



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

ELISANDRA TRICHES DA CUNHA

Efeitos do estresse subletal em bactérias promotoras de crescimento vegetal: revisão sistemática e aplicação em inoculantes de *Azospirillum brasilense* para milho

FLORIANÓPOLIS

2023

ELISANDRA TRICHES DA CUNHA

Efeitos do estresse subletal em bactérias promotoras de crescimento vegetal: revisão sistemática e aplicação em inoculantes de *Azospirillum brasilense* para milho

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares

FLORIANÓPOLIS

2023

DA CUNHA, ELISANDRA TRICHES

Efeitos do estresse subletal em bactérias promotoras de crescimento vegetal: revisão sistemática e aplicação em inoculantes de *Azospirillum brasilense* para milho / ELISANDRA TRICHES DA CUNHA ; orientadora, ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI, coorientador, CLÁUDIO ROBERTO FONSECA SOUSA SOARES, 2023.

142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal. 3. Inoculantes Bacterianos. 4. PMA-qPCR. I. ARISI, ANA CAROLINA MAISONNAVE. II. SOARES, CLÁUDIO ROBERTO FONSECA SOUSA. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

ELISANDRA TRICHES DA CUNHA

Efeitos do estresse subletal em bactérias promotoras de crescimento vegetal: revisão sistemática e aplicação em inoculantes de *Azospirillum brasilense* para milho

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 01/08/2023 pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Carolina Weigert Galvão

BEMG/UEPG

Prof(a). Dr(a). Fabienne Antunes Ferreira

MIP/ UFSC

Prof(a). Dr(a). Valdir Marcos Stefenon

Fitotecnia/UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de tese de doutorado.

Coordenação do Programa de Pós Graduação

Prof(a). Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dr(a). Orientadora

FLORIANÓPOLIS

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à espiritualidade, por me guiar e manter sempre no caminho certo, me dando amparo, força e coragem durante esta longa jornada da vida. Hoje eu sei que o acaso não existe, tudo que chega traz os ensinamentos que nossa alma necessita.

À toda minha família, principalmente aos meus queridos pais, Sirio André e Isolete, por serem meu porto seguro, por acreditarem em mim e investirem na minha educação. Por todo amor, amparo e compreensão dados a mim durante esta jornada. Aos meus irmãos Sirio Neto e Nicolas, por todo carinho, amizade e cumplicidade, e por todos momentos de alegria que me proporcionam, trazendo mais luz à minha vida. À minha querida tia (quase irmã) Lizandra, pela amizade e por ter sempre me ajudado, nos meus piores momentos, a reencontrar a mim mesma.

Ao meu namorado, Johnatan, por não ter deixado eu desistir dos meus sonhos há muitos anos atrás. Por ter acreditado em mim, mesmo quando eu mesma não acreditei. Por ter me esperado pacientemente e mesmo de longe ter me apoiado nesta jornada.

Aos meus gatinhos Lemmy, Ozzy e Jimmy, anjinhos companheiros de todas as horas, por todo amor e carinho que recarrega minhas energias diariamente. Especialmente ao Lemmy, que hoje me observa lá do céu, minha linda estrelinha.

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 desta tese.

Agradeço a todos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, especialmente à Ana Marina, pela sincera amizade, pelos momentos de alegria e descontração, compreensão, ajuda e apoio, não somente nas atividades do doutorado, mas na vida.

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

“Que tamanho tem o universo? O universo tem o tamanho do seu mundo. Que tamanho tem o meu mundo? Tem o tamanho dos seus sonhos.” Nunca desista dos seus sonhos - Augusto Cury.

RESUMO

O uso de inoculantes bacterianos comerciais formulados com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) na agricultura tem mostrado destaque significativo nos últimos anos devido aos benefícios de promoção de crescimento fornecidos às plantas por meio de diferentes mecanismos. A BPVC *Azospirillum brasilense* é amplamente utilizada como inoculante em importantes culturas de gramíneas, proporcionando inúmeros benefícios às plantas. No entanto, a sobrevivência e a viabilidade das células bacterianas nos inoculantes são afetadas durante o uso e podem diminuir sua eficácia. Estratégias de adaptação fisiológica têm atraído a atenção para resolver o problema de viabilidade. Esta tese foi dividida em dois capítulos: o capítulo um consistiu em uma revisão sistemática, que fornece uma visão geral das pesquisas sobre a seleção de estratégias de estresse subletal para aumentar a eficácia de inoculantes bacterianos; e o capítulo dois, consistiu em ensaios para avaliar os efeitos do estresse térmico e salino na sobrevivência de inoculante preparado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* e monitoramos a viabilidade das células estressadas após a inoculação de milho cultivado em condições *in vitro*. A revisão sistemática revelou que a aplicação de estresse subletal apresentou-se como uma estratégia de grande potencial para uso na formulação de inoculantes mais eficientes na agricultura, inclusive em condições de estresse ambiental. Os resultados encontrados no ensaio com estresse subletal em inoculantes de *A. brasilense* indicam que as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram potencial para osmo adaptação e resultaram em aumento da sobrevivência celular após a inoculação em plantas de milho. Este trabalho foi pioneiro no estudo de aplicação de estresse subletal em estirpes de *A. brasilense* bem como na descoberta do potencial de osmo adaptação da espécie, fornecendo informações que contribuem para otimização de processos de formulação de inoculantes para milho.

ABSTRACT

The use of commercial bacterial inoculants formulated with plant growth-promoting bacteria (BPCV) in agriculture has shown significant prominence in recent years due to the growth-promoting benefits provided to plants through different mechanisms. BPVC *Azospirillum brasilense* is widely used as an inoculant in important grass crops, providing numerous benefits to plants. However, the survival and viability of bacterial cells in inoculants are affected during use and may decrease their effectiveness. Physiological adaptation strategies have attracted attention to solve the feasibility problem. This thesis was divided into two chapters: chapter one consisted of a systematic review, which provides an overview of research on the selection of sublethal stress strategies to increase the effectiveness of bacterial inoculants; and chapter two, consisted of tests to evaluate the effects of heat and saline stress on the survival of inoculant prepared with the Ab-V5 and Ab-V6 strains of *A. brasilense* and we monitored the viability of stressed cells after inoculation of corn grown in in vitro conditions. The systematic review revealed that the application of sublethal stress presented itself as a strategy with great potential for use in the formulation of more efficient inoculants in agriculture, including in conditions of environmental stress. The results found in the sublethal stress test in *A. brasilense* inoculants indicate that the Ab-V5 and Ab-V6 strains showed potential for osmoadaptation and resulted in increased cell survival after inoculation in corn plants. This work was a pioneer in the study of the application of sublethal stress in strains of *A. brasilense* as well as in the discovery of the osmoadaptation potential of the species, providing information that contributes to the optimization of inoculant formulation processes for corn.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

- Figura 1.1 - Ilustração das estratégias para proteção e melhora da tolerância à desidratação em inoculantes não esporulantes. 35
- Figura 1.2 - Diferenciação de células viáveis e inviáveis tratadas com corantes de viabilidade e o efeito causado na técnica de qPCR. 40

Capítulo I

- Figura 2.1 - Fluxograma das etapas de triagem e seleção, seguidos da inclusão dos estudos na revisão sistemática, onde n denota o número de estudos resultante após cada etapa. 52
- Figura 2.2 - Composição taxonômica dos estudos incluídos na revisão sistemática. Classificação e frequência de uso das bactérias abordadas nos estudos de acordo com (A) filos e classes, (B) gêneros e (C) espécies. 55
- Figura 2.3 - Distribuição temporal (A), ocorrência de espécies em períodos delimitados (B) e distribuição geográfica (C) dos estudos incluídas na revisão sistemática. 58
- Figura 2.4 - Mapa de rede elaborado no software *VOSviewer* para termos com pelo menos uma ocorrência nas palavras-chaves dos estudos incluídos na revisão sistemática. O tamanho dos círculos indica a frequência com que os termos apareceram e as conexões com linhas mostram a coocorrência. As diferentes cores representam os clusters formados e os números identificam os clusters mais relevantes. 59
- Figura 2.5 - Mapa de rede elaborado no software *VOSviewer* para autores com pelo menos uma ocorrência nos estudos incluídos na revisão sistemática. O tamanho dos círculos indica a frequência com que os termos apareceram e as conexões com linhas mostram a coocorrência. As diferentes cores representam os clusters formados e os números identificam os clusters mais relevantes. 60
- Figura 2.6 - Frequência de aplicação das estratégias de estresse fisiológico nos estudos incluídos na revisão sistemática (A) e frequência do tipo de resposta das células bacterianas após aplicação do estresse (B). 61
- Figura 2.7 - Resumo dos principais tipos de estresse subletal encontrados, seus efeitos nas células bacterianas e as respostas adaptativas mais comuns dos inoculantes. PCT – Proteínas de choque térmico, PCA – Proteínas de choque ácido, EROs – espécies reativas de oxigênio, EPS – exopolissacarídeos. 77

Capítulo II

- Figura 3.1 - Fluxograma experimental dos ensaios de aplicação de estresse subletal em *Azospirillum* (A) e inoculação, cultivo *in vitro* e quantificação da viabilidade do inoculante em raízes de milho (B). 89
- Figura 3.2 - Curva de crescimento bacteriano (Log UFC.mL⁻¹ versus tempo) obtida a partir de contagem em placa e medida da densidade ótica (DO₆₀₀) para *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 (A) e estirpe Ab-V6 (B). Medições realizadas em quadruplicata, sendo cada placa unidade experimental. 95

| | |
|--|-----|
| Figura 3.3 - Curva de crescimento (Log UFC.mL ⁻¹ versus tempo) bacteriano sob aplicação de estresse térmico (30, 35, 40 e 45°C) e salino (NaCl 0, 0,1, 0,3 e 0,5M) obtido a partir de contagens em placas para estirpe de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 (A e C) e Ab-V6 (B e D). Os valores correspondem à média ± SD de quatro réplicas biológicas (n=4). Medições realizadas em quadruplicata, sendo cada placa uma unidade experimental..... | 97 |
| Figura 3.4 - Amplitude da fase exponencial de <i>Azospirillum brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em crescimento a 30°C sem adição de salinidade (condições ideais), obtido a partir de contagens em placas. Os valores correspondem à média ± SD de quatro réplicas biológicas (n=4). Medições realizadas em quadruplicata, sendo cada placa uma unidade experimental..... | 98 |
| Figura 3.5 - Contagem bacteriana (Log.CFU.mL ⁻¹) obtida para <i>Azospirillum brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 sob estresse salino com NaCl (A) ou estresse térmico (B) após 8 horas de cultivo. As barras representam a média ± SD de quatro réplicas biológicas (n=4) e letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)..... | 99 |
| Figura 3.6 – Enumeração (Log UFC.g ⁻¹) do inoculante preparado de <i>Azospirillum brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 após aplicação de estresse subletal (salino e térmico) em raízes de milho cultivadas in vitro obtidas por contagem em placa (A) e PMA-qPCR (B). Quantificação por PMA-qPCR obtida pela curva padrão de cultura isolada ou de misturas de cultura com raízes de milho. As barras representam a média ± SD de quatro réplicas biológicas (n=4) e letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)..... | 102 |

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1 - Mecanismos empregados por BPCV e seus principais efeitos nas plantas..... | 22 |
| Tabela 1.2- Linhagens recomendadas para espécies de cereais para uso em inoculantes comerciais no Brasil | 25 |
| Tabela 1.3 – Espécies de <i>Pseudomonas</i> utilizadas atualmente na fabricação de inoculantes pelo mundo | 27 |
| Tabela 1.4 - Linhagens recomendadas para principais espécies de leguminosas para uso em inoculantes comerciais no Brasil | 29 |
| Tabela 1.5 - Principais tipos de vieses analisados em revisões sistemáticas..... | 42 |

Capítulo I

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1 - Critérios de elegibilidade dos estudos seguindo a estratégia PICOS | 48 |
| Tabela 2.2 - Critérios de elegibilidade dos estudos seguindo a estratégia PICOS | 49 |
| Tabela 2.3 - Identificação e abrangência dos estudos incluídos na revisão sistemática..... | 54 |
| Tabela 2.4 - Classificação das espécies utilizadas nos estudos segundo o tipo de colonização das raízes das plantas associadas | 56 |

Capítulo II

| | |
|--|----|
| Tabela 3.1 – Tempo de geração para <i>Azospirillum brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em condições de estresse..... | 98 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 15 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 3.1 A CULTURA DO MILHO | 18 |
| 3.2 USO DE FERTILIZANTES NA AGRICULTURA | 18 |
| 3.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV) | 20 |
| 3.3.1 Gênero <i>Azospirillum</i> | 22 |
| 3.3.2 Gênero <i>Pseudomonas</i> | 25 |
| 3.3.3 Gênero <i>Rhizobium</i> | 27 |
| 3.4 O MERCADO DE INOCULANTES MICROBIANOS..... | 29 |
| 3.5 A VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA DE INOCULANTES | 30 |
| 3.5.1 Fatores que afetam a viabilidade de inoculantes | 31 |
| 3.5.2 A formulação de inoculantes e a desidratação | 33 |
| 3.5.3 Estratégias de proteção de inoculantes | 35 |
| 3.6 MONITORAMENTO DA VIABILIDADE DE POPULAÇÕES MICROBIANAS | 38 |
| 3.6.1 Monitoramento da viabilidade por PCR quantitativa combinada com corantes de viabilidade | 38 |
| 3.7 FUNDAMENTOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA | 41 |
| CAPÍTULO I | |
| 4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ESTRESSE SUBLETAL NA SOBREVIVÊNCIA DE INOCULANTES BACTERIANOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA | 44 |
| 4.1 RESUMO | 44 |
| 4.2 INTRODUÇÃO..... | 45 |
| 4.3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 4.3.1 Definição da questão de pesquisa, protocolo e estratégia de busca | 47 |
| 4.3.2 Critérios de elegibilidade | 48 |
| 4.3.3 Triagem e seleção dos estudos | 50 |
| 4.3.4 Extração dos dados | 50 |
| 4.3.5 Análise de risco de viés | 50 |
| 4.4 RESULTADOS | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.1 Pesquisa, seleção e análise de abrangência dos estudos | 51 |
| 4.4.2 Composição taxonômica dos estudos | 54 |
| 4.4.3 Distribuição temporal e geográfica e correlação com as espécies nos estudos..... | 56 |
| 4.4.4 Inter-relação e coocorrência de palavras-chave dos estudos e autoria..... | 59 |
| 4.4.5 Estratégias de estresse subletal e características gerais dos estudos..... | 61 |
| 4.5 DISCUSSÃO | 70 |
| 4.5.1 Bactérias benéficas associativas usadas como inoculantes | 70 |
| 4.5.2 Evolução, origem e aplicação do estresse subletal em inoculantes | 72 |
| 4.5.3 O papel da aplicação de estresse subletal na sobrevivência de inoculantes | 74 |
| 4.5.4 Eficácia de inoculantes estressados na promoção de crescimento vegetal | 82 |
| CAPÍTULO II | |
| 5 EFEITOS DO ESTRESSE SUBLETAL TÉRMICO E SALINO NA SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL <i>Azospirillum brasilense</i> EM INOCULANTES PARA MILHO | 86 |
| 5.1 RESUMO | 86 |
| 5.2 INTRODUÇÃO..... | 87 |
| 5.3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 88 |
| 5.3.1 Fluxograma experimental..... | 88 |
| 5.3.2 Estirpes bacterianas e condições de cultivo..... | 89 |
| 5.3.3 Curvas de crescimento bacteriano | 90 |
| 5.3.4 Aplicação de estresse subletal em <i>A. brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 | 90 |
| 5.3.5 Separação das plântulas de milho em grupos | 90 |
| 5.3.6 Germinação, inoculação e condições de crescimento das plântulas de milho..... | 91 |
| 5.3.7 Preparo das raízes e tratamento com PMA | 91 |
| 5.3.8 Extração de DNA vegetal e bacteriano | 92 |
| 5.3.9 PCR quantitativa associada à propídio monoazida (PMA-qPCR)..... | 92 |
| 5.3.10 Construção de curvas padrão para quantificação..... | 92 |
| 5.3.11 Ensaio de colonização das raízes de milho | 93 |
| 5.3.12 Determinação de UFC por PMA-qPCR e contagem em placa..... | 93 |
| 5.3.13 Análises estatísticas..... | 94 |
| 5.4 RESULTADOS | 94 |
| 5.4.1 Curvas de crescimento de <i>A. brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 | 94 |
| 5.4.2 Efeitos da aplicação de estresse subletal em culturas de <i>A. brasilense</i> | 95 |

| | |
|--|------------|
| 5.4.3 Parâmetros de reação para quantificação de células viáveis de <i>A. brasilense</i> em inoculantes..... | 100 |
| 5.4.4 Quantificação de células viáveis <i>A. brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em raízes de milho crescidas <i>in vitro</i> | 100 |
| 5.5 DISCUSSÃO | 103 |
| 5.6 CONCLUSÃO..... | 106 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 108 |
| 7 REFERÊNCIAS | 109 |
| 8 APÊNDICES | 138 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

Devido à ocorrência da pandemia de COVID-19 e à determinação da suspensão de atividades presenciais da UFSC em março de 2020, todas atividades laboratoriais referentes a esta tese foram paralisadas. Desta forma o projeto original sofreu alterações para permitir o desenvolvimento de parte do trabalho de forma remota e a adaptação dos experimentos. A partir do segundo semestre de 2020 deu-se início ao processo de planejamento do trabalho de revisão sistemática, apresentado neste documento no capítulo um. As atividades semi-presenciais foram retomadas no segundo semestre de 2021, sob regime de escala e carga horária reduzida, quando se deu início às atividades práticas relacionadas ao capítulo dois.

A cultura do milho representa uma das maiores cadeias produtivas de grãos no mundo devido à alta produtividade e elevado valor nutricional, sendo o Brasil o terceiro maior produtor de milho e o segundo maior produtor de soja no ranking mundial. A manutenção de uma alta produtividade agrícola baseia-se basicamente no uso de insumos e defensivos químicos, o que traz consigo alto custo ambiental como o esgotamento e contaminação de solos (DUNGAIT et al., 2012; MARKS et al., 2013).

Uma estratégia que vem ganhando crescente destaque para diminuir a utilização de insumos químicos sem afetar a produtividade é o uso de microrganismos benéficos em sistemas agrícolas. As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são capazes de melhorar o desenvolvimento de plantas e além de auxiliar na fixação biológica de nitrogênio, proporcionam a adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis (ANDREWS et al., 2011; MIRANSARI, 2011; ZAMIOUDIS et al., 2013).

Uma das associações mais estudadas e exploradas entre plantas e BPCV é a que ocorre entre os gêneros bacterianos *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e plantas leguminosas, em especial com a soja. Além de leguminosas, também se destaca a interação entre BPCV e gramíneas, como o milho e trigo em associação com bactérias do gênero *Azospirillum* e a interação de *Pseudomonas* e herbáceas. Além de atuar na fixação de nitrogênio, as BPCV podem promover a síntese de fitormônios, crescimento de raízes, produção de sideróforos, tolerância vegetal aos estresses abióticos, antagonismo a organismos fitopatogênicos e indução de resistência sistêmica contra doenças (ARRUDA et al., 2013; LIU et al., 2013; OLIVARES et al., 2017).

Para que ocorra efetivamente o estímulo do crescimento vegetal pela associação com estas bactérias, é fundamental a sobrevivência do inóculo na planta em número suficiente para

estabelecer uma colonização satisfatória. A viabilidade dos inoculantes pode ser afetada em resposta aos fatores bióticos e abióticos presentes em diferentes etapas, seja no momento de fabricação, aplicação ou após, nas condições de campo, sendo assim dependente das condições ambientais fornecidas. Existem estratégias de proteção natural para o inoculante desenvolver tolerância a tais situações de estresse em resposta a estes fatores. Mecanismos de proteção celular podem ser desencadeados por meio da aplicação de estresse subletal, o qual provoca uma modulação da fisiologia celular para melhor adaptação e condicionamento às variáveis ambientais e conseqüentemente, aumento da sobrevivência destas células bacterianas (BERNINGER et al., 2018b).

Este trabalho teve como objetivo fazer um levantamento na literatura sobre aplicação do estresse subletal como estratégia de proteção de inoculantes bacterianos por meio do desenvolvimento de uma revisão sistemática (capítulo um). Também teve como objetivo estudar a aplicação de estratégias de estresse subletal em inoculantes de *Azospirillum brasilense*, assim como de propor a utilização de ferramentas moleculares como propídio-monoazida associada a PCR quantitativa (PMA-qPCR), para avaliação da sobrevivência e adaptação destes inoculantes pré-estressados após inoculação em milho cultivado *in vitro* (capítulo dois).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão sistemática sobre os efeitos e eficácia do estresse subletal como estratégia para melhoria de sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes e avaliar a sobrevivência de inoculantes de *A. brasilense* após aplicação de estresse subletal em meio de cultura e em plantas de milho crescidas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer um levantamento e selecionar estudos com base em critérios de elegibilidade pré-definidos em protocolo de revisão sistemática sobre os tipos e os efeitos do estresse subletal aplicado em inoculantes bacterianos.
- Obter uma síntese e agrupar os principais tipos e efeitos do estresse subletal aplicados em inoculantes bacterianos e os mecanismos de proteção celular induzidos em resposta aos agentes estressores por meio de revisão sistemática.
- Avaliar o efeito do estresse subletal sob diferentes condições estressantes (térmico e salino) e avaliar a sobrevivência de inoculantes estressados de *A. brasilense* por contagem em placa.
- Avaliar a sobrevivência de *A. brasilense* submetido ao estresse subletal em raízes de milho inoculado em condições *in vitro* com ensaio de colonização e com uso da técnica de PMA-qPCR.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, originária da América Central que foi domesticada há aproximadamente 8.000 anos (MATSUOKA et al., 2002). Assim como o arroz e o trigo, o milho está entre os cereais mais importantes e cultivados no mundo, tendo grande contribuição para alimentação humana e animal, produção de biocombustíveis e fabricação de produtos. A importância socioeconômica do milho está relacionada ao seu potencial produtivo, além da composição química e nutricional que proporciona uma excelente fonte energética (RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014). A grande adaptabilidade desta cultura permite seu cultivo em diferentes condições climáticas, em diversas altitudes, em climas tropicais, subtropicais e temperados (BARROS; CALADO, 2014).

No cenário mundial, o milho destaca-se por ser o grão mais produzido e consumido, sendo que na safra de 2021/22 houve recorde de produção do grão, totalizando mais de 1,2 bilhões de toneladas. O Brasil ocupa atualmente o 3º lugar no ranking mundial de produção desse grão, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China (USDA, 2023). Foram totalizados no país, na safra de 2021/22, mais de 113 milhões de toneladas do grão de milho, aproximadamente 30% maior do que a safra anterior, em uma área aproximada de 21.582 mil hectares (ha), com produtividade média de 5.248 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2022).

Entre as principais regiões produtoras do grão no país estão a região Centro-Oeste e a região Sul. A região Centro-Oeste é responsável por mais de 50% da produção nacional de milho, tendo produzido 64 milhões de toneladas na safra 2021/22. A região Sul é a segunda maior produtora do grão de milho, responsável pela produção de 23 milhões de toneladas na safra 2021/22, sendo que somente o estado de Santa Catarina teve produção de 2,1 milhões de toneladas nesta safra (CONAB, 2022).

3.2 USO DE FERTILIZANTES NA AGRICULTURA

De acordo com projeções feitas pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a população mundial atingirá pelo menos 9,8 bilhões até o ano de 2050. Este aumento contínuo da população e conseqüentemente do consumo de alimentos se apresenta como um grande desafio para a agricultura, uma vez que para garantir a segurança alimentar global com a crescente demanda, seria necessário dobrar a produção

agrícola atual (REETZ, 2016; SOUMARE et al., 2020). A agricultura moderna no último século têm sido dependente da utilização de insumos e defensivos químicos para melhoria e estabilidade da produção agrícola, uma vez que o cultivo contínuo de culturas leva ao esgotamento dos nutrientes no solo (PRASHAR; SHAH, 2016).

As plantas requerem diferentes elementos para seu crescimento e rendimento, a maioria sendo fornecido pelo solo. Fertilizantes químicos, principalmente à base de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) são aplicados no solo para melhorar o rendimento de culturas com grande importância econômica, uma vez que estes nutrientes primários são utilizados pelas plantas em maior quantidade (MAHANTY et al., 2017; PRASHAR; SHAH, 2016). Entre os fertilizantes utilizados para suprir a demanda agrícola, destaca-se o uso de fertilizantes nitrogenados, uma vez que o nitrogênio (N) é considerado o nutriente mais limitante para o rendimento final de cultivos (GRANT et al., 2012). Este nutriente é um dos elementos mais importantes para crescimento de plantas, por ser um dos principais constituintes de ácidos nucleicos e proteínas, moléculas fundamentais para todos os processos biológicos (DE SOUZA et al., 2019).

A Associação Internacional de Fertilizantes (IFA) relata que em 2021/22, aproximadamente 198 milhões de toneladas de fertilizantes foram utilizados no mundo. No Brasil foram vendidas aproximadamente 41 milhões de toneladas de fertilizantes em 2022 de acordo com a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA, 2023). O tipo de solo e manejo utilizado influenciam fortemente a eficiência de uso dos fertilizantes convencionais (CALABI-FLOODY et al., 2018). Grande parte do solo brasileiro apresenta alguma deficiência de nutrientes, exigindo aplicação de quantidades elevadas de fertilizantes, sendo que uma fração considerável destes insumos aplicados acabam não sendo absorvidos pelas plantas. A perda de fertilizantes químicos no solo afeta diretamente o meio ambiente pelo acúmulo em águas subterrâneas e superficiais, eutrofização de ecossistemas aquáticos, além do impacto na qualidade do solo em termos de retenção de água e aumento da salinidade (MAHANTY et al., 2017; SAVCI, 2012; SHAIENDRA SINGH, 2015).

Questões como a saúde ambiental, a manutenção do equilíbrio ecológico e conservação da biodiversidade do solo se apresentaram a partir da última década como assuntos que precisam de maior atenção para melhor gerenciamento das crescentes demandas alimentares no mundo, sendo assim necessária a reavaliação da utilização exacerbada de

fertilizantes químicos, buscando minimizar os impactos negativos causados no meio ambiente (PRASHAR; SHAH, 2016).

