

ELISANDRA TRICHES DA CUNHA

Monitoramento da viabilidade celular da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* FP2 em raízes de milho *in vitro* usando PMA-qPCR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi

FLORIANÓPOLIS

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, Elisandra Triches da
Monitoramento da viabilidade celular da bactéria
promotora de crescimento vegetal *Azospirillum*
brasiliense FP2 em raízes de milho in vitro usando
PMA-qPCR / Elisandra Triches da Cunha ;
orientador, Ana Carolina Maisonnave Arisi, 2019.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bactérias
Promotoras de Crescimento Vegetal. 3. *Azospirillum*
brasiliense. 4. Viabilidade de inoculantes. 5. PMA
qPCR. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III.
Titulo.

**Monitoramento da viabilidade celular da bactéria
promotora de crescimento vegetal *Azospirillum
brasilense* FP2 em raízes de milho *in vitro* usando
PMA-qPCR**

por

Elisandra Triches da Cunha

Dissertação julgada e aprovada em 20/02/2019, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Ana Carolina Maisonnave Arisl (Presidente-CCA/UFSC)


Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Externo - UFPR/PR)
(participação por videoconferência)


Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares (Interno -
CCB/UFSC)


Prof. Dr. Franceli Rodrigues Kulcheski (Externo - CCB/UFSC)


Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me manter sempre no caminho certo, me dando força e coragem durante esta longa caminhada.

À toda minha família, principalmente meus pais Sirio André e Isolete, que nunca deixaram de me apoiar, por toda educação, amor, fé e compreensão dados a mim durante esta jornada.

Ao meu irmão Sírio Neto, por todo carinho, amizade e cumplicidade e ao irmãozinho Nicolas, um presente que trouxe mais luz e alegria à minha vida.

Ao meu namorado, Augusto, pela paciência, carinho, dedicação, apoio e incentivo em todos os momentos difíceis.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realização desta pós-graduação, pelos professores e funcionários do programa, sempre dedicados, fundamentais para meu crescimento profissional.

À CAPES por proporcionar os recursos necessários para execução deste trabalho.

À minha orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela orientação, ensinamentos, apoio, dedicação, incentivo e confiança depositados em mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, especialmente à Ana Marina Pedrolo e Franciele Paludo, pela amizade, momentos de descontração, compreensão, ajuda e apoio, e à colega Mirella Scariot pelos ensinamentos e por auxiliar no planejamento deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma durante minha formação como mestre, muito obrigada!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria promotora de crescimento vegetal (BPCV) atualmente utilizada como inoculante em diversas culturas. Uma vez que a condição essencial para que ocorra o estímulo efetivo do crescimento vegetal por BPCV é a sua capacidade de sobreviver na rizosfera, são necessários métodos analíticos precisos para identificar e monitorar as células viáveis presentes em formulações de inoculantes ou nas plantas. O objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio de reação em cadeia da polimerase (qPCR) associado ao corante monoazida de propídio (PMA) para avaliar a viabilidade celular de *A. brasilense* cepa FP2 em inoculantes e em raízes de milho. *A. brasilense* foi cultivado em meio de cultura específico submetido à tratamento térmico à 50°C de zero a 240 min. Raízes de milho foram cultivadas *in vitro* e colhidas sete dias após a inoculação (DAI). A quantificação de *A. brasilense* foi realizada por qPCR, PMA-qPCR e contagem de colônias em placa. A qPCR foi realizada utilizando iniciadores específicos para a cepa AzoR2.1. As eficiências das curvas padrão variaram de 85% a 99%. Os limites de detecção (LOD) foram 10² cópias do genoma e 10⁴ UFC / g de raiz fresca. Os resultados obtidos usando PMA-qPCR e contagem em placa após tratamento térmico foram semelhantes (de 10⁷ a 10² e 10⁷ a 10⁰ UFC/mL) e a diminuição das UFC de *A. brasilense* foram observadas de acordo com o aumento do tempo de aquecimento. Enquanto isso, os resultados obtidos por qPCR permaneceram constantes (de 10⁸ a 10⁶ UFC/mL). Os resultados de enumeração obtidos para de raízes de milho por qPCR (~ 8 log UFC/g) foram maiores que os obtidos por PMA-qPCR (~ 5 ou 6 log UFC/g) e contagem em placa (~ 5 ou 6 log UFC/g) . Estes resultados mostraram que o ensaio PMA-qPCR foi eficiente na quantificação de células viáveis de inoculantes e quando comparado com métodos dependentes de cultura, a combinação de PMA-qPCR forneceu resultados confiáveis de maneira rápida e precisa.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal; *Azospirillum brasilense*; inoculante; PCR quantitativa; Monoazida de propídeo; PMA-qPCR.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a plant growth promoting bacteria (PGPB) being already used as inoculant in diverse crop plants. Since essential condition for effective phytoestimulation is PGPB capacity to survive in the rhizosphere, accurate analytical methods are required to identify and monitor viable cells in inoculant formulations or *in planta*. The aim of this study was to develop a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay associated to propidium monoazide dye (PMA) in order to evaluate the cells viability of *A. brasilense* strain FP2 in inoculant and in maize roots. *A. brasilense* was grown in specific culture medium and exposed to 50°C heating treatment from zero up to 240 min. Maize roots were grown *in vitro* and harvested 7 days after inoculation (DAI). *A. brasilense* quantification was performed by qPCR, PMA-qPCR, and plate counting. qPCR was performed using AzoR2.1 strain-specific primers. Standard curves efficiency values ranged from 85% to 99%. The limits of detection (LOD) were 10² genome copies and 10⁴ CFU/g of fresh root. Results of PMA-qPCR and plate counting after heat treatment were similar, decreasing of *A. brasilense* CFU was observed in accordance with the increase of the heating time, ranging from 10⁷ to 10² and 10⁷ to 10⁰ UFC/mL, respectively. Meanwhile, qPCR results remained constant. *A. brasilense* enumeration obtained in maize roots by qPCR (~ 8 log CFU/g) where higher than enumeration by PMA-qPCR (~ 5 or 6 log CFU/g) and by plate counting (~ 5 or 6 log CFU/g). These results showed that the PMA-qPCR assay was efficient in quantifying inoculant viable cells and compared to culture-dependent methods, PMA-qPCR combination provides reliable results in a quickly and accurately way.

Keywords: Plant growth promoting bacteria; *Azospirillum brasilense*; Inoculant; Quantitative PCR; Propidium monoazide; PMA-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Maiores produtores mundiais de milho segundo a FAO. 22
- Figura 2 - Etapas do mecanismo de infecção por *Azospirillum* spp. 28
- Figura 3 - Os efeitos positivos de *Azospirillum* spp. em raízes de gramíneas. 29
- Figura 4 - Gráfico de amplificação da qPCR com sinal fluorescente (ΔR_n) vs. número de ciclos. C_q é o ciclo de quantificação; Threshold é o ponto da reação em que a fluorescência ultrapassa o ruído de fundo; 36
- Figura 5 - Células viáveis e inviáveis tratadas com corantes de viabilidade e o efeito causado no uso da técnica de qPCR Fonte: Adaptado de © Biotium. 40
- Figura 6 - Curvas padrão (C_q versus log UFC) da qPCR de *A. brasilense* FP2 utilizando iniciadores AzoR2.1. Quantificação realizada em duas e seis corridas de qPCR em dias diferentes usando DNA extraído de (A) cultura pura de *A. brasilense* FP2 e (B) misturas de cultura pura e raízes de milho. 54
- Figura 7 - Log n° de cópias de DNA de *A. brasilense* FP2 estimado por qPCR (Δ) e PMA-qPCR (.) em duas corridas de qPCR. Culturas puras bacterianas foram submetidas à tratamento térmico a 50 °C por diferentes períodos de tempo. Valores correspondem à média \pm SD de quatro extratos de DNA (n = 4). 56
- Figura 8 - Contagem de *A. brasilense* FP2 (log UFC / mL) obtido por meio de qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa de amostras submetidas a tratamento térmico a 50 °C por diferentes períodos de tempo. A) enumeração por qPCR; B) enumeração por PMA-qPCR; C) enumeração por contagem em placa. Barras representam a média \pm SD de quatro repetições biológicas (n = 4) e letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05). 58
- Figura 9 - Gráfico de dispersão e regressão linear dos valores de log UFC/mL obtidos por contagem em placa e PMA-qPCR para quantificação de *A. brasilense* FP2 em amostras de cultura submetidas à tratamento térmico a 50 °C durante diferentes períodos de tempo. 60

Figura 10 - Contagem de *A. brasilense* FP2 (log UFC/g) em raízes de milho crescidas *in vitro* obtida com ensaios de qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa. (A) quantificação obtida usando curva padrão a partir de cultura bacteriana pura; (B) quantificação obtida usando curva padrão obtida a partir de misturas de cultura e raízes de milho. Box plot representa a média \pm SD de quatro (qPCR) e três (PMA-qPCR) replicatas biológicas (n=4 e n=3). As extremidades do boxplot representam os quartis, e a linha de dentro representa a mediana. As barras mostram os maiores valores excluindo os outliers e os pontos representam outliers..61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos empregados por BPCV e seus principais efeitos na planta	25
Tabela 2 - Espécies descritas do gênero <i>Azospirillum</i>	26
Tabela 3 - Linhagens recomendadas para espécies de cereais para uso em inoculantes comerciais no Brasil	31
Tabela 4 - Critérios e definições da ENGL para validação de métodos moleculares quantitativos.....	37
Tabela 5 - Principais aplicações de corantes de viabilidade para quantificação de células viáveis.....	41
Tabela 6 - Parâmetros de qPCR obtidos das curvas padrão para quantificação de <i>A.brasilense</i> FP2, utilizando iniciadores Azo R2.1. O DNA foi extraído da cultura pura de <i>A. brasilense</i> cepa FP2 e de misturas de cultura e raízes milho.	55
Tabela 7 - Repetibilidade do ensaio de qPCR AzoR2.1 usando quantidades de DNA isoladas de <i>A. brasilense</i> FP2. ^a Valores são a média \pm SD (n = 18) de triplicatas de qPCR em seis corridas independentes realizadas em diferentes dias. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão de Repetibilidade.	55
Tabela 8 – Resultados das análises de regressão dos dados obtidos por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa (y= interceptação + slope.x) para ensaio de tratamento térmico.....	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO 1	21
1. REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1 A CULTURA DO MILHO E O USO DE FERTILIZANTES.....	21
1.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV).....	23
1.2.1 O Gênero <i>Azospirillum</i>	25
1.2.2 Mecanismos de Fixação, Colonização e Promoção de Crescimento Vegetal por <i>Azospirillum</i> spp.	27
1.2.3 <i>Azospirillum brasilense</i>	330
1.3 VIABILIDADE CELULAR DE INOCULANTES	31
1.4 MÉTODOS DE ENUMERAÇÃO DE POPULAÇÕES MICROBIANAS.....	33
1.4.1 Enumeração de microrganismos por PCR quantitativa (qPCR)	35
1.4.2 Enumeração de células viáveis de microrganismos por qPCR combinada com corantes de viabilidade	38
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
CAPÍTULO 2	45
3. INTRODUÇÃO	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO	48
4.2 PREPARO DE AMOSTRAS SUBMETIDAS À TRATAMENTO TÉRMICO.....	49
4.3 GERMINAÇÃO, INOCULAÇÃO E CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	49
4.4 PREPARO DE RAÍZES DE MILHO PARA TRATAMENTO COM PMA.....	50
4.5 TRATAMENTO COM PMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS	50
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	51
4.7 PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	51
4.8 CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO.....	52

4.8.1 Construção de curva padrão a partir da cultura pura de <i>A. brasilense</i> cepa FP2.....	52
4.8.2 Construção da curva padrão a partir de misturas da cultura pura de <i>A. brasilense</i> cepa FP2 e raízes de milho	52
4.9 ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES	53
4.10 DETERMINAÇÃO DE UFC POR qPCR E CONTAGEM EM PLACA.....	53
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
5. RESULTADOS	54
5.1 PARÂMETROS DE REAÇÃO DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DE <i>A. brasilense</i> cepa FP2.....	54
5.2 EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM PMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>A. brasilense</i> cepa FP2.....	56
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>A. brasilense</i> cepa FP2 EM CULTURA SUBMETIDA À TRATAMENTO TÉRMICO E RAÍZES DE MILHO CRESCIDAS <i>in vitro</i>.....	57
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICES.....	91

INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) representa uma das maiores cadeias produtivas de grãos no mundo devido à alta produtividade e elevado valor nutricional. O Brasil é o terceiro maior produtor do cereal, sendo responsável por aproximadamente 7% da produção mundial, ficando atrás dos Estados Unidos e China (USDA, 2016). Atualmente a manutenção de uma alta produtividade agrícola baseia-se no uso de insumos e defensivos químicos, trazendo consigo alto custo ambiental como o esgotamento e contaminação de solos (DUNGAIT et al., 2012; MARKS et al., 2013).

Uma estratégia para manter a produtividade e diminuir a utilização de insumos químicos é explorar o uso de microrganismos benéficos em sistemas agrícolas (ANDREWS et al., 2011). Bactérias promotoras de crescimento vegetal são comprovadamente vantajosas para melhorar o desenvolvimento de plantas além de auxiliar na fixação biológica de nitrogênio, proporcionando a adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis (MIRANSARI, 2011; ZAMIOUDIS et al., 2013).

Diferentes gêneros de bactérias diazotróficas têm sido estudadas devido sua capacidade de estabelecer associações com gramíneas de grande interesse econômico, como o milho (CHUBATSU et al., 2012). Entre estes, o gênero *Azospirillum* destaca-se, pois além de atuar na fixação de nitrogênio, promove a síntese de fitormônios (MONTAÑEZ et al., 2012), crescimento de raízes, produção de sideróforos, tolerância vegetal à estresses abióticos, antagonismo a organismos fitopatogênicos e indução de resistência sistêmica contra doenças (VAN LOON, 2007; VARGAS et al., 2012; ARRUDA et al., 2013; LIU et al., 2013).

Um dos pré-requisitos para que ocorra um estímulo efetivo do crescimento exercido por estas bactérias é a sobrevivência do inóculo (usado como biofertilizante) na planta em número suficiente para estabelecer uma colonização satisfatória. A viabilidade dos inoculantes pode ser afetada antes, durante e após sua aplicação em resposta à fatores bióticos e abióticos, sendo assim dependente das condições ambientais (ARORA et al., 2010).

Entre as diversas metodologias existentes para monitoramento de populações bacterianas, destaca-se a utilização de ferramentas moleculares baseadas na amplificação de DNA. Estas são técnicas

analíticas rápidas e acuradas que permitem a identificação, monitoramento efetivo e enumeração de células em plantas colonizadas (COUILLEROT et al., 2010). A PCR quantitativa (qPCR) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para quantificação de populações da rizosfera, pois proporciona alta especificidade, sensibilidade e velocidade (SØRENSEN et al., 2009). Entretanto, a qPCR pode superestimar o número de células viáveis ou apresentar resultados falso-positivos, visto que esta não é capaz de diferenciar células viáveis e inviáveis (NOCKER & CAMPER, 2009).

Uma alternativa promissora para resolver este problema, é o pré-tratamento das células com corantes intercalantes de DNA, como a monoazida de propídio (PMA) e monoazida de etídio (EMA). Estes corantes são capazes de intercalar-se na fita dupla de DNA de células com membranas celulares injuriadas, tornando o DNA insolúvel e impossibilitando a amplificação do fragmento durante a qPCR (NOGVA et al., 2003; NOCKER & CAMPER, 2006). Porém, esta abordagem ainda precisa ser avaliada para diferentes cepas bacterianas e matrizes utilizadas.

Dessa forma, este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de um ensaio de avaliação da viabilidade de *Azospirillum brasilense* em meio de cultivo e em raízes de milho, utilizando a metodologia de PMA-qPCR, de modo a facilitar o monitoramento da bactéria durante a interação e estudar a sua sobrevivência, esperando contribuir para o desenvolvimento de inoculantes mais eficientes.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A CULTURA DO MILHO E O USO DE FERTILIZANTES

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família *Poacea*, originária da América Central que foi domesticada há aproximadamente 8.000 anos, a partir do teosinto (*Zea mays* subsp. *Parviglumis*), uma gramínea selvagem nativa dos planaltos mexicanos (MATSUOKA et al., 2002). Assim como o arroz e o trigo, o milho está entre os cereais mais importantes e cultivados em todo mundo, tendo grande contribuição para alimentação humana e animal. A importância socioeconômica do milho está relacionada ao seu potencial produtivo, além da composição química e nutricional que proporciona uma excelente fonte energética (RANUM et al., 2014).

A grande adaptabilidade desta cultura permite seu cultivo desde o Equador até o limite de terras temperadas, em diversas altitudes, em climas tropicais, subtropicais e temperados (BARROS & CALADO, 2014). O milho é uma cultura com alta variabilidade genética, devido ao seu sistema de polinização cruzada, atribuindo à planta um elevado nível de diversidade genotípica (PECHANOVA et al., 2013). A partir do melhoramento vegetal, o rendimento da cultura foi elevado em média oito vezes, por meio da obtenção de novas cultivares e da exploração do vigor híbrido, que pode elevar o rendimento de 15 a 60%, dependendo da linhagem utilizada (WENDE et al., 2013; ZHANG et al., 2013).

