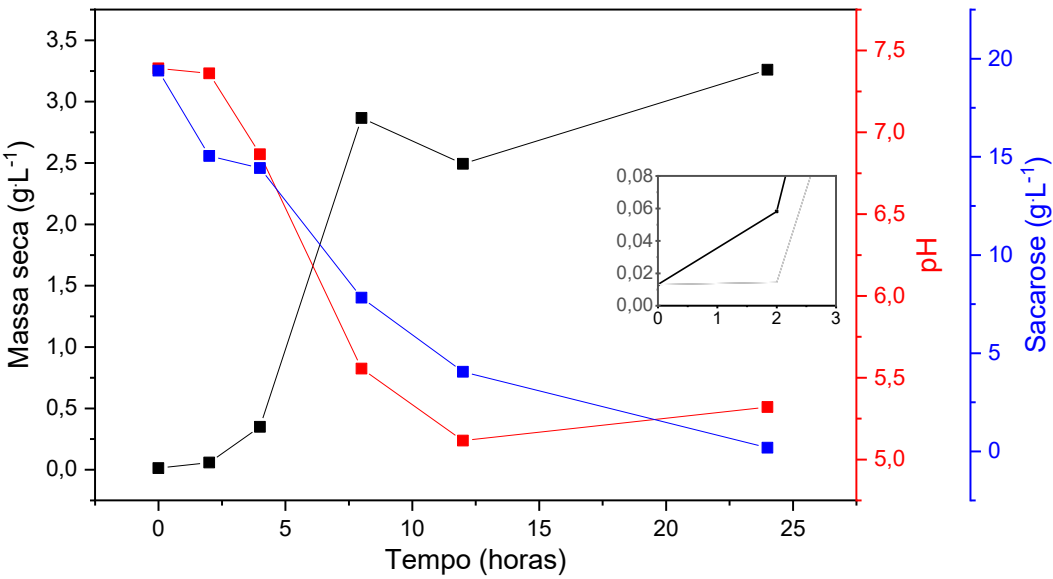
Figura 8: Potencial de crescimento da *Kosakonia* sp. em meio LB com Lactose



Fonte: própria (2025).

Como os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas entre as análises de um monossacarídeo (glicose) e um dissacarídeo (lactose), foi realizado o mesmo experimento com outro dissacarídeo, a sacarose (Figura 9). A célula teve bom potencial de crescimento, tendo início em 4 horas de fermentação e maior índice em 24 horas. O pH sofreu declínio durante o processo, com início em 7,38 e final a 5,29. A sacarose foi totalmente consumida no período analisado, portanto, é perceptível uma preferência do microrganismo por essa fonte de carbono.

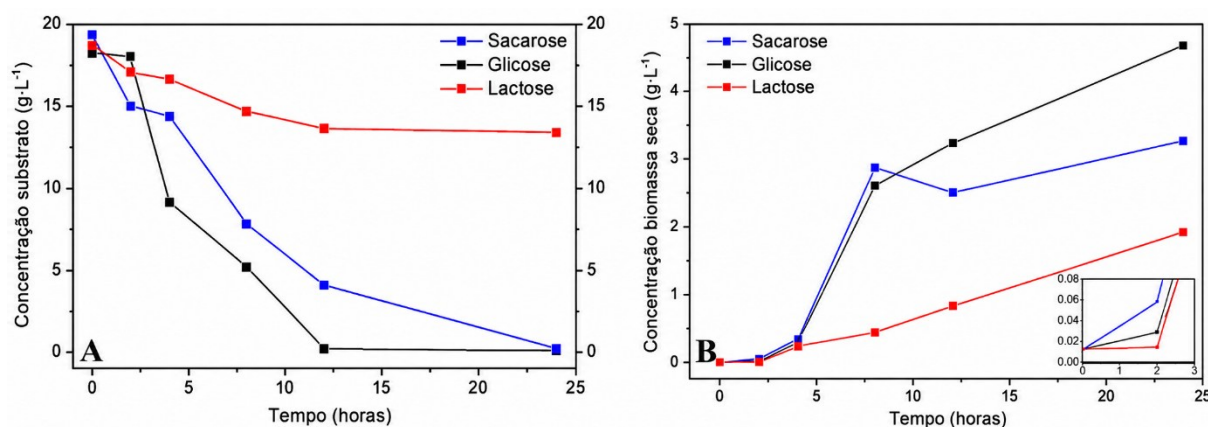
Figura 9: Potencial de crescimento da *Kosakonia* sp. em meio LB com Sacarose



Fonte: própria (2025).