Diferentes abordagens foram investigadas com intenção de reduzir o uso dos fertilizantes nos agroecossistemas. A utilização de inoculantes formulados a partir de bactérias benéficas fixadoras de nitrogênio se apresenta como uma alternativa eficiente e sustentável que permite diminuir a quantidade de fertilizantes químicos aplicados, reduzindo impactos econômicos e ambientais negativos (ALVES et al., 2019). Os inoculantes são rentáveis, ecologicamente corretos e seu uso contribui para adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis sem afetar a produtividade de grandes culturas (QIU et al., 2019)

3.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

A rizosfera consiste na área de solo conectado às raízes e alguns milímetros fora da superfície radicular, onde ocorre a maior parte dos processos de interação entre microrganismos e plantas (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). As bactérias que interagem nesta região podem ser classificadas em grupos benéficos, deletérios e neutros com base em seus efeitos no crescimento das plantas (DOBBELAERE et al., 2010). As bactérias benéficas que habitam esta região também são conhecidas como Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) e representam um grupo de bactérias que auxilia na melhora do crescimento e desenvolvimento de plantas de grande interesse econômico, incluindo cereais, oleaginosas, leguminosas e hortícolas (VERMA; MISHRA; ARORA, 2019; ZAMIOUDIS et al., 2013).

Estes microrganismos são utilizados como aditivos para fertilizantes químicos e têm como objetivo a melhora do rendimento de culturas e desenvolvimento de sistemas agrícolas de produção mais sustentáveis (QIU et al., 2019). Diversos gêneros de BPCV têm sido utilizados em formulações de inoculantes para plantas. Entre 1998 e 2014 verificou-se o uso de pelo menos 30 gêneros nestas formulações, entre os quais destacam-se: *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Sinorhizobium* (BASHAN et al., 2014).

O estímulo de crescimento da planta por BPCV envolve diferentes mecanismos que podem agir direta ou indiretamente no seu metabolismo. Os mecanismos diretos compreendem o aumento da disponibilidade de nutrientes, pela fixação biológica de

nitrogênio atmosférico, solubilização de compostos minerais como o fósforo, produção de sideróforos e a modulação dos níveis hormonais, pela produção de auxinas, giberelinas, citocininas e etileno. Os mecanismos indiretos envolvem atividade biocontroladora e ação antagonista à diversos fitopatógenos, induzindo resistência sistêmica da planta contra doenças, além de induzir tolerância e resistência vegetal à diferentes estresses abióticos, como salinidade, seca e temperaturas extremas (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; GLICK, 2012; TEWARI; ARORA, 2016; VESSEY, 2003). Possivelmente a influência das BPCV no crescimento vegetal se dá pela combinação de diferentes mecanismos, uma vez que cada tipo promove um efeito diferente na planta (Tabela 1.1). De maneira geral, estudos indicam que a associação com estas bactérias aumenta a germinação, vigor das plântulas, crescimento das raízes e parte aérea, biomassa total e a produtividade das plantas (VERMA; MISHRA; ARORA, 2019).

As interações que ocorrem entre plantas e BPCV diferem de acordo com o nicho de colonização. Para bactérias chamadas endofíticas ocorre a colonização dos espaços intercelulares dos tecidos vegetais, enquanto outras bactérias induzem a formação de estruturas diferenciadas nas raízes ou a agregação na superfície radicular (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). A interação mais representativa entre BPCV e plantas é aquela dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* com plantas leguminosas. Nesta interação ocorre formação de estruturas diferenciadas nas raízes, chamadas de nódulos, cuja principal função é fornecer um ambiente propício para a fixação biológica de nitrogênio (OLDROYD, 2013; POOLE; RAMACHANDRAN; TERPOLILLI, 2018). Outro tipo de interação é caracterizado pela colonização da superfície raízes com a formação de biofilmes, que pode ser representada especialmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azospirillum*. Existem ainda interações onde ocorre a colonização dos tecidos internos das raízes sem a formação de nódulos, representada pelo gênero *Herbaspirillum*. As espécies dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* são bactérias conhecidas pela associação com gramíneas e do gênero *Pseudomonas* com hortícolas de grande importância econômica (BALDANI; BALDANI, 2005; DORJEY; DOLKAR; SHARMA, 2017; HUNGRIA et al., 2010).

Tabela 1.1 - Mecanismos empregados por BPCV e seus principais efeitos nas plantas

| Mecanismo | Efeito no crescimento da planta | Exemplos de gêneros de BPCV |
|---|--|--|
| Fixação de nitrogênio | Aumento na quantidade de nitrogênio e biomassa | <i>Acetobacter, Azospirillum Azotobacter, Bradyrhizobium, Burkholderia, Frankia, Herbaspirillum, Rhizobium</i> |
| Produção de fitormônios | Aumento da ramificação e comprimento da raiz, da parte aérea e da biomassa | <i>Azospirillum, Bacillus, Bradyrhizobium, Herbaspirillum, Pseudomonas, Rhizobium</i> |
| Solubilização de fosfatos | Aumento da quantidade de fósforo e da biomassa | <i>Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Enterobacter, Herbaspirillum, Pseudomonas, Rhizobium</i> |
| Indução de resistência a doenças e estresse | Aumento da sobrevivência de plântulas e da biomassa | <i>Azospirillum, Pseudomonas, Rhizobium</i> |

Fonte: Adaptado de (ARKHIPOVA et al., 2007; BASHAN; BIOL; BASHAN, 2005; BASTIÁN et al., 1998; VAN OOSTEN et al., 2017; VERMA; MISHRA; ARORA, 2019)

3.3.1 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* faz parte da classe das Alfaproteobactérias, ordem *Rhodospirillales*, família *Rhodospirillaceae* é composto por 33 espécies descritas até o momento, de acordo com a base de dados *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN* (LPSN, 2023). Este gênero representa bactérias de vida livre no solo que habitam grande parte dos ambientes terrestres (DOBEREINER; PEDROSA, 1987; HUERGO et al., 2008) e já foram encontradas na rizosfera de diversos membros da família Poaceae, sendo arroz, trigo, milho, cana-de-açúcar os hospedeiros mais comuns (MEHNAZ, 2015). A espécie *Spirillum lipoferum* foi descrita inicialmente em 1925 e em 1978, foi proposta sua reclassificação como *Azospirillum* juntamente com a descrição das primeiras duas espécies do gênero: *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978), sendo estas as primeiras a ganhar destaque mundial com a descoberta da sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio quando associadas com gramíneas (DÖBEREINER; DAY, 1976).

As espécies pertencentes a este gênero são bactérias Gram-negativas, não esporulantes, caracterizadas pelo formato de bastonetes, padrão flagelar misto, com movimentos vibróide característico (HALL; KRIEG, 1984) apresentando diâmetro de 1 micrômetro (μm) e o comprimento de 2,1 a 3,8 μm (PRIMAVESI et al., 2005). São

conhecidas também pela sua habilidade de colonizar a rizosfera de plantas, porém, podem existir diferenças específicas entre linhagens e espécies do gênero na forma de colonização. 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 (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). As espécies de *Azospirillum* apresentam quimiotaxia para diversos exsudatos secretados pelas raízes destas plantas, como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e compostos aromáticos (OKON et al., 1980; RODRÍGUEZ-NAVARRO; DARDANELLI; RUÍZ-SAÍNIZ, 2007).

As bactérias deste gênero apresentam diversos genes envolvidos na fixação, assimilação e regulação do nitrogênio (N). De acordo com a literatura, por meio da FBN, estas bactérias podem contribuir com 5 a 18% de aumento total de nitrogênio em plantas gramíneas, ou seja, apenas uma pequena parte do nitrogênio fixado é efetivamente transferida para a planta. Desse modo, os estímulos hormonais se apresentam como a principal contribuição de *Azospirillum* spp. para o crescimento das plantas (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; MEHNAZ, 2015).

Diversos estudos relatam a capacidade de *Azospirillum* spp. de promover crescimento por meio da autoprodução de fitormônios, principalmente auxinas, giberelinas e citocininas, além do óxido nítrico e ácido abscísico (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Estes atuam como moléculas efetoras estimulando a cascata de sinalização celular na planta, induzindo sua produção endógena (CHAMAM et al., 2013; COHEN et al., 2015; DUCA et al., 2014). Entre os fitormônios produzidos por *Azospirillum* spp. mais estudados está o ácido indol-3-acético (AIA), considerado a auxina mais importante e mais produzida pela bactéria (GLICK, 2014; MEHNAZ, 2015). Assim como outras auxinas, o AIA parece desencadear mudanças diretas na arquitetura de raízes das plantas, como alongamento radicular, desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares, melhorando a capacidade de absorção de água e minerais pela planta (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; CHAMAM et al., 2013; COHEN et al., 2015; DUCA et al., 2014; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). As giberelinas (GAs) e o ácido abscísico (ABA) são outros importantes fitormônios produzidos por bactérias deste gênero e estão envolvidos na resposta da planta às fontes de estresse abiótico estimulando mecanismos de defesa das plantas (COHEN et al., 2009; VACHERON et al., 2013).

Além dos fitormônios, as bactérias do gênero também podem induzir a biossíntese de bacteriocinas, sideróforos e metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, contribuindo para o biocontrole de fitopatógenos (VACHERON et al., 2013; WALKER et al., 2011). Devido aos diversos efeitos positivos proporcionados durante a interação de *Azospirillum* e plantas, sua utilização na agricultura têm se revelado uma estratégia importante, sendo comercializadas em vários países, incluindo Brasil, Argentina, México, Itália, França, Austrália, Alemanha, EUA, Bélgica, Índia e Uruguai, sendo em formulações puras ou em consórcio com outros microrganismos (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021). No entanto, é essencial ressaltar que o sucesso da interação com as bactérias deste gênero depende tanto da espécie da planta associada quanto da estirpe bacteriana, além das condições ambientais do local onde ocorre a colonização (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

A eficiência agronômica de *Azospirillum* foi amplamente testada em ensaios de laboratório e campo por projetos de pesquisa em parceria entre um grupo de pesquisa da Embrapa Soja e o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). Obedecendo os critérios da legislação brasileira para inoculantes estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram selecionadas estirpes de *Azospirillum brasilense* que apresentavam maior sobrevivência no solo, promoção de crescimento e adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo. Os resultados demonstraram incrementos no rendimento de grãos entre 24 e 30% em relação ao controle não inoculado para estas culturas. Com base nestes e outros estudos, diversas linhagens de *A. brasilense* passaram a ser recomendadas pelo MAPA para uso em formulações de inoculantes para culturas de cereais (Tabela 1.2) conforme publicado em instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011). Também como resultado desta pesquisa foi desenvolvido o primeiro inoculante líquido, proveniente da parceria entre a Embrapa Soja e a empresa Total Biotecnologia, contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, lançado em 2010 e atualmente utilizado na cultura do milho e trigo (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021).

Tabela 1.2- Linhagens bacterianas recomendadas para espécies de cereais para uso em inoculantes comerciais no Brasil

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

Fonte: Adaptado de MAPA, 2011.

O genoma das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* foi sequenciado e anotado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja e está disponível no GenBank com os números de acesso POQV00000000.1 e POTD00000000.1, respectivamente. O genoma de *A. brasilense* estirpe Ab-V5 foi estimado em 6.934.595 pb e o genoma de *A. brasilense* estirpe Ab-V6 foi estimado em 7.197.196 pb, ambos montados com 63 *contigs*. Observou-se para ambas as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 dois plasmídeos em comum e genes de fixação de nitrogênio (*nif*) semelhantes, que conferem sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Embora as estirpes tenham diferenças em sua capacidade de sintetizar fitormônios, ambas compartilham os mesmos genes relacionados à síntese de auxinas (FUKAMI et al., 2017; FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; HUNGRIA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2018).

3.3.2 Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* faz parte da classe das Gamaproteobactérias, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae* e é composto por 532 espécies descritas até o momento, de acordo com a base de dados *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN* (LPSN, 2023). Entre as BPCV o grupo das *Pseudomonas* é considerado o maior e mais promissor devido às características distintas das espécies do gênero que incluem: crescimento rápido, simples requerimento de nutrientes e habilidade de utilizar diversos substratos inorgânicos, o que confere versatilidade nutricional, alta mobilidade e diversidade de metabólitos produzidos. As principais espécies do gênero

incluem *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas aureofaciens* (DORJEY; DOLKAR; SHARMA, 2017).

As espécies deste gênero são rizobactérias gram-negativas, quimioheterotróficas, aeróbias, com flagelos polares, sendo a grande maioria de vida livre ou endofíticas (PALLERONI et al., 1973). Estas espécies estão presentes em grande número em uma ampla gama de nichos ecológicos, incluindo ambientes terrestres e marinhos e possuem grande potencial de uso como biofertilizantes (PANPATTE et al., 2016). *Pseudomonas* spp. exibem diversos mecanismos de promoção de crescimento como a produção de enzimas e metabólitos, como antibióticos, sideróforos, biosurfactantes, osmólitos e fitormônios, solubilização de nutrientes, além de exercer forte papel como agente de biocontrole contra doenças e apresentar competição agressiva com outros microrganismos (AMBARDAR; VAKHLU, 2013; ANDREOLLI et al., 2021; GNANAMANICKAM, 2006; NADEEM et al., 2016b; PANPATTE et al., 2016; RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

As espécies de *Pseudomonas* mais utilizadas em formulações de inoculantes incluem *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, com potencial para colonização de diversas espécies vegetais, incluindo gramíneas, hortaliças, vegetais e leguminosas (NADEEM et al., 2016a). *P. fluorescens* é considerada a espécie mais estudada do gênero, sendo reconhecida pela habilidade de se adaptar rapidamente à rizosfera de plantas, por exibir diversos mecanismos de promoção do crescimento e diferem das demais espécies pela capacidade de produzir pigmentos solúveis em água (BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006; LANDA et al., 2002; RAINEY, 1999). As estirpes de *P. fluorescens* são amplamente utilizadas na associação com mais de 50 espécies vegetais, atuando principalmente na proteção das plantas contra patógenos durante o seu desenvolvimento (PANPATTE et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2000).

O gênero *Pseudomonas* é considerado um dos mais promissores de BPCV, devido à sua multifuncionalidade e potencial, sendo amplamente usado em diversos inoculantes de empresas estrangeiras, revelando sua comprovada eficiência principalmente para o cultivo de hortaliças e como agente de biocontrole para outras espécies vegetais (NAIK et al., 2008). Recentemente, foi inserido no Brasil um inoculante desenvolvido pela Embrapa Soja que associa as espécies de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*. O inoculante

multifuncional já está disponível para os produtores agrícolas. A Tabela 1.3 resume as principais espécies utilizadas em formulações comerciais e o país onde estes são fabricados atualmente.

Tabela 1.3 – Espécies de *Pseudomonas* utilizadas atualmente na fabricação de inoculantes pelo mundo

| Espécie Bacteriana | País do Fabricante |
|---------------------------|---|
| <i>P. fluorescens</i> | Brasil, Vietnã, Cuba, Sri Lanka, Alemanha e Índia |
| <i>P. striata</i> | Índia |
| <i>P. azotoformans</i> | Suécia |
| <i>P. chlororaphis</i> | Suécia |
| <i>P. aurantiaca</i> | Argentina |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | África do Sul e Reino Unido |

Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2022.

3.3.3 Gênero *Rhizobium*

O gênero *Rhizobium* foi primeiramente descrito como o único representante de bactérias fixadoras de nitrogênio que estabeleciam interações simbióticas com plantas da família Leguminosae. O gênero era composto por seis principais espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupine* e *R. japonicum* (FRED; BALDWIN; MCCOY, 1932). Esta taxonomia foi alterada em 1982 considerando padrões de crescimento, com a reclassificação em dois grupos: *Rhizobium spp.* e *Bradyrhizobium spp.*, sendo o primeiro caracterizado pela multiplicação rápida e o último pela multiplicação lenta (DELAMUTA et al., 2013; JORDAN, 1982; SHAMSELDIN; ABDELKHALEK; SADOWSKY, 2017).

O termo Rhizobia ou Rizóbios, foi originalmente criado para designar espécies do gênero *Rhizobium*, porém, é amplamente utilizado para designar bactérias com capacidade de formação de nódulos e FBN em leguminosas (WILLEMS, 2006). Atualmente, os rizóbios estão divididos em seis principais gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*, sendo este o grupo de bactérias mais utilizado como inoculantes em culturas de plantas leguminosas (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019; VELÁZQUEZ et al., 2010; WILLEMS, 2006).

O gênero *Rhizobium* faz parte da classe das Alphaproteobactérias, ordem *Rhizobiales*, família *Rhizobiaceae*. O gênero *Rhizobium* é composto por 177 espécies descritas até o momento, de acordo com a base de dados *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN* (LPSN, 2023). Os Rizóbios são bactérias gram-negativas, não

esporulantes, em forma de bastonetes, com tamanho variável 0,5-0,9 x 1,2-3,0 µm e sua mobilidade é dada por um flagelo polar e dois ou mais flagelos laterais. São predominantemente aeróbias e quimiorganotróficas (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994). Este grupo compreende gêneros bacterianos presentes no solo que são capazes de associar-se de forma simbiótica às raízes de planta leguminosas formando estruturas diferenciadas chamadas de nódulos. A simbiose leguminosas-rizóbios é o tipo de associação entre plantas e bactérias mais estudada, devido à grande importância que a FBN apresenta para estas plantas (HAYAT et al., 2010; RAJWAR; SAHGAL; JOHRI, 2013).

O principal mecanismo de promoção de crescimento exercido pelas bactérias do gênero *Rhizobium* assim como outros rizóbios, é a FBN. Apesar de este ser o mecanismo mais estudado e caracterizado, estes e outros gêneros de rizóbios têm demonstrado capacidade de produzir fitormônios, podendo proporcionar outros benefícios para as leguminosas em associação além do incremento de N na planta (HAYAT et al., 2010; SINDHU et al., 2019; WANG et al., 2019). Diversos estudos relatam como principal fitormônio produzido por rizóbios o AIA. Os rizóbios produtores de AIA demonstraram formação de nódulos mais intensa em associação com leguminosas, uma vez que auxinas podem influenciar neste processo de nodulação (PERRIG et al., 2007). O AIA atua também alterando a morfologia da raiz, o que resulta numa arquitetura de raiz mais extensa e conseqüentemente aumenta a absorção de nutrientes pelas plantas (DAZZO; YANNI, 2006). Algumas estirpes de *Bradyrhizobium* podem também proporcionar tolerância à estresse abiótico, devido à produção e acúmulo de ácido abscísico (ABA) e diminuição dos níveis de etileno (PERRIG et al., 2007; SINDHU et al., 2019).

O uso de rizóbios na agricultura é uma prática de grande importância, uma vez que a FBN promovida por estas bactérias reduz a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados. Inoculantes à base de rizóbios são geralmente utilizados para melhorar o crescimento e o rendimento final de culturas leguminosas, como a soja (PRAKAMHANG et al., 2015; SINDHU et al., 2019). Existem aproximadamente 13.000 espécies de leguminosas, das quais somente 20% foram examinadas quanto à capacidade de nodulação, demonstrando a possibilidade de ocorrer a fixação de nitrogênio pela associação com rizóbios (RAJWAR; SAHGAL; JOHRI, 2013). Em 1950 foi fundada uma coleção de bactérias associativas por pesquisadores da Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO - RS), cujo objetivo foi garantir a manutenção e distribuição das estirpes recomendadas para uso em inoculantes comerciais para

culturas leguminosas. Diversas instituições de pesquisa passaram a depositar nesta coleção as estirpes isoladas e atualmente, esta é considerada pelo MAPA, a coleção de referência nacional de rizóbios. Com base em diversos estudos realizados avaliando a interação destas bactérias com plantas leguminosas, foi feita uma seleção de diversas linhagens que passaram a ser recomendadas pelo MAPA para uso em formulações de inoculantes para leguminosas (Tabela 1.4) conforme publicado em instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011).

Tabela 1.4 - Linhagens recomendadas para principais espécies de leguminosas para uso em inoculantes comerciais no Brasil

| Cultura | Espécie Bacteriana | Linhagem |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Glycine max</i> | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | SEMIA 5079 |
| <i>Glycine max</i> | <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | SEMIA 5080 |
| <i>Glycine max</i> | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | SEMIA 587 e 5019 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | <i>Rhizobium tropici</i> | SEMIA 4077, 4080 e 4088 |
| <i>Vigna unguiculata</i> | <i>Bradyrhizobium</i> spp. | SEMIA 6461, 6462, 6463 e 6464 |
| <i>Lens esculenta</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | SEMIA 344, 3025 e 3026 |
| <i>Pisum sativum</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | SEMIA 3007 e 3033 |

Fonte: Adaptado de MAPA, 2011.

As estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e 4088 são atualmente recomendadas pelo MAPA e as mais usadas comercialmente na produção de inoculantes para o feijão. Estas estirpes são as mais adaptadas e recomendadas para solos ácidos tropicais, devido sua grande capacidade de nodulação e sua alta tolerância a estressores ambientais, como alta temperatura, acidez e salinidade (DEL CERRO et al., 2017). Diversas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* também são recomendadas para formulação de inoculantes para lentilha e ervilha, entre outras espécies de leguminosas.

3.4 O MERCADO DE INOCULANTES MICROBIANOS

O mercado de inoculantes microbianos está em constante expansão com previsão de crescimento contínuo nos próximos anos devido à demanda crescente por fertilizantes que sejam compatíveis com práticas agrícolas sustentáveis e orgânicas. Atualmente o mercado global está avaliado em cerca de 2,3 bilhões de dólares em 2023, com uma taxa de crescimento de aproximadamente 12% ao ano, está previsto para alcançar valor de até 4 bilhões em 2028. Este mercado atualmente representa 5% do mercado total de fertilizantes

(GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET, 2022; TIMMUSK et al., 2017).

A América do Norte é atualmente o líder de mercado de inoculantes microbianos e continua expandindo consideravelmente devido ao número crescente de fazendas orgânicas em economias imponentes como EUA, Canadá e México. A América do Sul está emergindo como o mercado de crescimento mais rápido, pelo aumento de demanda principalmente da Argentina e Brasil por produtos orgânicos (GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET, 2022).

Desde 2011, a quantidade de doses de inoculantes comercializados no Brasil tem crescido exponencialmente. De acordo com Dados da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), na safra 2021/2022, cerca de 90 milhões de doses de inoculantes foram comercializados, sendo aproximadamente 75% dessas doses de inoculantes para uso na cultura da soja e 9% para uso em culturas de gramíneas (ANPII, 2022).

Apesar do grande potencial de crescimento e rentabilidade deste mercado, existem vários desafios que restringem o sucesso de uso destes inoculantes. Estas restrições ocorrem devido à aspectos relacionados à qualidade, viabilidade e sobrevivência das células presentes nas formulações, os quais afetam diretamente os resultados obtidos no campo. Estes aspectos restritivos ainda são problemas que comprometem a eficácia destes inoculantes, mas que podem ser resolvidos com a adoção de novas estratégias de formulação além da criação de regulamentação e fiscalização de qualidade nos países nos quais ainda é inexistente.

3.5 A VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PRESENTES EM INOCULANTES

Os produtos agrícolas denominados inoculantes são compostos que contêm microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas. Os inoculantes devem ser estéreis e isentos de contaminantes dentro dos níveis de qualidade estabelecidos, de modo a garantir sua função. A formulação de inoculantes é composta por uma ou mais estirpes de uma mesma espécie bacteriana, ou pela mistura de estirpes de diferentes espécies, com adição de um material de suporte, que deve ser estéril e auxiliar na sobrevivência e crescimento dos microrganismos, facilitando sua aplicação (BRASIL, 2004; DE SOUZA et al., 2019).

A qualidade de inoculantes é crucial para que ocorra efetivamente o estímulo de desenvolvimento vegetal, portanto, deve obedecer aos níveis de qualidade estabelecidos pelo órgão responsável em cada país. Muitos países desenvolvidos como Holanda, Tailândia, Rússia, França, Austrália, Canadá e Reino Unido possuem regulamento para a qualidade de

inoculantes que levam a melhorias na qualidade de inoculantes comerciais (BASHAN et al., 2014). Nos países em desenvolvimento o processo de regulamentação está em construção e tem sido aprimorado com o passar dos anos, e no Brasil ocorreram melhorias, garantindo no mercado inoculantes de maior qualidade, com ótimo desempenho (DE SOUZA et al., 2019; PENNA et al., 2011).

De acordo com o MAPA, o padrão de qualidade de inoculantes no Brasil é avaliado com base em três aspectos fundamentais: a ausência de contaminantes na formulação dentro dos limites estabelecidos, a pureza do inoculante, relacionada à ausência de outros microrganismos que não os especificados e a concentração de células viáveis do inoculante (UFC.mL⁻¹ ou UFC.g⁻¹). A Instrução Normativa SDA nº 13/2011 regulamenta os limites de contaminantes permitidos e as concentrações mínimas de células viáveis mínimas desejadas presentes no produto. Inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio para leguminosas (rizóbios) devem apresentar uma concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ ou UFC.g⁻¹ com garantia até a data de vencimento. Já para os demais inoculantes, com bactérias associativas e promotores de crescimento de plantas no geral, incluindo gramíneas, a concentração mínima é a mesma informada no processo de registro do produto.

Apesar do grande sucesso da aplicação de inoculantes bacterianos existem grandes variações nos efeitos destes em condições de campo (HUNGRIA et al., 2010; LANA et al., 2012; MOHANRAM; KUMAR, 2019; TURAN et al., 2012). Em muitos casos, os resultados obtidos em condições controladas não são facilmente transferidos para o campo, especialmente para bactérias não esporulantes, que são mais suscetíveis aos fatores deletérios que ocorrem durante o processo de produção, armazenamento ou aplicação de inoculantes (O'CALLAGHAN, 2016).

3.5.1 Fatores que afetam a viabilidade de inoculantes

A viabilidade é definida de acordo com o número de células viáveis do microrganismo em determinado ambiente e é considerada um dos principais desafios que restringem o sucesso no uso de inoculantes na agricultura. Os efeitos de crescimento vegetal e incremento de produtividade dependem da presença de um grande número de células viáveis no inoculante, para garantir que haja sobrevivência e que o processo de colonização ocorra de forma satisfatória na planta associada. O desenvolvimento de inoculantes contendo microrganismos altamente eficazes, com longa vida útil e alta taxa de colonização é um dos principais desafios na comercialização destes produtos. A viabilidade pode ser afetada antes,

durante ou após a sua aplicação e dependerá basicamente das condições ambientais fornecidas durante estas etapas (BACKER et al., 2018; BERNINGER et al., 2018b; MOHANRAM; KUMAR, 2019).