Comercialmente, existem diversas variedades de híbridos disponíveis no mercado, indicados para sistemas de produção que utilizam alta tecnologia, sendo estes obtidos por cruzamento simples (entre duas linhagens puras), triplos (entre uma linha pura e um híbrido simples) ou duplos (entre dois híbridos simples). Por outro lado, as variedades recomendadas para plantios menos tecnificados são as obtidas por polinização natural através da seleção de grupos com características desejáveis com características genéticas comuns (CRUZ et al., 2010).

No cenário mundial o milho destaca-se por ser o grão mais produzido e consumido, sendo a expectativa de consumo em 2018/2019 um recorde do cereal, da ordem de 1,11 bilhões de toneladas, com produção prevista para a safra de 1,07 bilhões de toneladas (USDA, 2018). O Brasil ocupa o 3º lugar no ranking mundial de produção desse grão, atrás apenas dos Estados Unidos e China (Figura 1) (FAO, 2018). Foram

totalizados no país, na safra de 2017/2018, 80 milhões de toneladas do grão de milho, produzidas em 16,63 milhões de hectares, alcançando uma produtividade média de 4.857 kg ha⁻¹ (CONAB,2018). A produção prevista para safra 2018/2019 no país é de 94,5 milhões de toneladas, estando 15,2% acima do estimado para a última safra 2017/2018 (USDA, 2018). Entre as principais regiões produtoras do grão no país estão a região Sul, com 25% e a região Centro-Oeste com 51% da produção nacional. A região sul se destaca pela maior demanda brasileira de milho para a criação de aves e suínos e para produção de leite. A mesorregião Oeste Catarinense, principal produtora de milho do estado de Santa Catarina, juntamente com o Sudoeste do Paraná e Noroeste do Rio Grande do Sul, conforma a região que mais concentra agricultura familiar nas produções de milho do Sul do Brasil (WORDELL FILHO & CHIARADIA, 2016).



Figura 1 - Maiores produtores mundiais de milho segundo a FAO. Fonte: Adaptado de FAO (2018).

De acordo com as projeções feitas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) até 2022 o grão de milho para alimentação animal será o mais negociado nos mercados internacionais, representando 80% do comércio mundial (USDA, 2014). A alta demanda comercial desta cultura exige produtividade agrícola cada vez mais elevada, o que ocasionou em consequência o uso massivo de insumos e defensivos químicos. Fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados, são aplicados no solo para melhorar o rendimento de culturas com grande importância econômica. De acordo com a Associação Internacional de Fertilizantes (IFA, 2018), em 2017/2018, aproximadamente 187 milhões de toneladas de fertilizantes foram

utilizados mundialmente, sendo que no Brasil, em 2016, a aplicação de fertilizantes alcançou valores da ordem de 186 kg ha⁻¹ de terra arável (WDI, 2016). Considerando uma taxa de crescimento de 1,9% ao ano, a estimativa é de que no final de 2020 tenham sido utilizadas 201 milhões de toneladas (FAO, 2017).

Entre os fertilizantes aplicados no solo para suprir a demanda das plantas e melhorar o rendimento de grãos das culturas, destaca-se o uso de fertilizantes nitrogenados, uma vez que o nitrogênio é considerado o nutriente mais limitante para o rendimento final de cultivos (GRANT et al., 2012). A aplicação de fontes de nitrogênio representa cerca de 40% do custo total de produção da cultura do milho. Entretanto, uma grande parte dos compostos nitrogenados não são diretamente absorvidos pelas plantas, resultando em altas perdas do fertilizante aplicado (GUPTA et al., 2015; MAHANTY et al., 2017) e ocasionando diversos problemas ambientais, como contaminação de águas subterrâneas e superficiais, a eutrofização de ecossistemas aquáticos além de contribuir com a emissão de gases de efeito estufa (CHIEN et al., 2011; DUNGAIT et al., 2012; MARKS et al., 2013).

Neste contexto, é inevitavelmente necessário reavaliar as abordagens agrícolas existentes que incluem a utilização de fertilizantes químicos, buscando minimizar os impactos negativos no meio ambiente. Uma alternativa eficiente para reduzir a quantidade de fertilizantes químicos é a utilização de inoculantes formulados a partir de microrganismos benéficos associativos. Estes microrganismos são capazes de colonizar a rizosfera ou o interior das plantas, promovendo crescimento e aumentando a oferta de nutrientes para a planta simbiótica (BARDI & MALUSÀ, 2012; MALUSÀ & VASSILEV, 2014). Os inoculantes são rentáveis e ecologicamente corretos, seu uso prolongado aumenta a quantidade de bactérias associativas livres no solo, proporcionando a adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis sem afetar a produtividade (MAHDI et al., 2010).

1.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

Entre os diversos microrganismos utilizados nas formulações de inoculantes, encontram-se as Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV), um grupo heterogêneo de bactérias benéficas de vida livre, comprovadamente vantajosas para a melhora do crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico (ZAMIOUDIS et al., 2013). Existem diversos mecanismos pelos quais as BPCV estimulam o crescimento da planta: diretamente, pelo aumento da disponibilidade de

nutrientes por meio da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfatos e outros minerais, produção de sideróforos ou pela modulação dos níveis hormonais, estimulando a produção de auxinas, giberilinas, citocininas e etileno. Indiretamente, as BPCV podem agir como antagonistas à fitopatógenos como fungos, vírus e nematoides, como agentes biocontroladores de doenças, induzindo resistência sistêmica da planta contra doenças, além de promover a tolerância e resistência vegetal à diferentes estresses abióticos (VESSEY, 2003; VAN LOON, 2007; YANG et al., 2009; VARGAS et al., 2012; ARRUDA et al., 2013; LIU et al., 2013).

Em geral, acredita-se que a influência das BPCV sobre o desenvolvimento e crescimento vegetal se dá por meio das combinações destes mecanismos, uma vez que cada tipo promove um efeito diferente na planta (Tabela 1) (DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN & DE-BASHAN, 2005; HUNGRIA et al., 2010). Estes microrganismos são considerados como aditivos para fertilizantes químicos, com objetivo de melhorar o rendimento de culturas e desenvolver sistemas agrícolas de produção mais sustentáveis (HAYAT et al., 2010). Diversos gêneros de BPCV são descritos na literatura científica como potenciais inoculantes, destacam-se alguns como *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia* (MONTEIRO et al., 2012).

Embora as gramíneas geralmente não formem associações simbióticas naturalmente com fixadores de nitrogênio, elas formam relações associativas ou endofíticas com bactérias de vida livre no solo, como *Azospirillum* spp., o que garante a obtenção do nitrogênio atmosférico via fixação biológica de nitrogênio (FBN) (SANTI et al., 2013). O aumento no rendimento tem sido relatado quando estas estão associadas com BPCV, especialmente as do gênero *Azospirillum*, que se destacam por apresentar associação mais frequente com gramíneas de importância agrícola e econômica, como milho, arroz e trigo (BALDANI & BALDANI, 2005).

Tabela 1 - Mecanismos empregados por BPCV e seus principais efeitos na planta

Mecanismo	Efeito no Crescimento da Planta	Exemplos de gêneros de BPCV
Fixação de nitrogênio	Aumenta quantidade de nitrogênio e biomassa	<i>Azospirillum</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Rhizobium</i>
Produção de fitormônios	Aumenta ramificação e comprimento da raiz, parte aérea e da biomassa.	<i>Azospirillum</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>
Solubilização de fosfatos	Aumenta quantidade de fósforo e biomassa	<i>Azospirillum</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Bacillus</i>
Indução de resistência à doenças	Aumenta sobrevivência de mudas e biomassa.	<i>Azospirillum</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Serratia</i>

Fonte: Adaptado de BASHAN & DE-BASHAN (2005); BASTIAN et al. (1998) e ARKHIPOVA et al. (2007).

1.2.1 O Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* engloba espécies de α -proteobactérias de vida livre no solo que habitam quase todos os ambientes terrestres (DOBEREINER & PEDROSA, 1987; HUERGO et al., 2008). A espécie *Spirillum lipoferum* foi descrita pela primeira vez por Beijerinck e, em 1978, foi proposta sua reclassificação como *Azospirillum*, juntamente com a descrição de duas espécies, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (TARRAND et al., 1978). Estas bactérias ganharam destaque mundial com a descoberta da sua capacidade de fixação biológica do nitrogênio quando associadas com gramíneas (DÖBEREINER & DAY,

1976). Sabe-se que *Azospirillum* spp. já foi encontrado em quase todos os lugares do planeta (HUNGRIA et al., 2010; MEHNAZ et al., 2015), sendo que existem pelo menos 19 espécies descritas até o momento (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies descritas do gênero *Azospirillum*

	Espécie	Referência
A.	<i>lipoferum</i>	Tarrand 1978
A.	<i>brasileense</i>	Tarrand 1978
A.	<i>halopraeferens</i>	Reinhold 1987
A.	<i>largomobile</i>	Sly 1999
A.	<i>doebereineriae</i>	Eckert 2001
A.	<i>oryzae</i>	Xie and Yokota 2005
A.	<i>canadense</i>	Xie and Yokota 2005
A.	<i>melinis</i>	Peng 2006
A.	<i>zeae</i>	Mehnaz, Weselowski 2007
A.	<i>rugosum</i>	Young 2008
A.	<i>palatum</i>	Zhou 2009
A.	<i>picis</i>	Lin 2009
A.	<i>thiophilum</i>	Lavrinenko 2010
A.	<i>formosense</i>	Lin 2012
A.	<i>humicireducens</i>	Zhou 2012
A.	<i>fermentarium</i>	Lin 2013
A.	<i>hymalaiense</i>	Tyagi & Singh 2014
A.	<i>solis</i>	Lin 2015
A.	<i>agricola</i>	Lin 2016

Fonte: Adaptado de (CASSÁN et al., 2015) e NCBI Taxonomy database (2019).

As bactérias deste gênero são Gram-negativas, caracterizadas pelo formato de bastonetes, uniflageladas, com movimentos vibróide característico e padrão flagelar misto (HALL & KRIEG, 1984) apresentando diâmetro de 1 micrômetro (μm) e o comprimento de 2,1 a 3,8 μm (PRIMAVESI et al., 2005). Estas bactérias são chamadas de rizosféricas, porém possuem capacidade de infectar e colonizar tanto o interior das raízes quanto a rizosfera das plantas, dependendo da linhagem e espécie (BALDANI et al., 1997). Além disso, provavelmente possuem uma vantagem seletiva importante em relação à outros microrganismos da rizosfera, uma vez que suas células exibem uma alta motilidade aliada

à quimiotaxia positiva com ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e componentes aromáticos, bem como exsudatos da raiz (ZHULIN et al., 1988).

Azospirillum spp. são conhecidas como bactérias habitantes da rizosfera, porém, existem diferenças específicas entre linhagens e espécies do gênero na forma de colonização das raízes. A maioria das espécies coloniza principalmente a superfície de raízes, enquanto algumas linhagens de certas espécies são capazes de infectar os tecidos internos das plantas. Foi observado que linhagens de *A. lipoferum* e de *A. brasilense* são capazes de colonizar o interior das raízes de trigo, enquanto a maioria das linhagens coloniza principalmente a zona de alongação e pelos radiculares (BASHAN et al., 2004).

1.2.2 Mecanismos de Fixação, Colonização e Promoção de Crescimento Vegetal por *Azospirillum* spp.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas por sua habilidade de colonizar raízes de plantas, especialmente gramíneas. As espécies de *Azospirillum* apresentam quimiotaxia para diversos exsudatos secretados pelas raízes destas plantas, como aminoácidos, ácido orgânicos, açúcares e compostos aromáticos (OKON et al., 1980; RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2007). A quimiotaxia é uma função característica de bactérias presentes no solo, proporcionando a capacidade de migrar em direção aos nichos favoráveis de crescimento, sendo uma importante ferramenta que favorece a associação planta-bactéria (CARREÑO-LÓPEZ et al., 2009; ALEXANDRE, 2010).

A resposta quimiotática de *Azospirillum* spp. representa o primeiro estágio da colonização, seguida pela etapa de fixação as raízes das plantas, necessária para formação de uma associação efetiva (Figura 2) (BELYAKOV et al., 2012; FIBACH-PALDI et al., 2012; WISNIEWSKI-DYÉ et al., 2013). A fixação de *Azospirillum* spp. ocorre em duas fases distintas e consecutivas: adsorção e ancoragem. Na etapa de adsorção, ocorre uma fraca ligação entre as células da raiz e a bactéria mediadas pelo flagelo, estrutura formada por moléculas de flagelina (RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2007). Ao mesmo tempo, *Azospirillum* spp. produzem polissacarídeos capsulares (CPS) que se ligam à membrana celular externa e parecem mediar a adesão das bactérias nas superfícies da raiz (DUTTA E PODILE, 2010). A segunda fase, chamada de ancoragem, é mediada por exopolissacarídeos (EPS) que interagem

diretamente com componentes do envelope celular bacteriano (MORA et al., 2008) tornando a ligação planta-bactéria irreversível e forte, formando aglomerados no local de ligação (WINIK et al., 2009). Após a ligação das células de *Azospirillum* às raízes, ocorre o “swarming”, processo de translocação onde o grupo de bactérias avança rapidamente até locais específicos e coloniza de forma ordenada (VERSTRAETEN et al., 2008), possibilitando a formação de microcolônias e simultaneamente a formação de biofilme (BOGINO et al., 2013).

Existem diversos mecanismos pelos quais as espécies deste gênero podem promover o desenvolvimento das plantas associadas, entre eles está a fixação biológica de nitrogênio (FBN), conhecida como uma das principais características de vários gêneros de BPCV. O gênero *Azospirillum* apresenta diversos genes envolvidos na fixação, assimilação e regulação do nitrogênio (MEHNAZ, 2015). No entanto, os estímulos hormonais se apresentam como a principal contribuição de *Azospirillum* spp. para o crescimento das plantas (BASHAN & DE-BASHAN, 2010).

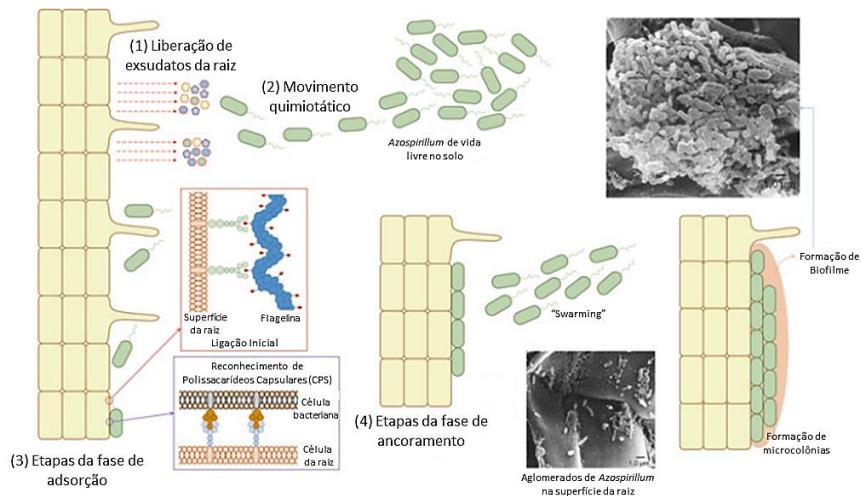


Figura 2 - Etapas do mecanismo de infecção por *Azospirillum* spp. Fonte: Adaptado de GUERRERO-MOLINA (2012).

Os fitormônios, assim como outros compostos como vitaminas, antibióticos e enzimas, são sintetizados por *Azospirillum* como forma de compensar pelos exsudatos radiculares secretados, levando a melhor absorção de água e minerais e estimulando o crescimento das plantas

(Figura 3) (DE-BASHAN et al., 2008; COHEN et al., 2015). Diversos estudos relatam a capacidade de *Azospirillum* spp. de promover crescimento por meio da ação de diferentes moléculas, entre estas destaca-se a autoprodução de fitormônios, principalmente auxinas, giberilinas e citocininas, além do óxido nítrico e ácido abscísico (SPAEPEN et al., 2007; BASHAN & DE-BASHAN, 2010). Estes fitormônios atuam como efetores e induzem a síntese destes compostos nos tecidos vegetais ao estimular a cascata de sinalização celular da planta (CHAMAM et al., 2013; DUCA et al., 2014; COHEN et al., 2015).

O ácido indol-3-acético (AIA) parece ser a auxina mais importante e mais produzida por *Azospirillum* (GLICK, 2014; MEHNAZ, 2015) em todos os estágios de crescimento (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009). Alguns trabalhos evidenciam que a síntese de fitormônios em *A. brasilense* depende da linhagem (DI SALVO et al., 2014), variando a quantidade de AIA produzida entre elas. O AIA é um fitormônio capaz de regular o ciclo da célula vegetal, assim como o tropismo, a dominância apical e senescência (MEHNAZ, 2015), além disso é capaz de alterar a morfologia e proliferação de raízes e aumentar biomassa (SPAEPEN et al., 2007). O AIA também afeta a fotossíntese, a biossíntese de metabólitos e outros fitormônios como citocininas e giberelinas (ILYAS & BANO, 2010; MEHNAZ, 2015).