Ao analisar conjuntamente os três processos fermentativos, observa-se que o consumo de glicose e sacarose apresentou comportamento semelhante, com redução acentuada já nas primeiras horas e consumo praticamente total após 24 horas de fermentação (Figura 10).

Figura 10: Comparação do processo fermentativo para as três fontes de carbono utilizadas no decorrer do tempo: A variação da concentração de substrato e B variação da biomassa



Fonte: própria (2025).

Esse padrão é amplamente descrito na literatura, uma vez que a glicose é o carboidrato mais facilmente assimilado por diversas bactérias, sendo rapidamente metabolizada e utilizada como principal fonte de energia (Gunkova *et al.*, 2021). De forma semelhante, a sacarose também é reconhecida como substrato eficiente para microrganismos associados a matrizes vegetais, sendo prontamente hidrolisada e utilizada para crescimento celular e produção de metabólitos (Angelov *et al.*, 2023).

Por outro lado, a lactose apresentou comportamento distinto, não sendo totalmente consumida ao longo do período analisado. Esse resultado pode ser explicado pelas características metabólicas da cepa utilizada, uma vez que bactérias do gênero *Kosakonia*, geralmente isoladas de solo e ambientes vegetais, são adaptadas à utilização de açúcares comuns nesses nichos, como glicose e sacarose, mas nem sempre possuem os sistemas enzimáticos necessários para metabolizar lactose, carboidrato pouco frequente nesses ambientes (Chen *et al.*, 2025; Harper *et al.*, 2022).

A assimilação da lactose depende de transportadores específicos e da enzima β -galactosidase, responsáveis por sua hidrólise em glicose e galactose. Microrganismos não associados a matrizes lácteas frequentemente apresentam ausência ou baixa expressão dessas vias metabólicas, o que limita sua utilização como fonte de carbono (Gasser *et al.*, 2022; Prabin

et al., 2025). Assim, é plausível que a cepa avaliada apresente preferência por açúcares típicos de origem vegetal, explicando o consumo incompleto da lactose.

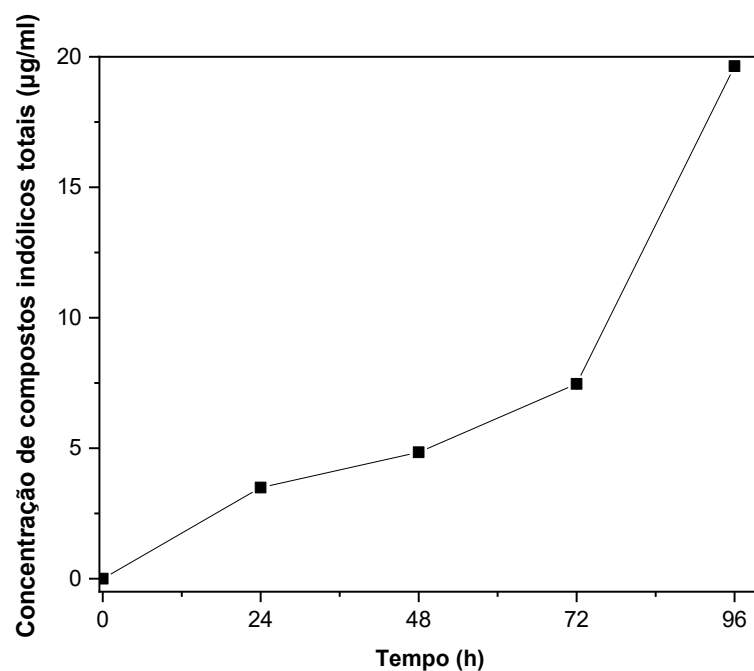
Além disso, o consumo parcial desse dissacarídeo pode estar relacionado à utilização preferencial de glicose e sacarose enquanto disponíveis, fenômeno comum em bactérias que priorizam substratos energeticamente mais favoráveis antes de ativar rotas metabólicas alternativas (Acin-Albiac *et al.*, 2022). Dessa forma, análises com períodos de fermentação superiores a 24 horas ou estudos de expressão gênica poderiam esclarecer se ocorre assimilação tardia da lactose pela cepa estudada.