Antes da aplicação o fator que mais afeta a viabilidade de inoculantes está relacionado ao tempo de armazenamento ou vida de prateleira do produto (*shelf-life*). O tempo de armazenamento determina o prazo de validade dos produtos à base de microrganismos, os quais devem exibir uma vida útil que seja suficientemente longa, e está intimamente relacionado ao processo de formulação, condições de embalagem e armazenamento (ARORA; KHARE; MAHESHWARI, 2011). De acordo com a IN SDA nº 13/2011 do MAPA, o tempo mínimo de validade dos inoculantes deve ser de 6 meses, porém, dependendo da formulação, pode alcançar até 2 anos (BASHAN et al., 2014). É bem reconhecido que o armazenamento a baixas temperaturas prolonga a sobrevivência bacteriana, porém o processo de refrigeração não é acessível na maioria dos casos. Dessa forma é necessário garantir uma sobrevivência prolongada dos inoculantes em condições de temperatura ambiente (O'CALLAGHAN, 2016).

Manter a viabilidade por longos períodos de tempo sem afetar as características biológicas dos inoculantes é um dos maiores desafios encontrados pela indústria. O aumento da quantidade de células iniciais no inoculante é uma estratégia adotada para compensar a alta taxa de mortalidade, porém, essa não é uma estratégia economicamente eficiente, uma vez que para aumentar o número de células é necessário incrementar o processo de produção com mais insumos (BASHAN et al., 2014). Os principais fatores que afetam a estabilidade do armazenamento incluem exposição ao oxigênio, altas temperaturas, umidade não controlada, contaminações microbianas, incidência de luz, além de embalagens e transporte inadequados (BASHAN et al., 2014; BERNINGER et al., 2018b; MORGAN et al., 2006a).

Durante o processo de aplicação o inoculante é confrontado com fatores adicionais que prejudicam sua viabilidade. O modo de aplicação depende do tipo de formulação, porém, uma distribuição uniforme garante boa aderência do inoculante a semente, folha ou solo. Além do não espalhamento ou aplicação corretos, fatores como exposição à alta temperatura, ou tempo muito longo entre a inoculação e semeadura podem prejudicar sua viabilidade (BASHAN et al., 2014; BERNINGER et al., 2018b). Alguns estudos também relatam que a aplicação simultânea de inoculantes com fungicidas ou inseticidas podem causar estresse às células bacterianas levando à inviabilidade (DENARDIN, 2006).

As condições ambientais no campo, após a aplicação e semeadura não são controladas

e o inoculante sofre uma diminuição mais significativa da sua viabilidade, o que interfere diretamente no processo de colonização das plantas. Os principais fatores que afetam a viabilidade nesta etapa incluem a exposição a temperaturas extremas, que depende do clima da região e da época de plantio; a disponibilidade de água, que depende do nível de precipitação; e a incidência de radiação ultravioleta (UV), principalmente quando a inoculação é via foliar. Além destes fatores as próprias condições flutuantes do solo, como variações de pH durante o manejo e as interações que ocorrem com a microbiota nativa se apresentam como um grande desafio para as bactérias inseridas (ARORA; KHARE; MAHESHWARI, 2011; BERNINGER et al., 2018b; SHAMEER; PRASAD, 2018).

Os inoculantes devem ser capazes de sobreviver aos fatores deletérios para alcançar sucesso na colonização de plantas, dessa forma, um processo de formulação adequado é de extrema importância. Os inoculantes devem ser formulados de modo de fornecer um microambiente adequado, que garanta a proteção das células por um longo período tempo, de modo que o processo de colonização seja efetivo (BERNINGER et al., 2018b; LOBO et al., 2019; SHAHZAD et al., 2017).

3.5.2 A formulação de inoculantes e a desidratação

Formulações aprimoradas dos inoculantes são necessárias para criar e comercializar produtos que sejam mais efetivos, mais estáveis, de melhor qualidade e que atendam às necessidades dos agricultores (BASHAN et al., 2014). Algumas das características desejáveis de uma boa formulação incluem: permitir a adição de nutrientes; pH facilmente ajustável; matéria-prima de baixo preço, com disponibilidade adequada; ser ecologicamente correto; ser não tóxico, não poluente e biodegradável; permitir a liberação rápida e controlada de bactérias no solo e permitir aplicação com máquinas de semeadura padrão além de permitir armazenamento a longo prazo (MAHANTY et al., 2017; MALUSÁ; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012).

Os inoculantes podem ser formulados sólidos, líquidos ou semi-líquidos. As formulações sólidas podem ser em pó ou grânulos, dependendo do tamanho das partículas, e contêm baixos teores de água na composição, o que garante uma sobrevivência por períodos mais longos, além de ser mais resistente a temperaturas altas. Geralmente, os inoculantes sólidos são aplicados em sementes ou diretamente no solo (BASHAN et al., 2014; BERNINGER et al., 2018b). Os principais materiais utilizados nas formulações sólidas são turfa, compostos do solo (carvão, argilas, entre outros), compostos orgânicos (serragem,

esterco, entre outros) e materiais inertes (vermiculita, polímeros, entre outros) (BASHAN, 1986).

Os inoculantes líquidos são formulados a partir de suspensões à base de óleos, água, emulsões e outros aditivos incorporados. A formulação líquida permite diversas formas de aplicação, nas sementes antes da semeadura, no solo durante o plantio ou posteriormente por meio de fertirrigação, além da possibilidade de aplicação foliar. É importante ressaltar que a escolha da tecnologia de formulação depende da técnica de aplicação, do equipamento disponível, das características da planta e semente, do custo e conveniência para o produtor, entre outros fatores (BASHAN et al., 2014; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; JAMBHULKAR; SHARMA; YADAV, 2016; MALUSÁ; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012).

Independente do processo de formulação, a desidratação ou dessecação que ocorre no processo de secagem é um dos maiores gargalos no processo de formulação e uso de inoculantes, sendo uma das principais causas da perda de viabilidade (BERNINGER et al., 2018b; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; GREFFE; MICHIELS, 2020b). A desidratação/dessecação é um processo no qual as funções vitais microbianas são interrompidas, induzindo um estado de dormência que é retomado após reidratação. Esta prática pode ocorrer em condições controladas, semi-controladas ou não controladas. A desidratação/dessecação ocorre em condições bem controladas durante o processo de formulação, como no caso das formulações sólidas, em que este processo ocorre durante a produção para incrementar o tempo de preservação do inoculante, além de diminuir o custo de armazenamento e evitar contaminações. Em formulações líquidas ocorre em condições semi-controladas, durante o armazenamento e aplicação do inoculante. Após a aplicação, nas condições de campo, este processo é completamente não-controlado, podendo causar mortalidade de até 90% dos microrganismos presentes no inoculante (BERNINGER et al., 2018b).

Encontrar alternativas de aliviar os efeitos negativos deste processo é essencial para melhora da efetividade dos produtos bacterianos em condições de campo. Estratégias de proteção das células bacterianas a estes fatores deletérios se apresentam como meios para aumentar a viabilidade destes inoculantes por tempo suficiente para que os efeitos benéficos sejam fornecidos para as plantas.

3.5.3 Estratégias de proteção de inoculantes

Diferentes estratégias são atualmente propostas pela literatura para proporcionar proteção de inoculantes aos fatores ambientais e estresse abiótico que causam perda da viabilidade, estas geralmente se baseiam em mecanismos bacterianos naturais de proteção fisiológica. Estudos relatam que *Bradyrhizobium japonicum* apresenta respostas fisiológicas ao processo de desidratação, incluindo a produção de substâncias osmoprotetoras, de proteínas de choque térmico, exopolissacarídeos e enzimas de reparo de DNA (CYTRYN et al., 2007; RAMOS et al., 2001). Estes mecanismos de proteção fisiológica podem fornecer tolerância ao processo de desidratação/dessecação durante a formulação do inoculante e após a sua aplicação. Com base nestes mecanismos são propostas estratégias de proteção, como a adição externa de protetores, a pré-adaptação a estresse, e formulações em consórcio (Figura 1.1). É importante ressaltar que cada espécie/estirpe bacteriana pode reagir diferentemente para cada estratégia, sendo necessários estudos específicos para cada caso (BERNINGER et al., 2018b; GREFFE; MICHIELS, 2020b).

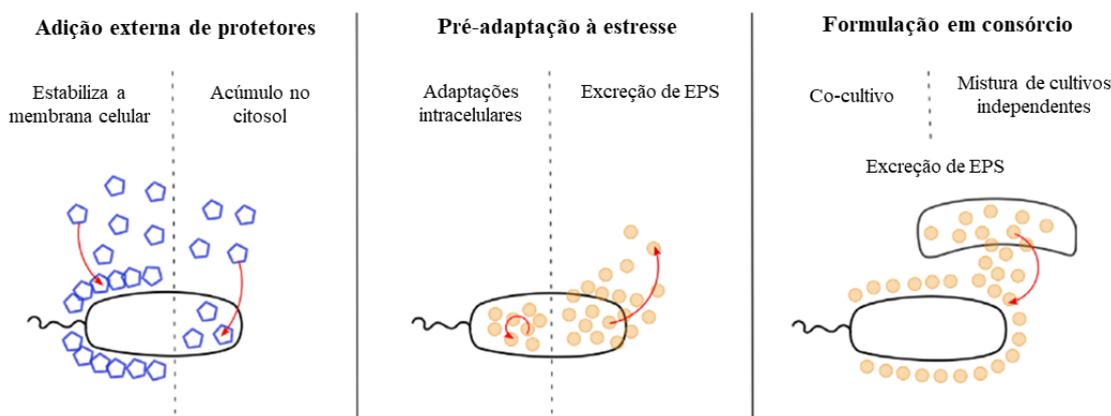


Figura 1.1 - Ilustração das estratégias para proteção e melhora da tolerância à desidratação em inoculantes não esporulantes: (A) adição externa de protetores – os compostos auxiliam estabilizando a membrana celular e aumentando o acúmulo no citosol intracelular; (B) pré-adaptação à estresse – a aplicação da fonte de estresse em doses subletais favorece adaptações intracelulares como o acúmulo e secreção de exopolissacarídeos (EPS); (C) formulação em consórcio - o co-cultivo ou mistura de cultivos independentes de espécies que favorecem a sobrevivência uma da outra, como a produção de osmoprotetores e EPS. Fonte: Adaptado de BERNINGER et al. 2018.

A adição externa de protetores é um método mais direto que vem sendo amplamente estudada, em que substâncias protetoras, como açúcares, polímeros ou aminoácidos, são adicionadas externamente as células ou no próprio meio de cultura. Alguns exemplos dos protetores mais utilizados e citados pela literatura incluem trealose, frutose, glicose, sacarose,

maltodextrina, glutamato de sódio, cisteína, polietilenoglicol, glicerol, polímeros naturais como gelatina e alginato, e sintéticos como o álcool polivinílico (COSTA et al., 2000; STRASSER et al., 2009; WESSMAN et al., 2011). Estas substâncias conferem proteção física às condições de estresse abiótico, principalmente por estabilizar a estrutura da membrana celular das bactérias e fornecendo equilíbrio da pressão osmótica celular, ou podem ainda acumular no citosol durante o cultivo (BERNINGER et al., 2018b). É importante ressaltar que o tipo de substância protetora a ser utilizada depende da espécie/estirpe bacteriana, por exemplo, o uso de frutose e lactose mostrou resultados positivos na proteção de células de *Pseudomonas* spp., e de trealose em *B. japonicum*, porém, não foram eficientes na proteção de *A. brasilense* em condições de estresse (STREETER, 2003).

O estresse subletal se apresenta como uma estratégia para aumentar a tolerância e adaptação dos inoculantes a condições não controladas. A estratégia se baseia em adaptações intracelulares que ocorrem naturalmente durante situações de estresse subletal e que resultam na modulação da fisiologia celular. Diversos estudos relatam o aumento da sobrevivência de diferentes espécies de microrganismos por aumento de tolerância aos estresses e sugerem que a pré-aplicação dos mesmos desencadeia uma série de respostas de sobrevivência, como síntese de proteínas responsivas ao estresse e metabólitos secundários, que proporcionam proteção celular (BERNINGER et al., 2018b; CABREFIGA et al., 2014a; MORGAN et al., 2006a)

A adaptação às fontes de estresse pode ser provocada durante o crescimento do microrganismo, ao fornecer condições no próprio meio de cultivo, como diferentes faixas de pH, temperatura sub-ótima de crescimento, diferentes concentrações de sais, baixa disponibilidade de nutrientes entre outros fatores. Estudos com *Pseudomonas fluorescens* demonstraram o acúmulo de proteínas responsivas ao estresse hiperosmótico aplicado pela adição de NaCl 0,7 mol/L ao meio de cultura. Este procedimento aumentou a sobrevivência após aplicação foliar em macieira (BONATERRA et al., 2007). O aumento de tolerância às condições adversas também foi observado em *P. fluorescens* após aplicação de choque térmico moderado (35°C por 1h). Este procedimento aumentou a sobrevivência em quase 80% após processo de liofilização (BISUTTI; HIRT; STEPHAN, 2015). Resultados promissores também foram observados em estudos com *Rhizobium* sp. pré-condicionados ao estresse osmótico pela adição de NaCl 0,2 mol/L ao meio de cultura, foram obtidos níveis de sobrevivência 35% maiores do que aqueles não tratados (REINA-BUENO et al., 2012).

Durante a exposição aos fatores estressantes um dos mecanismos de defesa dos microrganismos é a produção de metabólitos secundários, como os exopolissacarídeos (EPS), que auxiliam na criação de um microambiente favorável, por meio do envolvimento da membrana celular. Este tipo de proteção pode ser conferido pela inclusão de EPS exógeno adicionado na cultura celular ou pela própria indução da produção durante a aplicação de estresse subletal (BERNINGER et al., 2018b; PATEL; PRAJAPAT, 2013). Estudos com *P. aeruginosa* mostram a produção de EPS quando cultivada em meio salino, tendo a vida útil do inoculante aumentada, além de aumento da taxa de germinação de sementes de girassol, além do crescimento das plantas inoculadas com o mesmo (TEWARI; ARORA, 2014).

A formulação de inoculantes em consórcio também surge como alternativa para proteção de inoculantes, uma vez que microrganismos produtores de EPS, por exemplo, podem ser utilizados de forma a beneficiar a outras bactérias co-cultivadas. O foco dos estudos de co-inoculação tem se concentrado nos efeitos sinérgicos de estirpes parceiras, que resultam em melhor biocontrole ou promoção de crescimento, ignorando os efeitos que podem ter no próprio cultivo da bactéria em consórcio. O processo de cultivo em consórcio compreende o crescimento de diferentes espécies bacterianas no mesmo meio de cultivo, e pode ser uma alternativa economicamente mais viável do que os cultivos independentes e mistura, porém, as estirpes precisam ser compatíveis e é preciso ter conhecimento dos componentes extracelulares secretados por ambas (BERNINGER et al., 2018b). Por exemplo, o co-cultivo de *Pseudomonas* spp., *Paenibacillus* spp. e *Agrobacterium* spp. provou que estas são compatíveis uma vez que não foi observado prejuízo no seu crescimento. Após 60 dias em cultura *Pseudomonas* spp. mostraram uma viabilidade aumentada em 100 vezes em relação ao cultivo isolado (KOZYROVSKA et al., 2005).

Estas estratégias de proteção se apresentam como alternativas promissoras para manutenção da viabilidade de inoculantes, por isso novos estudos são necessários a fim de se compreender quais os efeitos destes mecanismos e como estas podem ser utilizadas para aumentar a viabilidade e garantir a melhor interação dos inoculantes com as plantas associadas. Diferentes métodos moleculares têm sido propostos para determinação da viabilidade celular de populações microbianas, 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.

3.6 MONITORAMENTO DA VIABILIDADE DE POPULAÇÕES MICROBIANAS

Os métodos dependentes de cultivo são conhecidos como métodos clássicos para enumeração de populações microbianas e dependem da capacidade das células de crescer ativamente e formar colônias visíveis em meios de cultura. Estes métodos foram essenciais para o avanço da microbiologia, mas apresentam certas limitações que podem acabar subestimando a enumeração dos microrganismos, além de exigir procedimentos laboriosos que demandam grande quantidade de tempo e de meios de cultivo (KEER; BIRCH, 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; XU, 2016).

Os métodos alternativos para enumeração de células microbianas foram desenvolvidos nas últimas décadas, entre estes estão os métodos que se baseiam na fisiologia e integridade celular (CARON, 1998; DIAPER; EDWARDS, 1994), na atividade metabólica da célula, e baseados na presença de ácidos nucleicos (DEL MAR LLEÒ et al., 2000). Os métodos moleculares são independentes de cultivo e fornecem uma descrição ampla sobre a diversidade em comunidades microbianas (DAHLLÖF; BAILLIE; KJELLEBERG, 2000). Alguns métodos moleculares se baseiam na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual permite a detecção e diferenciação dos microrganismos pela amplificação de sequências específicas de DNA (COCOLIN et al., 2013).

A PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica frequentemente utilizada para detecção, quantificação e análise da diversidade microbiana, mesmo quando estes microrganismos estão em pequenas concentrações na amostra (GIRAFFA; NEVIANI, 2001; HIERRO et al., 2006). A incapacidade da qPCR em distinguir células viáveis das inviáveis durante a detecção dos microrganismos se apresenta como uma limitação da técnica. A utilização de corantes de viabilidade associados a qPCR surgiu como uma alternativa para superar essa limitação, uma vez que estes são capazes de intercalar com o DNA de células viáveis e, quando utilizados como pré-tratamento das amostras antes da qPCR, permitem a quantificação apenas das células com membrana íntegra (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006).

3.6.1 Monitoramento da viabilidade por PCR quantitativa combinada com corantes de viabilidade

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica na qual ocorre a amplificação *in vitro* de sequências específicas de ácido nucleicos (MULLIS, 1990; MULLIS;

FALOONA, 1989). O desenvolvimento de um procedimento baseado na cinética de fluorescência permitiu a quantificação dos produtos de PCR em tempo real, resultando no monitoramento da amplificação durante sua ocorrência (GIULIETTI et al., 2001). O monitoramento da síntese dos *amplicons* em tempo real é possível através do uso de compostos fluorescentes com afinidade específica para DNA de fita dupla ou de sondas específicas de oligonucleotídeos marcadas com moléculas fluorescentes (GUT et al., 1999).

Entre os compostos intercalantes mais usados na qPCR, destaca-se o uso do SYBR® Green, que se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, mas não se liga à fita simples. A falta de especificidade deste 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 amplicons não específicos e dímeros de iniciadores (GARCÍA-CAÑAS; CIFUENTES; GONZÁLEZ, 2004). Contudo, pela análise das curvas de dissociação térmica as características dos produtos amplificados podem ser diferenciadas (WEIGHARDT, 2006).

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*, *Bradyrhizobium* e *Pseudomonas* (BOONEN et al., 2010; BRANKATSCHK et al., 2012; CIBICHAKRAVARTHY et al., 2012; GURSKA; GLICK; GREENBERG, 2015; LÓPEZ et al., 2018; MARTINI et al., 2015). Com espécies do gênero *Azospirillum*, existem trabalhos desenvolvidos para quantificação de DNA e monitoramento da expressão gênica destas bactérias em matrizes de milho e trigo, entre outras gramíneas (COUILLEROT et al., 2010; ESPINDULA et al., 2017; FALEIRO et al., 2013; GALISA et al., 2012; SANTOS et al., 2017; STETS et al., 2015).

Apesar da frequente utilização, os métodos baseados em 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 mesmo após a morte celular (JOSEPHSON; GERBA; PEPPER, 1993; MASTERS; SHALLCROSS; MACKEY, 1994). Desse modo, análises que se baseiam na quantidade de DNA do microrganismo alvo podem superestimar o número de células viáveis, ou apresentar resultados falso-positivos, visto que a técnica não é capaz de diferenciar células viáveis das não viáveis (NOCKER; CAMPER, 2009).

Uma nova abordagem da técnica de qPCR foi apresentada com o conceito de corantes de viabilidade como alternativa para detecção de células viáveis durante a amplificação (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; NOGVA et al., 2003). 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. Os corantes de viabilidade, como monoazida de propídeo (PMA) e 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 luz halógena, a molécula do corante intercala a fita dupla de DNA e forma ligações covalentes (Figura 1.2). 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 (FITIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; NOCKER; CAMPER, 2009).

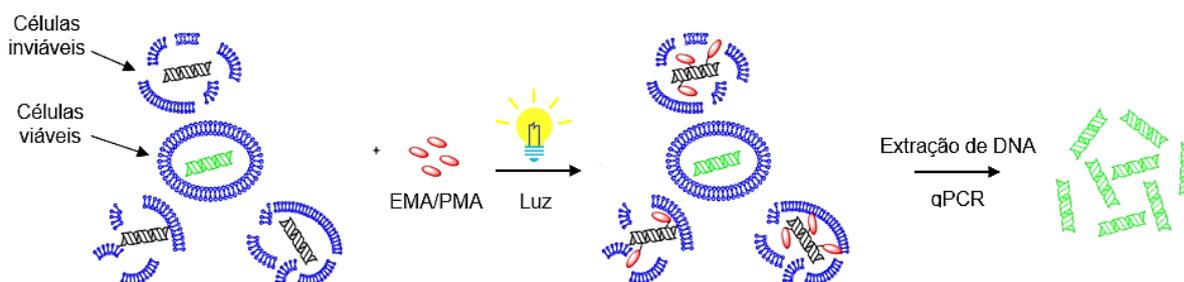


Figura 1.2 - Diferenciação de células viáveis e inviáveis tratadas com corantes de viabilidade e o efeito causado na técnica de qPCR. Os corantes de viabilidade (PMA/EMA) quando adicionados à uma amostra são capazes de penetrar pelas membranas de células inviáveis e após exposição à uma fonte de luz halógena, se liga ao DNA tornando-o insolúvel e conseqüentemente dificultando sua extração e impedindo sua amplificação na reação de qPCR. Fonte: Adaptado de © Biotium.

A utilização destes corantes combinados com a qPCR tem sido aplicada a 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 (DA CUNHA et al., 2020).

A concentração de células viáveis nas formulações de inoculantes 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., 2018). 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 em hortaliças frescas (CRESPO-SEMPERE et al., 2013; ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; YANG et al., 2013), de fitopatógenos em plantas (AL-DAOUD et al., 2017; TEMPLE et al., 2013), bem como para detectar agentes de controle biológico em superfícies de plantas (SOTO-MUÑOZ et al., 2014). Mais recentemente foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, um ensaio PMA-qPCR para a quantificação de células viáveis de *A. brasilense* em raízes de milho, o qual demonstrou que este método é confiável para monitoramento da viabilidade da bactéria em plantas inoculadas de milho (DA CUNHA et al., 2020).

3.7 FUNDAMENTOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Atualmente existe uma grande abundância de estudos científicos disponíveis na literatura sobre os mais variados assuntos e temas, no entanto, muitos dos estudos disponíveis nem sempre são homogêneos em relação ao desenho, condições operacionais, metodologias e amostragem utilizadas, ou ainda apresentam abordagens que podem lidar com a questão de pesquisa de diferentes formas, o que aumenta a complexidade das evidências e a síntese das conclusões (BELLO et al., 2015).

A revisão sistemática (RS) apresenta-se como uma abordagem de estudo com altos níveis de evidência e quando bem conduzida é considerada uma solução viável para seleção de informações científicas. A RS é definida como uma revisão que utiliza um método sistemático para resumir evidências sobre questões com um plano de estudo detalhado e abrangente (TAWFIK et al., 2019). Este tipo de revisão minimiza o viés por meio de pesquisas exaustivas na literatura e buscas imparciais com maior grau de eficiência e qualidade (LIBERATI et al., 2009).

A construção de uma RS de qualidade deve atender a algumas características específicas e para isso utiliza-se guias e protocolos oficiais, como o PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*). O PRISMA é um dos protocolos mais utilizados para este tipo de revisão e consiste na verificação de 27 itens e um diagrama de fluxo, e foi desenvolvido para aumentar a transparência e precisão das revisões (LIBERATI et al., 2009). As etapas básicas na condução de uma RS geralmente começam com a formulação da pergunta de pesquisa, identificação de trabalhos relevantes, avaliação dos estudos incluídos e resumo das evidências, além da interpretação dos resultados (KHAN et al., 2003; RYŚ et al., 2009).

A pergunta de pesquisa deve ser elaborada de forma que seja viável, interessante, nova, ética e relevante e para isso utiliza-se a estratégia PICOS (*Population, Intervention, Control group, Outcome e Study design*) ou suas variantes. Após a formulação da pergunta de pesquisa recomenda-se uma busca preliminar para identificar estudos relevantes, garantir a validade da ideia proposta, evitar a duplicação de estudos, entre outros (TAWFIK et al., 2019; YANNASCOLI et al., 2013). Uma vez validada a pergunta de pesquisa, as estratégias de busca devem ser montadas, com uso de palavras-chave específicas ligadas ao tema em questão. Atualmente existem guias com recomendações para montagem de tais estratégias como o *PRESS - Peer review of electronic search strategies: 2015 guideline statement* (MCGOWAN et al., 2016), que auxiliam nas buscas em diferentes bases de dados. Para definir os critérios de elegibilidade que decidirão quais estudos farão parte da RS a pergunta de pesquisa deve estar bem definida. Os critérios devem definir as características dos estudos que devem ser incluídos e excluídos do estudo, também devem ser bem estabelecidos e alinhados com a pergunta de pesquisa (YANNASCOLI et al., 2013). Após a definição de todas as características da RS, da seleção dos estudos e extração dos dados, é necessário fazer a avaliação da metodologia (risco de viés). A análise do risco de viés é considerada uma das etapas mais importantes da RS, pois permite a classificação dos estudos incluídos, o que possibilita validar a força e a qualidade da RS (CANTO, 2020). Existem diversos tipos de vieses, que devem ser avaliados de acordo com o tipo de cada estudo, sendo que os principais estão listados e especificados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 - Principais tipos de vieses analisados em revisões sistemáticas

| Viés (<i>bias</i>) | Definição | Medidas preventivas para minimizar o risco de viés |
|---------------------------|---|--|
| <i>Confounding bias</i> | A associação entre a intervenção/exposição e o desfecho difere do seu efeito causal, gerando fatores de confundimento | Presença de grupos controle (não-tratado ou antes do tratamento), randomização e ajuste estatístico. |
| <i>Selection bias</i> | Diferenças entre composição do grupo controle e tratado, grupo não representativo | Número de objetos de estudo, medidas usadas para evitar contaminações entre grupo tratado e controle |
| <i>Attrition bias</i> | Diferenças entre grupos no início e final dos estudos, como perda de amostras ou interrupção de tratamentos | Não existe prevenção, mas é desejado que os autores justifiquem ao longo do estudo |
| <i>Reporting bias</i> | Relato incompleto da metodologia ou resultados obtidos | |
| <i>Analytical bias</i> | Execução adequada de testes estatísticos | |

Fonte: Autora (2023)

A construção do protocolo de pesquisa da revisão sistemática é uma das etapas mais importantes, uma vez que todas as informações sobre a construção da revisão devem estar sintetizadas no mesmo, desde a pergunta de pesquisa, definição da equipe de revisores, bases de dados utilizadas, definição das estratégias de busca, critérios de elegibilidade dos estudos, análise do risco de viés, entre outros. O protocolo de pesquisa deve ser revisado e validado por todos os membros da equipe antes da fase de execução ser iniciada, a fim de evitar futuras discordâncias sobre a condução da RS.