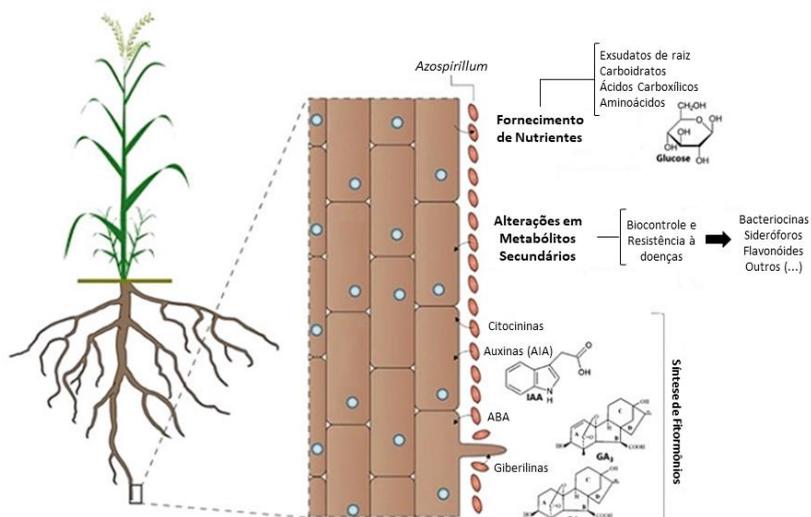


Figura 3 - Os efeitos positivos de *Azospirillum* spp. em raízes de gramíneas. Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al. (2015).

Azospirillum spp. também produzem citocininas, fitormônios responsáveis por controlar mecanismos de crescimento vegetal, como a divisão celular, diferenciação de cloroplastos, senescência foliar e sinalização nutricional (ARKHIPOVA et al., 2007). Giberilinas (GAs) e ácido abscísico (ABA) são produzidos por diferentes linhagens de *Azospirillum*, contribuindo para o alívio ao estresse hídrico e estimulando os mecanismos de defesa de plantas (COHEN et al., 2009; VACHERON et al., 2013). As GAs são responsáveis pela divisão e alongamento celular, estimulando oposição ao nanismo e induzem a germinação de sementes. O ABA é um fitormônio sintetizado em todas as partes da planta, sendo produzido em resposta ao estresse ambiental (BASHAN & DE-BASHAN, 2010).

Em seus hospedeiros *Azospirillum* spp. induzem a biossíntese de bacteriocinas e sideróforos, que são metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, o que contribui para o biocontrole de fitopatógenos (WALKER et al., 2011; VACHERON et al., 2013). Considerando os efeitos positivos proporcionados durante a interação de *Azospirillum* e plantas, a sua utilização como biofertilizante representa uma estratégia importante para a agricultura. No entanto, é importante ressaltar que o sucesso da interação com esta bactéria, depende tanto da espécie da planta quanto da linhagem, bem como das condições ambientais onde está ocorrendo a fixação e colonização (SANTI et al., 2013).

1.2.3 *Azospirillum* brasilense

Entre as espécies mais estudadas do gênero encontra-se *A. brasilense*, sendo uma das primeiras espécies a ser utilizada na produção de inoculantes comerciais no mundo. Seguindo legislação brasileira para inoculantes estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pesquisadores da Embrapa Soja (HUNGRIA, 2011), comprovaram que cepas de *A. brasilense* apresentaram maior sobrevivência no solo, promoção de crescimento, adaptação à tecnologias utilizadas na cultura do milho e trigo e incrementos de produtividade do milho de até 30% em relação ao controle.

Como resultado deste e outros estudos, algumas linhagens de *A. brasilense* já são utilizadas na formulação de inoculantes para a cultura do milho, como as cepas Ab-V5 e Ab-V6 no Brasil, cepa Az39 na

Argentina e cepa CRT1 na Europa. Outras linhagens da espécie são recomendadas para utilização em formulações para outras culturas de cereais, como trigo e arroz (Tabela 3). Entre as diversas linhagens de *A. brasilense* empregadas como inoculantes, a linhagem FP2, uma mutante espontânea da linhagem Sp7, destaca-se por possuir genes de resistência a antibióticos, permitindo seu fácil isolamento em meio de cultura para uso experimental visando o estudo da interação de *Azospirillum* spp. com diferentes gramíneas (LANA et al., 2012).

Tabela 3 - Linhagens recomendadas para espécies de cereais para uso em inoculantes comerciais no Brasil

Espécie da Planta	Espécie Bacteriana	Linhagem
<i>Triticum</i> spp.	<i>A. brasilense</i>	Ab-V1
<i>Zea mays</i>	<i>A. brasilense</i>	Ab-V4
<i>Zea mays</i> e <i>Triticum</i> spp.	<i>A. brasilense</i>	Ab-V5
<i>Zea mays</i> e <i>Triticum</i> spp.	<i>A. brasilense</i>	Ab-V6
<i>Zea mays</i>	<i>A. brasilense</i>	Ab-V7
<i>Triticum</i> spp.	<i>A. brasilense</i>	Ab-V8
<i>Oryza sativa</i>	<i>A. brasilense</i>	Ab-V5
<i>O. sativa</i>	<i>A. brasilense</i>	Ab-V6

Fonte: Adaptado de BRASIL (2011)

De acordo com a Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII, 2019), o uso de inoculantes para gramíneas teve aumento gradativo nos últimos anos, sendo que em 2016, foram vendidas aproximadamente 4.532 milhões de doses. O Brasil tem potencial para gerar economia de 30 a 50 kg ha⁻¹ de fertilizantes nitrogenados com aplicação de inoculantes de *A. brasilense* em milho (FANCELLI, 2010). A possibilidade real de incremento de produtividade e redução do uso de fertilizantes despertou ainda mais o interesse da indústria e pesquisa agrária no estudo das interações entre *Azospirillum brasilense* com diversas culturas, assim como no desenvolvimento de inoculantes cada vez mais eficientes.

1.3 VIABILIDADE CELULAR DE INOCULANTES

Estudos de revisão indicam que existe uma taxa de 60-70% de sucesso no uso de *Azospirillum* spp. como inoculantes, com ganho de 5-30% no cultivo de cereais de grande importância econômica, como o milho (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994; HUNGRIA et al., 2010). No entanto, grandes variações sobre o efeito destes inoculantes ainda são rotineiramente encontrados em experimentos à campo

(HUNGRIA et al., 2010; LANA et al., 2012; TURAN et al., 2012). Em muitos casos, os resultados obtidos em condições controladas não são facilmente transferidos para o campo, principalmente para bactérias deste tipo, que são mais suscetíveis à fatores deletérios que ocorrem durante processo de produção e armazenamento ou aplicação de inoculantes (POTTS, 1994; O'CALLAGHAN, 2016).

A presença de um grande número de células viáveis no inoculante é um pré-requisito para que ocorra uma colonização satisfatória na planta, e assim sejam observados efeitos de crescimento e incremento de produtividade no campo. A viabilidade de inoculantes em condições não-controladas pode ser afetada em diferentes níveis: antes, durante e após sua aplicação (BERNINGER et al., 2017). Um dos primeiros fatores que podem afetar a viabilidade do inoculante é a estocagem, exigindo que o produto tenha uma vida de prateleira suficientemente longa, cuja estabilidade deve ser garantida durante o processo de produção, empacotamento e transporte (KHARE & ARORA, 2011). Durante e após a sua aplicação, o inoculante é confrontado com diversos fatores desfavoráveis, como exposição à radiação ultravioleta (ZOHAR-PEREZ et al., 2003); exposição das sementes tratadas à fungicidas e outros aditivos químicos (DEAKER et al., 2011); propriedades flutuantes do solo e condições climáticas, como grau de fertilidade, pH, temperatura, umidade, deficiências nutritivas ou elementos tóxicos; interação com a microbiota nativa presente no solo pela competição ou antagonismo além da limitação de suprimentos como oxigênio e água além de alta pressão osmótica (KHARE & ARORA, 2011). Devido a estes fatores limitantes, a indústria está sempre em constante busca de novas tecnologias para o desenvolvimento de inoculantes, incluindo formas de processamento, aplicação e formulações líquidas, o que causaram aumento no uso destes produtos no Brasil (ALBAREDA et al., 2008).

Existe uma vasta discussão na literatura quanto à definição de viabilidade celular, sendo uma questão muito levantada por microbiologistas. Mais recentemente, estes conceitos foram estabelecidos com base na avaliação fisiológica e metabólica das células. São consideradas células viáveis, aquelas que possuem suas membranas celulares intactas além de metabolismo funcional, fundamentais para o funcionamento de uma célula saudável (NEBE-VON-CARON et al., 2000; CODONY et al., 2015).

Em algumas condições de estresse ambiental, as células podem entrar em um estado de sobrevivência, em que estas não são mais capazes de formar colônias ou manter sua reprodução (PINTO et al., 2015). Estas células são chamadas de viáveis mas não-cultiváveis, pois perdem a capacidade de crescimento, mantendo a integridade da membrana celular. Além disso, estas células podem ter mudanças na morfologia e composição da membrana e na parede celular (SIGNORETTO et al., 2002), mas ainda são capazes de manter o metabolismo de respiração, expressão gênica e síntese de proteínas, porém em níveis reduzidos. É importante ressaltar que esta característica de não-cultivabilidade é reversível, e as células voltam ao seu funcionamento normal quando o ambiente se torna favorável (CHIU et al., 2008). Quando as células estão sob condições de estresse, podem ainda ter a sua membrana celular injuriada, levando à morte celular. Embora estas células inviáveis possam manter certo nível de atividade enzimática residual, a integridade da membrana e o metabolismo não são mantidos e mesmo sob condições favoráveis não tem a capacidade de recuperar o status normal (NEBE-VON-CARON et al., 2000; CODONY et al., 2015).

A determinação da viabilidade celular e enumeração de populações microbianas pode ser determinada com base em três aspectos fundamentais para uma célula viva: integridade da membrana celular, atividade metabólica e responsividade (NOCKER & CAMPER, 2009; FITTIPALDI et al., 2012). Diversos métodos moleculares têm sido propostos para esta finalidade, de modo que se faz necessário o aperfeiçoamento destes métodos para permitir avaliação da viabilidade celular de forma rápida e precisa, a fim de contribuir para o desenvolvimento de formulações mais eficientes de inoculantes.

1.4 MÉTODOS DE ENUMERAÇÃO DE POPULAÇÕES MICROBIANAS

Os métodos clássicos para enumeração de populações microbianas dependem da capacidade das células de crescer ativamente e formar colônias visíveis em meios de cultura (XU, 2016). Estes métodos chamados de dependentes de cultivo, foram de extrema importância para consolidação e avanço da microbiologia. Porém, sob algumas circunstâncias os métodos são limitados podendo subestimar o número de microrganismos nas amostras, como células viáveis que perderam a capacidade de formar colônias, além de exigir procedimentos laboriosos que demandam grande quantidade de tempo (KEER & BIRCH, 2003;

MOREIRA, 2006). Por outro lado, a grande vantagem deste método em relação às técnicas modernas é o fato de fornecer material microbiano biologicamente ativo para ser usado em outras análises (AL-AWADHI et al., 2013; XU, 2016).

Nas últimas décadas, métodos alternativos para enumeração de células microbianas foram desenvolvidos, entre estes estão os métodos que se baseiam na fisiologia e integridade celular, como a citometria de fluxo e técnicas de coloração fluorescente (DIAPER & EDWARDS, 1994; CARON, 1998), os que se baseiam na atividade metabólica da célula, como avaliação da respiração celular e aqueles baseados na presença de ácidos nucléicos (SHERIDAN et al., 1998; DEL MAR LLEÒ et al., 2000). Os métodos moleculares, embasam um grupo de métodos chamados de independentes de cultivo e fornecem uma visão sobre a diversidade microbiana permitindo uma descrição mais rápida das comunidades microbianas (DAHLLÖF et al., 2000).

Os métodos independentes de cultivo são baseados principalmente na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde a detecção e diferenciação dos microrganismos se dá por meio da amplificação de uma sequência específica de DNA (COCOLIN et al., 2013). As abordagens baseadas na PCR são usadas principalmente por causa de sua alta sensibilidade, especificidade e aplicabilidade para amostras complexas, porém, a PCR convencional é um método qualitativo que não pode avaliar a quantidade de microrganismos, apenas a detecção (XU, 2016). A PCR quantitativa (qPCR) é amplamente utilizada para identificação, quantificação e análise da diversidade microbiana, mesmo quando estes microrganismos estão em pequenas proporções na amostra (GIRAFFA & NEVIANI, 2001; HIERRO et al., 2006). No entanto, uma limitação desta técnica é a incapacidade de distinguir células viáveis das inviáveis durante a detecção dos microrganismos. Com o objetivo de superar esta limitação, foram propostas novas abordagens da técnica, que consistem na utilização de corantes de viabilidade, capazes de intercalar com o DNA de células viáveis, como pré-tratamento das amostras antes da qPCR (NOCKER & CAMPER, 2006; GARCIA-CAYUELA et al., 2009).

1.4.1 Enumeração de microrganismos por PCR quantitativa (qPCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica onde ocorre a amplificação *in vitro* de sequências específicas de ácido nucléicos (MULLIS & FALOONA, 1987; MULLIS, 1990). A PCR quantitativa baseia-se na PCR convencional, técnica que utiliza a enzima DNA polimerase para amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos que atuam como iniciadores. A reação de PCR ocorre basicamente em três etapas: desnaturação da fita dupla de DNA da amostra, pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA desnaturado e extensão das cadeias de DNA a partir de cada um dos iniciadores sob catálise da enzima DNA Polimerase, sendo que cada fase ocorre em diferentes temperaturas (GIULIETTI et al., 2001).

A introdução de um procedimento baseado na cinética de fluorescência introduziu a quantificação dos produtos de PCR em “tempo real”, permitindo o monitoramento da amplificação durante sua ocorrência (ciclo a ciclo). Desse modo, a qPCR se apresenta como uma técnica mais sensível, acurada e rápida que os demais métodos de quantificação, resultando em informações tão rapidamente quanto o processo de amplificação, não necessitando de manipulações pós-PCR (GIULIETTI et al., 2001). A principal diferença da qPCR em relação à PCR convencional é que esta ocorre em um sistema fechado, não necessitando de manipulações após a amplificação, e é monitorada através de um programa computacional que avalia a evolução da amplificação a cada ciclo por meio da detecção de fluorescência dos produtos amplificados (MACKAY et al., 2002). O monitoramento da produção dos *amplicons* em tempo real é possível através do uso de marcadores fluorescentes com afinidade específica para DNA de fita dupla ou de sonda específicas de oligonucleotídeos marcadas com moléculas fluorescentes (GUT et al., 1999).

Entre os compostos intercalantes usados na qPCR, o mais utilizado é o SYBR® Green, que se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, mas não se liga à fita simples. Quando livre na solução de reação o fluoróforo não é capaz de emitir fluorescência, mas durante a extensão dos iniciadores pela DNA polimerase este se liga ao DNA que está sendo sintetizado. O aumento da quantidade de DNA sintetizado resulta no aumento do sinal fluorescente, que é medido ao final de cada extensão e observado em tempo real (MARKOULATOS et al., 2004). A falta de

especificidade do fluoróforo permite que seja utilizado com qualquer par de iniciadores para a amplificação de qualquer sequência alvo. No entanto, esta falta de especificidade acaba sendo uma das principais limitações do sistema de quantificação, devido ao risco de detecção de amplificações não específicas e dímeros de iniciadores (GARCÍA-CAÑAS et al., 2004). Contudo, pela análise das curvas de dissociação térmica as características dos produtos amplificados podem ser diferenciadas (WEIGHARDT, 2006).

A qPCR apresenta quatro fases distintas: fase lag (*background*), fase exponencial, fase linear e fase platô (Figura 4). Na fase lag existem flutuações correspondentes ao sinal do ruído de fundo (*background*), mas ainda não houve amplificação suficiente a ponto de ser detectada a fluorescência. Na fase exponencial, o sinal fluorescente é significativamente maior que o ruído de fundo. Na fase linear, a qPCR atingiu sua fase ótima de amplificação, onde a quantidade dos produtos de amplificação dobra à cada ciclo, com aumento contínuo do sinal fluorescente. Na fase platô, ocorre o fim da reação, quando não há aumento do número de produtos de amplificação.

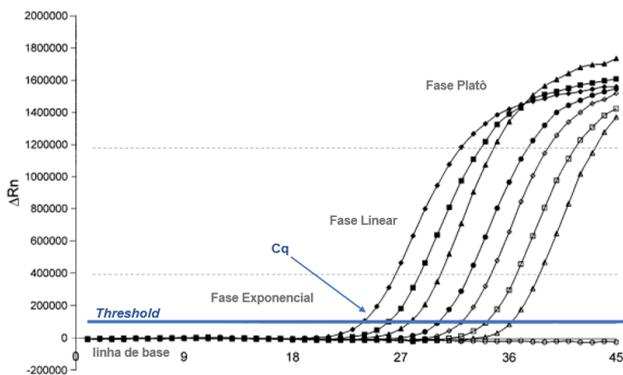


Figura 4 - Gráfico de amplificação da qPCR com sinal fluorescente (ΔRn) vs. número de ciclos. C_q é o ciclo de quantificação; Threshold é o ponto da reação em que a fluorescência ultrapassa o ruído de fundo; Fonte: Adaptado de GIULIETTI et al. (2001).