5.2 Avaliação da produção de ácidos indólicos

Com os resultados promissores do microrganismo em meio fermentativo, foi analisada a capacidade da *Kosakonia* sp de produzir compostos indólicos, promotores de crescimento vegetal.

O período de análise de 96 horas foi definido com base em estudos prévios, como o de Narayanan *et al.* (2022), que indicam que a produção de ácido indol-3-acético por bactérias promotoras de crescimento vegetal atinge níveis máximos em torno de 72 horas, com posterior estabilização. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo (Figura 11), apresentaram comportamento distinto, uma vez que a concentração de compostos indólicos aumentou de forma contínua ao longo de todo o período experimental, alcançando o maior valor (20 µg/ml) após 96 horas. Essa divergência pode ser atribuída à variabilidade existente entre diferentes cepas de *Kosakonia* sp., bem como a diferenças nas condições experimentais empregadas, como composição do meio de cultivo e parâmetros de incubação, fatores que influenciam diretamente a cinética de produção desses metabólitos.

Figura 11: Produção de ácidos indólicos



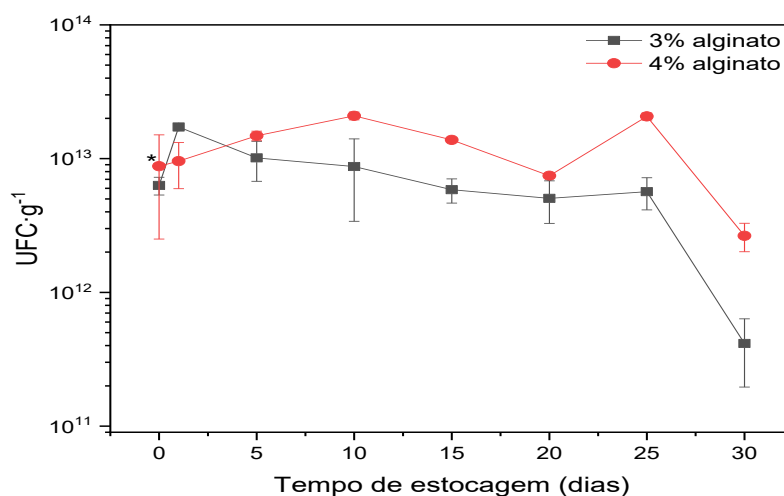
Fonte: própria (2025)

A alta produção de ácidos indólicos por rizobactérias como a *Kosakonia* sp., é um grande indicativo da eficiência de substituir os fertilizantes químicos por compostos orgânicos, tendo em vista que eles são capazes de aumentar a produção de triptofano, fitormônios e diversos outros componentes que estimulam e melhoram o crescimento vegetal, radicular e a fertilidade do solo (Narayanan *et al.*, 2022).

5.3 Encapsulamento

Para o encapsulamento, foram usados dois tipos de tratamento e verificou-se a estabilidade dos grânulos nos primeiros dias de estocagem. A Figura 12 demonstra a variação de células de *Kosakonia* sp. dentro do grânulo, no período de 30 dias.

Figura 12: Variação de UFC por tempo. Os pontos seguidos por um asterisco (*) não apresentam diferença estatisticamente significativa a um nível de 5% de significância.



Fonte: própria (2025)

A quantidade de microrganismo na cápsula atingiu $2,1 \times 10^{13}$ UFC·g⁻¹ de grânulo para o tratamento de 4% e atingiu $1,0 \times 10^{13}$ para o tratamento com 3% de alginato. Valores que, ao serem comparados com a literatura, possuem uma correspondência positiva e promissora; tendo em vista que Zago e colaboradores (2019) produziram grânulos com *Azospirillum brasilense* em várias formulações de alginato e obtiveram resultados de $7,86 \times 10^{12}$ no trigésimo dia de tratamento apenas com alginato.