CAPÍTULO I

4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ESTRESSE SUBLETAL NA SOBREVIVÊNCIA DE INOCULANTES BACTERIANOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Elisandra Triches da Cunha, Ana Marina Pedrolo, Ana Carolina Maisonnave Arisi

Artigo original publicado em *Archives of Microbiology*, 205:190 (2023)
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03542-8>

4.1 RESUMO

O uso de inoculantes bacterianos comerciais formulados com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) na agricultura tem mostrado destaque significativo nos últimos anos devido aos benefícios de promoção de crescimento fornecidos às plantas por meio de diferentes mecanismos. No entanto, a sobrevivência e a viabilidade das células bacterianas nos inoculantes são afetadas durante o uso e podem diminuir sua eficácia. Estratégias de adaptação fisiológica têm atraído a atenção para resolver o problema de viabilidade. Esta revisão visa fornecer uma visão geral da pesquisa sobre a seleção de estratégias de estresse subletal para aumentar a eficácia de inoculantes bacterianos. As buscas foram realizadas em novembro de 2021 usando os bancos de dados *Web of Science*, *Scopus*, *PubMed* e *Proquest*. As palavras-chave "nitrogen-fixing bactéria", "plant growth-promoting rhizobacteria", "azospirillum", "pseudomonas", "rhizobium", "stress pre-conditioning", "adaptation", "metabolic physiological adaptation", "cellular adaptation", "increasing survival", "protective agent" e "protective strategy" foram usados nas buscas. Foi encontrado um total de 2.573 publicações e 34 estudos foram selecionados para um estudo mais aprofundado do assunto. Com base na análise dos estudos, foram identificadas lacunas e possíveis aplicações relacionadas ao estresse subletal. As estratégias mais utilizadas incluíram estresse osmótico, térmico, oxidativo e nutricional, e o principal mecanismo de resposta celular ao estresse foi o acúmulo de osmólitos, fitormônios e exopolissacarídeos (EPS). Sob estresse subletal, a sobrevivência do inoculante mostrou incrementos positivos após processos de liofilização, dessecação e armazenamento de longo prazo.

4.2 INTRODUÇÃO

A manutenção da produtividade atualmente depende do uso de fertilizantes químicos. Estes fertilizantes fornecem nutrientes às plantas rapidamente, trazendo resultados mais rápidos, porém, estão associados a um alto custo ambiental incluindo a poluição do solo e da água. O uso de microrganismos benéficos em inoculantes para sistemas agrícolas representa uma estratégia ecológica sustentável que permite o desenvolvimento vegetal, por meio da acessibilidade de nutrientes às plantas, controle de doenças e tolerância à estresses abióticos, além de minimizar o uso de insumos químicos sem afetar a produtividade (FERREIRA; SOARES; SOARES, 2019; KOUR et al., 2020). Entre estes microrganismos, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) apresentam diversos mecanismos de promoção de crescimento e captação de nutrientes, e por isso têm despertado grande interesse na agroindústria (LOBO et al., 2019).

Os inoculantes são compostos que contêm células vivas de microrganismos potencialmente benéficos para o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais de importância econômica e atualmente com grande destaque e escala de mercado para uso na agricultura (KOUR et al., 2020; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Diversos inoculantes foram desenvolvidos para uso em diferentes culturas em todo o mundo e, embora seu uso ajude a resolver problemas associados à agricultura extensiva, seu sucesso enfrenta alguns desafios críticos. Existem variações em seus efeitos nas condições de campo, inconsistência nos resultados e declínio nas populações de inoculantes e sua atividade após aplicação no solo. Esses desafios estão relacionados a fatores externos, como o clima, condições do solo, interações bióticas e disponibilidade de nutrientes, uma vez que diversas condições ambientais podem afetar diretamente os microrganismos presentes na formulação de inoculantes (BERNINGER et al., 2018a; HUNGRIA et al., 2010; LANA et al., 2012; MOHANRAM; KUMAR, 2019; O'CALLAGHAN, 2016; TURAN et al., 2012; VASSILEV et al., 2015). Microrganismos introduzidos no solo devem superar desafios ao lidar com condições desfavoráveis no ambiente. Aumentar o desempenho, a persistência e a eficiência de inoculação dos inoculantes do solo é uma prioridade para aproveitar seu potencial e, ao mesmo tempo, reduzir os riscos de resultados adversos (QIU et al., 2019).

Portanto, é necessário desenvolver pesquisas que avaliem estratégias fisiológicas e tecnológicas para formular inoculantes estáveis e funcionais para permitir a sobrevivência de microrganismos no solo resultando em alta produtividade e agricultura sustentável (SZOPA et

al., 2022; THAKUR, 2018). A qualidade da formulação dos inoculantes é crucial para o desenvolvimento efetivo das plantas associadas. Deve, portanto, ser rigorosamente controlada de acordo com os níveis de qualidade estabelecidos pelo órgão regulador de cada país (BASHAN et al., 2014). A sobrevivência das células bacterianas em inoculantes é considerada um dos principais desafios que restringem a sua comercialização. Uma alta concentração de células viáveis nas formulações de inoculantes é um fator fundamental para que a colonização vegetal ocorra de forma satisfatória e, conseqüentemente, para melhorar o desenvolvimento vegetal e incrementar a produtividade. No entanto, a sobrevivência dessas células pode ser afetada em diferentes estágios de manipulação de inoculantes, devido à sua exposição a fatores físicos, químicos e biológicos em condições semi-controladas ou não controladas (BACKER et al., 2018; BERNINGER et al., 2018a; MOHANRAM; KUMAR, 2019).

Várias estratégias são propostas atualmente para melhorar a sobrevivência das células bacterianas nestas formulações, a grande maioria baseada em mecanismos naturais de proteção biológica, desenvolvidos pelos próprios microrganismos. Espécies de rizobactérias têm demonstrado mecanismos fisiológicos de proteção como produção de osmólitos, proteínas responsivas ao estresse, exopolissacarídeos (EPS) e enzimas de reparo do DNA sob condições de estresse ambiental. A adição externa de substâncias protetoras, aplicação de estresse subletal e formulações em consórcio são algumas destas estratégias com potencial para serem utilizadas na fabricação dos inoculantes bacterianos (BERNINGER et al., 2018a; CABREFIGA et al., 2014b).

No entanto, estudos com aplicação desse tipo de estratégia ainda são escassos, e os principais efeitos e eficácia ainda não foram totalmente elucidados, uma vez que cada espécie ou estirpe bacteriana pode reagir de maneira diferente a cada agente estressor (ATIENO; LESUEUR, 2019; BERNINGER et al., 2018a; GREFFE; MICHIELS, 2020a).

Esta revisão sistemática teve como objetivo avaliar os avanços no uso de estratégias de estresse subletal com BPCV em inoculantes para melhorar suas sobrevivência e a eficácia da interação com plantas. Foram discutidos os principais tipos de estresse subletal, efeitos causados pelo estresse, respostas primárias das células bacterianas aos estressores e a eficiência destas bactérias estressadas quando associadas a plantas. A principal contribuição deste artigo foi a identificação de lacunas e estratégias na seleção dos estresses adequados para uma adaptação efetiva das células utilizadas para formulação de inoculantes e,

consequentemente, melhor desenvolvimento das plantas associadas. O presente estudo pode servir como base científica de qualidade para pesquisas futuras.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Definição da questão de pesquisa, protocolo e estratégia de busca

Uma revisão sistemática de estudos publicados relatando os efeitos da aplicação de estratégias de estresse subletal na sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes foi desenvolvida de junho de 2021 à junho de 2022. A revisão sistemática foi preparada de acordo com os critérios metodológicos estabelecidos pelo guia *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis Procotocols* (PRISMA) (SHAMSEER et al., 2015). Os detalhes sobre a condução desta revisão sistemática estão resumidos no protocolo de pesquisa (Apêndice 1).

As palavras-chave "nitrogen-fixing bacteria", "plant growth-promoting rhizobacteria", "azospirillum", "pseudomonas", "rhizobium", "stress pre-conditioning", "adaptation", "metabolic physiological adaptation", "cellular adaptation", "increasing survival", "protective agent" e "protective strategy" foram usadas para definir a intervenção. Dois revisores independentes, R1 e R2 participaram diretamente das fases de busca e seleção dos estudos incluídos nesta revisão sistemática, com as discrepâncias resolvidas por meio de consulta com um terceiro revisor, R3. As etapas de extração de dados, análise do risco de viés e estruturação da revisão sistemática foi realizada pelo R1 e revisado por toda equipe de revisores (R1, R2 e R3). A equipe de revisores atuou em conjunto para definição do tema da revisão sistemática e estruturação do protocolo de pesquisa.

A proposta inicial desta revisão sistemática resultou na identificação de duas perguntas de pesquisa, sendo a primeira sobre os efeitos das estratégias de estresse subletal na sobrevivência de bactérias associativas em cultivo e a segunda sobre os efeitos na sobrevivência das mesmas em plantas já inoculadas. Após a definição da pergunta de pesquisa foi realizada uma busca preliminar na literatura a fim de determinar a existência de revisões sistemáticas já publicadas, em andamento ou protocolos existentes sobre o tema em questão. A definição da estratégia de busca foi realizada de acordo com as recomendações do guia *PRESS - Peer review of eletronic search strategies: 2015 guideline statement* (MCGOWAN et al., 2016). As bases de dados *Web of Science*, *Scopus*, *Pubmed* e *Proquest* foram utilizadas na pesquisa de estudos publicados elegíveis usando termos específicos relacionados à

pergunta da pesquisa. A estratégia de busca utilizada em cada base de dados consistiu no uso das palavras-chave elegidas combinadas com operadores booleanos para especificar a pesquisa (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Critérios de elegibilidade dos estudos seguindo a estratégia PICOS

| Base de dados | Estratégia de busca |
|-----------------------|--|
| <i>Web of Science</i> | TS= ("nitrogen-fixing bacteria" OR "plant growth-promoting bacteria" OR "plant growth-promoting rhizobacteria" OR " azospirillum" OR "pseudomonas" OR "rhizobium") AND TS= ("stress pre-conditioning" OR "physiological* stress*" OR "osmotic stress" OR "physiological adaptation" OR "metabolic adaptation*" OR "cellular adaptation*" OR "increasing survival" OR "improving* survival" OR "protective agent*" OR "protective strategy*") |
| <i>Scopus</i> | (TITLE-ABS-KEY ("nitrogen-fixing bacteria" OR "plant growth-promoting bacteria" OR "plant growth-promoting rhizobacteria" OR " azospirillum" OR "pseudomonas" OR "rhizobium") AND TITLE-ABS-KEY ("stress pre-conditioning" OR "physiological* stress*" OR "metabolic adaptation*" OR "cellular adaptation*" OR "increasing survival" OR "improving* survival" OR "protective agent*" OR "protective strategy*")) |
| <i>Pubmed</i> | ("nitrogen-fixing bacteria" [Title/Abstract] OR "plant growth-promoting bacteria" [Title/Abstract] OR "plant growth-promoting rhizobacteria" [Title/Abstract] OR " azospirillum" [Title/Abstract] OR "pseudomonas" [Title/Abstract] OR "rhizobium" [Title/Abstract]) AND ("stress pre-conditioning" [Title/Abstract] OR "physiological* stress*" [Title/Abstract] OR "osmotic stress" [Title/Abstract] OR "physiological adaptation" [Title/Abstract] OR "metabolic adaptation*" [Title/Abstract] OR "cellular adaptation*" [Title/Abstract] OR "increasing survival" [Title/Abstract] OR "improving* survival" [Title/Abstract] OR "protective agent*" [Title/Abstract] OR "protective strategy*" [Title/Abstract]) |
| <i>Proquest</i> | ((("nitrogen-fixing bacteria" OR "plant growth-promoting bacteria"OR "plant growth-promoting rhizobacteria" OR " azospirillum" OR "pseudomonas" OR "rhizobium") AND TS= ("stress pre-conditioning" OR "physiological* stress*" OR "osmotic stress" OR "physiological adaptation" OR "metabolic adaptation*" OR "cellular adaptation*" OR "increasing survival" OR "improving* survival" OR "protective agent*" OR "protective strategy*")) AND PEER(yes)) |

Fonte: Autora (2023)

4.3.2 Critérios de elegibilidade

Estudos originais revisados por pares escritos em inglês e sem restrições de data foram incluídos nesta revisão sistemática de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos com base na estratégia *PICOS* (*Population, Intervention, Controls, Outcomes and Study design*) (Tabela 2.2). Foram incluídos estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias associativas, agentes de biocontrole ou BPCV nos quais houve aplicação de estratégias de estresse subletais durante o crescimento bacteriano (em cultura ou na planta) e subsequentes avaliações da sobrevivência.

Tabela 2.2 - Critérios de elegibilidade dos estudos seguindo a estratégia PICOS

| PICOS | Inclusão | Exclusão |
|--|---|---|
| População | <ul style="list-style-type: none"> Bactérias fixadoras de nitrogênio; bactérias associativas; agentes de biocontrole ou BPCV | <ul style="list-style-type: none"> Outros tipos de microrganismos ou populações Estudos com classificação taxonômica não especificada |
| Intervenção | <ul style="list-style-type: none"> Estratégias de pré-condicionamento à estresse Aplicação de estresse fisiológico durante o crescimento bacteriano | <ul style="list-style-type: none"> Aplicação de estresse visando apenas adaptações que não causam alterações fisiológicas |
| Controle | <ul style="list-style-type: none"> Reporta ou mede o crescimento bacteriano, germinação ou variáveis de crescimento vegetal sem a aplicação do estresse | <ul style="list-style-type: none"> Estudos sem pelo menos um grupo controle |
| Desfecho (<i>outcomes</i>) | <ul style="list-style-type: none"> Reporta ou mede a eficácia ou sobrevivência de bactérias associativas com ou sem a aplicação do estresse | <ul style="list-style-type: none"> Estudos que não reportam a sobrevivência ou eficácia de bactérias associativas com ou sem a aplicação do estresse |
| Tipo de estudo (<i>study design</i>) | <ul style="list-style-type: none"> Estudos de pesquisa originais e escritos em inglês, com resumos disponíveis Estudos da literatura científica, indexado em periódicos, revisado por pares e disponíveis na base de dados Estudos com dados e metodologia completos | <ul style="list-style-type: none"> Outros tipos de estudos |

Fonte: Autora (2023).

4.3.3 Triagem e seleção dos estudos

A triagem e seleção inicial dos estudos incluídos na revisão sistemática foram realizadas utilizando o software *State of the Art through Systematic Review: Start Software*, desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa em Engenharia de Software - Lapes - UFSCar (v 3.3 Beta 03). O software *Microsoft Office Excel* ® foi usado para execução manual da inclusão dos estudos na revisão sistemática. Os estudos foram classificados com base nos critérios de elegibilidade previamente definidos (ver item 4.3.2). Para a etapa da triagem os estudos encontrados nas buscas foram selecionados ou não após a remoção dos arquivos duplicados, pela leitura dos títulos e resumos pelo primeiro e segundo revisores, R1 e R2, respectivamente. Após a triagem, os estudos selecionados inicialmente foram incluídos ou não na revisão sistemática após a leitura completa do texto pelo R1.

4.3.4 Extração dos dados

A extração dos dados foi realizada de forma manual pelo R1 utilizando o software *Microsoft* ® e consistiu na sumarização das seguintes informações: autores, ano de publicação, título, país de origem, palavras-chave, identificação e tipo de fonte, DOI, taxonomia, métodos de avaliação da sobrevivência e unidade de medida, tipo de estratégia de estresse, especificação do agente estressor, concentrações e condições experimentais, substâncias adicionais, período de avaliação, espécie vegetal inoculada, condições de crescimento da planta, período de avaliação do crescimento, parâmetros avaliados, principais objetivos e principais resultados. O software *VOSviewer* (v. 1.6.6) foi utilizado para geração de clusters usando um método de contagem binário que resultou na combinação das palavras-chave encontradas nos estudos selecionados. Os critérios utilizados no software incluíram o mínimo de uma ocorrência, resultando em 108 termos os quais foram agrupados por similaridade ou inter-relação.

4.3.5 Análise de risco de viés

A fim de determinar o nível de qualidade de cada estudo, as fontes de viés foram determinadas por meio de discussão entre a equipe de revisores. As fontes de viés avaliadas nesta revisão foram definidas usando *The Catalogue of Bias – CEBM – University of Oxford* (<https://catalogofbias.org/biases/>). Os parâmetros de validação foram discutidos pela equipe de revisores e foi definida a organização em três níveis de qualidade: alta, média e baixa

(Apêndice 2). Os estudos foram classificados em nível de qualidade alto, quando todos os parâmetros obedeceram aos critérios dentro desta categoria, em nível de qualidade médio ou baixo, quando pelo menos um parâmetro obedeceu aos critérios da categoria, respectivamente. Quando dois parâmetros obedeceram a categoria de nível médio, o estudo foi classificado no nível de qualidade baixo. O time de revisores contribuiu assiduamente para a avaliação do risco de viés e classificação dos estudos de acordo com níveis de qualidade, sendo a classificação realizada pelo R1 e checada pelos outros revisores.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Pesquisa, seleção e análise de abrangência dos estudos

Em novembro de 2021, as pesquisas na literatura identificaram 2.573 estudos, dos quais 258 dos estudos foram removidos como duplicados. Na etapa de triagem realizada no período de novembro de 2021 a junho de 2022, os 2.315 estudos foram analisados com base nos títulos e resumos, e de acordo com os critérios de elegibilidade, foram selecionados 64 estudos. Após a triagem, os estudos selecionados foram analisados rigorosamente com base no texto completo e apenas 34 estudos preencheram os critérios de elegibilidade estabelecidos para serem incluídos na revisão sistemática (Figura 2.1).

Dos 64 estudos selecionados das buscas na literatura, 2 foram excluídos por estarem duplicados, 1 por não estar disponível na base de dados, 2 por serem desenvolvidos com espécie bacteriana não pertencente ao grupo das bactérias benéficas associativas, 3 por apresentarem dados ou metodologia incompleta, 20 por não reportar/medir os efeitos da aplicação do estresse na bactéria e 2 por terem aplicado a estratégia de estresse após o crescimento microbiano, não configurando assim uma estratégia de aplicação de estresse subletal.

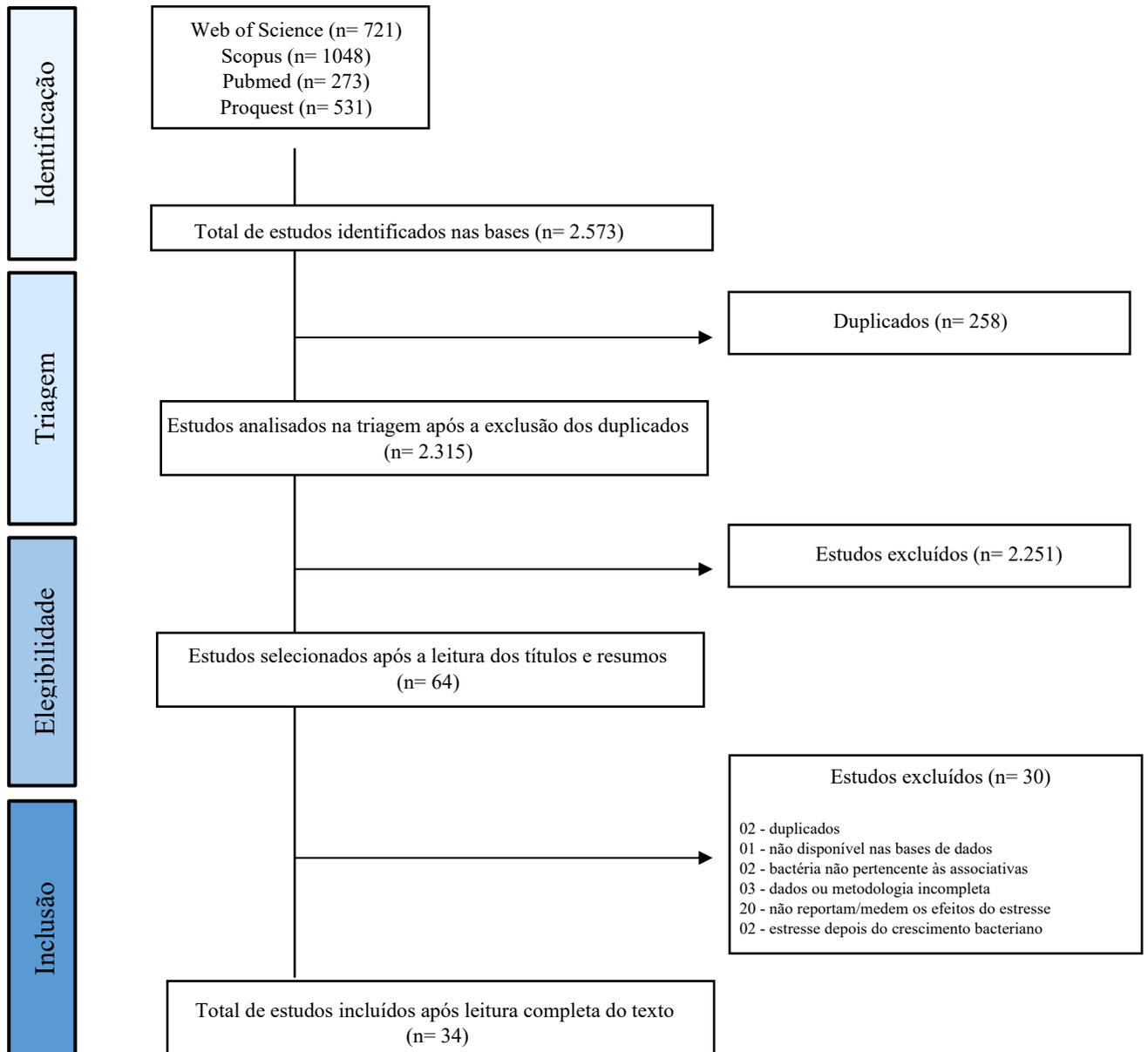


Figura 2 1 - Fluxograma das etapas de triagem e seleção, seguidos da inclusão dos estudos na revisão sistemática, onde n denota o número de estudos resultante após cada etapa. Fonte: Autora (2023).

Os autores dos 34 estudos incluídos na revisão sistemática foram identificados, nomeados com numeração crescente após serem listados em ordem alfabética e, a seguir, classificados quanto ao nível de abrangência (Tabela 2.3) com base em parâmetros de validação estabelecidos pela equipe de revisores (Apêndice 2). Apenas 13 dos estudos apresentaram alta abrangência, com todos os parâmetros avaliados classificados nesta categoria. Em contrapartida, 19 estudos apresentaram média abrangência, com pelo menos um dos parâmetros classificados na categoria. Outros 2 estudos foram classificados como de baixa abrangência, apresentando pelo menos duas classificações dentro da categoria média.

Apesar da variabilidade no nível de abrangência dos estudos, todos os 34 foram mantidos nesta revisão sistemática e todos são citados a seguir: (AHMAD et al., 2013; BAZIRE et al., 2007; BONATERRA et al., 2007; BRAEKEN et al., 2008; CABREFIGA et al., 2011a, 2014b; CASTERIANO; WILKES; DEAKER, 2013a; CHANRATANA et al., 2017; CHIEN; WANG; LIN, 2014; CHOUDHURY; AZAD; KALITA, 2010; CROCKFORD; BEHNCKE; WILLIAMS, 1996; DRAGHI et al., 2016; DROUIN; PRÉVOST; ANTOUN, 2000b; FREEMAN et al., 2013; GHOSH; GUPTA; MOHAPATRA, 2019; GRILLO-PUERTAS et al., 2018; HACHICHO; BIRNBAUM; HEIPIEPER, 2017; KHARE; ARORA, 2011a; LEANDRO et al., 2021; LIN et al., 2014; MARINKOVIĆ et al., 2013; MAZHAR et al., 2016; MHAMDI et al., 2015; MIRPURI et al., 1997; MOODY et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2016; PEZZONI; PIZARRO; COSTA, 2012; REINA-BUENO et al., 2012; SANDHYA et al., 2009; SORIA et al., 2006; TANG et al., 2020; TEWARI; ARORA, 2014; WANG; TANG; WANG, 2020a, 2020b).

Tabela 2.3 - Identificação e abrangência dos estudos incluídos na revisão sistemática

| ID ^a | Referência | NQ ^b | ID ^a | Referência | NQ ^b |
|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| 1 | AHMAD et al. (2013) | ● | 18 | KHARE; ARORA (2011) | ● |
| 2 | BAZIRE et al. (2007) | ● | 19 | LEANDRO et al. (2021) | ● |
| 3 | BONATERRA et al. (2007) | ● | 20 | LIN et al. (2014) | ● |
| 4 | BRAEKEN et al. (2008) | ● | 21 | MAZHAR et al. (2016) | ● |
| 5 | CABREFIGA et al. (2014) | ● | 22 | MARINKOVIĆ et al. (2013) | ● |
| 6 | CABREFIGA et al. (2011) | ● | 23 | MHAMDI et al. (2015) | ● |
| 7 | CASTERIANO et al. (2013) | ● | 24 | MIRPURI et al. (1997) | ● |
| 8 | CHANRATANA et al. (2017) | ● | 25 | MOODY et al. (2019) | ● |
| 9 | CHIEN et al. (2014) | ● | 26 | OLIVEIRA et al. (2016) | ● |
| 10 | CHOUDHURY et al. (2010) | ● | 27 | PEZZONI et al. (2012) | ● |
| 11 | CROCKFORD et al. (1996) | ● | 28 | REINA-BUENO et al. (2012) | ● |
| 12 | DRAGHI et al. (2016) | ● | 29 | SANDHYA et al. (2010) | ● |
| 13 | DROUIN et al. (2000) | ● | 30 | SORIA et al. (2006) | ● |
| 14 | FREEMAN et al. (2013) | ● | 31 | TANG et al. (2020) | ● |
| 15 | GHOSH et al. (2019) | ● | 32 | TEWARI; ARORA (2014) | ● |
| 16 | GRILLO-PUERTAS et al. (2018) | ● | 33 | WANG et al. (2020) | ● |
| 17 | HACHICHO et al. (2017) | ● | 34 | WANG et al. (2020b) | ● |

^a Identificação, ^b Nível de abrangência, ● alta, ● média, ● baixa. Fonte: Autora (2023)

4.4.2 Composição taxonômica dos estudos

Entre as bactérias benéficas associativas utilizadas em todos estudos incluídos nesta revisão sistemática, apenas dois filos foram identificados, sendo o filo mais representativo *Proteobacteria* (95,8%) seguido do filo *Firmicutes* (4,2%). Para o filo *Proteobacteria* as classes *Gammaproteobacteria* (31,9%), *Alphaproteobacteria* (29,2%), e *Betaproteobacteria* (5,6%) foram identificadas nos estudos. Para o filo *Firmicutes*, a classe *Bacilli* (2,8%) foi identificada nos estudos (Figura 2.2 A). Um total de 11 gêneros foi identificado, com os gêneros *Pseudomonas* (47,9%) e *Rhizobium* (18,8%) sendo os mais frequentes. Outros gêneros incluindo *Bradyrhizobium*, *Glucanacetobacter*, *Sinorhizobium*, *Cupriavidus*, *Mesorhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Methylobacterium* tiveram frequência menor nos estudos avaliados ($\leq 7\%$) (Figura 2.2 B).