A quantificação ocorre na fase linear, pois nessa fase é gerado um acúmulo de produtos amplificados e conseqüentemente aumento da emissão de fluorescência. O ciclo onde o sinal fluorescente emitido ultrapassa o limiar de detecção de sinal permite inferir a concentração

inicial do DNA alvo para cada amostra. O limiar de detecção é definido dentro da fase exponencial, no ponto em que as réplicas sejam mais coincidentes (GIULIETTI et al.; HEID et al., 1996; WONG et al., 2005). O ciclo de quantificação (Cq) é o ciclo em que a curva de amplificação de cada DNA alvo cruza o limiar de detecção do sinal. Quanto maior a quantidade inicial do DNA alvo, mais cedo ocorre aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de Cq (ANDERSEN et al., 2006; WEIGHARDT, 2006).

A validação de métodos analíticos é uma etapa importante no desenvolvimento de um trabalho de pesquisa, pois garante a confiabilidade dos resultados para ajudar a assegurar a integridade da leitura científica, promover consistência entre os experimentos de diferentes laboratórios e aumentar a transparência experimental. Os critérios para validação de métodos são estabelecidos por órgãos competentes como a ENGL (*European Network of GMO Laboratories*), órgão responsável por regulamentar normas de praticamente todos os laboratórios e centros de pesquisa da União Européia. Alguns dos critérios estabelecidos pela ENGL são utilizados para validação da qPCR, como os listados na tabela 4.

Tabela 4 - Critérios e definições da ENGL para validação de métodos moleculares quantitativos

Critério	Definição
Eficiência de Amplificação	É a taxa de amplificação calculada a partir do slope da curva padrão obtida (Cq vs. Cópia de DNA). A eficiência pode ser calculada pela equação $E = 10^{(-1/s)} - 1$. A eficiência ideal é igual a 100%.
Coefficiente de Determinação (R ²)	É o coeficiente de determinação de uma curva obtido por análise de regressão linear. O valor médio deste coeficiente deve ser igual ou maior que 0,98.
Precisão – Repetibilidade Relativa do Desvio Padrão (RSDr)	É o desvio padrão relativo dos resultados obtidos em testes de repetibilidade. As condições de repetibilidade são condições onde os mesmos resultados dos testes são obtidos usando o mesmo método, com os mesmos materiais de ensaio, mesmo laboratório, mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A repetibilidade relativa do desvio padrão deve ser menor ou igual a 25% através de toda variação dinâmica do método.

Limite de Quantificação (LOQ)	É a menor quantidade ou concentração do analito em uma amostra que pode ser quantificado de forma confiável, com um nível aceitável de precisão e exatidão. O LOQ é o menor valor da concentração alvo em que o RSDr é menor ou igual a 25%.
Limite de Detecção (LOD)	É a menor quantidade ou concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LOD é o menor valor da concentração alvo em que todas as replicatas de reação foram positivas.

Fonte: Adaptado de HOUGS et al. (2017) .

A qPCR se tornou uma ferramenta de extrema importância para avaliação de DNA e RNA e diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando esta metodologia para estudar as interações entre plantas e microrganismos. A técnica tem possibilitado desde a identificação da expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de interação até a identificação e quantificação de populações microbianas em diversas matrizes (COUILLEROT et al., 2010; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; GALISA et al., 2012; KANG et al., 2012; VARGAS et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013).

Existem diversos estudos com aplicação de qPCR para quantificação de microrganismos associados à rizosfera de plantas e em amostras de solo, principalmente com espécies do gênero *Rhizobium* e *Pseudomonas* (BOONEN et al., 2010; CIBICHAKRAVARTHY et al., 2012; GURSKA et al., 2015; MARTINI et al., 2015). Com espécies do gênero *Azospirillum*, existem trabalhos desenvolvidos para quantificação e monitoramento da expressão gênica destas bactérias em matrizes de milho, trigo entre outras gramíneas (COUILLEROT et al., 2010; FALEIRO et al., 2013; STETS et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

1.4.2 Enumeração de células viáveis de microrganismos por qPCR combinada com corantes de viabilidade

A utilização de técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucléicos tornou-se importante para as análises microbiológicas em laboratórios de pesquisa e para diagnóstico microbiológico em indústrias, devido à versatilidade e velocidade de obtenção dos resultados (NOCKER & CAMPER, 2009). Os métodos baseados na quantificação de DNA, apresentam uma desvantagem quando o propósito é o

monitoramento de células viáveis em uma amostra, uma vez que a molécula de DNA pode permanecer íntegra no ambiente por longos períodos de tempo, mesmo após a morte celular (JOSEPHSON et al., 1993; MASTERS et al., 1994). Assim, análises de qPCR que se baseiam na concentração de DNA da amostra, podem superestimar o número de células viáveis, ou apresentar resultados falso-positivos, visto que a técnica não é capaz de diferenciar células viáveis das inviáveis (NOCKER & CAMPER, 2009). A incapacidade de diferenciar a viabilidade de células é vista como uma das maiores desvantagens da qPCR durante análises de detecção e quantificação de microrganismos em amostras de alimentos, ambientais e clínicas (FITIPALDI et al., 2012).

O desenvolvimento de uma nova abordagem da técnica de qPCR foi apresentada em 2003 por Nogva e colaboradores e reforçada em 2006 por Nocker & Camper, com o conceito de corantes de viabilidade como alternativa para detecção de células viáveis durante a amplificação. A combinação da qPCR com corantes de viabilidade tem sido, desde então, amplamente utilizada para monitoramento da viabilidade celular de diversos microrganismos em diferentes matrizes (Tabela 5). Os corantes de viabilidade, como a monoazida de propídeo (PMA) e a monoazida de etídeo (EMA), são moléculas intercalantes de DNA capazes de penetrar em células com membranas celulares comprometidas quando utilizados como pré-tratamento de amostras que serão quantificadas. Após o tratamento, quando as amostras são expostas à uma fonte de luz halógena, a molécula do corante intercala a fita dupla de DNA e forma ligações covalentes (Figura 5). Esta reação ocorre devido à presença de um grupamento azida na molécula do corante, que no momento da fotólise é convertido em um radical nitrogênio altamente reativo, capaz de reagir com uma molécula orgânica próxima como o DNA e o excesso de corante reage com moléculas de água. A modificação resultante do tratamento com corantes de viabilidade rende uma molécula de DNA insolúvel, que não é extraída durante os produtos de extração nem detectada durante as reações de amplificação (NOCKER & CAMPER, 2009; FITIPALDI et al., 2012).

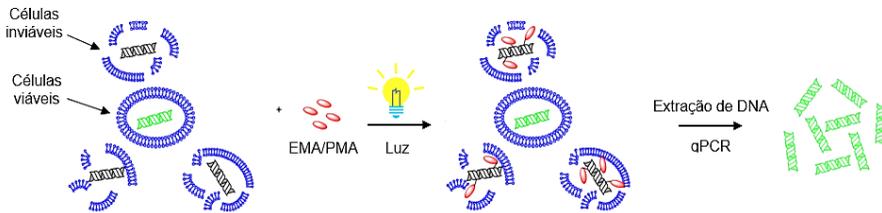


Figura 5 - Células viáveis e inviáveis tratadas com corantes de viabilidade e o efeito causado no uso da técnica de qPCR Fonte: Adaptado de © Biotium.

Embora os dois corantes de viabilidade comportem-se de maneira bem semelhantes, eles diferem a respeito da permeabilidade através das membranas celulares. Foi relatado que o EMA apresenta capacidade de penetrar através de membranas de células viáveis, dependendo da espécie bacteriana (NOCKER & CAMPER, 2006; FLEKNA et al., 2007), o que representa uma grande limitação na utilização deste corante. Quando comparado com o EMA, o corante PMA apresentou maior especificidade na discriminação de células viáveis, por não ser tão permeável e por isso tem sido amplamente utilizado na quantificação de células viáveis de diversos microrganismos (CANGELOSI & MESCHKE, 2014).

Uma desvantagem da utilização dos corantes de viabilidade é que estes não conseguem fazer a distinção entre células viáveis e células não-cultiváveis, uma vez que a distinção da viabilidade é feita com base na integridade da membrana e células não-cultiváveis possuem a membrana intacta, apesar de apresentar atividade metabólica reduzida (ver item 1.3) (NOCKER & CAMPER, 2009; CODONY et al., 2015).

Para desenvolver um ensaio de qPCR de viabilidade, normalmente divide-se a amostra em estudo em dois grupos que são submetidos a tratamento para obtenção de células inviáveis. Uma vez que os corantes de viabilidade se baseiam na integridade da membrana celular, os tratamentos devem ser agressivos o bastante para provocar danos nas células. Normalmente são utilizados tratamentos térmicos, agentes químicos e exposição à radiação ultravioleta (VONDRAKOVA et al., 2018). Um grupo de amostras é tratado com PMA ou EMA, enquanto o outro grupo não é tratado, servindo como controle do ensaio. Existem vários fatores que devem ser considerados na otimização da

metodologia, que podem influenciar nos resultados pela utilização destes corantes, como: a escolha do corante (PMA ou EMA) de acordo com a espécie bacteriana estudada, a concentração de tratamento da amostra, condições de incubação, fonte de luz fornecida, presença de células mortas e questões relacionada ao tipo de matriz, como salinidade, turbidez, presença de sólidos suspensos e pH. Todos estes fatores devem ser otimizados para melhor desempenho da metodologia ao utilizar diferentes cepas bacterianas e diferentes matrizes avaliadas (FITTIPALDI et al., 2012). Após a otimização das condições de tratamento, os grupos de amostras são quantificados por qPCR, e os resultados são analisados comparando as diferenças no sinal da qPCR entre os dois grupos de amostras. A contagem em placa pode também ser utilizada como forma de controlar os resultados obtidos com o uso destes corantes, uma vez que somente células viáveis serão cultiváveis (CANGELOSI & MESCHKE, 2014).

A utilização destes corantes tem sido aplicada à uma vasta gama de microrganismos, incluindo células vegetativas de bactérias em diferentes abordagens. As principais áreas de aplicação do método estão relacionadas à avaliação microbiológica de matrizes alimentares, condições higiênico-sanitárias de águas e produtos residuais, amostras ambientais, solos e plantas. Alguns dos trabalhos mais relevantes desenvolvidos estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Principais aplicações de corantes de viabilidade para quantificação de células viáveis

Matriz	Microrganismo	Corante de Viabilidade	Referência
<i>Lácteos</i>			
Iogurte	<i>Lactobacillus paracasei</i>	PMA	(SCARIOT et al., 2018)
Iogurte	<i>Streptococcus, Lactobacillus e Lactobacoccus</i> spp.	PMA	(PORCELLATO et al., 2015)
Queijo	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	PMA	(ERKUS et al., 2016)
<i>Águas</i>			
Fonte Urbana	<i>Legionella pneumophila</i>	PMA	(BONETTA et al., 2018)
Fonte Urbana e Rural	<i>E. coli, Enterococcus</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i>	PMA	(GENSBERGER et al., 2014)

Bacia Hidrográfica	Coliformes Totais, <i>E.coli</i> e <i>Enterococci</i>	PMA	(THULSIRAJ et al., 2017)
Fonte Urbana	<i>Mycobacterium</i> , <i>Variovax</i> e <i>Sphingopyxis</i> spp.	PMA	(GOMEZ-ALVAREZ et al., 2016)
Fonte Urbana	<i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i>	PMA	(LIN et al., 2016)
Fonte Urbana	<i>Mycobacterium</i> , <i>Aeromonas</i> spp. e <i>P.aeruginosa</i>	PMA	(XING et al., 2018)
<hr/>			
<i>Amostras Ambientais</i>			
Biossólidos	Coliformes Fecais e Patógenos	PMA	(VAN FRANKENHUYZEN et al., 2011)
Argila Solo	Arqueobactérias Bactérias, Arqueobactérias e Fungos	PMA PMA e EMA	(HEISE et al., 2016) (WAGNER et al. 2015)
<hr/>			
<i>Plantas</i>			
Alface e Tomate	<i>Salmonella tyohimurium</i>	PMA	(YANG et al., 2013)
Tomate	<i>Alternaria</i> spp.	PMA	(CRESPO-SEMPERE et al., 2013)
Espinafre e saladas mistas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PMA	(ELIZAQUÍVEL et al., 2012)
Alface e Espinafre	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PMA	(DINU & BACH, 2013)
Alface	<i>Escherichia coli</i>	PMA	(TRUCHADO et al., 2016)
Vegetais	Norovirus	PMA e EMA	(RANDAZZO et al., 2016)
Sementes de Cenoura	<i>Xanthomonas hortorum</i>	PMA	(TEMPLE et al., 2013)
Folhas de pêra, morango e kiwi	<i>Lactobacillus plantarum</i>	PMA e EMA	(DARANAS et al., 2018)
Sementes de Tomate	<i>Clavibacter michiganensis</i>	PMA e EMA	(HAN et al., 2018)
Sementes de Pepino	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	PMA	(MENG et al., 2016)
Cascas de Laranja	<i>Pantoea agglomerans</i> CPA-2	PMA	(SOTO-MUÑOZ et al., 2015)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ensaio de avaliação da viabilidade celular de *Azospirillum brasilense* FP2 em meio de cultivo e em raízes de milho, utilizando a metodologia de PMA-qPCR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar condições para obtenção de células inviáveis de *A. brasilense* por tratamento térmico e posterior contagem em placa.
- Testar metodologia PMA-qPCR, para quantificação de células viáveis de *A. brasilense* em culturas puras e em plantas de milho inoculadas crescidas *in vitro*.
- Determinar a enumeração e comparar resultados obtidos por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa.

CAPÍTULO 2

Monitoramento da viabilidade celular da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* FP2 em raízes de milho crescidas *in vitro* usando PMA-qPCR

Autores: Elisandra Triches da Cunha, Ana Marina Pedrolo, Franciele Paludo, Mirella Crhistine Scariot, Ana Carolina Maisonnave Arisi.

3. INTRODUÇÃO

A bactéria promotora de crescimento vegetal (BPCV) *Azospirillum brasilense* é a espécie mais estudada do gênero *Azospirillum* e se destaca pela frequente associação à diferentes gramíneas de importância econômica. Também exerce influências benéficas sobre o crescimento e produtividade das plantas por meio de vários mecanismos, como a fixação de nitrogênio e a produção de fitormônios (DOBBELAERE ET AL., 2003; BASHAN ET AL., 2004; FIBACH-PALDI et al., 2012). *A. brasilense* tem sido extensivamente recomendada para uso em inoculantes comerciais no Brasil, sendo que as formulações existentes geralmente contêm as cepas derivadas da SP7, como a cepa FP2. *A. brasilense* mostrou promover o crescimento de plantas quando associado a gramíneas (HUNGRIA et al., 2010). No entanto, o sucesso da interação e do estímulo efetivo do crescimento vegetal depende, entre outros fatores, principalmente da sobrevivência de cepas inoculadas na rizosfera (BASHAN et al., 2004). A viabilidade de inoculantes pode ser afetada antes, durante e após a sua aplicação e depende basicamente das condições ambientais que são fornecidas (KHARE & ARORA, 2011).

Atualmente, métodos dependentes de cultivo ou independentes de cultivo são utilizados para avaliar a diversidade de bactérias associadas às plantas cultivadas. A identificação de espécies de *Azospirillum* em plantas inoculadas usando métodos laboriosos convencionais, envolve o uso de meios seletivos e testes fisiológicos (SHIME–HATTORI et al., 2011). De fato, apenas algumas ferramentas estão disponíveis para monitorar efetivamente o número de células inoculadas na rizosfera de maneira rápida e precisa (COUILLEROT et al., 2010). Métodos independentes de cultivo baseados em DNA têm sido empregados com sucesso para identificar e quantificar espécies de *Azospirillum* nas interações com gramíneas (COUILLEROT et al., 2010; SHIME–HATTORI et al., 2011; FALEIRO et al., 2013; STETS et al., 2015). No entanto, mesmo após a morte celular, a molécula de DNA pode permanecer íntegra no meio ambiente. Nesse caso, os resultados da qPCR provavelmente serão superestimados, uma vez que o método não permite a discriminação entre as células viáveis e não viáveis (NOCKER & CAMPER, 2009; FITTIPALDI et al., 2012).

O pré-tratamento de amostras com corantes intercalantes de ácidos nucleicos, como a monoazida de propídio (PMA), foi proposto como uma técnica prévia a ser executada antes da qPCR, para evitar resultados falso-positivos. Este pré-tratamento permite a detecção seletiva de DNA de células viáveis, incluindo as cultiváveis e não-cultiváveis. Essa diferenciação é baseada na capacidade do PMA de penetrar em células mortas ou com membranas celulares comprometidas e se ligar de forma covalente ao DNA, após a exposição à luz halógena. Este DNA ligado com o PMA torna-se insolúvel e sua amplificação por qPCR é inibida (NOCKER & CAMPER, 2006; FITTIPALDI et al., 2012). Uma vez que o corante é impermeável à membrana de células viáveis, as tensões ambientais que afetam a viabilidade consequentemente aumentam a permeabilidade do PMA na parede celular das bactérias mortas (PRIBYLOVA et al., 2012).