Mesmo com uma maior rigidez do encapsulado, na concentração de 4%, notou-se crescimento celular no interior dos grânulos no decorrer dos dias. Fator que também foi verificado no estudo de Zago e colaboradores (2019).

Ambos os tratamentos apresentaram maior perda nos últimos cinco dias e, ainda sim, apresentaram valores acima dos valores encontrados em fertilizantes comerciais, como o BiomaPhos® (Oliveira *et al.*, 2020) com 4×10^9 UFC·mL⁻¹ (células viáveis). Dessa forma, ressalta-se a promissora aplicabilidade comercial do microrganismo.

A Tabela 3 ilustra os dados morfométricos obtidos na produção das esferas. As dimensões apresentaram tamanhos uniformes, com baixo desvio padrão, confirmando o protocolo. Os grânulos com tratamento de 3% foram menores quando comparados ao tratamento de 4%. O rendimento médio foi de $16,82 \pm 0,02$ esferas por ml de solução extrusada, com perdas durante o processo devido à formação de esferas não conformes.

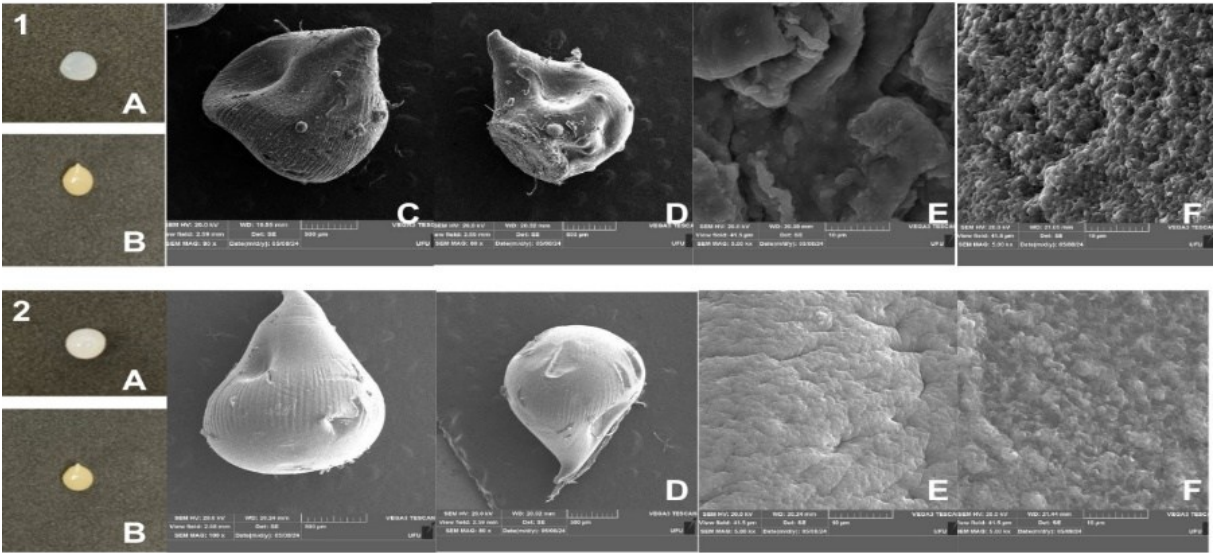
Tabela 3: Dados Morfométricos e Rendimento de extrusão.

Tratamento	Peso (g)	Diâmetro (mm)	Rendimento (um mL ⁻¹)
Alginato 3%	0,037±0,011 ^a	4,06±0,20 ^a	16,8±0,5 ^a
Controle 3%	0,038±0,0041 ^a	4,42±0,17 ^{ab}	16,9±0,6 ^a
Alginato 4%	0,042±0,003 ^a	4,44±0,15 ^b	16,8±0,2 ^a
Controle 4%	0,043±0,003 ^a	4,28±0,26 ^{ab}	16,8±0,3 ^a

Os valores seguidos por letras iguais não diferem entre si estatisticamente, a um nível de significância de 5%.