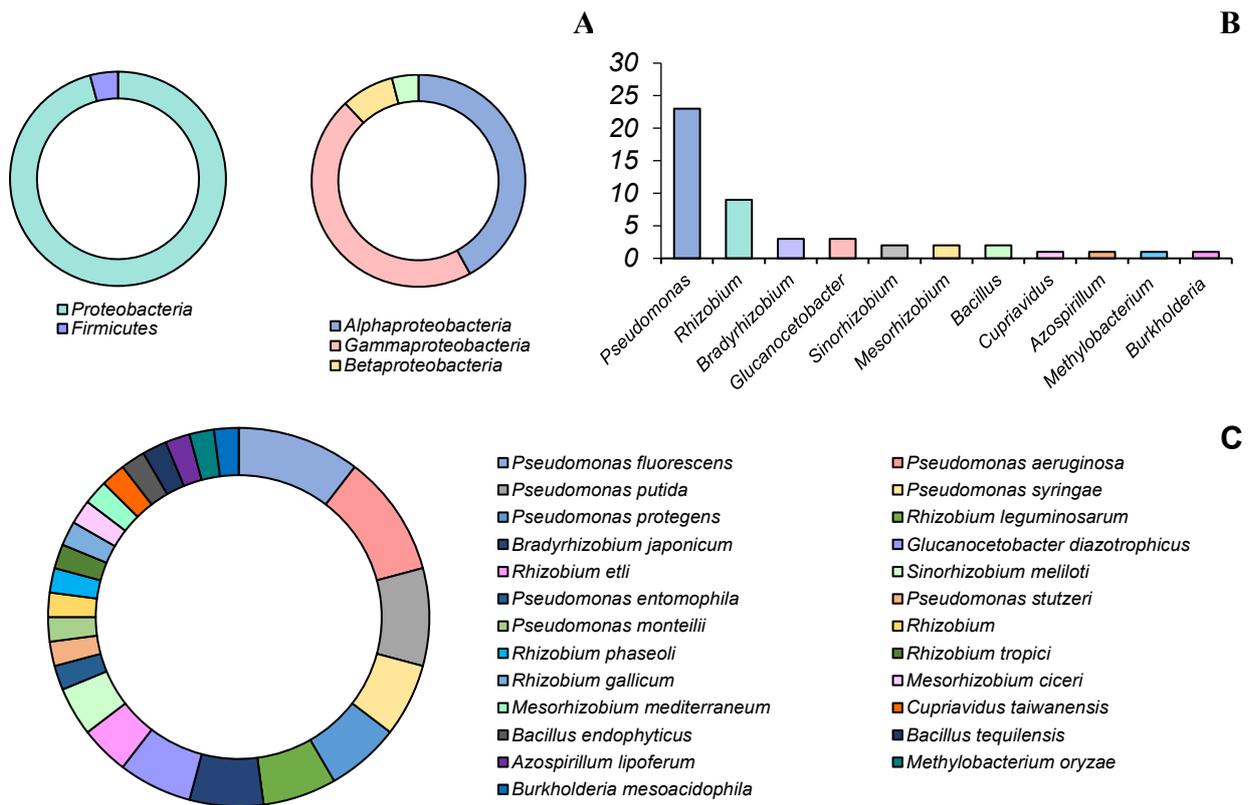


Figura 2.2 - Composição taxonômica dos estudos incluídos na revisão sistemática. Classificação e frequência de uso das bactérias abordadas nos estudos de acordo com (A) filos e classes, (B) gêneros e (C) espécies. Fonte: Autora (2023).

Entre as 25 espécies identificadas nos estudos, as espécies mais utilizadas foram *Pseudomonas fluorescens* (10,4%), *Pseudomonas putida* (8,3%) e as espécies *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas protegens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Glucanocetobacter diazotrophicus* (6,3%). As outras espécies identificadas tiveram frequência menor de uso ($\leq 4,2\%$) (Figura 2.2 C). As espécies utilizadas nos estudos foram classificadas de acordo com o tipo principal de colonização com as espécies vegetais associadas. Eles foram classificados em colonização de superfície, intercelular e nódulo (Tabela 2.4). Das 25 espécies classificadas, 44% apresentam colonização de nódulos, 36% colonização de superfície e 20% colonização intercelular.

Tabela 2.4 - Classificação das espécies utilizadas nos estudos segundo o tipo de colonização das raízes das plantas associadas

| Espécies | Colonização de superfície | Colonização intercelular | Colonização de nódulos |
|---|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>Azospirillum lipoferum</i> | + | - | - |
| <i>Bacillus endophyticus</i> | - | + | - |
| <i>Bacillus tequilensis</i> | - | + | - |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | - | - | + |
| <i>Burkholderia mesoacidophila</i> | - | + | - |
| <i>Cupriavidus taiwanensis</i> | - | - | + |
| <i>Glucanacetobacter diazotrophicus</i> | - | + | - |
| <i>Mesorhizobium ciceri</i> | - | - | + |
| <i>Mesorhizobium mediterraneum</i> | - | - | + |
| <i>Methylobacterium oryzae</i> | - | + | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas monteilii</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas protegens</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas putida</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | + | - | - |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | + | - | - |
| <i>Rhizobium spp.</i> | - | - | + |
| <i>Rhizobium etli</i> | - | - | + |
| <i>Rhizobium gallicum</i> | - | - | + |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | - | - | + |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> | - | - | + |
| <i>Rhizobium tropici</i> | - | - | + |

Fonte: Autora (2023).

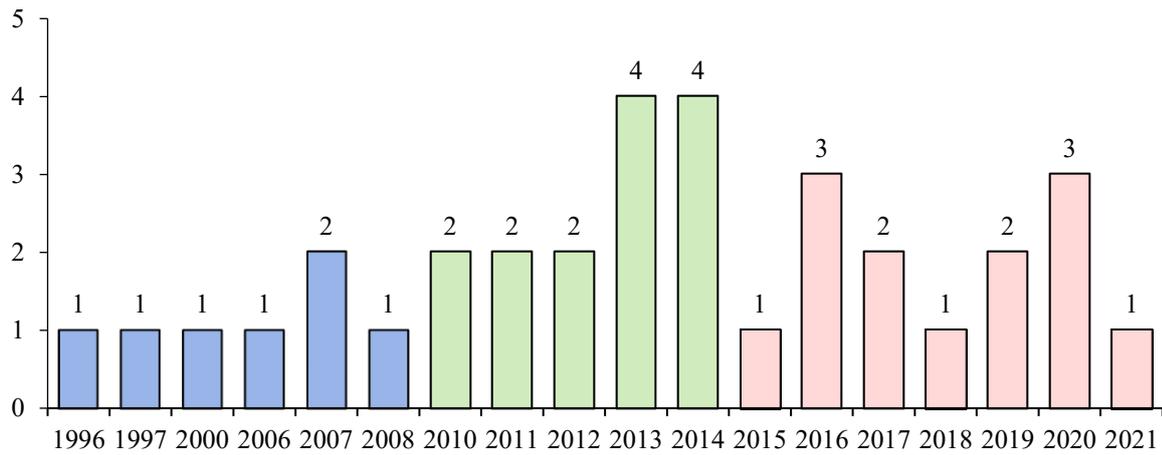
4.4.3 Distribuição temporal e geográfica e correlação com as espécies nos estudos

A distribuição temporal consistiu no número de estudos publicados por ano e está resumido na Figura 2.3 A. A evolução do número de estudos pode ser dividida em três períodos: 1996 - 2009: número reduzido de estudos (7), 2010 - 2015: um aumento considerável no número de estudos (14) e 2016 - 2021: número de estudos se manteve (13). A distribuição temporal foi correlacionada com as espécies frequentemente avaliadas nos estudos (Figura 2.3 B). No primeiro período (1996 a 2009), a espécie mais utilizada nos estudos foi *R. leguminosarum* (29%). Outras espécies com menor frequência de uso, como *P. putida*, *B. japonicum*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *R. etli* também foram observadas. No

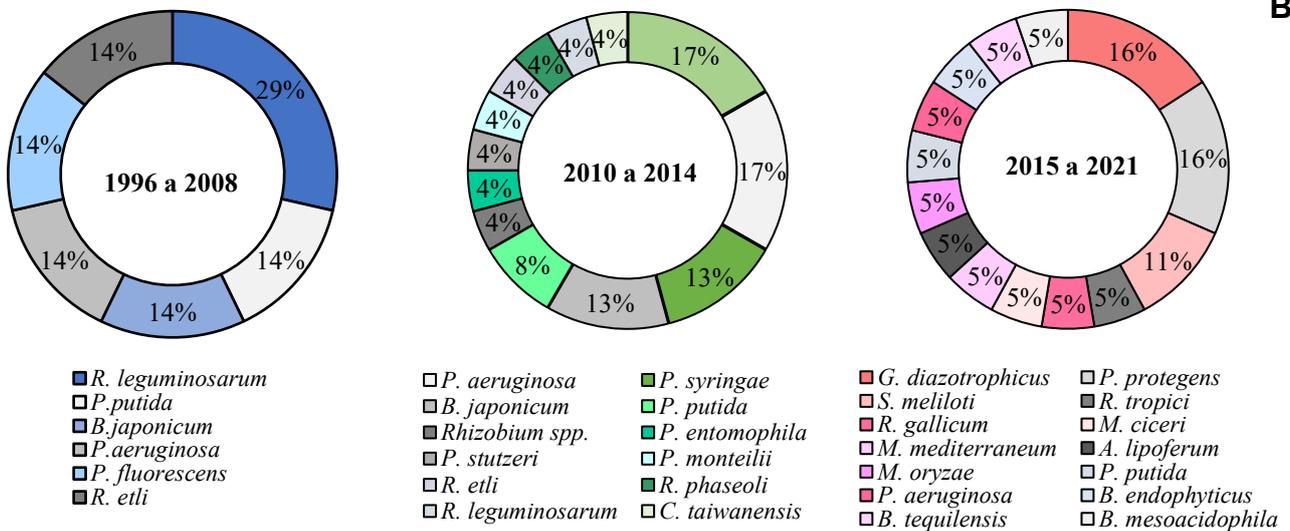
segundo período (2010 a 2014), houve maior frequência de uso das espécies *P. fluorescens* (17%), *P. aeruginosa* (17%), *P. syringae* (13%) e *B. japonicum* (13%). Além disso, no terceiro período (2015 a 2021), os estudos utilizaram com frequência espécies de *G. diazotrophicus* (16%), *P. protegens* (16%) e *S. meliloti* (11%).

A distribuição geográfica (Figura 2.3 C) dos estudos incluídos na revisão sistemática concentrou-se em ordem decrescente nos continentes, Ásia (13), Europa (10), América do Sul (6), América do norte (4), África (1) e Oceania (1), respectivamente. Do total de estudos analisados, a grande maioria teve origem na Índia (5), na China (4), na Espanha (4) e na Argentina (4). Os demais países como EUA, Brasil, Paquistão e Reino Unido, Tunísia, Canadá, Coreia do Sul, Taiwan, Bélgica, França, Alemanha, Sérvia e Austrália tiveram um número menor de estudos relacionados ao tema desta revisão sistemática (≤ 3).

A



B



C

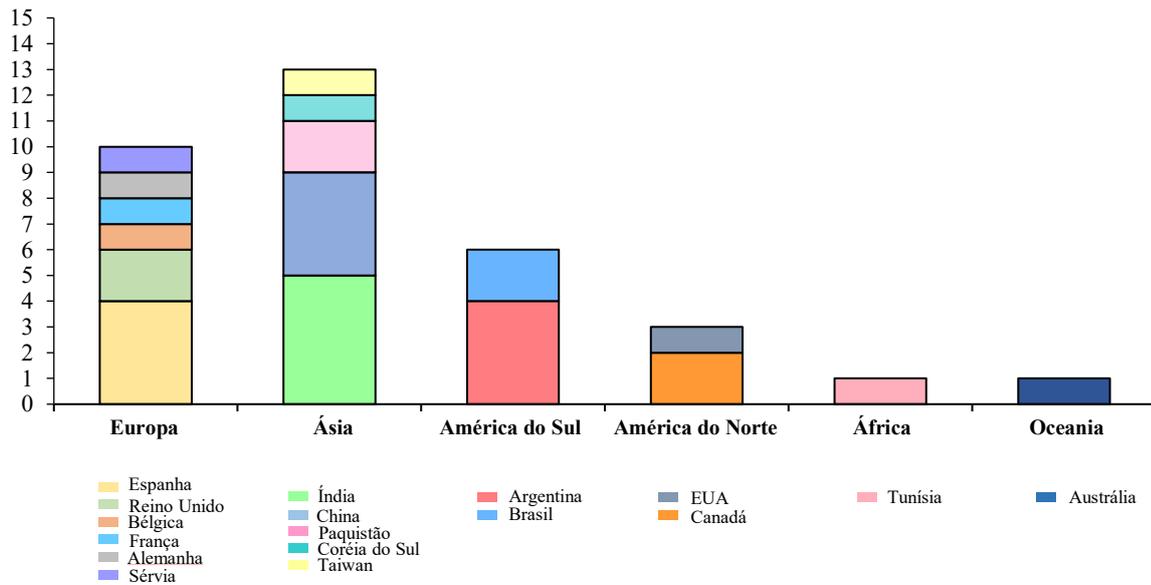


Figura 2.3 - Distribuição temporal (A), ocorrência de espécies em períodos delimitados (B) e distribuição geográfica (C) dos estudos incluídas na revisão sistemática. Fonte: Autora (2023).

4.4.5 Estratégias de estresse subletal e características gerais dos estudos

As frequências de aplicação das estratégias de estresse subletal nos estudos incluídos na revisão sistemática estão resumidas na Figura 2.6 A. Entre os 6 tipos de estresse encontrados nos estudos, os mais frequentemente usados foram o estresse osmótico (51%), estresse térmico (14%), estresse oxidativo (13%) e estresse nutricional (13%). Os demais tipos de estresse (estresse de pH e estresse de radiação) não tiveram frequência maior do que 5%.

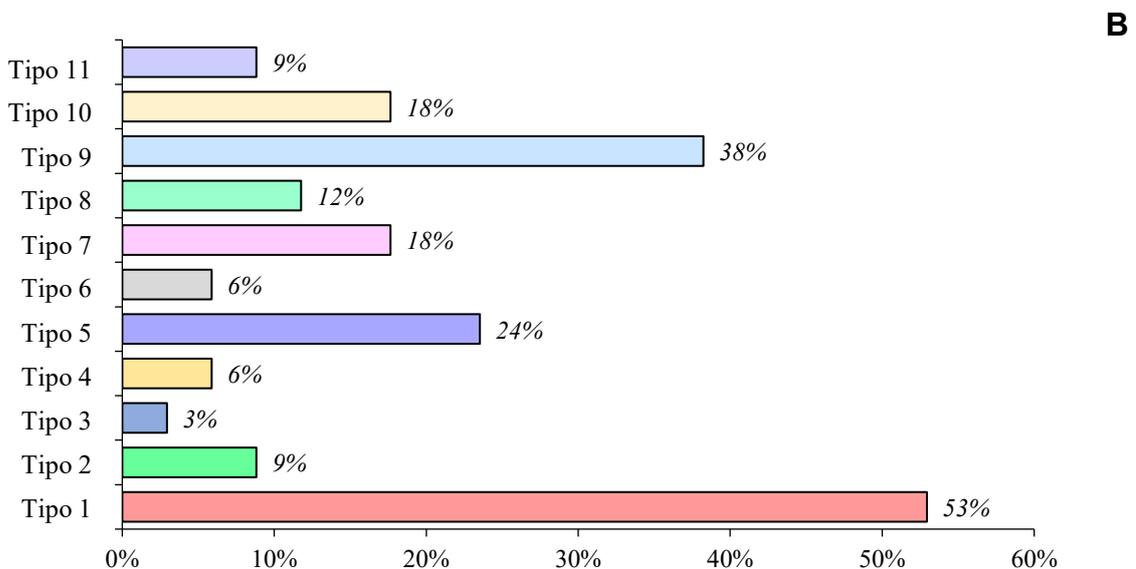
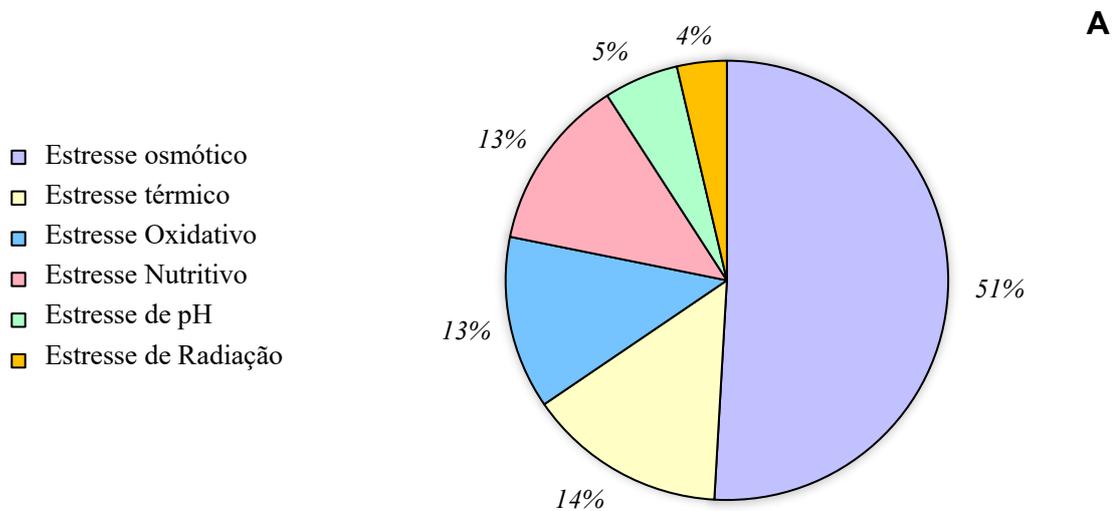


Figura 2.6 - Frequência de aplicação das estratégias de estresse fisiológico nos estudos incluídos na revisão sistemática (A) e frequência do tipo de resposta das células bacterianas após aplicação do estresse (B). Fonte: Autora (2023).

A Tabela 2.5 descreve as principais características dos estudos incluídos na revisão sistemática, incluindo as bactérias utilizadas, fontes primárias de estresse, parâmetros e período de avaliação da sobrevivência, agentes estressores utilizados suas concentrações e condições experimentais, além dos principais resultados encontrados.

Os parâmetros de sobrevivência mais discutidos foram o crescimento microbiano por medida de densidade óptica (D.O) e contagem de unidades formadoras de colônias (Log UFC. mL⁻¹) das culturas bacterianas. Os períodos de avaliação da sobrevivência mais observados foram de 24 e 48 horas após início do crescimento bacteriano. Para os estudos que aplicaram como estratégia de estresse subletal o estresse osmótico, o principal agente estressor utilizado foi o cloreto de sódio (NaCl) com concentrações variando de 0,01 à 1 mol.L⁻¹. No caso da aplicação de estresse térmico, a estratégia mais utilizada foi uso de calor, com exposição a temperaturas variando de 35 a 50 °C. Para os estudos cuja abordagem foi o uso de estresse oxidativo, o agente estressor mais usado foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), com concentrações de até 50 mmol.L⁻¹. Por fim, foram observadas substituições das fontes de carbono e inanição pela ausência total de glicose no meio para o estresse nutricional.

Entre os resultados mais observados para a grande maioria das estratégias de estresse subletal aplicadas nos estudos, destacou-se a tendência de diminuir as taxas de crescimento microbiano com o aumento da quantidade do agente estressor. Também foi observado o aumento do acúmulo de metabólitos secundários, como osmólitos, fitormônios, exopolissacarídeos (EPS), entre outros, durante a aplicação do estresse. Na presença de substâncias osmoprotetoras, maiores níveis de sobrevivência foram observados após aplicação das estratégias de estresse subletal. Além disso, respostas positivas foram geralmente observadas, como maior tolerância a condições estressantes e melhor sobrevivência após processo de dessecação ou liofilização e armazenamento à longo prazo.

Os principais resultados observados permitiram a classificação dos estudos em 11 tipos de acordo com a resposta das células bacterianas ao agente estressor (Figura 2.6 B). As respostas foram caracterizadas por taxas reduzidas de crescimento microbiano (Tipo 1); aumento das taxas de crescimento microbiano (Tipo 2); formação reduzida de biofilmes/biomassa (Tipo 3); aumento da formação de biofilmes/biomassa (Tipo 4); aumento da síntese de osmólitos protetores (Tipo 5); aumento dos níveis de fitormônios (Tipo 6); aumentos dos níveis de EPS (Tipo 7); aumento na síntese de enzimas e/ou proteínas responsivas ao estresse (Tipo 8); aumento da tolerância e/ou sobrevivência após aplicação de

estresse (Tipo 9); maior sobrevivência à dessecação, liofilização ou processos de armazenamento de longo prazo (Tipo 10).; alterações morfológicas na membrana celular (Tipo 11). As respostas mais frequentes observadas em bactérias após a aplicação de estresse subletal foram a do Tipo 1 (53%), Tipo 9 (38%), Tipo 5 (24%), Tipo 7 e Tipo 10 (18%).

A Tabela 2.6 descreve as principais características dos estudos avaliando a resposta da bactéria em plantas inoculadas e incluiu informações como espécie bacteriana utilizada, principais fontes de estresse, características do inóculo utilizado, espécie vegetal inoculada, condições de crescimento vegetal, período de avaliação do crescimento, parâmetros avaliados e os principais resultados encontrados.

Dos 13 estudos que desenvolveram ensaios para avaliar a sobrevivência bacteriana na planta, apenas 5 utilizaram o inóculo preparado com células pré-adaptadas, previamente estressadas. Os outros 8 estudos utilizaram inóculos preparados em condições normais e avaliaram a sobrevivência aplicando estresse durante o desenvolvimento vegetal, observando o efeito do estresse e da inoculação em conjunto. Alguns estudos também avaliaram a capacidade de biocontrole em resposta à inoculação e aplicação de estresse subletal pela exposição das plantas a patógenos. A maioria dos estudos desenvolveu os ensaios com plantas cultivadas *in vitro*, sob condições salinas ou de estresse osmótico, com períodos de avaliação variando entre 5 e 120 dias. Diversos parâmetros de crescimento vegetal foram avaliados para acessar os efeitos da inoculação após aplicação da estratégia de estresse subletal, incluindo a colonização bacteriana (Log UFC.g^{-1}), incidência de doenças ou capacidade de biocontrole (%), matéria seca e fresca, comprimento de parte aérea e raiz entre outros (Tabela 2.6).

Entre os resultados mais observados em estudos cujos inoculantes foram utilizados após a aplicação do estresse subletal está o aumento na sobrevivência bacteriana nas plantas, na eficiência de biocontrole com a redução de doenças, no peso seco e na produtividade da planta em relação ao controle não adaptado. Para os estudos cujos inoculantes foram preparados de forma convencional e submetidos ao estresse após inoculação, observou-se aumento da matéria seca e do crescimento das plantas, maior tolerância bacteriana às condições estressantes e maior eficácia do biocontrole em comparação com o controle não inoculado ou inoculado sob condições não estressantes.

Os estudos analisados apresentaram diferentes abordagens para avaliar a adaptabilidade ou tolerância das bactérias em condições de estresse. Diferentes tipos de

estresse, parâmetros e períodos de avaliação da sobrevivência, agentes estressores, espécies vegetais inoculadas e concentrações ou condições experimentais foram encontrados para os estudos. Assim, foi impossível avaliar quantitativa e estatisticamente os resultados por meio de meta-análise devido a heterogeneidade das metodologias utilizadas nos estudos incluídos nesta revisão sistemática.