O uso de PMA foi integrado com sucesso em ensaios de qPCR para detecção de células viáveis em populações microbianas de diferentes matrizes (ELIZAQUÍVEL et al., 2012; CRESPO-SEMPERE et al., 2013; TEMPLE et al., 2013; GENSBERGER et al., 2014; WAGNER et al., 2015; TRUCHADO et al., 2016; AL-DAOUD et al., 2017; SCARIOT et al., 2018). No entanto, apesar de a PMA-qPCR ter sido sugerida como uma abordagem promissora para avaliar a viabilidade celular e de armazenamento de inoculantes bacterianos não esporulados, ainda é um método combinado que precisa ser avaliado para diferentes cepas bacterianas e condições de estresse ambiental (BERNINGER et al., 2017).

Até onde sabemos, a aplicação da PMA-qPCR para enumeração de células viáveis de bactérias promotoras do crescimento vegetal em inoculantes e em plantas inoculadas ainda não foi avaliada. Neste trabalho, foi desenvolvido um ensaio para avaliação de células viáveis de *A. brasilense* FP2 em cultura pura e raízes de milho cultivadas *in vitro*, usando PMA-qPCR e os resultados foram comparados à quantificação obtida por qPCR e contagem em placa (Apêndice 1).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Azospirillum brasilense cepa FP2 (Pedrosa e Yates, 1984) foi cultivada em meio NFbHPN (MACHADO et al., 1991) suplementado

com 5mg / L de lactato de sódio a 30 °C sob aeração e agitação de 120 rpm até DO₆₀₀ 0,8, correspondendo a ~ 10⁸ UFC / mL. Foram adicionados à cultura bacteriana os antibióticos estreptomina (SM) na concentração final de 80 µg / mL e ácido nalidíxico (NAL) a 10 µg / mL. As cepas bacterianas usadas na qPCR como controle negativo (*Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*) foram cultivadas como previamente descrito (PEREIRA et al., 2014). Obteve-se uma correlação entre a densidade ótica (DO) medida a 600 nm utilizando o espectrofotômetro Hitachi U2910 (Tóquio, Japão) e o número unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas por contagem em placa. Para as contagens em placa, foram diluídas em série quantidades conhecidas de células em solução salina 0,9% e realizada semeadura por gotejamento (*drop plate*) em placas com meio seletivo de ágar NFbHPN. A contagem bacteriana foi realizada após plaqueamento e incubação por 72h a 30 °C.

4.2 PREPARO DE AMOSTRAS SUBMETIDAS À TRATAMENTO TÉRMICO

Para o ensaio de viabilidade, alíquotas de 1,5 mL de suspensão celular retirada da fase de crescimento logarítmico médio (~ 10⁸ UFC / mL) foram colocadas em tubos de microcentrífuga e expostas à 50 °C em banho-maria e retiradas à 0, 15, 30, 60, 120 e 240 min após a incubação. O primeiro grupo de amostras permaneceu sem tratamento (amostras não tratadas com PMA), o segundo grupo foi tratado com PMA (amostras tratadas com PMA) e o terceiro grupo foi semeado em placas contendo meio NFbHPN. Quatro repetições biológicas foram obtidas para cada grupo de tratamento. O primeiro e o segundo grupo de amostras foram submetidos à centrifugação (6000 x g, 4 °C , 3 min) e os precipitados bacterianos foram lavados 3 vezes com solução salina 0,9% antes das análises (Apêndice 2).

4.3 GERMINAÇÃO, INOCULAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO*

O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando a variedade de milho híbrido Dow 20A55, grupo controle e inoculado com *A. brasilense* cepa FP2. A superfície das sementes foram esterilizadas em cabine de segurança biológica com 3 lavagens em água destilada autoclavada, seguida de submersão em etanol 70% por 3 minutos e agitação durante 30 min em solução de hipoclorito de sódio 2% e Tween 20 2,5%. Em

seguida, as sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada, transferidas para placas contendo ágar 0,8% e mantidas por 3 dias em câmara de crescimento no escuro à 25 °C para germinação. As plântulas pré-germinadas foram inoculadas com a cultura de *A. brasilense* cepa F2 (~ 10⁸ UFC / mL) após diluição para 10⁷ UFC / mL (1 mL por semente) em meio lactato NFb (sem fonte de nitrogênio), durante 30 min à 30 °C sob agitação constante (80 rpm) (RONCATO-MACCARI et al., 2006). As plântulas controle foram inoculadas nas mesmas condições, na ausência da cultura bacteriana. Para o cultivo, as plântulas foram lavadas em solução salina 0,9% por 1 min, colocadas em tubos de vidro contendo meio *Plant Medium* (EGENER et al., 1999). Os tubos foram distribuídos lado-a-lado em uma câmara de crescimento controlada e mantidos por 7 dias à 16 horas de fotoperíodo, 25 °C e 40% de umidade. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições biológicas. As plântulas de milho foram coletadas aleatoriamente sete dias após a inoculação (DAI). As superfícies das raízes foram tratadas com 2 min de imersão em etanol 70% seguido de 2 min em solução de hipoclorito de sódio 1%. Em seguida, as raízes foram lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

4.4 PREPARO DE RAÍZES DE MILHO PARA TRATAMENTO COM PMA

Antes do tratamento com PMA, 100 mg de raízes de milho crescidas *in vitro* foram esmagadas utilizando almofariz e pistilo, em 1 mL de solução salina 0,9% e transferidas para tubos de microcentrífuga. As alíquotas foram centrifugadas (9000 x g, 10 min) e estocadas em gelo até o tratamento com PMA.

4.5 TRATAMENTO COM PMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS

PMA (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) foi dissolvido (1 mg) em água ultrapura de acordo com as instruções do fabricante para obter uma solução estoque 20 mM (armazenada a -20 °C no escuro). Os precipitados obtidos a partir da cultura submetida à tratamento térmico e das raízes de milho crescidas *in vitro* foram ressuspensos em 500 µl e 1000 µl, de água ultra-pura, respectivamente, e tratadas para obter uma concentração final de 50 µM de PMA (GARCIA-CAYUELA et al.,

2009). Os tubos contendo os tratamentos foram incubados por 5 min no escuro (com agitação intermitente), colocados horizontalmente no gelo e expostos a 500 W de fonte de luz de halógena durante 15 min. A distância entre os tubos e a fonte de luz foi de 20 cm. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas (5000 g, 10 min) e os precipitados armazenados a -80 °C até a extração do DNA.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído de culturas bacterianas de *A. brasilense* cepa FP2 utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™, Madison, WI, EUA) com modificações (FALEIRO et al., 2013). O DNA total de raízes de milho *in vitro* foi extraído utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) conforme descrito pelo fabricante com modificações (PEREIRA et al., 2014). Cada extrato correspondeu à um pool de raízes de quatro plantas (~ 100 mg de tecido). A concentração e a qualidade do DNA foram medidas em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop™ 2000 (Wilmington, DE, EUA), pela medida da absorbância da amostra em 260 e 280 nm.

4.7 PCR QUANTITATIVA (qPCR)

A quantificação do DNA de *A. brasilense* cepa FP2 em amostras de culturas submetidas ao tratamento térmico e raízes de milho crescidas *in vitro* foi realizada por qPCR em ABI PRISM 7500 Detection System e StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O par de iniciadores cepa-específico AzoR2.1 foi usado para amplificar uma região não codificadora (STETS et al., 2015) do DNA de *A. brasilense* cepa FP2. As reações de amplificação continham 12,5 µL de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 µM do par de iniciadores AzoR2.1 R / F, água ultrapura e 10 ng / µL de DNA num volume final de 25 µL. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata técnica sob as condições de ciclagem: 2 min a 50 °C , 10 min a 95 °C seguido por 40 ciclos de 15 s a 94 °C e 1 min a 60 °C. Uma curva de dissociação adicional com aumento linear de 60 a 95 °C foi realizada automaticamente após cada corrida. Todas as corridas de PCR quantitativa foram analisadas usando configurações automáticas do software.

4.8 CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO

4.8.1 Construção de curva padrão a partir da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2

As curvas padrão (Cq versus log n° de cópias de DNA e Cq versus log UFC) foram obtidas a partir de diluição (10x) seriada de DNA isolado de *A. brasilense* cepa FP2 em água ultra-pura. As quantidades de DNA nas soluções variaram de 8,26 ng a 8,26 fg, correspondendo ao número estimado de cópias de DNA de 10⁶ a 10⁰, calculadas com base no tamanho do genoma de *A. brasilense* cepa Sp24 (Genbank ASM23736V1) de 7,53 Mpb (WISNIEWSKI-DYÉ et al., 2011). Para esta estimativa, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$m = \frac{\text{Tamanho do genoma de } A. \text{ brasilense} \times 660}{6,023 \times 10^{23}}$$

onde 6.023 x 10²³ e 660 correspondem a constante de Avogadro e a massa molar média dos ácidos nucleicos (660 Da/bp), respectivamente. Os números de UFC correspondentes às concentrações de DNA foram determinados pela contagem de UFC em placa, a partir das mesmas alíquotas utilizadas no isolamento do DNA, como descrito anteriormente (ILHA et al., 2016) com modificações. As eficiências de amplificação foram determinadas conforme descrito anteriormente (FALEIRO et al., 2013), utilizando a seguinte fórmula:

$$E = \left[\left(10^{-\frac{1}{s}} \right) - 1 \right] \times 100$$

onde *E* é a porcentagem de eficiência obtida e *s* é o slope obtido a partir da curva de calibração. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados com base no *Guidelines for verification of Analytical Methods from European Network of GMO Laboratories* (HOUGS et al., 2017).

4.8.2 Construção da curva padrão a partir de misturas da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2 e raízes de milho

As curvas padrão também foram construídas utilizando DNA isolado de raízes de milho misturadas em diluições seriadas da cultura de *A. brasilense* cepa FP2, conforme descrito anteriormente (STETS et al.,

2015) com as seguintes modificações. A superfície das sementes de milho foi esterilizada e as plântulas foram cultivadas *in vitro* durante 7 dias. As raízes foram coletadas, lavadas em água destilada autoclavada e trituradas em nitrogênio líquido usando almofariz e pistilo. Adicionou-se 100 μ L das diluições da cultura da *A. brasilense* cepa FP2 (10^2 a 10^8 UFC) à 100 mg de raízes trituradas. As misturas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e o DNA foi isolado utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). As eficiências de amplificação foram calculadas plotando os valores Cq versus log UFC / g.

4.9 ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES

Para determinar a colonização bacteriana nas raízes, as plântulas cultivadas *in vitro* foram coletadas aleatoriamente 7 DAI. As raízes foram lavadas em água destilada autoclavada, e ~ 100 mg de raiz fresca foram esmagadas com uso de almofariz e pistilo em 1 mL de solução salina 0,9%. Os homogenatos foram diluídos em série e semeados em placas com meio seletivo de ágar para determinar UFC por grama de raiz fresca após 48 horas de incubação a 30 °C (BALSANELLI et al., 2010).

4.10 DETERMINAÇÃO DE UFC POR qPCR E CONTAGEM EM PLACA

A estimativa da contagem bacteriana em UFC / mL da cultura pura *A. brasilense* cepa FP2 e das raízes de milho crescidas *in vitro* por qPCR foram calculadas conforme descrito anteriormente (ILHA et al., 2016) com modificações (Apêndice 3). A contagem em placa da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2 e das raízes de milho foram determinadas pelo método de gotejamento (*drop plate*) em meio seletivo de ágar. Os dados foram expressos como número de UFC por mL (cultura) ou por grama (peso fresco) da raiz.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica (13.3, 2017, TIBCO Software Inc.). A análise de variância e o teste de Tukey foram utilizados para determinar as diferenças estatisticamente significativas na quantificação das amostras de culturas submetidas ao tratamento térmico durante diferentes períodos de tempo ($p < 0,05$). A análise de regressão foi utilizada para determinar as relações entre os resultados obtidos por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa

e análise de correlação para estimar o grau de relacionamento entre PMA-PCR e contagem em placa, para as amostras de cultura submetida à tratamento térmico. Os valores de inclinação e interceptos foram comparados em intervalos de confiança de 95%. A normalidade e homogeneidade dos dados do ensaio *in vitro* foram analisadas usando os testes de *Lilliefors* e *Bartlett*, respectivamente e a variação dos dados foi determinada utilizando os valores de quartis.

5. RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS DE REAÇÃO DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DE *A. brasilense* cepa FP2

Os parâmetros de reação de qPCR (eficiência, *slope* e coeficiente de correlação) usando AzoR2.1 foram determinados com base nas curvas padrão obtidas do DNA isolado da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2 ou das misturas de cultura pura e raízes de milho (Figura 6).

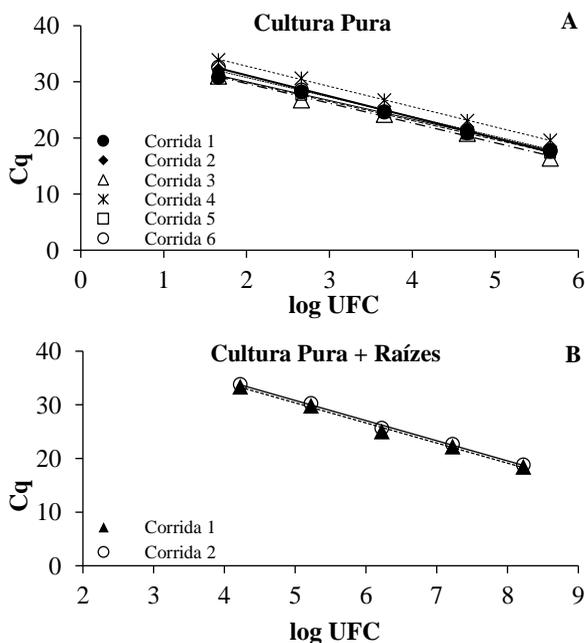


Figura 6 - Curvas padrão (Cq versus log UFC) da qPCR de *A. brasilense* FP2 utilizando iniciadores AzoR2.1. Quantificação realizada em duas e seis

corridas de qPCR em dias diferentes usando DNA extraído de (A) cultura pura de *A. brasilense* FP2 e (B) misturas de cultura pura e raízes de milho.

Seis curvas padrão independentes foram realizadas a partir da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2 e duas a partir de misturas de cultura pura e raízes de milho. A eficiência das curvas padrão obtidas a partir da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2 variaram de 85 a 99% e a partir de misturas atingiram 85% (Tabela 6). Todas as curvas padrão apresentaram coeficiente de correlação linear adequado ($R^2 > 0,99$).

Tabela 6 - Parâmetros de qPCR obtidos das curvas padrão para quantificação de *A. brasilense* FP2, utilizando iniciadores Azo R2.1. O DNA foi extraído da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2 e de misturas de cultura e raízes milho.

Corrida de qPCR	Cultura pura de <i>A. brasilense</i> FP2			Misturas de cultura e raízes de milho		
	Eficiência (%)	Slope	R ²	Eficiência (%)	Slope	R ²
1	99	-3,3432	0,9967	85	-3,7481	0,9951
2	93	-3,5048	0,9987	85	-3,7548	0,9967
3	92	-3,5194	0,9926			
4	89	-3,6185	0,9995			
5	97	-3,4021	0,9987			
6	85	-3,7367	0,9987			

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) da qPCR com as amostras de cultura pura foram ambos estabelecidos como 10^2 cópias do genoma (Cq médio= 31,94), correspondendo a 826 fg de DNA. O desvio padrão da repetibilidade (% RSDr) dos valores de Cq obtidos em dezoito reações de qPCR apresentou valores abaixo de 6,29 % (Tabela 7). Para a cultura pura e mistura de raízes de milho, o LOD foi de 10^4 UFC / g (Cq médio = 33,59), como observado anteriormente (Stets et al., 2015).

Tabela 7 - Repetibilidade do ensaio de qPCR AzoR2.1 usando quantidades de DNA isoladas de *A. brasilense* FP2. ^a Valores são a média \pm SD (n = 18) de triplicatas de qPCR em seis corridas independentes realizadas em diferentes dias. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão de Repetibilidade.

Nº de Cópias de DNA	Quantidade de DNA (ng)	Cq médio ^a	SD ^b	%RSDr ^c
10^6	8,26	17,59	1,10	6,29
10^5	0,826	21,27	1,04	4,88

10^4	0,0826	24,79	1,09	4,39
10^3	0,00826	28,26	1,35	4,77
10^2	0,000826	31,94	1,29	4,04

5.2 EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM PMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *A. brasilense* cepa FP2

Com o intuito de testar a capacidade do tratamento com PMA em suprimir a amplificação de DNA de células mortas, amostras contendo 10^8 UFC / mL de cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2, foram aquecidas a 50 °C, em diferentes períodos (zero até 240 min) para obtenção de diferentes proporções entre células viáveis e mortas por calor. Após a extração do DNA, as amostras foram quantificadas por qPCR com e sem tratamento prévio com PMA. As corridas de qPCR foram realizadas em dois dias diferentes. O número de cópias de DNA de *A. brasilense* foi estimado a partir dos valores de Cq (Apêndice 4) e das curvas padrão obtidas do DNA bacteriano isolado de cultura pura (Apêndice 5) e comparado entre as corridas de qPCR (Figura 7).