A análise realizada na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) apresentada na Figura 13, evidenciou o formato de gota do grânulo, ocorrido devido o processo de extrusão lenta. Assim, obteve-se gotas de alginato em solução de CaCl₂

Figura 13: Aspectos morfológicos dos grânulos. 1. Alginato 3%; 2. Alginato 4%. A. Esfera de controle; B. Esfera de teste; C. Superfície externa do controle; D. Superfície externa do teste, aumento de 100x; E. Superfície interna do controle; F. Superfície interna do teste, aumento de 5000x



Fonte: própria (2025)

De acordo com a conformação estrutural obtida no MEV, notou-se que o processo de desidratação para o equipamento comprometeu a estrutura das esferas. Estudos como o de Faria (2019) e Ribeiro (2024) demonstram que a microscopia pode degradar a superfície das esferas sem afetar os microrganismos no seu interior. Os autores citados, produziram grânulos em

menores concentrações, contendo *Bacillus* spp. e *Azospirillum* spp. que obtiveram deformações.

Ademais, é notória a presença de células nas Figura 13 (1F e 2F) e a não contaminação das amostras controle (Figura 13- 1E e 2E), além de não ter sido encontrados resquícios de amostra em nenhuma superfície dos grânulos.

6 CONCLUSÃO

O estudo evidencia a influência que a composição de um meio de cultura tem no crescimento celular de um microrganismo e revela que *Kosakonia* sp. apresenta metabolismo fermentativo eficiente com desempenho variado em diferentes fontes de carbono, destacando-se os meios com glicose e sacarose. A facilidade deste microrganismo em assimilar essas fontes de carbono, sugere que o uso de resíduos industriais ricos em carboidratos, como melaço de cana-de-açúcar e resíduos de processamento de frutas, podem ser fontes adequadas para a produção em escala industrial da cepa. Além disso, sua produção de ácidos indólicos indica que uma biofertilização com este microrganismo, pode influenciar o crescimento vegetal e radicular das plantas.

Os bioinoculantes encapsulados em alginato tiveram estabilidade inicial durante os primeiros dias de armazenamento, com quantidade celular no interior dos grânulos variável ao longo dos 30 dias, para ambos os tratamentos. Morfometricamente, as esferas mantiveram uniformidade com baixos desvios padrão, comprovando a eficiência do protocolo. E, apesar de ocorrer uma perda significativa nos últimos cinco dias, os valores obtidos permaneceram superiores aos encontrados em fertilizantes comerciais.

Logo, o microrganismo *Kosakonia* sp. apresenta bom índice de crescimento nos meios de cultivo, com potencial produção de fitormônios, e a encapsulação com alginato se mostra eficiente na proteção celular, garantindo um número elevado de células viáveis, mesmo após o período de 30 dias.

Assim, a utilização de *Kosakonia* sp. na produção de biofertilizantes e bioinsumos demonstra potencial para reduzir o uso de fertilizantes convencionais, contribuindo para o desenvolvimento de uma agricultura mais segura e sustentável.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar dos resultados obtidos neste estudo terem cumprido os objetivos propostos de maneira favorável, existem análises a serem realizadas posteriormente a fim de sanar algumas dúvidas e complementar a pesquisa.

Uma delas é a fermentação do meio de cultivo contendo a lactose como substrato. De acordo com os resultados, há um indício de crescimento celular em um tempo superior ao de 24 horas, sendo necessário um estudo de 48 ou 72 horas, por exemplo.

Outro estudo a ser desenvolvido é o da aplicabilidade do encapsulado no sulco do plantio, seja em associação à semente ou adjunto do microrganismo. Este resultado pode comprovar ainda mais a eficácia *Kosakonia* sp. na produção de biofertilizantes e bioinsumos, reduzindo o uso de fertilizantes convencionais e contribuindo para uma agricultura segura e sustentável.