Tabela 2.5 – Resumo das características dos estudos de estresse subletal selecionados na revisão sistemática

| ID ^a | Taxonomia | Tipo de estresse | Parâmetro de avaliação da sobrevivência | Período de avaliação da sobrevivência | Agente estressor | Concentrações/ Condições experimentais | Principais resultados |
|-----------------|--|---|---|---------------------------------------|---|---|--|
| 1 | <i>Pseudomonas syringae</i> (Mk1); <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Mk20; Mk25); <i>Rhizobium phaseoli</i> (M1 – M10) | Osmótico | D.O. 540 | 72 h | NaCl | 0 a 12 Ds.m ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento com aumento da salinidade |
| 2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) | Osmótico | D.O. 570 | 24 h | NaCl | 0,5 mol.L ⁻¹ | ↓ desenvolvimento do biofilme sem osmoprotetor |
| 3 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPS62e) | Osmótico | D.O. 600 | 48 h | NaCl | 0,01 a 0,7 mol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento sem osmoprotetor ↑ sobrevivência à dessecação ↑ trealose e osmólitos |
| 4 | <i>Rhizobium etli</i> (CNPAF512; CMPG8705) | Osmótico; Térmico; Oxidativo | D.O. 600; UFC.mL ⁻¹ ; % sobrevivência | NI | NaCl; Calor; H ₂ O ₂ | 0 a 2,5 mol.L ⁻¹ ; 25 a 45 ° C; 10 mmol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento com aumento da salinidade, após oxidação e acima de 37 °C |
| 5 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPS62e) | Osmótico | Log UFC.mL ⁻¹ | 48 h | NaCl | 0,01 a 0,7 mol.L ⁻¹ | ↑ sobrevivência após liofilização na presença de osmoprotetor |
| 6 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPS62e) | Osmótico; Nutricional | D.O 600; Taxa de crescimento (μ) | 48 h | NaCl; Fontes de C | 0,01 a 0,7 mol.L ⁻¹ ; NI | ↑ taxa de crescimento com estressores combinados |
| 7 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> (TA1); <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (CB1809) | Osmótico | % sobrevivência | 3 a 7 dias | Extrato aquoso de turfa | 12,5, 25 e 100% (m/v) | ↑ tolerância à dessecação ↑ trealose e proteínas responsivas ao estresse ↑ espessamento de membrana |
| 8 | <i>Methylobacterium oryzae</i> (CBMB20) | Nutricional; Radiação; Térmico; Oxidativo; Osmótico | Log UFC.mL ⁻¹ | NI | Razão C/N ou zero glicose; UV; Frio / Calor; H ₂ O ₂ ; NaCl | Alta/Baixa; 0 a 120 seg; 30 a 180 min; 4 a 50 ° C; 0,5 a 3%; 0 a 200 mmol.L ⁻¹ | ↑ EPS, prolina e auxinas ↑ tolerância aos estressores das células agregadas |
| 9 | <i>Cupriavidus taiwanensis</i> (EJ02, BCRC 17206 T e BCRC 17208) | Oxidativo | D.O 600 | 140 h | CdCl ₂ | 0 a 8 mmol.L ⁻¹ | ↑ tolerância à concentração alta de Cd para estirpe EJ02 |
| 10 | <i>Rhizobium</i> (AR1, BR5, BR8, BR12, GR13, AR10, BR13, GM16, GR21) | pH | D.O 540 | 7 dias | NI | pH 4,5 a 6,5 | Melhor taxa de crescimento para isolados de crescimento lento |
| 11 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli (4292) | Oxidativo; Osmótico; Térmico; Nutricional | % sobrevivência | 4 a 6 h | H ₂ O ₂ ; MD; CDNB; NaCl; Calor; Zero glicose | 0 a 50 mmol.L ⁻¹ ; NI; NI; 30 a 45 ° C; NI | ↑ tolerância à oxidação de células privadas de C ↑ tolerância com pré-tratamento de H ₂ O ₂ |
| 12 | <i>Sinorhizobium meliloti</i> (Rm 2011) | pH | D.O. 600; N° células.mL ⁻¹ ; % sobrevivência | NI | NI | Ph 7,0 a 6,0 | ↓ taxa de crescimento e sobrevivência até pH 6,0 a 6,1 ↑ consumo de O ₂ celular |

| | | | | | | | |
|----|--|--|---------------------------------|-----------|---|--|---|
| 13 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> (Lj3, Lj8, Lp0610 e ATCC 10004) | Térmico | % viabilidade | 24 h | Frio | 25 a – 80 °C | ↑ sobrevivência das estirpes Lp0610, Lj3 e Lj8 ↑ sobrevivência da estirpe sensível com aclimatação |
| 14 | <i>Pseudomonas syringae</i> (DC3000, B728a, 1448 ^a); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) | Osmótico | Tempo máximo de crescimento (h) | 140 h | NaCl | 0 a 1 mol.L ⁻¹ | ↑ tolerância ao estresse da estirpe B728 após 8h de exposição ↓ GB e captação de colina |
| 15 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PM389, ZNP1); <i>Bacillus endophyticus</i> (J13); <i>Bacillus tequilensis</i> (J12) | Osmótico | D.O. 600; UFC.mL ⁻¹ | 28 h | PEG 6000 | 25 % | ↓ taxa de crescimento ↑ ou = EPS e fitormônios |
| 16 | <i>Glucanocetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) | Osmótico; Oxidativo; Nutricional | UFC.mL ⁻¹ | 48 h | NaCl; CuSO ₄ ; Cu ₂ O; Cu(OH) ₂ ; Pi | 25 a 200 mmol.L ⁻¹ ; 10 a 100 ppm; 0 a 30 mmol.L ⁻¹ | ↑ tolerância a estressores na presença de fosfatos ↑ formação de biofilmes na presença de fosfatos |
| 17 | <i>Pseudomonas putida</i> (mt-2) | Osmótico | D.O. 560 | 5 ou 32 h | NaCl | 0 a 1 mol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento até 0,7M ↑ hidrofobicidade e saturação de ácidos graxos na membrana celular |
| 18 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Eki) | Osmótico; Nutricional | Log UFC.mL ⁻¹ | 180 dias | NaCl; Zero glicose | 1 mol.L ⁻¹ ; NI | ↑ viabilidade após 6 meses de armazenamento para células privadas de C e submetidas a salinidade |
| 19 | <i>Glucanocetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) | Osmótico | D.O. 600; % viabilidade | 12 h | NaCl | 0 a 250 mmol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento até 150 Mm ↑ alterações morfológicas e modulação de proteínas de ajuste osmótico |
| 20 | <i>Pseudomonas putida</i> (CZ1) | Osmótico; pH; Térmico | D.O. 600 | 160 h | NaCl; NaOH Frio / Calor | 51 a 547 mmol.L ⁻¹ ; pH 5,5 a 8,5; 15 a 35 ° C | ↓ taxa de crescimento ↑ EPS, proteínas e carboidratos e biomassa ↓ biomassa em baixas temperaturas |
| 21 | <i>Azospirillum lipoferum</i> | Osmótico | D.O. 600 | 48 h | NaCl | 25 a 200 mmol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento ↑ osmólitos |
| 22 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D216, 518, 6,3, 511) | Osmótico | Log UFC.mL ⁻¹ | 72 h | PEG | 9% | ↓ taxa de crescimento |
| 23 | <i>Sinorhizobium meliloti</i> (RCR2011, 4H41, TII7); <i>Rhizobium tropici</i> (CIAT 899); <i>Rhizobium gallicum</i> (8a3); <i>Mesorhizobium 66cero</i> (835, CMG6); <i>Mesorhizobium mediterraneum</i> (C11) | Osmótico | D.O. 620 (%) | 5 dias | NaCl; PEG | 200 a 700 mmol.L ⁻¹ ; 15 a 40% | ↓ taxa de crescimento ↑ tolerância de <i>Sinorhizobium</i> ↑ SOD |
| 24 | <i>Pseudomonas putida</i> (54G) | Nutricional | UFC.mL ⁻¹ | 30 dias | Tolueno | 150 a 750 ppm | ↓ taxa de crescimento ↑ metabólitos intermediários |
| 25 | <i>Burkholderia mesoacidophila</i> (ATCC 31433) | Osmótico; Oxidativo Nutritivo; Térmico | D.O. 550 | 20 h | KCl; H ₂ O ₂ ; Diamida; Calor | 85,5 a 375 mmol.L ⁻¹ ; 88 a 880 μmol.L ⁻¹ ; 1 a 0,125 mmol.L ⁻¹ ; 25 a 40 ° C | ↓ taxa de crescimento acima de 30 ° C e na presença de H ₂ O ₂ ↑ tolerância estresse oxidativo com nutricional |

| | | | | | | | |
|----|---|------------------------------|------------------------------------|-------------|--|--|--|
| 26 | <i>Glucanocetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) | Osmótico | D.O. 600 | 36 h | Sacarose; PEG 400; NaCl; KCl; Na ₂ SO ₄ ; K ₂ SO ₄ | 0 a 700 mmol.L ⁻¹ ; 0 a 700 mmol.L ⁻¹ ; 0 a 120 mmol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento com NaCl e KCl ↑ taxa de crescimento em níveis baixos de PEG e sacarose ↑ taxa de crescimento com Na ₂ SO ₄ ; K ₂ SO ₄ |
| 27 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1, PAO-JP2, PW2696, PW8190, PW8769) | Radiação; Osmótico Oxidativo | D.O. 650; Fração de sobrevivência | 3 h | UV-A; NaCl; H ₂ O ₂ | 0 a 180 min; 1 mol.L ⁻¹ ; 30 % | ↑ sobrevivência células pré-tratadas com UV-A baixa ↑ resistência estresse osmótico ↑ ativação proteína fotoprotetora |
| 28 | <i>Rhizobium etli</i> (CFN42, CE3, CMS310) | Térmico; Osmótico | D.O. 600; % sobrevivência | 4 a 21 dias | Calor; NaCl | 28 e 35 °C; 0 a 0,2 mol.L ⁻¹ | ↑ trealose e glutamato com NaCl ↓ taxa de crescimento com estresses combinados ↑ tolerância a dessecação |
| 29 | <i>Pseudomonas entomophila</i> ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Pseudomonas syringae</i> ; <i>Pseudomonas monteilli</i> | Osmótico | Log UFC.mL ⁻¹ | 24 h | PEG 6000 | 25 % | ↓ taxa de crescimento ↑ EPS, aminoácidos e prolina |
| 30 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (E109) | Osmótico | UFC.mL ⁻¹ | 36 a 108 h | NaCl | 0 a 150 mmol.L ⁻¹ | ↓ taxa de crescimento ↑ tolerância ao NaCl em fase estacionária |
| 31 | <i>Pseudomonas protegens</i> (SN15-2) | Osmótico; Térmico; | D.O. 600; Log UFC.mL ⁻¹ | 36 h | NaCl; Calor; Frio | 450 mmol.L ⁻¹ ; 0 – 4 min a 50 °C; 1 h a – 20 °C | ↓ taxa de crescimento com NaCl ↑ tolerância a todos estressores na presença de colina |
| 32 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PF23) | Osmótico | D.O. 610 | 48 h | NaCl | 0 a 2.200 mmol.L ⁻¹ | ↑ tolerância ao NaCl até 2.000 Mm ↑ EPS |
| 33 | <i>Pseudomonas protegens</i> (SN15-2) | Osmótico | Log UFC.mL ⁻¹ | 24 h | NaCl | 450 mmol.L ⁻¹ | ↑ tolerância a altas temperaturas e congelamento ↑ trealose e prolina |
| 34 | <i>Pseudomonas protegens</i> (SN15-2) | Osmótico | Log UFC.mL ⁻¹ | 32 h | NaCl | 0 a 600 mmol.L ⁻¹ | ↑ viabilidade durante secagem e armazenamento |

^a Identificação, NI: não informado, ↑ aumento, ↓ diminuição, = manteve os mesmos níveis. Fonte: Autora (2023).

Tabela 2.6 – Resumo das características dos estudos com avaliação de sobrevivência na planta inoculada selecionados na revisão sistemática

| ID ^a | Espécie bacteriana | Espécie vegetal inoculada | O inóculo foi preparado com células adaptadas? | Condições de crescimento vegetal | Período de avaliação | Parâmetros avaliados | Principais resultados |
|-----------------|--|---|---|---|---|--|---|
| 1 | <i>Pseudomonas syringae</i> (Mk1); <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Mk20; Mk25); <i>Rhizobium phaseoli</i> (M1 – M10) | <i>Vigna radiata</i> | Não | In vitro; estresse hídrico | 21 e 60 dias | Matéria seca total (g.planta ⁻¹) | ↑ matéria seca total em relação ao controle para plantas inoculadas e co-inoculadas |
| 3 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPS62e) | <i>Malus domestica</i> cv. Fuji; <i>Pyrus communis</i> cv. Conference | Sim, com estresse osmótico | In vitro; baixa UR / campo; patógeno <i>E. amylovora</i> | 0, 5, 11 e 14 dias para maçã e 0 a 132h para pêra | Colonização bacteriana (log CFU.g ⁻¹) e controle biológico (%) | ↑ sobrevivência nas plantas em relação ao controle não pré-adaptado ↑ eficácia em 30-50% no biocontrole |
| 4 | <i>Rhizobium etli</i> (CNPAF512, CMPG8705) | <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Limburge vroege | Não | In vitro; aplicação do estresse após re-isolamento | 35 dias | Colonização dos nódulos (CFU.g ⁻¹) | ↑ resistência bacteriana à temperaturas elevadas e salinidade após re-isolamento |
| 5 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPS62e) | <i>Pyrus communis</i> cv. Passe Crassane, cv. Conference | Sim, com estresse osmótico | In vitro; alta/baixa UR; patógeno <i>E. amylovora</i> | 5 dias | Colonização bacteriana (log CFU.g ⁻¹) e incidência de infecções (%) | Alta UR: sem diferença no biocontrole para células pré-adaptadas Baixa UR: ↑ eficiência de biocontrole em relação às não-adaptadas |
| 6 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPS62e) | <i>Malus domestica</i> cv. Mode, cv. Golden ; <i>Pyrus communis</i> cv. Passe Crassane, cv. Abate Fetel, cv. Doyenne du Comice. | Sim, com estresse osmótico ou enriquecidas com nutrientes | In vitro; alta/baixa UR / campo; patógeno <i>E. amylovora</i> | 5 dias / 10 dias | Colonização bacteriana (Log UFC.flor ⁻¹) e incidência de infecções (%) | Alta UR: ↑ sobrevivência em flores de pêra das células enriquecidas/estressadas e combinação das duas. Baixa UR: ↑ sobrevivência e capacidade de biocontrole na combinação (enriquecidas + stressadas) |
| 10 | <i>Rhizobium</i> (AR1, BR5, BR8, BR12, GR13, AR10, BR13, GM16, GR21) | <i>Phaseolus aureus</i> Roxb | Não | In vitro; diferentes faixas de pH | 42 dias | Contagem e massa seca de nódulos, atividade nitrogenase | ↑ número de nódulos, massa seca e atividade da nitrogenase para 3 isolados de crescimento lento |

| | | | | | | | |
|----|--|--|---------------------------------------|--|-------------------|--|---|
| 14 | <i>Pseudomonas syringae</i> (DC3000, B728a, 1448A); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) | <i>Glycine max</i> cv. Williams 82, <i>Zea Mays</i> B73, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. R.G.PtoS, <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. B.B. Lake 274 | Sim, com estresse osmótico | In vitro / campo | 0 a 120h / 10 DAI | Taxa de sobrevivência ou Log UFC.g ⁻¹ | ↑ sobrevivência da estirpe B728a em folhas de soja e milho em condições de secagem ↑ sobrevivência da estirpe B728a em todas plantas em condições de campo |
| 15 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PM389, ZNP1); <i>Bacillus endophyticus</i> (J13); <i>Bacillus tequilensis</i> (J12) | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Não | In vitro; condições salinas | 7 dias | Peso fresco, peso seco, teor de água da planta | ↑ crescimento das plantas inoculadas em condições de estresse em relação à não-inoculada nas mesmas condições ↑ peso fresco e teor de água |
| 16 | <i>Glucanacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) | <i>Fragaria ananassa</i> cv. 'Pájaro' | Não | In vitro; diferentes concentrações de fosfatos | 26 dias | Peso seco, área de raiz | ↑ promoção de crescimento em altas concentrações de fosfatos |
| 18 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Eki) | <i>Cicer arietinum</i> | Sim, com estresse osmótico + inanição | Campo; patógeno <i>M. phaseolina</i> | 120 dias | Comprimento, massa seca e fresca parte aérea e raiz, vagens por planta, % de incidência da doença | ↑ peso seco e rendimento em relação ao controle ↓ incidência de doença em relação ao controle |
| 21 | <i>Azospirillum lipoferum</i> | <i>Triticum aestivum</i> L. | Não | In vitro / Casa de vegetação; condições salinas; patógeno <i>Aspergillus niger</i> e <i>A. terus</i> | NI | Germinação, comprimento, peso fresco e seco de parte aérea; área foliar; níveis de clorofila, prolina e açúcares; SOD; estabilidade de membrana e potencial hídrico das folhas | ↑ germinação de sementes inoculadas em condições salinas ↓ crescimento vegetal em condições salinas em relação ao controle (condições não salinas) ↑ crescimento vegetal em plantas inoculadas em relação as não-inoculadas |
| 32 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PF23) | <i>Helianthus annuus</i> | Não | In vitro; condições salinas; patógeno <i>M. phaseolina</i> | 5 dias / 120 dias | Germinação, comprimento, peso fresco e seco de raízes e parte aérea | ↑ germinação de sementes inoculadas em condições salinas ↑ comprimento e peso fresco e seco de plantas inoculadas em condições salinas ↑ biocontrole em condições salinas e não-salinas |
| 34 | <i>Pseudomonas protegens</i> (SN15-2) | <i>Solanum lycopersicum</i> | Não | Campo; patógeno <i>Ralstonia solanacearum</i> | NI | Incidência de doença (%) | ↑ 80% biocontrole em relação ao controle |

^a Identificação, NI: não informado, UR: umidade relativa, ↑ aumento, ↓ diminuição. Fonte: Autora (2023).

4.5 DISCUSSÃO

4.5.1 Bactérias benéficas associativas usadas como inoculantes

Esta revisão sistemática foi desenvolvida para reunir estudos que avaliaram os principais efeitos das estratégias de estresse subletal em células bacterianas de inoculantes de BPCV, resultando em 34 estudos. Conhecer e selecionar estratégias para manter a viabilidade de inoculantes é um fator de grande importância para o desenvolvimento de novas formulações, pois podem garantir a melhor interação dos inoculantes com plantas associadas.

A grande maioria das bactérias abordadas nos estudos reunidos nesta revisão pertencem ao filo *Proteobacteria* e às classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (Figura 2.2 A). As bactérias deste filo são Gram-negativas e não possuem capacidade de formar esporos (STACKEBRANDT; MURRAY; TRÜPER, 1988). Principalmente, as bactérias não esporulantes são consideradas mais suscetíveis a fatores deletérios em condições ambientais adversas, portanto, precisam de formulações protetivas para aumento da sua eficiência como inoculante (O'CALLAGHAN, 2016).

Um total de 11 gêneros e 25 espécies foram encontrados nos estudos selecionados para este trabalho, sendo os gêneros *Pseudomonas* e *Rhizobium* os mais frequentemente utilizados (Figura 2.2 B). O gênero *Pseudomonas* compreende um grupo de rizobactérias de vida livre ou endofíticas, presentes em uma ampla gama de nichos ecológicos com grande potencial para uso como biofertilizantes. As espécies desse gênero exibem versatilidade nutricional e diversidade na produção de enzimas, principalmente aquelas envolvidas no processo de solubilização de fósforo, como as enzimas fitases, C-P liases e fosfonatases (OTIENO et al., 2015). Também apresentam produção de metabólitos, como antibióticos, sideróforos, biosurfactantes, osmólitos e fitormônios, contribuindo positivamente para o desenvolvimento das plantas. Além disso, essas espécies são conhecidas por contribuir significativamente para a atividade de biocontrole, principalmente por meio da produção de metabólitos como quitinases que degradam células fúngicas com potencial para causar doenças. *P. putida* apresentou capacidade de produzir proteases, quitinases, ureases e outros metabólitos que levaram à inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Ceratocystis fimbriata* e *Sclerotium rolfsii*, relevantes fungos causadores de doenças como

mancha, podridão negra e mofo cinza em várias culturas de plantas (SARITHA; PANNEERSELVAM; GANESHAMURTHY, 2015). Além do biocontrole, essas espécies também contribuem para aumentar a disponibilidade de nutrientes, tolerância ao estresse ou realizar biorremediação em ambientes com deficiência de ferro, contaminados por componentes aromáticos ou em condições de estresse abiótico (ANDREOLLI et al., 2021; NADEEM et al., 2016b; SAH; KRISHNANI; SINGH, 2021; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019)(AMBARDAR; VAKHLU, 2013; ANDREOLLI et al., 2021; NADEEM et al., 2016a; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). As espécies de *Pseudomonas* mais utilizadas em formulações de inoculantes incluem *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, com potencial para colonização de diversas espécies de plantas, incluindo gramíneas, vegetais e leguminosas (NADEEM et al., 2016a).

Entre as 25 espécies identificadas nesta revisão (Figura 2.2 C), *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* tiveram a maior frequência de aplicação nos estudos encontrados (10,4%). *Pseudomonas putida* (8,3%), *Pseudomonas syringae* (6,3%) e *Pseudomonas protegens* (6,3%) também foram frequentes nos estudos. Essas espécies se destacam entre as BPCV pela alta capacidade de produzir EPS em condições de estresse, indicando maior capacidade de colonização radicular e formação de biofilme nas plantas associadas. Além de beneficiar as bactérias, a secreção de EPS também favorece o crescimento das plantas, pois contribui para a melhor construção das estruturas radiculares e, conseqüentemente, melhor absorção de água e nutrientes (O'CALLAGHAN, 2016; VURUKONDA et al., 2016).

Os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, também muito utilizados em estudos, compreendem grupos de bactérias simbióticas cuja interação com leguminosas vem sendo estudada há quase 130 anos devido à sua capacidade de formar nódulos e fixar nitrogênio. As bactérias deste gênero apresentam grande relevância agrônômica para a fertilidade do solo, pois a fixação biológica de nitrogênio (FBN) promovida reduz a necessidade de uso de fertilizantes nitrogenados e melhora a produtividade de leguminosas de grande importância econômica (HASSEN; LAMPRECHT; BOPAPE, 2020; SINDHU et al., 2019). Portanto, as espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são as

mais utilizadas em formulações de inoculantes para o cultivo de leguminosas (HASSEN; LAMPRECHT; BOPAPE, 2020; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019; VELÁZQUEZ et al., 2010). Entre estas podemos destacar as espécies *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium elkanni*, *Rhizobium tropici* e *Rhizobium leguminosarum* como as mais recomendadas para serem utilizadas atualmente como inoculantes (DE SOUZA et al., 2019; SIQUEIRA et al., 2014).

Das 25 espécies classificadas por tipo de colonização, 44% apresentaram colonização de nódulos, 36% colonização de superfície e 20% colonização intercelular (Tabela 2.1). As diferentes formas de colonização durante a interação podem influenciar a capacidade de sobrevivência da BPCV e a efetividade do crescimento vegetal. Para as bactérias que colonizam os espaços intercelulares, um ambiente é considerado favorável ao desenvolvimento e desempenho, pois estão disponíveis proteção física e altos níveis de carboidratos, aminoácidos e nutrientes inorgânicos (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). Para as bactérias que colonizam raízes, induzindo a formação de nódulos, há também um microambiente favorável para a sobrevivência das mesmas; no entanto, os nutrientes não estão disponíveis como nos espaços intercelulares. Nesse caso, a planta fornece ácidos dicarboxílicos para serem utilizados em troca da secreção de amônia pela bactéria, uma vez que a FBN ocorre nesse ambiente específico por meio da ação da nitrogenase (CHANG; LEE; HUNGRIA, 2015; POOLE; RAMACHANDRAN; TERPOLILLI, 2018). Portanto, a suscetibilidade a fatores ambientais adversos é diminuída para bactérias associadas a esses tipos de colonização. No entanto, para aquelas que colonizam a superfície das raízes formando biofilmes, há maior suscetibilidade a fatores ambientais adversos, incluindo estresses bióticos e abióticos, devido à sua exposição à rizosfera (BERNINGER et al., 2018a).

4.5.2 Evolução, origem e aplicação do estresse subletal em inoculantes

Nesta revisão, a análise da distribuição dos estudos publicados por ano mostrou um aumento considerável no número de publicações na última década (Figura 2.3 A). Aproximadamente 67% dos estudos foram publicados nesse período, o que demonstra o crescente interesse da comunidade científica pela agricultura sustentável, principalmente relacionada ao uso de biofertilizantes e ao desenvolvimento de novos inoculantes, e explica

o aumento observado desde 2010 (GUNDI et al., 2018; SANTOS; HUNGRIA; NOGUEIRA, 2017).

A distribuição temporal correlacionada com as espécies frequentemente avaliadas nos estudos (Figura 2.3 B) mostrou que de 1996 a 2014, as espécies mais estudadas pertenciam aos gêneros *Rhizobium* e *Pseudomonas*, e de 2015 a 2021, espécies dos gêneros *Glucanacetobacter*, *Pseudomonas* e *Sinorhizobium* foram mais frequentes. De 1996 a 2014, espécies mais consolidadas como BPCV foram utilizadas nos estudos: *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *R. etli*, *P. putida* e *P. aeruginosa*. No período mais recente (2015 a 2021), o uso de espécies mais recentemente empregadas como potenciais BPCV, como *G. diazotrophicus*, *P. protegens*, *S. meliloti*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *A. lipoferum*, *B. endophyticus* entre outros.

Observou-se com a evolução temporal dos estudos, o foco inicial em espécies de BPCV que são frequentemente associadas por nodulação ou colonização de superfície, e posteriormente o interesse em estudos de espécies que formam associações frequentes com plantas por colonização intercelular. Durante o primeiro período, o foco principal dos estudos foi avaliar apenas a resposta fisiológica e a sobrevivência da BPCV após aplicação do estresse subletal. A partir de 2007, foi possível observar a análise da produção de osmólitos protetores e a avaliação da sobrevivência após processos de dessecação, liofilização e armazenamento prolongado.

Esta revisão sistemática revelou que a maioria dos estudos teve origem na Ásia, Europa e América do Sul (Figura 2.3 C). De acordo com o último relatório sobre agricultura mundial da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2022) a Ásia, Europa e Américas se destacaram por representar os continente com maior valor global agregado do total gerado pela agricultura, equivalendo a 60%, 16% e 14%, respectivamente. Os países asiáticos e europeus estão entre os maiores consumidores de inoculantes devido à área predominantemente agrícola na agricultura orgânica. Os países da América do Sul estão emergindo como o mercado que mais cresce nessa área. Também se destacaram no uso de fertilizantes inorgânicos na agricultura, correspondendo a 53%, 16% e 25% do total utilizado no mundo. Na Ásia, Índia e China, e na América do Sul, o Brasil estão entre os maiores produtores de *commodities* agrícolas, portanto, os países com

aplicabilidade mais significativa do uso de inoculantes (GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET, 2022).

Apesar do grande destaque de produtividade agrícola nestes países, a maioria dos estudos encontrados nesta revisão sistemática foram desenvolvidos em regiões onde a agricultura é seriamente afetada por fatores ambientais, como a presença de fitopatógenos, salinidade, acidificação e contaminação dos solos com agrotóxicos. Portanto, o papel das bactérias benéficas presentes nas formulações de inoculantes está diretamente relacionado à manutenção de fontes de estresse bióticos e abióticos que afetam a produtividade agrícola, uma vez que estes microrganismos possuem alta capacidade de adaptação às condições ambientais adversas (HALLSWORTH, 2018; SHAMEER; PRASAD, 2018).