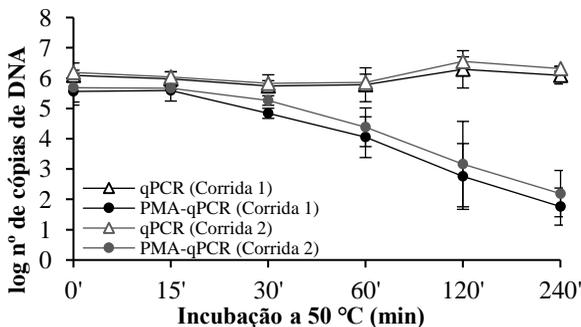


Figura 7 - Log n° de cópias de DNA de *A. brasilense* FP2 estimado por qPCR (Δ) e PMA-qPCR (●) em duas corridas de qPCR. Culturas puras bacterianas foram submetidas à tratamento térmico a 50 °C por diferentes períodos de tempo. Valores correspondem à média ± SD de quatro extratos de DNA (n = 4).

Em ambos os ensaios, o número de cópias de DNA permaneceu constante para as amostras não tratadas com PMA (qPCR), enquanto amostras tratadas com PMA (PMA-qPCR) mostraram um número decrescente de cópias de DNA durante o aumento do tempo de

aquecimento. Amostras submetidas a zero e 15 min de aquecimento não mostraram diferenças na comparação do número de cópias de DNA entre as amostras tratadas e não tratadas com PMA. No entanto, de 30 até 240 min de aquecimento, as amostras tratadas com PMA (PMA-qPCR) apresentaram valores decrescentes do número de cópias do DNA de *A. brasilense* cepa FP2, em comparação com as amostras não tratadas com PMA (qPCR). Não foram observadas ampliações para as amostras de controle negativo.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *A. brasilense* cepa FP2 EM CULTURA SUBMETIDA À TRATAMENTO TÉRMICO E RAÍZES DE MILHO CRESCIDAS *in vitro*

A. brasilense cepa FP2 foi quantificada em amostras de culturas submetidas a tratamento térmico e em raízes de milho (controle e inoculadas) cultivadas *in vitro*, por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa. O DNA total extraído de ambos os ensaios foi utilizado como modelo para qPCR, a fim de quantificar o DNA de *A. brasilense* FP2. A enumeração foi realizada utilizando curvas padrão Cq versus log UFC plotadas com base na média de UFC obtida da cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2. Na quantificação de amostras de raízes de milho, a enumeração também foi obtida a partir de curvas padrão de raízes de milho misturadas com cultura pura diluída em série (Figura 7).

Para ambos os ensaios, os valores de Cq observados para amostras tratadas com PMA (PMA-qPCR) foram maiores do que para as amostras não tratadas com PMA (qPCR). As principais diferenças foram observadas a partir dos 60 min de tratamento térmico (Apêndice 4). O DNA isolado das raízes do milho controle apresentou valores tardios de Cq ($> 31,94$, abaixo do LOD de 10^2) correspondentes a ampliações inespecíficas (Apêndice 6).

As contagens bacterianas em log UFC / mL foram obtidas por qPCR e PMA-qPCR (dos valores Cq determinados e curvas padrão construídas) e por contagem em placa. A enumeração obtida por qPCR para *A. brasilense* cepa FP2 em amostras submetidas ao tratamento térmico e raízes de milho crescidas *in vitro* foi superior a enumeração obtida por PMA-qPCR e a contagem em placa. Resultados semelhantes foram obtidos por PMA-qPCR e contagem em placa para a maioria das amostras (Figura 8 e 9).

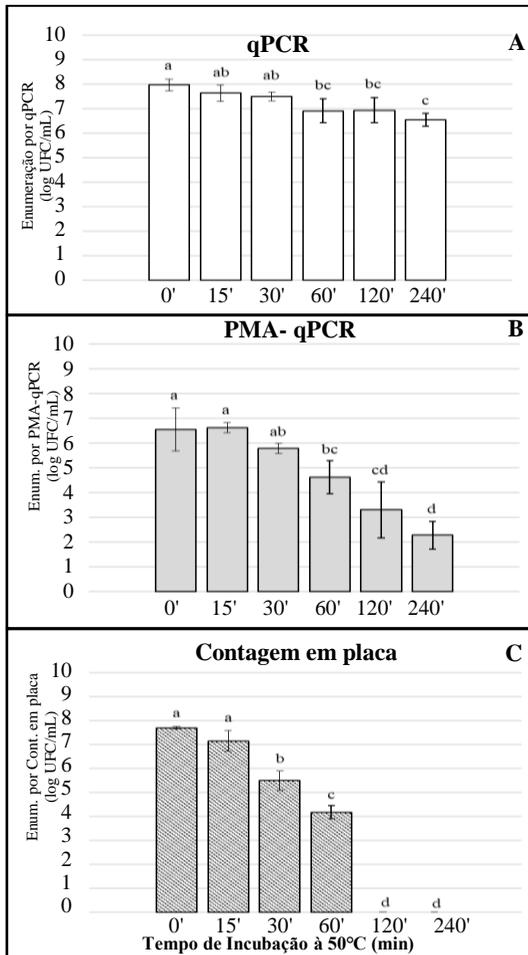


Figura 8 - Contagem de *A. brasiliense* FP2 (log UFC / mL) obtido por meio de qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa de amostras submetidas a tratamento térmico a 50 °C por diferentes períodos de tempo. A) enumeração por qPCR; B) enumeração por PMA-qPCR; C) enumeração por contagem em

placa. Barras representam a média \pm SD de quatro repetições biológicas (n = 4) e letras diferentes indicam diferença significativa (P <0,05).

As amostras submetidas ao tratamento térmico apresentaram valores de enumeração por qPCR mais uniformes, variando de 10^8 a 10^6 UFC / mL (Figura 8A). Os valores obtidos por contagem em placa e PMA-qPCR não foram uniformes, diminuindo a medida que o tempo de tratamento térmico aumentou, variando de 10^7 a 10^2 (Figura 8B) e 10^7 a 10^0 (Figura 8C), respectivamente. Nenhuma contagem bacteriana foi observada aos 120 e 240 min de tratamento térmico na contagem em placa, enquanto que usando PMA-qPCR foi detectada 10^3 e 10^2 UFC / mL de *A. brasilense* cepa FP2, respectivamente.

Análises de regressão foram realizadas para estabelecer semelhanças e diferenças entre os métodos de quantificação bacteriana no ensaio de tratamento térmico (Apêndice 7). Os valores de inclinação e interceptação foram obtidos dentro do intervalo de confiança (IC) de 95% para cada método (Tabela 8) e comparados entre si. As equações obtidas para PMA-qPCR e contagem em placa mostraram valores semelhantes de interceptação, sobrepondo-se ao IC de 95%. Diferente dos outros dois métodos, a equação obtida por qPCR apresentou valores com pouca ou nenhuma sobreposição. Os valores de R^2 também foram semelhantes para PMA-qPCR e contagem em placa.

Tabela 8 – Resultados das análises de regressão dos dados obtidos por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa ($y = \text{interceptação} + \text{slope} \cdot x$) para ensaio de tratamento térmico.

	slope (IC 95%)	Interceptação (IC 95%)	R ²
qPCR	0,005125 (0,0031 – 0,0070)	7,6525 (7,4317 – 7,8731)	0,5741
PMA-qPCR	0,01885 (0,0145 – 0,0231)	6,3257 (5,8433 – 6,8081)	0,7924
Cont. em placa	0,03388 (0,0264 – 0,0413)	6,7153 (5,8746 – 7,5560)	0,8024

Análises de correlação foram realizadas para estabelecer o relacionamento entre os resultados de enumeração obtidos por PMA-qPCR e contagem em placa para o ensaio de tratamento térmico. Os

valores de inclinação e interceptação, assim como o coeficiente de correlação de Pearson foram obtidos dentro do IC de 95% (Figura 9). O gráfico de dispersão e coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,8047$) obtido mostrou que existe uma relação linear positiva moderada entre as duas metodologias utilizadas para quantificação, indicando que existe uma correlação estatisticamente significativa entre elas.

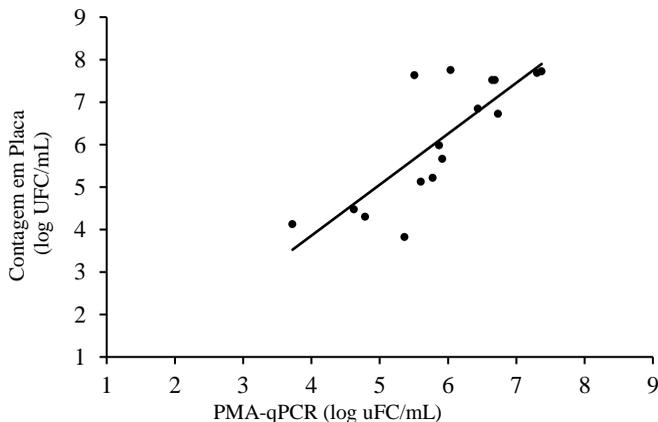


Figura 9 - Gráfico de dispersão e regressão linear dos valores de log UFC/mL obtidos por contagem em placa e PMA-qPCR para quantificação de *A. brasilense* FP2 em amostras de cultura submetidas à tratamento térmico a 50 °C durante diferentes períodos de tempo.

Para raízes de milho *in vitro* colhidas 7 DAI, a enumeração por qPCR (Figura 6B) apresentou valores médios de $7,83 \pm 0,40$ log UFC / g e por PMA-qPCR apresentou valores médios de $5,16 \pm 0,52$ log UFC / g usando curvas padrão obtidas a partir de cultura bacteriana pura (Figura 10A). A enumeração utilizando curvas padrão de misturas de cultura e raízes de milho revelou valores médios de $7,28 \pm 0,39$ log CFU / g por qPCR e $5,51 \pm 0,52$ log CFU / g por PMA-qPCR (Figura 10B). A contagem em placa de *A. brasilense* cepa FP2 em raízes de milho cultivadas *in vitro* foi maior ($5,56 \pm 0,60$ log UFC / g) do que a enumeração estimada por PMA-qPCR usando as curvas padrão obtidas a partir de cultura bacteriana pura. A enumeração de PMA-qPCR usando as curvas padrão de misturas de cultura de *A. brasilense* e raízes de milho foi similar à obtida pela contagem de placas (Figura 10).

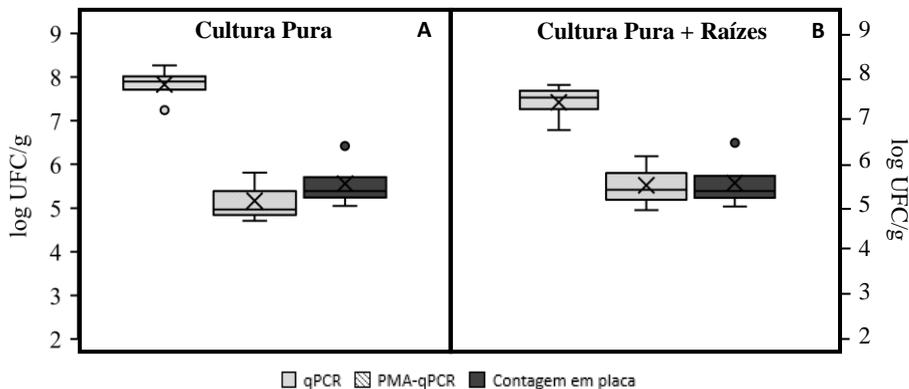


Figura 10 - Contagem de *A. brasilense* FP2 (log UFC/g) em raízes de milho crescidas *in vitro* obtida com ensaios de qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa. (A) quantificação obtida usando curva padrão a partir de cultura bacteriana pura; (B) quantificação obtida usando curva padrão obtida a partir de misturas de cultura e raízes de milho. Box plot representa a média \pm SD de quatro (qPCR) e três (PMA-qPCR) replicatas biológicas (n=4 e n=3). As extremidades do boxplot representam os quartis, e a linha de dentro representa a mediana. As barras mostram os maiores valores excluindo os outliers e os pontos representam outliers.

6. DISCUSSÃO

A concentração de células viáveis nas formulações de biofertilizantes representa um fator chave para que ocorra um estímulo efetivo no crescimento da planta, uma vez que garantir este fator é fundamental para uma colonização satisfatória das mesmas (BERNINGER et al., 2017). Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para detectar e monitorar a sobrevivência de inoculantes devido a sua alta sensibilidade e especificidade. O uso de PMA associado a qPCR é uma abordagem eficiente que tem sido utilizada para diferenciar células viáveis de não viáveis em amostras de plantas. Esta abordagem tem sido extensivamente empregada para quantificação de patógenos viáveis de alimentos em hortaliças frescas (ELIZAQUÍVEL et al., 2012; CRESPOSEMPERE et al., 2013; YANG et al., 2013), de fitopatógenos em plantas (TEMPLE et al., 2013; AL-DAOUD et al., 2017), para avaliar a atividade microbiana em amostras de água ambiental (GENSBERGER et al., 2014; TRUCHADO et al., 2016) e em solo (WAGNER et al., 2015), bem como para detectar agentes de controle biológico em superfícies de plantas (SOTO-MUÑOZ et al., 2015). Neste estudo, avaliamos a aplicabilidade

do método PMA-qPCR no monitoramento de células viáveis de *A. brasilense* cepa FP2 em amostras de cultura pura submetidas a tratamento térmico e em raízes de milho crescidas *in vitro* e comparamos aos resultados obtidos utilizando qPCR e contagem em placa.

A fim de estabelecer um ensaio confiável de qPCR para a quantificação do DNA de *A. brasilense* cepa FP2, os parâmetros de reação para o ensaio de qPCR usando corante intercalante SYBR Green foram definidos usando curvas-padrão obtidas a partir de cultura pura e de misturas de raízes de milho e cultura bacteriana. Estudos anteriores demonstraram que a presença de tecido vegetal na reação interfere na curva padrão, diminuindo o limite de detecção da quantificação para *Azospirillum* spp. em diferentes matrizes de plantas. Isso é explicado pela inclusão de fatores que influenciam a sensibilidade do ensaio, como a presença de DNA de origem vegetal, permitindo que a quantificação fique mais próxima da realidade (COUILLEROT et al., 2010; STETS et al., 2015).

A ENGL (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>) determina os requisitos de métodos de PCR em tempo real para a quantificação de OGM. A mesma estabeleceu que uma curva padrão confiável deve apresentar valores de R^2 superiores à 0,95 e valores de inclinação (*slope*) entre - 3,6 e - 3,1, correspondendo à eficiência de qPCR entre 90 e 110% (ENGL, 2017). Outros autores consideram aceitáveis valores de R^2 superiores à 0,95 e valores de inclinação entre - 3,9 e - 3,0, correspondendo à eficiência de qPCR entre 80 e 115% (ZHANG & FANG, 2006). Neste trabalho, foram realizadas curvas padrão utilizando o DNA de *A. brasilense* cepa FP2 isolado de cultura pura e de misturas de raízes de milho e amostras de cultura bacteriana. As curvas padrão apresentaram parâmetros de reação adequados (Figura 7A). As eficiências variaram de 85% a 99%, as inclinações variaram de - 3,33 a - 3,75 e os valores de R^2 foram superiores a 0,99, tanto para as curvas obtidas a partir de cultura pura quanto das misturas (Tabela 6). Resultados semelhantes já foram observados em ensaios de qPCR usando AzoR2.1 para quantificação de *A. brasilense* cepa FP2: 101,3% de eficiência e $R^2 = 0,9980$ (STETS et al., 2015).

De acordo com a ENGL a sensibilidade do ensaio de qPCR é determinada por meio do limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ). LOD é definido como a menor quantidade de um analito da amostra, que pode ser detectada de forma confiável, mas não necessariamente quantificada. Por sua vez, LOQ é definido como a quantidade mínima de um analito que pode ser quantificada de forma

confiável com níveis aceitáveis de precisão e exatidão (ENGL, 2017). Os ensaios de qPCR desenvolvidos neste trabalho apresentaram valores de detecção de *A. brasilense* cepa FP2 variando de 10^6 à 10^2 cópias do genoma usando curvas padrão obtidas a partir de cultura pura (Tabela 7) e 10^8 a 10^4 UFC / g de raiz de milho usando curvas padrão obtidas a partir das misturas de raízes de milho e cultura bacteriana (Figura 7B), mostrando a alta sensibilidade deste método. A ENGL também estabelece a repetibilidade dos ensaios de qPCR com base no Desvio Padrão da Repetibilidade Relativa (RSDr), que deve ser inferior a 25% em relação ao intervalo dinâmico do método. Neste estudo, os valores de RSDr obtidos para qPCR foram inferiores a 7,72% (Tabela 7), indicando baixa variação do ensaio e grau de precisão apropriado.