REFERÊNCIAS

- ACIN-ALBIAC, M. *et al.* **How water-soluble saccharides drive the metabolism of lactic acid bacteria during fermentation of brewers' spent grain.** *Microbial biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 915–930, mar. 2022.
- ANGELOV, A. *et al.* **On the molecular selection of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from indigenous fermented plant-based foods and further fine chemical characterization.** *Foods* v. 12, n. 18, p. 3346, set. 2023.
- BELTRÁN-PINEDA, M. E.; BERNAL-FIGUEROA, A. A. **Biofertilizantes: alternativa biotecnológica para los agroecosistemas.** *Revista Mutis*, v. 12, n. 1, 2022.
- BETIOL, O. *et al.* **Biofertilizantes pulverizados nas folhas e no sulco de semeadura na cultura do amendoim.** *South American Sciences* v. 2, n. esp, p. e21140, dez. 2021.
- BOTELHO, G. R.; BRASIL, M. **Rizobactérias: Uma visão geral da importância para plantas e agrossistemas.** *Revista Ambientes em Movimento*, v. 1, n. 3, p. 22-46, jul. 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Fomento e crédito para bioinsumos. Publicado em 27 maio 2020; atualizado em 01 ago. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/fomento-e-credito-para-bioinsumos>.
- CAMPOS, É. da C.; SANTANA, L. R.; CARREÑO, N. L. V. **Extração de alginato de sódio da macroalga *Durvillaea antarctica*.** In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (CIC), 31.; SEMANA INTEGRADA, 8. Universidade Federal de Pelotas, 2022. Disponível em: https://anais-siiepe.ufpel.edu.br/2022/EN_04685.pdf.
- CAPPUCCINO, J. G.; WELSH, C. **Microbiology: a laboratory manual.** 11. ed. Hoboken, NJ: Pearson, 2019. (Global Edition).
- CATTELAN, A. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.** Londrina: Embrapa, 1999.
- CHEN, Z. *et al.* **Evolution in a plant matrix: adaptive reshaping of kefir grains microbiota and function during long-term soymilk culture.** *Frontiers in Microbiology*, v. 16, p. 1614639, jun. 2025.
- COSTA, F. S. F. **Desenvolvimento e avaliação de biofertilizantes à base de alginato de cálcio: Uma abordagem sustentável para o cultivo de plantas.** 2023. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, 2023.
- EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira.** Brasília: Embrapa, 2018.

FARIA, D. J. **Biorremediação em derramamento de Petróleo com ênfase na técnica de encapsulamento de microrganismos consorciados**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2019.

FARIAS, S. S. de *et al.* **Biopolímeros: Uma alternativa para promoção do desenvolvimento sustentável**. *Revista Geonorte*, edição especial 5, v. 7, n. 26, p. 61-77, 2016. ISSN 2237-1419.

GASSER, C. *et al.* **Co-utilization of saccharides in mixtures: Moving toward a new understanding of carbon metabolism in *Streptococcus thermophilus***. *Food Microbiology*, v. 107, art. 104080, out. 2022.

GONÇALVES, O. S. *et al.* **Harnessing novel soil bacteria for beneficial interactions with soybean**. *Microorganisms*, v. 11, n. 2, p. 300, jan. 2023.

GUNKOVA, P. I. *et al.* **Carbohydrate fermentation test of lactic acid starter cultures**. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 852, n. 1, p. 012035, 2021.

HARPER, A. R. *et al.* **Fermentation of plant-based dairy alternatives by lactic acid bacteria**. *Microbial Biotechnology*, v. 15, n. 5, p. 1404–1421, abr. 2022.

JAN-ROBLERO, J.; CRUZ-MAYA, J. A.; BARAJAS, C. G. ***Kosakonia***. In: SHARMA, V.; SALWAN, R.; AL-AZEMI, M. J. (ed.). *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. London: Elsevier, 2020. p. 213-231.

JESUS, J. F. V. de *et al.* **Composição microbiológica e indicadores físicos e químicos de biofertilizantes líquidos**. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, v. 11, n. 28, p. 997–1018, ago. 2024.

LIMA, A. F.; SILVA, E. G. DE A.; IWATA, B. de F. **Agriculturas e agricultura familiar no Brasil: uma revisão de literatura**. *Retratos de Assentamentos*, v. 22, n. 1, p. 50–68, 2019.

MARTÍNEZ-CANO, B. *et al.* **Review and perspectives of the use of alginate as a polymer matrix for microorganisms applied in agro-industry**. *Molecules*, v. 27, n. 13, art. 4248, 2022.