A análise de coocorrência e inter-relação das palavras-chave relacionadas aos estudos selecionados nesta revisão sistemática revelou que a aplicação de estresse subletal está frequentemente relacionada aos aspectos da bioformulação de inoculantes, capacidade de resistência a diferentes tipos de estresse ambiental, mecanismos de biocontrole de doenças, produção de osmólitos, formação de biofilmes e rizobactérias (Figura 2.4). Estes temas estão relacionados à necessidade de aprimorar e desenvolver novos produtos à base de microrganismos, uma vez que as condições ambientais e presença de doenças podem afetar os benefícios desses produtos (PARNELL et al., 2016). Para a autoria, a análise de coocorrência e inter-relação revelou a distribuição dos estudos em 28 grupos de autores, com poucos estudos sendo desenvolvidos no mesmo grupo de autoria (máximo de 3 estudos por grupo), mostrando a distribuição diversa dos estudos em diferentes grupos de pesquisa (Figura 2.5).

4.5.3 O papel da aplicação de estresse subletal na sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes

A aplicação de estresse subletal é uma estratégia utilizada para aumentar a tolerância e adaptação dos inoculantes aos estressores ambientais e, conseqüentemente, sua sobrevivência. Essas estratégias baseiam-se em adaptações intracelulares que desencadeiam uma série de respostas de sobrevivência, como o acúmulo de proteínas responsivas e metabólitos secundários que aumentam a proteção celular (BERNINGER et al., 2018a).

Os microrganismos presentes no solo estão diretamente expostos às condições flutuantes deste ambiente, como mudanças de temperatura, indisponibilidade de nutrientes, limitação de oxigênio ou água, tensão osmótica devido a presença de sais, valores extremos de pH ou presença de compostos químicos. A variabilidade na estrutura do solo e nas propriedades físico-químicas apresenta grandes desafios como ambiente receptor para inoculantes microbianos do solo (O'CALLAGHAN, 2016). Portanto, qualquer alteração ambiental que resulte em respostas adaptativas fisiológicas ou bioquímicas na célula bacteriana pode ser considerada uma fonte de estresse. Essas respostas são fatores fundamentais para sua sobrevivência (SCHOUG et al., 2008).

Nesta revisão sistemática, foram identificados 6 tipos de estresse usados como estratégia adaptativa para melhorar a sobrevivência ou eficácia das bactérias benéficas associativas. O estresse osmótico causado por salinização ou dessecação, estresse térmico por calor ou frio (incluindo choque térmico e congelamento), estresse oxidativo por agentes oxidantes ou exposição a metais e estresse nutricional por substituição de fontes de carbono ou inanição. Outros tipos de estresse subletal foram identificados nesta revisão sistemática, como estresse de pH caracterizado pela acidificação ou alcalinização do meio de cultura e estresse de radiação com aplicação de radiação ultravioleta (UV) (Figura 2.6 A).

As respostas primárias observadas para as células bacterianas após a aplicação de estresse foram categorizadas em 11 tipos (Figura 2.6 B). As respostas mais frequentes incluíram a diminuição das taxas de crescimento microbiano (Tipo 1), aumento da síntese de osmólitos (Tipo 2) e melhor sobrevivência à dessecação, liofilização ou processos de armazenamento de longo prazo (Tipo 10). A aplicação de estresse subletal causa uma pressão externa que afeta o metabolismo da população microbiana, gerando uma série de adaptações intracelulares. Para alcançar a resistência ao estresse, é comum experimentar taxas de crescimento celular diminuídas, entrando em um estado estacionário ou de crescimento lento (PANDEY et al., 2022). Após a exposição a estressores, as células bacterianas respondem as condições ambientais com mecanismos que modificam a expressão gênica para reprogramar a célula e ajudar na sua sobrevivência (BEGLEY; HILL, 2015). Essas respostas podem resultar na produção de osmólitos, proteínas de reparo e outros mecanismos de proteção celular. A resposta adaptativa ou protetora é configurada

pela pré-exposição das células a níveis subletais de estresse, protegendo contra a exposição subsequente a níveis severos do mesmo tipo de estresse (YOUSEF; COURTNEY, 2002); assim, ocorre um aumento na sobrevivência após submeter as células a processos que afetam a viabilidade.

Os estudos desta revisão sistemática apresentaram diferentes metodologias. A grande maioria dos estudos analisou a sobrevivência do inoculante bacteriano para avaliar as capacidades adaptativas a aplicação de estresse (Tabela 2.5). Alguns estudos combinaram mais de um tipo de estresse subletal e avaliaram a resposta de sobrevivência dos inoculantes com a sobreposição de estresses. Cada tipo de estresse observado causou diferentes efeitos e respostas nas células bacterianas dos inoculantes, a identificação dos estudos incluídos e o tipo de estresse subletal avaliados estão resumidos na Figura 2.7.

Nos estudos analisados, o estresse osmótico causado nos inoculantes foi induzido principalmente pela presença de altas concentrações de sal no meio de cultura. Quando há um aumento ou diminuição da pressão osmótica extracelular, o fluxo de água do ambiente altera a função e estrutura celular bacteriana, concentrando ou diluindo os solutos no citosol. Para sobreviver a tais condições, mecanismos intracelulares como o acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular chamados de osmólitos, solutos compatíveis ou osmoprotetores, são habilitados. Estes osmólitos são responsáveis pela osmorregulação celular e incluem alguns polióis (manitol e glicerol), dissacarídeos (sacarose e trealose) e aminoácidos (prolina, betaína e glutamato) (HOSSEINIYAN KHATIBI et al., 2019; PANDEY et al., 2022; PATIL et al., 2017).

No caso do estresse térmico, o calor ou o frio foram observados como agentes estressantes. O estresse térmico por exposição ao calor foi o mais observado e causa a desnaturação de proteínas celulares e induz a produção de proteínas de choque térmico (PCT), que atuam como chaperonas moleculares, responsáveis pelo enovelamento de novos polipéptidos ou daqueles já danificados ou mesmo encaminhando proteínas danificadas à destruição. O estresse térmico por exposição ao frio afeta principalmente a fluidez da membrana, a conformação de ácidos nucleicos e a síntese de novas proteínas. O estresse por frio também pode induzir a produção de proteínas de choque frio (PCF), cuja função principal é estabilizar a estrutura dos ácidos nucleicos e permitir a transcrição e tradução

celular (BEGLEY; HILL, 2015; O’CALLAGHAN, 2016c; PANDEY et al., 2022; PANOFF et al., 1997; PATIL et al., 2017).

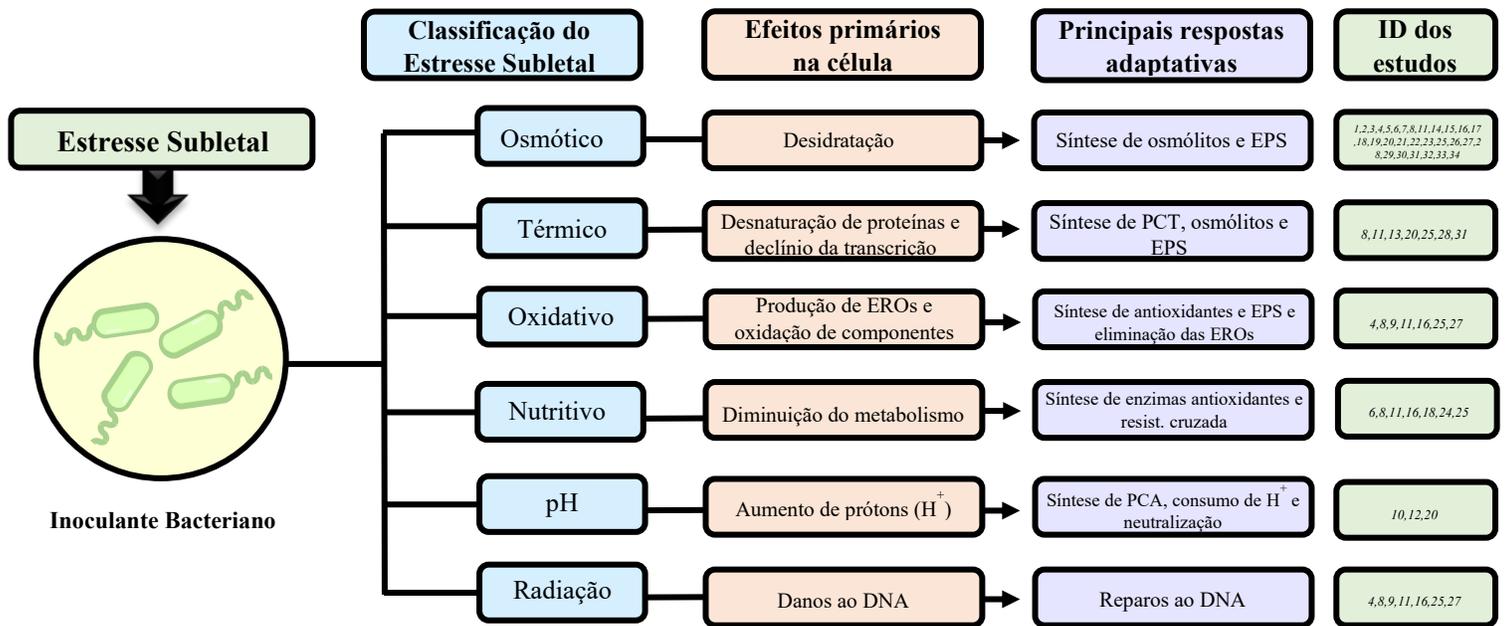


Figura 2.7 - Resumo dos principais tipos de estresse subletal encontrados, seus efeitos nas células bacterianas e as respostas adaptativas mais comuns dos inoculantes. PCT – Proteínas de choque térmico, PCA – Proteínas de choque ácido, EROs – espécies reativas de oxigênio, EPS – exopolissacarídeos. Fonte: Autora (2023).

No caso do estresse térmico, o calor ou o frio foram observados como agentes estressantes. O estresse térmico por exposição ao calor foi o mais observado e causa a desnaturação de proteínas celulares e induz a produção de proteínas de choque térmico (PCT), que atuam como chaperonas moleculares, responsáveis pelo enovelamento de novos polipetídeos ou daqueles já danificados ou mesmo encaminhando proteínas danificadas à destruição. O estresse térmico por exposição ao frio afeta principalmente a fluidez da membrana, a conformação de ácidos nucleicos e a síntese de novas proteínas. O estresse por frio também pode induzir a produção de proteínas de choque frio (PCF), cuja função principal é estabilizar a estrutura dos ácidos nucleicos e permitir a transcrição e tradução celular (BEGLEY; HILL, 2015; O’CALLAGHAN, 2016c; PANDEY et al., 2022; PANOFF et al., 1997; PATIL et al., 2017).

O estresse oxidativo é frequentemente causado pelo aumento intracelular dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânions superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e radicais hidroxila (HO⁻). Estas e outras EROs podem ser induzidas

pela exposição da célula bacteriana à metais e substâncias oxidativas e causam rupturas nas cadeias de ácidos nucleicos, bloqueios no sítio ativo de enzimas e clivagem de moléculas de proteínas, reduzindo drasticamente a energia da célula. A resposta celular a este tipo de estresse resulta na produção de compostos e enzimas com atividade antioxidante, como compostos carotenóides, vitaminas lipossolúveis e poliaminas que impedem a oxidação do DNA, e as enzimas peroxidase, superóxido dismutase e catalase que degradam as EROs (PANDEY et al., 2022; PATIL et al., 2017; SHARMA et al., 2012). No caso do estresse oxidativo induzido por íons metálicos, como cádmio, cobre, níquel e zinco, a produção de tióis ajuda a inativar o potencial de oxidação dos íons por meio da formação de complexos (SINGH et al., 2001).

No caso do estresse nutricional, ocorre a limitação ou substituição de nutrientes essenciais para as células bacterianas e sua multiplicação. Este tipo de estresse foi observado frequentemente durante o crescimento bacteriano após a bactéria atingir a fase estacionária, quando a célula bacteriana começa a diminuir seu metabolismo podendo induzir o estado viável mas não cultivável (VMNC), além de degradar as proteínas intracelulares. A resposta das células a este tipo de estresse resulta na produção de proteínas responsivas ao estresse, alterações morfológicas e produção de enzimas antioxidantes como a catalase, o que pode levar à resistência cruzada destas células à outros tipos de estresse, como o oxidativo e térmico (GAO et al., 2022; WANG et al., 2022).

A maioria dos estudos analisados relatou aumento da produção e acúmulo de osmólitos intracelulares nas bactérias durante aplicação de diferentes tipos de estresse, especialmente para o estresse osmótico e térmico. A resposta adaptativa de *Pseudomonas aeruginosa* estirpe PAO1 ao estresse osmótico foi demonstrada por BAZIRE et al. (2007) após adição de sais no meio de cultivo durante o preparo do inoculante. Foram observadas a síntese de osmólitos como trealose, N-acetil glutamato glutamina amida e glicosil-glicerol, porém houve diminuição das taxas de crescimento microbiano. A adição de glicina betaína (GB) como osmoprotetor aumentou as taxas de crescimento e rendimento celular, além de promover o acúmulo dessa substância dentro das células. Este estudo ainda avaliou a resposta da osmoadação à dessecação e observou aumento de 10 a 100 vezes na sobrevivência das células em comparação aos controles não adaptados. O processo de

osmo Adaptação e aprimoramento nutricional também foi avaliado em *Pseudomonas fluorescens* estirpe EPS62 por CABREFIGA et al. (2011) pela adição de sais e alteração das fontes de carbono no meio de cultivo, e observaram que houve aumento das taxas de crescimento microbiano com a combinação dos dois estressores. A mesma estratégia foi aplicada para avaliar a sobrevivência de *P. fluorescens* estirpe EPS62 durante o processo de dessecação na presença de lactose, e observou-se uma taxa de sobrevivência 30% maior (CABREFIGA et al., 2014).

A capacidade de sobrevivência de *Rhizobium etli* estirpe CE3 foi avaliada após exposição às fontes de estresse osmótico e altas temperaturas (28 e 35 °C) (REINABUENO et al., 2012). Em células não estressadas com salinidade observou-se que o acúmulo de trealose duplicou em resposta ao estresse térmico, e em condições salinas houve acúmulo ainda mais pronunciado para ambas temperaturas, sendo que os níveis de trealose aumentaram treze e cinco vezes em relação às não estressadas, para 28 e 35 °C, respectivamente. Em *Pseudomonas protegens* estirpe SN15-2 e seus mutantes a tolerância foi avaliada após exposição ao estresse osmótico (NaCl 450 mM), choque térmico (50 °C) e frio (- 20 °C por 1 hora) por TANG et al. (2020). Foi observado acúmulo de betaína nas células bacterianas em condições hiperosmóticas, porém houve uma diminuição na taxa de crescimento bacteriano. Na presença de colina, um precursor do osmólito GB, foi observado aumento de tolerância para todos os fatores estressantes, incluindo o choque térmico e frio em relação às células sem a presença de colina. A sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* estirpe TA1 e *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CB1809 foi avaliada após crescimento aeróbio em extratos aquosos de turfa (CASTERIANO et al., 2013). O uso de componentes de alto peso molecular, como o extrato de turfa, parece estar relacionado a uma diminuição da atividade de água no meio de cultivo, ocasionando o estresse osmótico e conseqüentemente uma resposta adaptativa. No uso do extrato observou-se o aumento dos níveis de trealose e proteínas responsivas ao estresse, além de espessamento das membranas plasmáticas para ambas as estirpes avaliadas. A sobrevivência de *R. leguminosarum* em extrato aquoso de turfa foi 18 vezes maior do que as células cultivadas em meio líquido definido.

Alguns estudos relataram a tendência de células em situação de estresse nutricional

a desenvolver uma tolerância aumentada ao estresse osmótico e oxidativo. Este estresse nutricional pode ser provocado propositalmente por restrição de nutrientes no meio de cultura ou naturalmente quando o microrganismo se encontra em fase mais tardia do crescimento, onde os nutrientes tendem a ser mais escassos (MORGAN et al., 2006b). Este efeito de resistência cruzada foi observado ao avaliar a capacidade adaptativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* juntamente com a sobreposição com outros estresses ambientais (CROCKFORD et al., 1996). Houve aumento da resistência das células bacterianas, principalmente na fase estacionária de cultivo, em baixas concentrações dos agentes oxidativos. Observou-se maior tolerância à oxidação de células privadas de carbono (inanição) e maior resistência ao choque osmótico e térmico para células estressadas por H₂O₂. Os estresses osmótico, oxidativo, nutricional e térmico combinados foram avaliados em *Burkholderia mesoacidophila* (MOODY et al., 2019). Observou-se diminuição da taxa de crescimento bacteriano em temperaturas acima de 30° C e na presença de agentes oxidantes, sendo a temperatura o fator estressante que mais afetou a sobrevivência das células. Porém, para as células estressadas com ambiente nutricional limitado houve maior tolerância das células ao estresse oxidativo. A bactéria *Pseudomonas fluorescens* estirpe Eki foi testada quanto à sua capacidade de tolerância ao estresse por inanição e ao estresse osmótico em condições de liofilização para ser usada em uma bioformulação à base de talco (KHARE; ARORA, 2011). Observou-se uma redução nas contagens de UFC após 6 meses de armazenamento do inoculante, porém esta perda de viabilidade foi menor para as células privadas de carbono e submetidas ao estresse osmótico em comparação com as não estressadas, indicando potencial de adaptação da bactéria a condições estressantes.

Um estudo com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe E109 avaliou a sobrevivência do inoculante em condições de salinidade e constatou que a estabilidade do inoculante estava diretamente relacionado à fase de crescimento da cultura utilizada nos experimentos (SORIA et al., 2006). As células coletadas na fase estacionária demonstraram maior tolerância a níveis altos de salinidade em relação às células da fase exponencial de crescimento. Este resultado pode estar relacionado também, à escassez de nutrientes que as células da fase estacionária enfrentam, indicando uma possível resistência cruzada para o estresse osmótico.

Além do acúmulo de osmólitos intracelulares e outros mecanismos de tolerância desempenhados pelas células bacterianas de inoculantes, também foram observadas com frequência nos estudos a produção e a secreção de EPS, bem como a maior agregação das células e formação de biofilmes. EPS são substâncias poliméricas de alto peso molecular constituídas por carboidratos e desempenham papel importante na proteção celular, formação de biofilmes, agregação microbiana, estabelecimento da interação microrganismo-planta, biorremediação entre outros (DONOT et al., 2012; GOUDA et al., 2018). Além disso, entre as diversas funções dos EPS podemos destacar o papel essencial na proteção celular em condições ambientais adversas, como durante a dessecação, predação e efeitos tóxicos de agentes químicos e outros compostos (BOMFETI et al., 2011; CIEŚLA et al., 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010; PATEL; PRAJAPAT, 2013).

Um estudo desenvolvido por GHOSH et al. (2019) avaliou a capacidade de diferentes estirpes bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa* estirpe PM389 e ZNP1, *Bacillus endophyticus* estirpe J13 e *Bacillus tequilensis* estirpe J12) de tolerar o estresse osmótico induzido por polietilenoglicol (PEG) no meio de cultura. Todas as estirpes analisadas tiveram capacidade de crescer em tais condições, porém, com uma taxa de crescimento mais lenta do que sob condições não estressadas. Para as estirpes de *Bacillus* foi observado aumento dos níveis de fitormônios produzidos e as estirpes ZNP1 e J13 tiveram a produção aumentada de EPS em condições osmóticas. Para as estirpes PM389 e J12 os níveis de EPS se mantiveram iguais à condições sem o estresse. Essa variação na produção de EPS para *Pseudomonas* spp. já foi relatado em estudos com caracterização de estirpes após aplicação de condições estressantes, demonstrando que as respostas adaptativas parecem ser estirpe-dependentes (SANDHYA et al., 2009).

Em outro estudo desenvolvido por CHANRATANA et al. (2017) a bactéria *Methylobacterium oryzae* estirpe CBMB20 foi testada quanto à capacidade de tolerância a diversos estresses. Observou-se que a agregação das células foi maior para aquelas cultivadas em meio com alta razão carbono/nitrogênio (C/N). Além disso as células agregadas apresentaram maior tolerância a radiação UV, calor, dessecação, estresse oxidativo e inanição. Sob estresse osmótico foram observados aumento nos níveis de EPS, acúmulo de prolina e melhora na formação de biofilme.

O estresse de pH é causado pela acidificação ou alcalinização do ambiente, onde se encontram os microrganismos. As mudanças de pH no meio afetam diretamente a concentração de prótons (H^+) no interior das células, influenciando as cargas de macromoléculas e afetando a estrutura e função das mesmas. As células nesta situação de estresse desencadeiam uma série de enzimas para atuar em reações que resultam no consumo deste excesso de prótons e na produção de compostos para neutralizar o pH. Além disso, em condições de baixo pH são produzidas proteínas de choque ácido (PCA), como chaperonas e proteases, que irão auxiliar na proteção e reparo das proteínas existentes (FOSTER, 1993, 2000; LUND et al., 2020). Um estudo avaliou a capacidade adaptativa de *Sinorhizobium meliloti* exposto ao estresse ácido (DRAGHI et al., 2016). Foi observada capacidade de crescimento até pH 6,0 e o aumento do consumo de oxigênio em mais de cinco vezes. O aumento da respiração celular pode estar associado à demanda de energia para reparo e biossíntese de proteínas para o crescimento bacteriano em tais condições.

O estresse causado por radiação é frequentemente desencadeado por meio de incidência de luz ultravioleta (UV) na célula bacteriana. O principal efeito que este tipo de estresse causa são os danos ao DNA, e a principal resposta das células é a ativação de genes que trabalham no reparo do DNA (SANDERS; VENEMA; KOK, 1999). Por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa* foi observado atraso no crescimento após exposição a baixas fluências de UVA e demonstrou tolerância cruzada com estresse osmótico (PEZZONI et al., 2012).

4.5.4 Eficácia de inoculantes estressados na promoção de crescimento vegetal

Os mecanismos de osmotolerância desenvolvidos por microrganismos, como o acúmulo de osmólitos no citosol e produção de EPS, são conhecidos por ajudar a aliviar o efeito do estresse nas células bacterianas, mantendo seu metabolismo inalterado e permitindo a promoção de crescimento e alívio de estresse também das plantas associadas. Diversos estudos relatam associações com BPCV com sucesso na atenuação dos efeitos causados por estresses nas plantas, além de melhora no seu desenvolvimento (PAUL; LADE, 2014; VAISHNAV et al., 2018; VERMA; MISHRA; ARORA, 2019). Nesta revisão sistemática, alguns estudos avaliaram a sobrevivência bacteriana visando uma posterior análise da eficácia do inoculante em condições de estresse quando associado a

plantas, sendo a grande maioria com aplicação do estresse osmótico adaptativo ou crescimento em condições salinas (Tabela 2.6).

Em um estudo desenvolvido com *Pseudomonas fluorescens* submetida à estresse osmótico, a síntese e acúmulo de osmólitos foram observados (BONATERRA et al., 2007). Foram avaliados os efeitos da inoculação macieira e pereira com esta estirpe osmoadaptada em condições de baixa umidade relativa e a capacidade de biocontrole do fitopatógeno *Erwinia amylovora*. A sobrevivência de *P. fluorescens* osmoadaptada aumentou de 100 a 1000 vezes, e a eficácia de biocontrole aumentou de 30 a 50% em frutos imaturos em relação ao controle não pré-adaptado. Para *Pseudomonas fluorescens* estirpe EPS62e submetida à estresse osmótico em meio enriquecido com nutrientes foi observada melhora de sobrevivência após inoculação em flores de pereira, além de aumento de biocontrole em baixa umidade relativa (CABREFIGA et al., 2011; CABREFIGA et al., 2014).

Um estudo com *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou a resposta adaptativa após aplicação do estresse osmótico pelo aumento de tolerância ao estresse e acúmulo de GB (FREEMAN et al., 2013). A sobrevivência bacteriana também foi avaliada após inoculação em plantas de soja, milho, tomate e feijão e observou-se incremento de sobrevivência de *P. syringae* em todas espécies vegetais em condições de campo. *Pseudomonas fluorescens* estirpe Eki foi testada quanto a sua capacidade de tolerância ao estresse por inanição e estresse osmótico e mostrou maior tempo de viabilidade para os inoculantes (KHARE; ARORA, 2011). Após inoculação de *P. fluorescens* em grão-de-bico foram avaliados os parâmetros relativos ao crescimento das plantas e a capacidade de biocontrole ao fitopatógeno *Macrophina faseolina*. Houve aumento do peso seco e rendimento além de maior controle da doença em relação ao grupo controle não-inoculado.

Além de avaliar o desempenho bacteriano sob estresse, alguns estudos analisaram a sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes com a aplicação do estresse durante a associação com a planta, observando o efeito do estresse e da inoculação simultaneamente. Após avaliar a capacidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* de tolerar o estresse osmótico e constatar a produção de EPS e fitormônios, GHOSH et al. (2019) avaliaram a resposta das bactérias inoculadas em *Arabidopsis thaliana* em condições de salinidade. Eles

observaram aumento do crescimento das plantas inoculadas em condições salinas em relação à inoculadas em condições normais, além de aumento do peso fresco e teor de água no tecido vegetal.

Em *Pseudomonas aeruginosa* estirpe PF23 foi observada a produção de EPS após aplicação de estresse osmótico (TEWARI; ARORA, 2014). Após a inoculação em plantas de girassol sob condições salinas observou-se incremento da germinação, comprimento, peso fresco e seco da plantas, além de maior capacidade de biocontrole contra *M. faseolina* em condições salinas. Este efeito de melhora da tolerância e crescimento das planta ao estresse frequentemente está relacionado à produção de fitormônios, osmólitos e EPS secretados pelos inoculantes, que causam efeitos positivos na saúde das plantas (NASEEM et al., 2018; SANDHYA et al., 2009; VACHERON et al., 2013; VURUKONDA et al., 2016).

A associação das plantas com as BPCV presentes nos inoculantes pode ser vantajosa pelo aumento de tolerância sistêmica induzida, que se baseia na capacidade de resposta mais rápida do sistema de defesa da planta em situações de estresse induzidas pela associação com bactérias benéficas. Os principais efeitos benéficos dessa associação incluem melhora nas relações hídricas, ajuste osmótico das células vegetais, desintoxicação, regulação de fitormônios, melhora na aquisição de nutrientes pelas raízes e eficiência fotossintética (ARORA et al., 2018; ILANGUMARAN; SMITH, 2017; VERMA; MISHRA; ARORA, 2019a; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009). O acúmulo e secreção de osmólitos e EPS pelos inoculantes nas condições de estresse são absorvidos pelas raízes de plantas e contribuem para o balanço osmótico e prevenção de danos oxidativos dos tecidos vegetais em condições de salinidade. A produção de fitormônios também induz a produção endógena nas plantas resultando no aumento da superfície radicular e conseqüentemente na melhor absorção de água e nutrientes (ILANGUMARAN; SMITH, 2017).