Foi relatado anteriormente que a sensibilidade da técnica de PMA-qPCR varia dependendo da espécie bacteriana e da matriz de suspensão de células (NKUIPOU-KENFACK et al., 2013; LI et al., 2016). No caso de tecidos vegetais, a turbidez dos tecidos parece afetar a transmissão de luz durante a fotólise, por isso as amostras devem ser diluídas antes da exposição à fonte de luz halógena (HAN et al., 2018). Para avaliar a eficácia do PMA na quantificação de células viáveis de *A. brasilense* cepa FP2, foram obtidas diferentes proporções de células mortas aquecendo a cultura bacteriana à 50 °C de 0 até 240 min e tratando amostras com PMA antes da qPCR, outros ensaios de tratamento térmico para obtenção de células mortas de espécies bacterianas já foram reportados para esta mesma finalidade (YANG et al., 2011; TEMPLE et al., 2013; VONDRAKOVA et al., 2018). Uma abordagem semelhante foi empregada para quantificar células viáveis de *Pantoea agglomerans* CPA-2 e determinar o número de células mortas obtidas por tratamento térmico (SOTO-MUÑOZ et al., 2015). Nesse estudo, a PMA-qPCR foi capaz de quantificar células exclusivamente viáveis em matrizes de laranja. No presente estudo, a enumeração de *A. brasilense* cepa FP2 por qPCR permaneceu entre ~ 8 e 6 log UFC / mL (Figura 9A). O decréscimo do número de células observado com o decorrer do tempo pode ser explicado pela etapa anterior ao processo de extração de DNA, durante a lavagem dos precipitados bacterianos. Com o aumento do tempo de aquecimento, também aumentou o número de células não viáveis nas amostras, e a presença destas pode ter afetado o processo de lavagem. Por outro lado, a enumeração obtida por PMA-qPCR e pela contagem em placa diminuiu devido ao tratamento térmico, variando de aproximadamente 7 a 2 log UFC / mL e de 7 a 0 log UFC / mL, respectivamente (Figs 9B e 9C).

As análises de regressão realizadas para estabelecer a relação entre os métodos de quantificação confirmaram as semelhanças entre a enumeração obtida por PMA-qPCR e a contagem em placa, além do distanciamento destas da enumeração obtida por qPCR (Tabela 8). As análises de correlação confirmaram o relacionamento existente entre as metodologias utilizadas para a enumeração das amostras submetidas a tratamento térmico, obtida por PMA-qPCR e contagem em placa. Estudos demonstraram que as diferenças observadas entre os métodos se devem à presença de células viáveis e mortas ou não cultivadas nas amostras. A qPCR parece quantificar o DNA total, incluindo as células mortas, enquanto a contagem em placa e PMA-qPCR quantifica apenas o DNA das células viáveis (TRUCHADO et al., 2016; AL-DAOUD et al., 2017; SCARIOT et al., 2018). De 60 à 240 min de tempo de aquecimento, foram observadas as maiores diferenças entre os resultados de PMA-qPCR e enumerações de contagem em placa. Isso pode ser explicado devido à indução do estado viável mas não cultivável (VMNC), uma resposta adaptativa das células ao estresse, contra condições ambientais sub-ótimas, já anteriormente observada (DINU & BACH, 2013; DARANAS et al., 2018). Nossos resultados mostram que a concentração de 50 μ M do PMA e 15 min de exposição ao tratamento com luz halógena foram efetivos para a enumeração de células viáveis de *A. brasilense* cepa FP2 por PMA-qPCR.

Para avaliar a eficiência do tratamento com PMA na presença da matriz vegetal, raízes de milho foram cultivadas *in vitro*, colhidas 7 DAI com *A. brasilense* cepa FP2 e foram quantificadas por qPCR após o tratamento com PMA. Os precipitados das raízes crescidas *in vitro* foram ressuspendidas em volume maior de água ultrapura (item 2.5), a fim de evitar que a turbidez das amostras interferisse na fotólise do PMA. A enumeração obtida por qPCR resultou em aproximadamente 8 log CFU / g enquanto que a enumeração obtida por PMA-qPCR e pela contagem em placa mostraram resultados entre 5 e 6 log CFU / g. Em geral, comparando a enumeração bacteriana de células viáveis por PMA-qPCR e contagem em placa, não foram observadas diferenças significativas, especialmente considerando o efeito da matriz na construção da curva padrão (Figura 10B). Raízes de milho não inoculadas (amostras de controle) não foram quantificadas uma vez que as amplificações obtidas foram inespecíficas, abaixo do LOD de 10^4 UFC / g de raiz fresca. Não houve crescimento de bactérias em meio de cultura seletivo. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que as células viáveis de *A. brasilense* cepa

FP2 foram quantificadas em amostras de cultura pura e em raízes de milho utilizando o método da PMA-qPCR.

Em conclusão, o ensaio PMA-qPCR representa um método adequado para a quantificação de células viáveis de *A. brasilense* cepa FP2 em cultura pura e em amostras de raízes de milho. Espera-se que este método seja confiável para realizar o monitoramento da viabilidade de bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de milho inoculadas. Como consequência, futuros estudos sobre o processo de colonização e sobrevivência de inoculantes em condições de campo seriam permitidos, de alguma forma contribuindo para formulações de biofertilizantes que prezem pela efetividade dos resultados da interação. Espera-se também a adequação da metodologia de PMA-qPCR para a quantificação de células viáveis de outras espécies de bactérias associativas benéficas em plantas inoculadas.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil. Elisandra T. Cunha e Franciele Paludo são bolsistas de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Educação, Brasil. Ana M. Pedrolo e Mirella C. Scariot são bolsistas de Doutorado da CAPES e Ana Carolina M. Arisi é bolsista de produtividade em pesquisa (PQ2) do CNPq. Gostaríamos de expressar nossa gratidão à Emanuel Maltempi de Souza e Roseli Prado, Universidade Federal do Paraná (UFPR) pelo fornecimento de *A. brasilense* cepa FP2 e *H. seropedicae* cepa SmR1.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As BPCV oferecem uma alternativa eficaz ao uso de fertilizantes químicos, contribuindo para o aumento da produção agrícola de forma sustentável, sem prejudicar o meio ambiente. Entre estas bactérias, destaca-se o gênero *Azospirillum*, que engloba espécies amplamente utilizadas em inoculantes para gramíneas no mundo inteiro. No entanto, sabe-se que apesar da comprovada vantagem da utilização destes inoculantes, existe uma grande dificuldade na sua fabricação, para que mantenham sua viabilidade após aplicação no campo. A viabilidade de inoculantes pode ser afetada em diferentes estágios, durante a sua fabricação, transporte, armazenamento e após aplicação ao ser exposto a condições ambientais adversas. Desta forma, se fazem necessários estudos que visem o monitoramento da viabilidade destes inoculantes, de forma a contribuir para a formulação de produtos mais eficientes. Para isso, é importante o desenvolvimento de técnicas e metodologias capazes de mensurar e enumerar de forma precisa e rápida, o número de células viáveis em inoculantes e em plantas colonizadas. Com base nestas informações, a realização deste estudo propôs o desenvolvimento da metodologia já amplamente utilizada para monitoramento de viabilidade celular de diversas espécies de microrganismos, através do uso do corante de viabilidade monoazida de propídeo (PMA) aliado à qPCR. Foram realizados ensaios de PMA-qPCR para monitoramento de *Azospirillum brasilense* cepa FP2 em culturas puras submetidas à tratamento térmico e em raízes de milho crescidas *in vitro*. O presente estudo serve como base para realização de trabalhos futuros com outras cepas/espécies de BPCV entre outros inoculantes, e com outras culturas de plantas com as quais estas bactérias fazem associação.

REFERÊNCIAS

- AL-AWADHI, H. et al. Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 369, 2013.
- AL-DAOUD, F. et al. Propidium Monoazide Improves Quantification of Resting Spores of *Plasmodiophora brassicae* with qPCR. **Plant disease**, v. 101, n. 3, p. 442-447, 2017.
- ALBAREDA, M. et al. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2771-2779, 2008.
- ALEXANDRE, G. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2283-2293, 2010.
- ANDERSEN, C. B. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.
- ANDREWS, M. et al. Positive plant microbial interactions in perennial ryegrass dairy pasture systems. **Annals of Applied Biology**, v. 159, n. 1, p. 79-92, 2011.
- ARKHIPOVA, T. N. et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant and Soil**, v. 292, n. 1-2, p. 305-315, 2007.
- ARORA, N. K.; KHARE, E.; MAHESHWARI, D. K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies. In: (Ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, p.97-116, 2010.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES (ANPII). **Estatística do número de doses vendidas de inoculantes no país**. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/estatisticas/>>. Acessado em: 20/02/2019.

BALDANI, J. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V. L. D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, n. 1-3, p. 35-46, 1986.

BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233-2244, 2010.

BARDI, L.; MALUSÀ, E. Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms. **Abiotic stress: new research**, 1-57 p. 2012.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. A cultura do milho. 2014.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Plant growth-promoting. **Encyclopedia of soils in the environment**, v. 1, p. 103-115, 2005.

_____. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in agronomy**: Elsevier, v.108, p.77-136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

pçpç

BASTIAN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum*

seropedicae in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7-11, 1998.

BELYAKOV, A. Y. et al. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Carbohydrate research**, v. 361, p. 127-132, 2012.

BERNINGER, T. et al. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 277-301, 2017.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. In: (Ed.). **Nitrogen Economy in Tropical Soils**: Springer, p.241-250, 1995.

BOGINO, P. C. et al. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838-15859, 2013.

BONETTA, S. et al. Effectiveness of a neutral electrolysed oxidising water (NEOW) device in reducing *Legionella pneumophila* in a water distribution system: A comparison between culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods. **Chemosphere**, v. 210, p. 550-556, 2018.

BOONEN, M. et al. Quantitative PCR assays to enumerate *Rhizobium leguminosarum* strains in soil also target non viable cells and overestimate those detected by the plant infection method. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2342-2344, 2010.

BRASIL, S.-M. Normative Ruling no. 13 of 2011 March 24. **Federal Official Gazette**, Section 1: National Press, Brasília Google Scholar, 2011.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 113-125, 2012.

CANGELOSI, G. A.; MESCHKE, J. S. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 19, p. 5884-5891, 2014.

CARON, G. N. V. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 6, p. 988-998, 1998.

CARREÑO-LÓPEZ, R. et al. Characterization of chsA, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Archives of microbiology**, v. 191, n. 6, p. 501-507, 2009.

CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. Handbook for *Azospirillum*. **Springer**, Switzerland., v. 10, p. 978-3, 2015.

CHAMAM, A. et al. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum*–*Oryza sativa* association. **Phytochemistry**, v. 87, p. 65-77, 2013.

CHIEN, S. H. et al. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, n. 2, p. 229-255, 2011.

CHIU, S.-W.; CHEN, S.-Y.; WONG, H.-C. Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7016-7022, 2008.

CHUBATSU, L. S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1, p. 197-207, 2012.

CIBICHAKRAVARTHY, B. et al. Diazotrophic diversity in the rhizosphere of two exotic weed plants, *Prosopis juliflora* and *Parthenium hysterophorus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 605-613, 2012.

COCOLIN, L. et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29-43, 2013.

CODONY, F.; AGUSTÍ, G.; ALLUÉ-GUARDIA, A. Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 29, n. 3, p. 190-192, 2015.

COHEN, A. C. et al. Azospirillum brasilense ameliorates the response of Arabidopsis thaliana to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 1, p. 79-90, 2015.

_____. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, v. 87, n. 5, p. 455-462, 2009.

CORDEIRO, F. A. et al. Proteomic analysis of Herbaspirillum seropedicae cultivated in the presence of sugar cane extract. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 3, p. 1142-1150, 2013.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain Azospirillum lipoferum CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010/12/01/ 2010. ISSN 0038-0717.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable Alternaria spp. contamination in tomato products. **International journal of food microbiology**, v. 165, n. 3, p. 214-220, 2013.

CRUZ, J. C. C. et al. **Cultivo do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2010.

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3376-3380, 2000.

DARANAS, N. et al. Monitoring viable cells of the biological control agent Lactobacillus plantarum PM411 in aerial plant surfaces by means of a strain-specific viability quantitative PCR. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00107-18, 2018.

DEAKER, R. et al. **Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers**. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2011.

DEL MAR LLEÒ, M. et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4564-4567, 2000.

DE-BASHAN, L. E.; ANTOUN, H.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. In promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 44, n. 4, p. 938-947, 2008.

DI SALVO, L. P. et al. Physiological and biochemical characterization of *Azospirillum brasilense* strains commonly used as plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1310-1321, 2014.

DIAPER, J. P.; EDWARDS, C. Survival of *Staphylococcus aureus* in lakewater monitored by flow cytometry. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 35-42, 1994.

DINU, L.-D.; BACH, S. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 268-273, 2013.

DOBBELAERE, S. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech Publishers, 1987. ISBN 0910239118.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014..

- DUNGAIT, J. A. J. et al. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. **Science of The Total Environment**, v. 434, p. 39-50, 2012.
- DUTTA, S.; PODILE, A. R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 3, p. 232-244, 2010.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. **Azospirillum VI and related microorganisms**: Springer, 1995.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. **Washington State University Press Pullman**, 1976. p.518-538.
- EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic Expression of nif Genes of Azoarcus sp. Strain BH72 in Rice Roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 813-819, 1999.
- ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1-13, 2014.
- ELIZAQUÍVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne E. coli O157: H7, Listeria monocytogenes and Salmonella in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 704-708, 2012.
- ERKUS, O. et al. Use of propidium monoazide for selective profiling of viable microbial cells during Gouda cheese ripening. **International journal of food microbiology**, v. 228, p. 1-9, 2016.
- FALEIRO, A. C. et al. Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria Azospirillum brasilense strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125-133, 2013.
- FANCELLI, A. L. **Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute Brazil, p. 1-16, 2010.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99-108, 2012.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 2, p. 276-289, 2012.

FLEKNA, G. et al. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 5, p. 405-412, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). World fertilizer trends and outlook to 2020. **Summary report**, 2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i6895e.pdf>>. Acessado em: 25/02/2019.

GALISA, P. S. et al. Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. **Journal of microbiological methods**, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2012.

GARCIA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6-7, p. 405-409, 2009.

GARCÍA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A.; GONZÁLEZ, R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 6, p. 425-436, 2004.

GENSBERGER, E. T. et al. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. **Water research**, v. 67, p. 367-376, 2014.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International journal of food microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 19-34, 2001.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.

GOMEZ-ALVAREZ, V. et al. Resilience of microbial communities in a simulated drinking water distribution system subjected to disturbances: role of conditionally rare taxa and potential implications for antibiotic-resistant bacteria. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 2, n. 4, p. 645-657, 2016.

GRANT, C. A. et al. Crop yield and nitrogen concentration with controlled release urea and split applications of nitrogen as compared to non-coated urea applied at seeding. **Field Crops Research**, v. 127, p. 170-180, 2012.

GUPTA, G. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, p. 096-102, 2015.

GURSKA, J.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Gene expression of *Secale cereale* (Fall Rye) grown in petroleum hydrocarbon (PHC) impacted soil with and without plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), *Pseudomonas putida*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 9, p. 308, 2015.

GUT, M. et al. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. **Journal of virological methods**, v. 77, n. 1, p. 37-46, 1999.

HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 2, p. 433, 1984.

HAN, S. et al. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, 2018.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HEISE, J. et al. Propidium monoazide treatment to distinguish between live and dead methanogens in pure cultures and environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 121, p. 11-23, 2016.

HIERRO, N. et al. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7148-7155, 2006.

HOUGS, L. et al. **Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods**. EUR 29015 EN, Publication Office of the European Union. 2017.

HU, H.; DAVIS, M. J.; BRLANSKY, R. H. Quantification of Live 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' Populations Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide. **Plant Disease**, v. 97, n. 9, p. 1158-1167, 2013.

HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **Cassán FD, García salomone. Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p. 17-35, 2008.

HUNGRIA, M. **Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo.** Embrapa Soja Londrina, 2011.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597-606, 2016.

ILYAS, N.; BANO, A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 4, p. 393-406, 2010.

INTERNATIONAL FERTILIZER ASSOCIATION (IFA). Fertilizer Outlook 2018-2022. **Production & International Trade and Agriculture Services**, 2018. Disponível em: <<https://api.ifastat.org/reports/download/12250>>. Acessado em: 25/02/2019.

JOSEPHSON, K. L.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 10, p. 3513-3515, 1993.

KANG, M. J. et al. Quantitative in planta PCR assay for specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* using putative membrane protein based primer set. **Crop protection**, v. 40, p. 22-27, 2012.

KEER, J. T.; BIRCH, L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 2, p. 175-183, 2003.

KHARE, E.; ARORA, N. K. Physiologically stressed cells of fluorescent *Pseudomonas* EKi as better option for bioformulation development for management of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in field conditions. **Current microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1789, 2011.

LANA, M. D. C. et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.

LI, F. et al. Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control. **LWT-Food Science and Technology**, v. 74, p. 176-182, 2016.

LIN, Y.-W. et al. Bacterial regrowth in water reclamation and distribution systems revealed by viable bacterial detection assays. **Chemosphere**, v. 144, p. 2165-2174, 2016.

LIU, F. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4617-4625, 2013.

MACHADO, H. B. et al. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37 (7), p. 549-553, 1991.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MAHANTY, T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3315-3335, 2017.

MAHDI, S. S. et al. Bio-fertilizers in organic agriculture. **Journal of Phytology**, 2010.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European journal of soil biology**, v. 45, n. 1, p. 73-80, 2009.

MALUSÁ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6599-6607, 2014.

MARKOULATOS, P. et al. Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. **Food reviews international**, v. 20, n. 3, p. 275-296, 2004.