MATSUMURA, E. E. *et al.* **Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense***. *Annals of Microbiology*, v. 65, p. 2187–2200, 2015.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo**. São Paulo: Unesp, 2010. 569 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (BRASIL). **Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011.** Diário Oficial da União, Brasília, 7 out. 2011.

MIRANDA, R. A. DE; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. DE. **O mercado de biofertilizantes e inoculantes: status e potencial de ativos da Embrapa Milho e Sorgo.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2023.

MITROPOULOU, G. *et al.* **Immobilization technologies in probiotic food production.** *Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 2013, art. 716861, p. 1-15, 2013.

NAKATANI, A. S.; GATO, I. M. B.; SANDINI, I. E. **Uso de diferentes *Bacillus* spp. promotores de crescimento vegetal associado com adubação nitrogenada na cultura do milho.** *Observatório de la economia Latino-americana*, v. 22, n. 3, p. e3733, 13 mar. 2024.

NARAYANAN, M. *et al.* **Influence of *Kosakonia* sp. on the growth of *Arachis hypogaea* L. on arid soil.** *Agronomy*, v. 12, n. 8, art. 1801, 2022.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* **Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. **Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications.** *Biomaterials*, v. 33, n. 11, p. 3279-3305, 2012.

PEREIRA, L. A. *et al.* **A agricultura e suas relações com o ambiente.** In: SAMPAIO, E. V. S. B. *et al.* *Impactos ambientais causados pela agricultura no Semiárido brasileiro.* Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2010. cap. 1, p. 13-29.

PIGNATI, W. A. *et al.* **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

PRABIN, K. *et al.* **Regulation of sugar metabolism during fermentation of brewers' spent grain by *Leuconostoc pseudomesenteroides* DSM20193.** *Microbial biotechnology*, v. 18, n. 4, 2025.

REETHA, D.; KUMARESAN, G.; MILTON, J. D. **Studies to improve the shelf life of *Azospirillum lipoferum* immobilized in alginate beads.** *International Journal of Advanced Research*, v. 5, n. 12, p. 2178–2182, 28 dez. 2014.

RIBEIRO, D. A. **Desenvolvimento de esferas híbridas biodegradáveis visando a liberação de zinco e de bactérias promotoras do crescimento de plantas.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2024

ROJAS-SÁNCHEZ, B. *et al.* **Bioencapsulation of microbial inoculants: Mechanisms, formulation types and application techniques.** *Applied Biosciences*, v. 1, n. 2, p. 198–220, 2022.

SANTOS, E. A. Q. G. dos *et al.* **Biofertilizante encapsulado por alginato de cálcio.** 2023. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Técnico em Química) – Etec de Cidade Tiradentes, São Paulo, SP, 2023.

SOUZA, G. de B. *et al.* **Potencial de uso do biofertilizante na Agricultura: uma revisão integrativa.** In: SILVA, E. J. R.; CORCIOLI, G. (org.). *Agronegócio e sustentabilidade: métodos, técnicas, inovação e gestão*. Guarujá, SP: Editora Científica Digital, 2021. p. 13-29. DOI: 10.37885/211106706.

SZCZECZ, M.; MACIOROWSKI, R. **Microencapsulation technique with organic additives for biocontrol agents.** *Journal of Horticultural Research*, v. 24, n. 1, p. 111–122, 2016.

SZOPA, D. *et al.* **Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach** *Industrial Crops and Products*, v. 181, art. 114846, jul. 2022.

THANWISAI, L.; SIRIPORNADULSIL, W.; SIRIPORNADULSIL, S. ***Kosakonia oryziphila* NP19 bacterium acts as a plant growth promoter and biopesticide to suppress blast disease in KDML105 rice.** *Scientific Reports*, v. 14, p. 17944, 2024.

VASQUES, N. C. *et al.* **Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos.** Londrina: Embrapa Soja, 2024.

VEMMER, M.; PATEL, A. V. **Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents.** *Biological Control*, v. 67, n. 3, p. 380–389, 2013.

VIDAL, M. C. *et al.* **Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela sustentabilidade do agro brasileiro.** *Economic Analysis of Law Review*, v. 12, p. 557–574, 2021.

VIDAL, M. C.; DIAS, R. P. **Bioinsumos a partir das contribuições da agroecologia.** *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 18, n. 1, p. 171–192, 2023.

ZAGO, S. L. *et al.* **Shelf life of *Azospirillum brasilense* in alginate beads enriched with trehalose and humic acid.** *Journal of Agricultural Science*, v. 11, n. 6, p. 269, 2019.

APÊNDICE A: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MASSA CELULAR

A curva de calibração para a quantificação da massa celular da bactéria *Kosakonia* sp foi construída a partir de soluções padrão obtidas em diluições seriadas e pela correlação da concentração celular e os valores de absorbância, medidos experimentalmente.

A absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda previamente definido de acordo com a literatura, seguindo as mesmas condições aplicadas posteriormente às amostras. Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido experimentalmente.

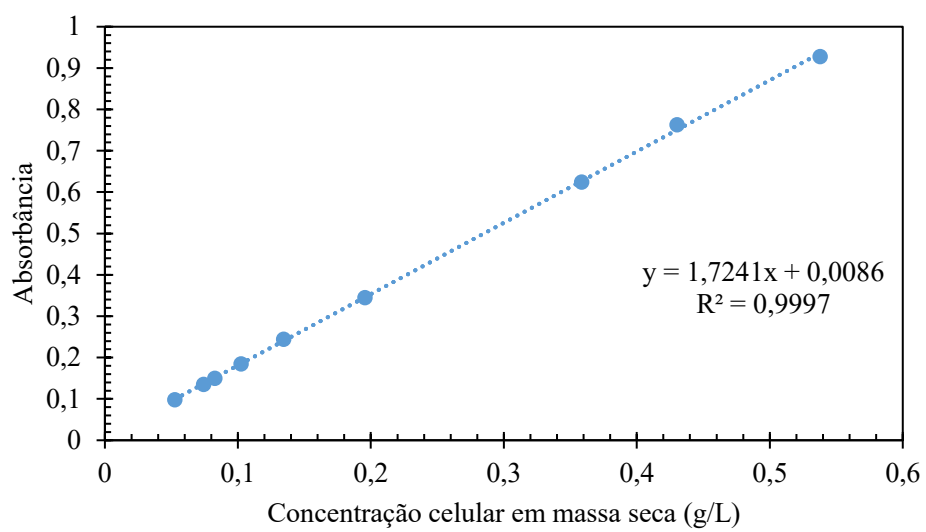
A Tabela 4 apresenta as concentrações celulares expressas em massa seca (g/L) e os respectivos resultados de absorbância.

Tabela 4: Concentração celular em massa seca e absorbância.

Concentração sol est. g/L	ABS
0,052479675	0,098
0,074195402	0,135
0,08275641	0,15
0,102460317	0,185
0,134479167	0,244
0,195606061	0,345
0,358611111	0,624
0,430333333	0,763
0,537916667	0,928

E, a partir desses valores, cria-se a curva de calibração e os ajustes lineares, como demonstrado na Figura 14. O comportamento linear é descrito pela equação $y=1,7241x + 0,0086$, com coeficiente de determinação $R^2=0,9997$; que indica uma excelente linearidade e uma curva apropriada para quantificação de massa celular das amostras analisadas.

Figura 14: Curva de calibração de massa seca em função da absorbância.



APÊNDICE B: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

A curva de calibração para a quantificação do ácido indol-3-acético (AIA) foi construída a partir de solução padrão preparada com ácido indol-3-acético (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., teor mínimo de 99%), nas concentrações de 2 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm, permitindo a obtenção da curva de calibração utilizada para a quantificação do AIA nas amostras

A Tabela 5, apresenta as concentrações utilizadas e os respectivos valores de absorvância e a Figura 15 apresenta a linearidade desses resultados, com um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9965$ indicando um bom parâmetro linear para analisar as amostras posteriormente.

Tabela 5: Concentração de ácido indol-3-acético.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Abs
2	0,032
5	0,099
8	0,192
10	0,253
15	0,414
20	0,535
30	0,755
40	1,014

Figura 15: Curva de calibração do AIA em função da absorvância