MARKS, B. B. et al. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 21, 2013.

MARTINI, M. et al. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of fluorescent pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 277-285, 2015.

MASTERS, C. I.; SHALLCROSS, J. A.; MACKEY, B. M. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 1, p. 73-79, 1994.

MATSUOKA, Y. et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, 2002.

MEHNAZ, S. Azospirillum: a biofertilizer for every crop. In: (Ed.). **Plant microbes symbiosis: Applied facets**: Springer, p.297-314, 2015.

MENG, X. et al. Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 296-306, 2016.

MIRANSARI, M. Soil microbes and plant fertilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 875-885, 2011.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

MONTEIRO, R. A. et al. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **FEMS microbiology ecology**, v. 80, n. 2, p. 441-451, 2012.

MORA, P. et al. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium. **Archives of microbiology**, v. 189, n. 5, p. 519-524, 2008.

MOREIRA, F. M. D. S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ufla, 2006.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.155, p.335-350, 1987.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Taxonomy database**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>>. Acessado em: 25/02/2019.

NEBE-VON-CARON, G. et al. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, n. 1, p. 97-114, 2000.

NKUIPOU-KENFACK, E. et al. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 1, p. 20-24, 2013.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1997, 2006.

_____. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **FEMS Microbiology Letters**, v. 291, n. 2, p. 137-142, 2009.

NOGVA, H. K. et al. Ethidium Monoazide for DNA-Based Differentiation of Viable and Dead Bacteria by 5'-Nuclease PCR. **BioTechniques**, v. 34, n. 4, p. 804-813, 2003.

OKON, Y. et al. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: a note. **Microbial ecology**, v. 6, n. 3, p. 277-280, 1980.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.

O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5729-5746, 2016.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 734-742, 1978.

PECHANOVA, O. et al. Maize proteomics: an insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 637-662, 2013.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95-101, 1984.

PEREIRA, T. P. et al. Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 7, p. 660-670, 2014.

PINTO, D.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 1, p. 61-76, 2015.

PORCELLATO, D.; MAGRI, M.; NARVHUS, J. Viable cells differentiation improves microbial dynamics study of fermented milks. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 136-142, 2015.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 4, p. 755-805, 1994.

PRIBYLOVA, R. et al. Effect of short-and long-term antibiotic exposure on the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as measured by propidium monoazide F57 real time quantitative PCR and culture. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 3, p. 354-360, 2012.

PRIMAVESI, A. C. et al. Efeito de doses e de fontes de nitrogênio na composição mineral de capim-marandu. **Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado técnico**, 2005.

RANDAZZO, W. et al. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 229, p. 1-6, 2016.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

RODRIGUES, A. C. et al. ***Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture**. Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. Sustainable Development and Biodiversity: © Springer International Publishing, 2015.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; DARDANELLI, M. S.; RUÍZ-SAÍNZ, J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. **FEMS microbiology letters**, v. 272, n. 2, p. 127-136, 2007.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2006.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SANTOS, K. et al. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and

superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1-2, p. 245-255, 2017.

SCARIOT, M. C. et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International journal of food microbiology**, v. 264, p. 1-7, 2018.

SHERIDAN, G. E. C. et al. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1313-1318, 1998.

SHIME-HATTORI, A. et al. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 4, p. 915-924, 2011.

SIGNORETTO, C.; DEL MAR LLEO, M.; CANEPARI, P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. **Current microbiology**, v. 44, n. 2, p. 125-131, 2002.

SOTO-MUÑOZ, L. et al. DNA-based methodologies for the quantification of live and dead cells in formulated biocontrol products based on *Pantoea agglomerans* CPA-2. **International journal of food microbiology**, v. 210, p. 79-83, 2015.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STETS, M. I. et al. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, 2015.

SØRENSEN, J. et al. Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1, p. 483-512, 2009.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian journal of microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TEMPLE, T. N. et al. Quantitative molecular detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment. **Plant disease**, v. 97, n. 12, p. 1585-1592, 2013.

THULSIRAJ, V.; ZIMMER-FAUST, A. G.; JAY, J. A. Use of Viability-Based Methods for Improved Detection of Recent Fecal Contamination in a Microbial Source Tracking Study Near Tijuana, Mexico. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 2, p. 63, 2017.

TRUCHADO, P. et al. Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production. **Food Control**, v. 62, p. 150-156, 2016.

TURAN, M. et al. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 175, n. 6, p. 818-826, 2012.

TYAGI, S.; SINGH, D.K. *Azospirillum himalayense* sp. nov., a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India. **Annals of microbiology**, v. 64, n. 1, p. 259-266, 2014.

VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 356, 2013.

VAN FRANKENHUYZEN, J. K. et al. Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 3, p. 263-272, 2011.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243-254, 2007.

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 496-506, 2008.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VONDRAKOVA, L. et al. Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy. **Food Control**, v. 85, p. 23-28, 2018.

WAGNER, A. O. et al. Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. **Applied Soil Ecology**, v. 93, p. 56-64, 2015.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, v. 189, n. 2, p. 494-506, 2011.

WEIGHARDT, F. Quantitative PCR for the detection of GMOs. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms: **Joint Research Centre**, 2006.

WENDE, A. et al. Genetic interrelationships among medium to late maturing tropical maize inbred lines using selected SSR markers. **Euphytica**, v. 191, n. 2, p. 269-277, 2013.

WINIK, B. C.; GUERRERO MOLINA, M. F.; PEDRAZA, R. O. Colonization of strawberry (*Fragaria ananassa*) plant tissues by *Azospirillum brasilense*. **Acta Microsc**, v. 18, p. 675-676, 2009.

WISNIEWSKI-DYÉ, F. et al. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002430, 2011.

_____. Azospirillum-plant interaction: from root colonization to plant growth promotion. **Beneficial plant-microbial interactions: ecology and applications**, p. 237-269, 2013.

WONG, Marisa L.; MEDRANO, Juan F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

WORDELL FILHO, J. A.; CHIARADIA, L. A. **A cultura do milho em Santa Catarina**: Epagri 2016.

WORLD DEVELOPMENT INDICATORS (WDI). **Fertilizer consumption**. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/indicator/AG.CON.FERT.PT.ZS>> Acesso em 25/02/2019.

XING, X. et al. Effects of phosphate-enhanced ozone/biofiltration on formation of disinfection byproducts and occurrence of opportunistic pathogens in drinking water distribution systems. **Water Research**, v. 139, p. 168-176, 2018.

XU, W. The Identification and Detection Technology of Research in Microorganisms Including Living or Dead Bacteria. In: XU, W. (Ed.). **Functional Nucleic Acids Detection in Food Safety: Theories and Applications**. Singapore: Springer Singapore, 2016. p.343-364.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C.-M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.

YANG, X.; BADONI, M.; GILL, C. O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1478-1482, 2011.

YANG, Y. et al. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. **Food microbiology**, v. 34, n. 2, p. 418-424, 2013.

ZAMIOUDIS, C. et al. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.

ZHANG, G. et al. Fine mapping a major QTL for kernel number per row under different phosphorus regimes in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and applied genetics**, v. 126, n. 6, p. 1545-1553, 2013.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 281-289, 2006.

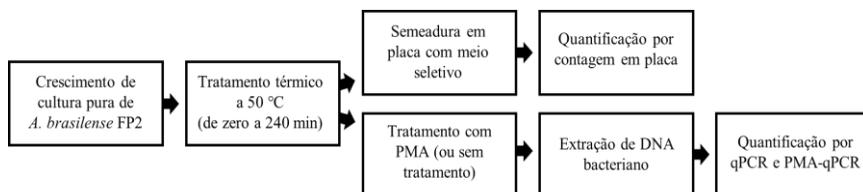
ZHULIN, I. B.; TRETYAKOVA, S. E.; IGNATOV, V. V. Chemotaxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. **Folia microbiologica**, v. 33, n. 4, p. 277-280, 1988.

ZOHAR-PEREZ, C. et al. Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against UVC radiation. **Radiation research**, v. 160, n. 2, p. 198-204, 2003.

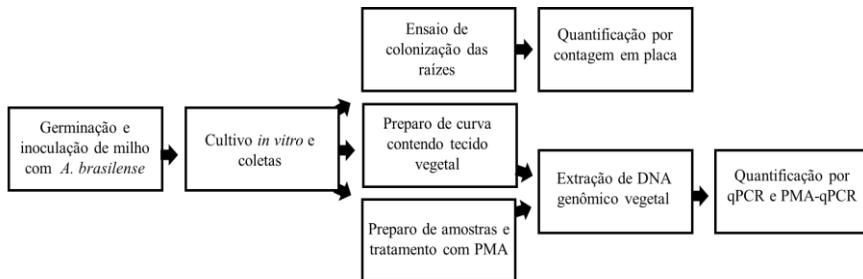
APÊNDICES

Apêndice 1 – Fluxograma Geral dos Experimentos

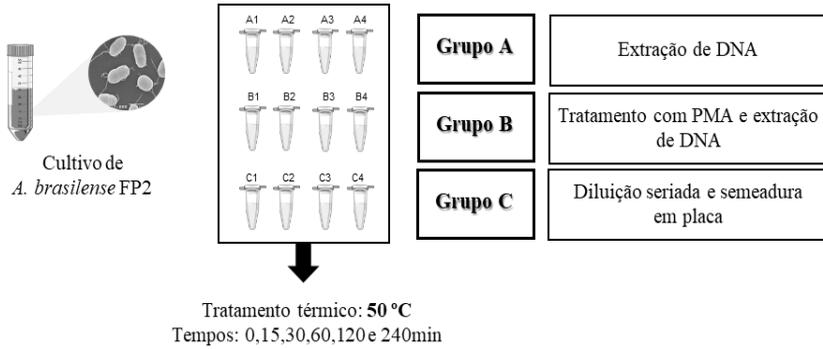
Ensaio de Tratamento Térmico



Ensaio de Inoculação em Milho



Apêndice 2 – Esquematização dos ensaios de tratamento térmico



Apêndice 3 - Cálculo da quantificação de células viáveis de *A. brasilense* FP2

Dados da Amostra de Cultura Pura:

Contagem em placa ($V = 1,0 \text{ mL}$): $1,5 \cdot 10^8 \text{ UFC / mL}$

Extração de DNA ($V = 1,5 \text{ mL}$): $102 \text{ ng / } \mu\text{L}$

Volume Final de DNA: $40 \mu\text{L}$

- 1) Cálculo da quantidade de DNA no volume final
 $102 \text{ ng / } \mu\text{L} \times 40 \mu\text{L} = \mathbf{4080 \text{ ng de DNA}}$

- 2) Cálculo da UFC em $1,5 \text{ mL}$ de cultura
 $1 \text{ mL} = 1,5 \cdot 10^8 \text{ UFC}$
 $1,5 \text{ mL} = \mathbf{2,25 \cdot 10^8 \text{ UFC}} = 4080 \text{ ng de DNA}$

- 3) Cálculo da UFC no primeiro ponto da curva (10^6)
 Primeiro ponto da curva: $8,26 \text{ ng de DNA}$ (base no tamanho do genoma)
 $4080 \text{ ng de DNA} = 2,25 \cdot 10^8 \text{ UFC}$
 $8,26 \text{ ng de DNA} = \mathbf{4,55 \cdot 10^5 \text{ UFC}}$

- 4) Pontos da Curva em UFC
 $10^6 = 4,55 \cdot 10^5 \text{ UFC}$
 $10^5 = 4,55 \cdot 10^4 \text{ UFC}$
 $10^4 = 4,55 \cdot 10^3 \text{ UFC}$
 $10^3 = 4,55 \cdot 10^2 \text{ UFC}$
 $10^2 = 4,55 \cdot 10^1 \text{ UFC}$
 $10^1 = 4,55 \cdot 10^0 \text{ UFC}$

- 5) Plotar gráfico Cq versus log UFC para cada corrida de qPCR

- 6) Substituir o Cq das amostras na equação da reta

- 7) Valor de UFC obtido com a curva aplicado na equação:

$$\left[\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right] = \frac{A \cdot B \cdot C}{D \cdot E}$$

onde,

A: UFC obtido com a curva

B: concentração de DNA ($\text{ng / } \mu\text{L}$)

C: volume final de DNA extraído (μL)

D: massa de DNA inicial usado na qPCR (ng)

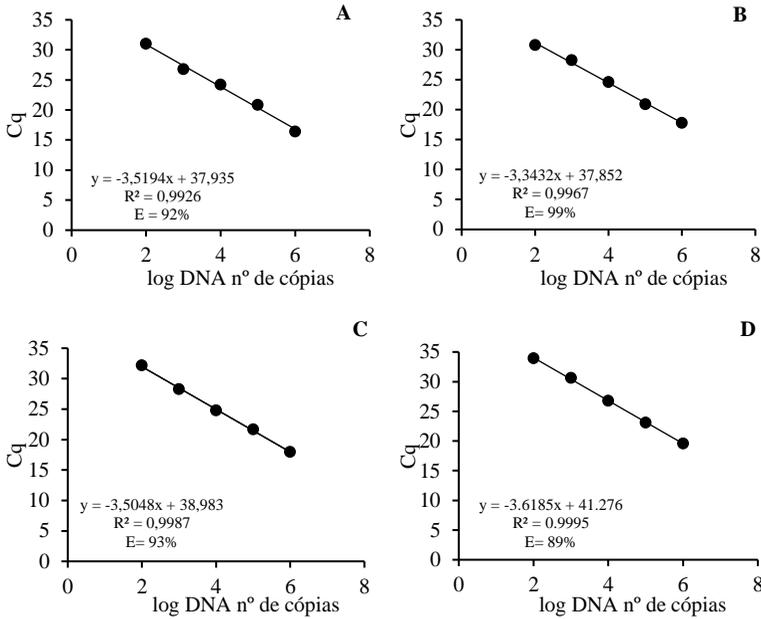
E: volume de amostra utilizada para extração (mL)

Apêndice 4 – Cq médio obtido por ensaios qPCR e PMA-qPCR usando DNA isolado de amostras submetidas à tratamento térmico. Os valores representam as médias das triplicatas de qPCR executadas em diferentes corridas. ND representam os valores não determinados durante a qPCR.

Amostras não tratadas com PMA	Cq médio	Amostras tratadas com PMA	Cq médio
0' 1	17,36 16,64	0' 1	20,85 20,05
0' 2	17,69 17,46	0' 2	20,85 20,05
0' 3	17,46 17,90	0' 3	18,59 18,90
0' 4	17,65 18,01	0' 4	18,55 18,94
15' 1	18,05 16,66	15' 1	18,21 17,95
15' 2	16,74 17,53	15' 2	18,10 17,95
15' 3	18,69 19,12	15' 3	20,60 20,98
15' 4	18,45 18,86	15' 4	20,27 20,64
30' 1	18,93 18,64	30' 1	20,07 19,89
30' 2	18,01 17,57	30' 2	21,37 19,90
30' 3	19,57 20,01	30' 3	21,44 21,86
30' 3	18,54 18,96	30' 3	21,17 21,64
60' 1	17,37 16,56	60' 1	23,37 22,50
60' 2	16,56 16,70	60' 2	27,37 25,40

60' 3	19,84 20,09	60' 3	24,88 25,18
60' 4	20,86 21,43	60' 4	22,46 22,75
120' 1	14,88 14,42	120' 1	32,47 31,99
120' 2	15,28 14,90	120' 2	31,01 30,09
120' 3	18,23 18,32	120' 3	26,21 25,82
120' 4	19,29 17,25	120' 4	25,95 25,14
240' 1	17,05 ND	240' 1	32,07 32,67
240' 2	16,38 15,55	240' 2	34,65 32,21
240' 3	18,17 18,24	240' 3	32,23 32,10
240' 4	18,71 18,77	240' 4	30,45 30,05

Apêndice 5 – Curvas padrão de qPCR (log DNA n° de cópias versus Cq) obtidas para quantificação usando os iniciadores Azor2.1 executadas em quatro dias diferentes, com DNA isolado de cultura pura de *A. brasilense* cepa FP2.



Apêndice 6 - C_q obtido por ensaios de qPCR e PMA-qPCR usando DNA isolado de amostras de raízes de milho (controle e inoculadas). Os valores representam as médias das triplicatas de qPCR executadas em diferentes corridas. <LOD representam valores abaixo do limite de detecção de 100 cópias de DNA (10²) e ND representam os valores não determinados durante a qPCR.

Amostras não tratadas com PMA	C_q médio	Amostras tratadas com PMA	C_q médio
Controle 1	< LOD	Controle 1	ND
	< LOD		ND
Controle 2	< LOD	Controle 2	ND
	< LOD		ND
Controle 3	< LOD	Controle 3	ND
	< LOD		ND
Controle 4	< LOD	Controle 4	ND
	< LOD		ND
Inoculada 1	23,91	Inoculada 1	28,59
	24,46		29,39
Inoculada 2	21,73	Inoculada 2	30,33
	22,12		30,88
Inoculada 3	20,4	Inoculada 3	26,11
	20,68		26,5
Inoculada 4	20,93	Inoculada 4	ND
	21,39		ND

Apêndice 7 - Scatter plot demonstrando as correlações e diferenças entre a enumeração log UFC / mL de *A. brasilense* FP2 determinada por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa durante tratamento térmico à 50 °C por diferentes períodos de tempo.