4.6 CONCLUSÃO

Com base nos estudos analisados, observamos que as respostas das células bacterianas dos inoculantes à exposição aos agentes estressores são complexas e dependentes de múltiplos fatores, como o tipo e concentração do agente estressor, a fase de

crescimento bacteriano, além da sobreposição de efeitos da combinação destes estresses. Além destes fatores, a resposta adaptativa parece ser estirpe dependente, uma vez que microrganismos da mesma espécie podem responder de forma diferente aos estressores. Em geral, observou-se diminuição inicial da taxa de crescimento dos microrganismos quando submetidos às condições de estresse, mas também foi observado o aumento da tolerância na maioria dos casos, por meio de diferentes mecanismos de adaptação como a produção de osmólitos, fitormônios e EPS. A melhora da sobrevivência dos inoculantes foi observado principalmente após a aplicação do estresse durante processos de dessecação, liofilização ou armazenamento a longo prazo. Nos casos em que a sobrevivência dos inoculantes foi avaliada após inoculação das plantas, observou-se a capacidade dos mesmos de sobreviver em condições de estresse, além de aumentar a tolerância e desenvolvimento das plantas em tais condições. De acordo com os estudos selecionados nesta revisão sistemática, concluímos que *Pseudomonas* spp. destacou-se quanto à aplicação do estresse subletal, apresentando os resultados mais significativos e positivos; portanto, esse grupo de bactérias benéficas apresentou grande potencial para uso na produção de inoculantes mais eficazes. Em conclusão, o estresse subletal apresentou-se como uma estratégia de grande potencial para uso na formulação de inoculantes mais eficientes para uso na agricultura, inclusive em condições de estresse ambiental, no entanto se fazem necessários estudos futuros para avaliar os efeitos e respostas adaptativas em estirpes específicas usadas para produção de inoculantes.

CAPÍTULO II

5 EFEITOS DO ESTRESSE SUBLETAL TÉRMICO E SALINO NA SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL *Azospirillum brasilense* INOCULADA EM MILHO

Elisandra Triches da Cunha, Ana Marina Pedrolo, Ana Carolina Maisonnave Arisi

Artigo submetido ao *Journal of the Science of Food and Agriculture*

5.1 RESUMO

A bactéria promotora de crescimento vegetal (BPCV) *Azospirillum brasilense* é amplamente utilizada como inoculante em importantes culturas de gramíneas, proporcionando inúmeros benefícios às plantas a ela associadas. No entanto, existem limitações para o desenvolvimento comercial de inoculantes viáveis e controle de sua sobrevivência no campo, exigindo o uso de estratégias que garantam sua sobrevivência durante o manuseio e aplicação. A aplicação de estresse subletal parece ser uma estratégia promissora para aumentar a tolerância das células bacterianas a condições ambientais adversas, uma vez que induz a ativação da proteção fisiológica nas bactérias. Neste trabalho, avaliamos os efeitos do estresse térmico e salino na sobrevivência de inoculante preparado de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e monitoramos a viabilidade das células estressadas após a inoculação de milho cultivado em condições *in vitro*. Os efeitos da aplicação de estresse térmico em cultivos isolados acima de 35 °C para ambas as estirpes (Ab-V5 e Ab-V6) resultaram em declínio na taxa de crescimento, assim como para o estresse salino com concentrações de NaCl superiores a 0,3 mol.L⁻¹; no entanto, nenhum tratamento teve uma contagem mais alta do que o grupo controle. A enumeração obtida com PMA-qPCR para raízes de milho inoculadas *cultivadas in vitro* por 7 dias mostrou que há um aumento no número de células viáveis no inoculante quando utilizado o tratamento de estresse salino subletal, o que significa que as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab -V6 apresentaram maior capacidade de adaptação às condições de crescimento com meio contendo 0,3 mol.L⁻¹ NaCl. Os resultados

encontrados mostraram que as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram potencial para osmo Adaptação e resultaram em aumento da sobrevivência celular após a inoculação em plantas de milho.

5.2 INTRODUÇÃO

O uso de inoculantes formulados com microrganismos rizosféricos para gramíneas tem aumentado contínua e gradualmente nos últimos anos, incluindo inoculantes bacterianos. A bactéria promotora de crescimento vegetal (BPCV) *Azospirillum brasilense* é a espécie mais bem estudada dentro do gênero *Azospirillum* e coloniza a rizosfera de várias gramíneas economicamente relevantes (MUKHERJEE; SEN, 2014). *A. brasilense* tem eficácia agrônômica comprovada cientificamente e é atualmente um dos gêneros mais recomendados para inoculantes comerciais em todo o mundo. No Brasil, as estirpes recomendadas para formulações de inoculantes para cereais incluem as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*. Porém, apesar da grande ênfase na aplicação de inoculantes bacterianos na agricultura, manter a viabilidade tem sido um grande desafio que gera resultados divergentes no campo. A viabilidade de inoculantes está sujeita a fatores deletérios aos quais ele é continuamente exposto durante ou após o processo de formulação. Esses efeitos deletérios acabam prejudicando o impacto da interação, o estímulo de crescimento das plantas e o aumento da produtividade das plantas, pois afetam o número de células viáveis disponíveis para inoculação (BACKER et al., 2018; BERNINGER et al., 2018; MOHANRAM; KUMAR, 2019; O'CALLAGHAN, 2016).

Uma formulação adequada é um fator crucial para o sucesso dos inoculantes bacterianos. A formulação é responsável por criar um microambiente mais adequado e estabilizar as células durante o armazenamento e aplicação do inoculante (BASHAN et al., 2014; O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022). Estratégias de proteção baseadas em mecanismos de proteção fisiológica têm sido propostas para alcançar sobrevivência e eficácia mais notáveis de inoculantes, como a aplicação de estresse subletal. A aplicação de estresse subletal é apresentada como uma estratégia para aumentar a sobrevivência das células bacterianas, aumentando a tolerância ao agente estressor, o que desencadeia respostas adaptativas, como a síntese de proteínas responsivas ao estresse e metabólitos secundários, fornecendo proteção celular (BERNINGER et al., 2018; CABREFIGA et al., 2014;

MORGAN et al., 2006). No entanto, esse tipo de estratégia ainda não foi elucidado, uma vez que as respostas adaptativas aos estressores parecem ser dependentes da estirpe bacteriana, sendo necessário desenvolver estudos específicos para cada caso (BERNINGER et al., 2018; GREFFE; MICHIELS, 2020).

A PCR quantitativa (qPCR) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a quantificação de microrganismos da rizosfera, pois proporciona alta especificidade, sensibilidade e rapidez no monitoramento da população bacteriana (SORENSEN et al., 2009). O pré-tratamento de células bacterianas com corantes intercalares de DNA como monoazida de propídeo (PMA) é uma abordagem que permite a quantificação de células viáveis por qPCR, sem superestimar a quantificação da população bacteriana (NOCKER; CAMPER, 2006; NOGVA et al., 2003). A técnica de PMA-qPCR tem sido amplamente utilizada para detectar células viáveis em populações microbianas em diversas espécies de plantas. Mais recentemente foi adaptada para quantificar inoculantes bacterianos de *A. brasilense* em raízes de milho (DA CUNHA et al., 2020a). Este presente trabalho avaliou os principais efeitos de estratégias de aplicação de estresse subletal na sobrevivência e eficácia de inoculantes de *A. brasilense* em interação com plantas de milho, quantificando células viáveis, usando ferramentas moleculares e microbiológicas. O objetivo principal foi identificar a possibilidade de adaptação de células para serem utilizadas em formulações de inoculantes comerciais e, conseqüentemente, melhor desempenho na interação com plantas.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Fluxograma experimental

Os ensaios de aplicação de estresse subletal em inoculantes de *Azospirillum brasilense* foram conduzidos de forma isolada a fim de observar o efeito das diferentes fontes de estresse (salino e térmico) na sobrevivência dos inoculantes por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após semeadura em placa. Com base nestes ensaios, foram selecionadas as melhores condições dos agentes estressores, e foram aplicadas em ensaio de inoculação de plantas de milho crescidas *in vitro*. Os experimentos realizados estão sumarizados no fluxograma abaixo (Figura 3.1).

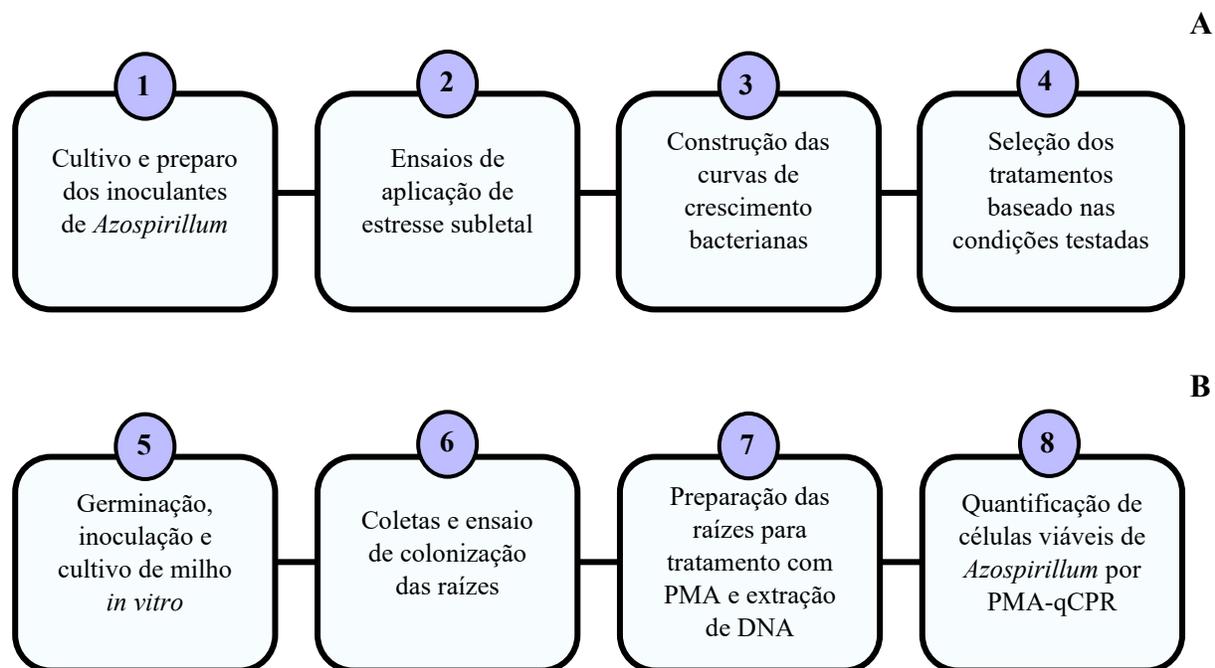


Figura 3.1 - Fluxograma experimental dos ensaios de aplicação de estresse subletal em *Azospirillum* (A) e inoculação, cultivo *in vitro* e quantificação da viabilidade do inoculante em raízes de milho (B). Fonte: Autora (2023).

5.3.2 Estirpes bacterianas e condições de cultivo

As estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* foram cultivadas separadamente em meio de cultura NFbHPN (MACHADO et al., 1991) suplementado com 5 mg.L⁻¹ de lactato de sódio a 30 °C sob aeração e agitação de 120 rpm até DO₆₀₀ 0,8, correspondendo a ~ 10⁸ UFC.mL⁻¹. Foram adicionados à cultura bacteriana os antibióticos estreptomicina (SM) na concentração final de 80 µg/mL e ácido nalidíxico (NAL) a 10 µg/mL. As estirpes usadas na qPCR como controle negativo (*Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*) foram cultivadas conforme previamente descrito (PEREIRA et al., 2014). Foram obtidas correlações 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 (DO AMARAL et al., 2016). Para as contagens em placa, as culturas foram diluídas 10 vezes em série em solução salina 0,9% e 10 µL de cada diluição foi semeada por gotejamento em triplicata em placas de ágar

NFbHPN. Após incubação por 48h a 30 °C, as contagens bacterianas foram expressas em UFC. mL⁻¹.

5.3.3 Curvas de crescimento bacteriano

As curvas de crescimento das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 foram obtidas após estriamento em meio sólido NFbHPN para obtenção de colônias isoladas, seguidas do cultivo em 40 mL de meio líquido NFbHPN. Esta cultura (pré-inóculo) foi cultivada por 18 horas, e 5% do pré-inóculo usado para preparo do inóculo e incubado em condições ideais de crescimento por até 10 horas. As leituras da densidade ótica a 600 nm foram realizadas periodicamente em conjunto com a diluição seriada e plaqueamento por gotejamento para posterior contagem bacteriana após incubação por 48h a 30 °C (DO AMARAL et al., 2016).

5.3.4 Aplicação de estresse subletal em *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6

As estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 foram submetidas a diferentes fatores de estresse durante seu crescimento em meio líquido, sendo acompanhado por leituras de densidade ótica e contagem em placa (UFC) em meio NFbHPN. Foram testadas as seguintes condições de estresse subletal: térmico (30, 35, 40 e 45 °C) e salino (NaCl 0, 0,1, 0,3 e 0,5 mol. L⁻¹) durante 48 horas de crescimento. As leituras da densidade ótica a 600 nm foram realizadas periodicamente em conjunto com a diluição seriada e plaqueamento por gotejamento (drop plate) para posterior contagem bacteriana após incubação por 48h a 30 °C.

O tempo de geração de crescimento das estirpes foi calculado para o crescimento em condições ideais e para as condições de estresse subletal testadas conforme descrito por MAIER & PEPPER (2015). A amplitude da fase exponencial foi determinada para ambas as estirpes considerando o coeficiente de determinação (R²) dos conjuntos de valores acordo com o modelo exponencial.

5.3.5 Separação das plântulas de milho em grupos

As plântulas foram separadas de acordo com os tratamentos de estresse que o inóculo recebeu: controle não inoculado (C), controle inoculado (IN), inóculo cultivado sob estresse térmico a 35°C (T1), inóculo cultivado sob estresse térmico a 40°C (T2), inóculo cultivado sob estresse salino a 0,3 mol.L⁻¹ NaCl (S1) e inóculo cultivado sob estresse salino a 0,5 mol.L⁻¹ NaCl (S2). As plântulas controle inoculadas (IN) receberam o inóculo cultivado em

condições ideais. As plântulas controle não-inoculadas (C) foram submetidas às mesmas condições, na ausência da cultura bacteriana.

5.3.6 Germinação, inoculação e condições de crescimento das plântulas de milho

O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando a variedade de milho híbrido de alto vigor (Dow 20A55) para os grupos controle e inoculados com *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6. O inoculante de *A. brasilense* foi preparado pela mistura das culturas das duas estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 previamente crescidas em meio líquido na mesma proporção (1:1). As superfícies das sementes foram desinfestadas em cabine de biossegurança conforme descrito anteriormente (DA CUNHA et al., 2020a) e mantidas por 3 dias em câmara de crescimento no escuro a 25 °C após serem transferidas para placas de ágar (0,8%) para germinação. As plântulas pré-germinadas foram inoculadas com as culturas de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 ($\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹) após diluição para 10^7 UFC.mL⁻¹ (1 mL por semente) em meio lactato NFb (sem fonte de nitrogênio), durante 30 min a 30 °C sob agitação constante (80 rpm) (RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Para o cultivo *in vitro*, as plântulas foram lavadas em solução salina 0,9% por 1 min e colocadas em tubos de vidro com pontes de papel germiteste e *Plant Medium* (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 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 (DIC) com quatro replicatas biológicas. As plântulas de milho foram coletadas aleatoriamente aos 7 dias após a inoculação (DAI). As superfícies das raízes foram tratadas conforme descrito anteriormente (DA CUNHA et al., 2020a) e imediatamente utilizadas no ensaio de colonização ou tratadas com PMA e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento da extração de DNA.

5.3.7 Preparo das raízes e tratamento com PMA

As raízes de milho crescidas *in vitro* (~ 100 mg) foram preparadas para tratamento com PMA por esmagamento em solução salina conforme descrito anteriormente (DA CUNHA et al., 2020a). Os precipitados obtidos das raízes de milho crescidas *in vitro* foram ressuspensos em 1 mL de água ultra-pura e tratados com PMA (Biotium Inc., Hayward, CA,

USA) a 20 mM, para obter uma concentração final de 50 μ M de PMA (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009). Os tubos 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.

5.3.8 Extração de DNA vegetal e bacteriano

O DNA genômico foi extraído a partir de culturas bacterianas de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™, Madison, WI, EUA) com modificações (FALEIRO et al., 2013). O DNA total de raízes de milho foram extraídos utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) conforme descrito pelo fabricante com modificações. Cada extrato correspondeu a um pool de raízes de quatro plantas (~ 100 mg de tecido). A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop™ 2000 (Wilmington, DE, EUA), pela medida da absorbância da amostra em 260 e 280 nm.

5.3.9 PCR quantitativa associada à propídio monoazida (PMA-qPCR)

A quantificação do inoculante preparado de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em amostras de raízes de milho crescidas *in vitro* foi realizada por PMA-qPCR utilizando ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O par de iniciadores AznifA foi usado para amplificação do fragmento de 96 pb de uma região codificadora do gene *nifA* de *A. brasilense* (FALEIRO et al., 2013). As reações de amplificação consistiram em 12,5 μ L de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 600 nM do par de primers AznifA R/F, água ultrapura e 10 ng/ μ L DNA molde em um volume final de 25 μ L. As reações de PMA-qPCR foram realizadas em duplicata nas condições descritas anteriormente (DA CUNHA et al., 2020a). Todas as execuções de PCR em tempo real foram analisadas usando as configurações automáticas do software.

5.3.10 Construção de curvas padrão para quantificação

As curvas padrão (Cq versus log número de cópias de DNA e Cq versus Log UFC) foram obtidas por diluição seriada (10x) de DNA de cultivos isolados das estirpes de *A.*

brasilense Ab-V5 e Ab-V6 em água ultra-pura. As concentrações das soluções de DNA variaram de 7,70 ng a 7,70 fg, correspondendo a um número estimado de cópias de DNA de 10^6 a 10^0 , calculadas com base no genoma total de *A. brasilense* estirpe Sp7 (Genbank ASM782742v1) de 7.030.811 pb (WHITMAN et al., 2015). A contagem de UFC correspondente às concentrações de DNA foi determinada pela contagem de UFC em placa, a partir das mesmas alíquotas utilizadas no isolamento do DNA (ILHA et al., 2016). As eficiências de amplificação foram determinadas conforme descrito anteriormente (FALEIRO et al., 2013). As curvas padrão também foram construídas usando DNA isolado de raízes de milho misturados em diluições seriadas do inóculo preparado com os cultivos das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 (DA CUNHA et al., 2020a). As sementes de milho foram esterilizadas na superfície e as plântulas foram cultivadas *in vitro* por 7 dias. As raízes foram coletadas, lavadas em água destilada autoclavada e trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Uma alíquota de 100 μ L de inóculo diluído de *A. brasilense* (variando de 10^2 a 10^8 UFC) foi adicionada a 100 mg de raízes trituradas. As misturas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e o DNA foi isolado. As eficiências de amplificação foram calculadas plotando os valores de Cq versus \log_{10} UFC.g⁻¹. Nenhuma bactéria foi adicionada ao controle negativo.

5.3.11 Ensaio de colonização das raízes de milho

Para determinar a colonização bacteriana nas raízes, as plântulas de milho cultivadas *in vitro* foram coletadas aleatoriamente aos 7 DAI. As raízes foram lavadas e aproximadamente 100 mg de raiz fresca 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 NFbHPN de ágar para determinar a contagem (UFC.g⁻¹ de peso fresco de raiz) após 48 horas de incubação a 30 °C (FALEIRO et al., 2013).

5.3.12 Determinação de UFC por PMA-qPCR e contagem em placa

A estimativa da contagem bacteriana nos inoculantes, cultivos de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, e nas raízes de milho inoculados por qPCR foram calculadas conforme descrito anteriormente (ILHA et al., 2016). A contagem em placa das culturas de inoculantes e das raízes de milho foram determinadas pelo método de gotejamento (*drop*

plate) em meio ágar NFbHPN. Os dados foram expressos como UFC.mL⁻¹ (inoculante) ou UFC.g⁻¹ (peso fresco de raiz de milho).

5.3.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica (13.3, 2017, TIBCO Software Inc.). Análise de variância e teste de Tukey foram utilizados para determinar as diferenças estatisticamente significativas na quantificação de *A. brasilense* nas amostras de culturas submetidas às diferentes condições de estresse subletal e nas amostras de raízes inoculadas ($p < 0,05$). Análise de correlação foi utilizada para estimar o grau de relacionamento entre os resultados obtidos por PMA-qPCR e contagem em placa. A normalidade e homogeneidade dos dados dos ensaios *in vitro* serão analisadas usando os testes de *Shapiro-Wilk* e a variação dos dados foi determinada usando valores de quartis.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Curvas de crescimento de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6

O desempenho microbiano das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* foi avaliado em suas condições ideais de cultivo por meio da obtenção das curvas de crescimento de cada estirpe em condições de isolamento (Figura 3.2 A e B). As curvas de crescimento obtidas para ambas estirpes apresentaram desempenho semelhante, sendo possível observar a correlação existente entre a densidade óptica e a contagem em placa. O ponto de fase exponencial equivalente a $\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹ foi observado com 8 horas de cultivo (OD₆₀₀ 0,8).

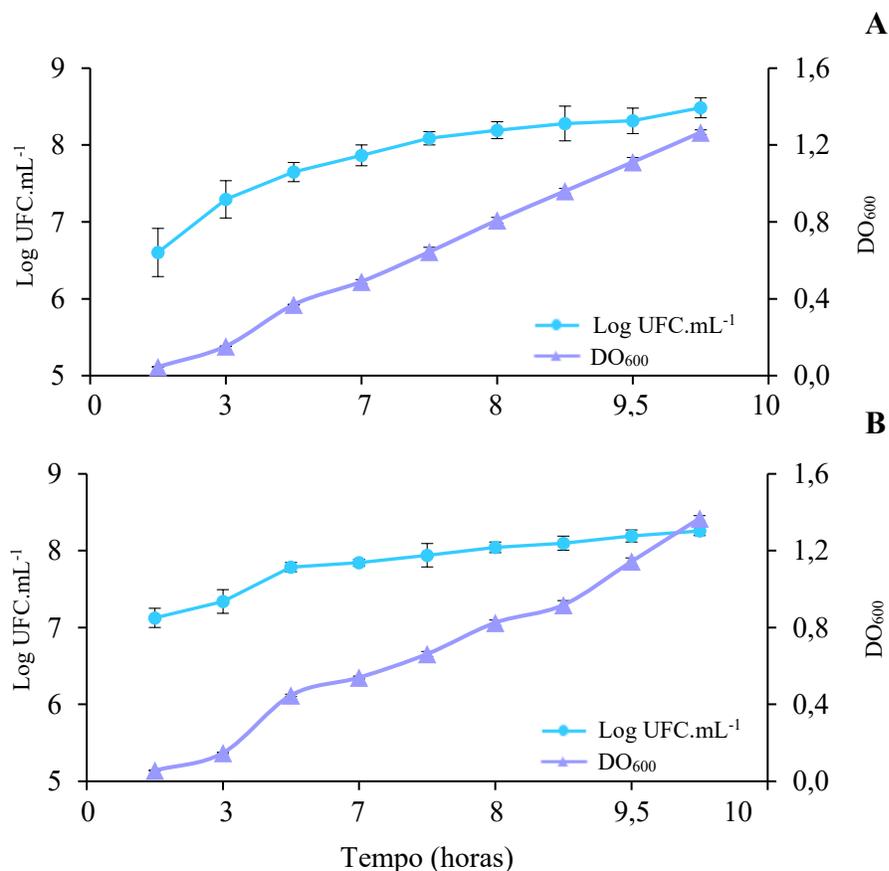


Figura 3.2 - Curva de crescimento bacteriano (Log UFC.mL⁻¹ versus tempo) obtida a partir de contagem em placa e medida da densidade ótica (DO₆₀₀) para *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 (A) e estirpe Ab-V6 (B). Medições realizadas em quadruplicata, sendo cada placa unidade experimental. Fonte: Autora (2023).

5.4.2 Efeitos da aplicação de estresse subletal em culturas de *A. brasilense*

Os efeitos da aplicação de estresse subletal em culturas bacterianas das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e B-V6 foram avaliados por meio da obtenção de curvas de crescimento (log UFC.mL⁻¹ versus tempo) sob condições de estresse térmico e salino (Figura 3.3). Ensaio de estresse térmico foram desenvolvidos usando temperaturas de crescimento subletais (35, 40 e 45 °C) durante o cultivo de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (Figura 3.3A e 3.3B). Uma diminuição considerável na viabilidade bacteriana foi observada para ambas as estirpes a partir de temperaturas de crescimento de 40 e 45°C. Para o crescimento com temperatura de 35°C, o desempenho das estirpes manteve-se semelhante ao crescimento em condições ideais (30°C). Os testes com aplicação de estresse salino foram desenvolvidos

pela adição de sais no meio de cultura em diferentes concentrações (0,1, 0,3 e 0,5 mol.L⁻¹ NaCl) para cultivo das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* (Figura 3.3C e 3.3D). Uma diminuição considerável na viabilidade bacteriana foi observada para ambas as estirpes a partir de concentrações de NaCl de 0,3 mol.L⁻¹. Não foram observadas colônias para ambas as estirpes após 3 horas de crescimento na concentração de NaCl de 0,5 mol.L⁻¹. Para menores concentrações de sal, as estirpes apresentaram desempenho semelhante ao crescimento em condições ideais, sem adição de sais no meio além da quantidade presente na sua composição original (0 mol.L⁻¹).

A amplitude da fase exponencial foi determinada para ambas as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com os valores de log UFC.mL⁻¹ obtidos em condições ideais de crescimento durante o período de até 48 h (Figura 3.4). Foram considerados dentro do intervalo de crescimento exponencial os valores que apresentaram coeficiente de determinação (R²) adequado de acordo com o modelo exponencial.

A fase exponencial de crescimento bacteriano, também conhecida como fase logarítmica (log) é caracterizada pela duplicação do número de células a cada intervalo de tempo. Nesta fase as bactérias estão em um estado rápido de crescimento e divisão, a cultura bacteriana atinge sua taxa máxima de crescimento e o número de bactérias aumenta exponencialmente. O tempo que a bactéria leva para duplicar-se em um período de tempo específico é chamado de tempo de geração. Uma vez que se conhece a concentração inicial de células de uma cultura, podemos calcular o tempo de geração bacteriano com base nas fórmulas:

$$(1) n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2}$$

$$(2) g = \frac{t}{n}$$

Onde n = número de gerações; N1 = concentração final de células; N0 = concentração inicial de células; g = tempo de geração e t= período de tempo especificado (MAIER; PEPPER, 2015).

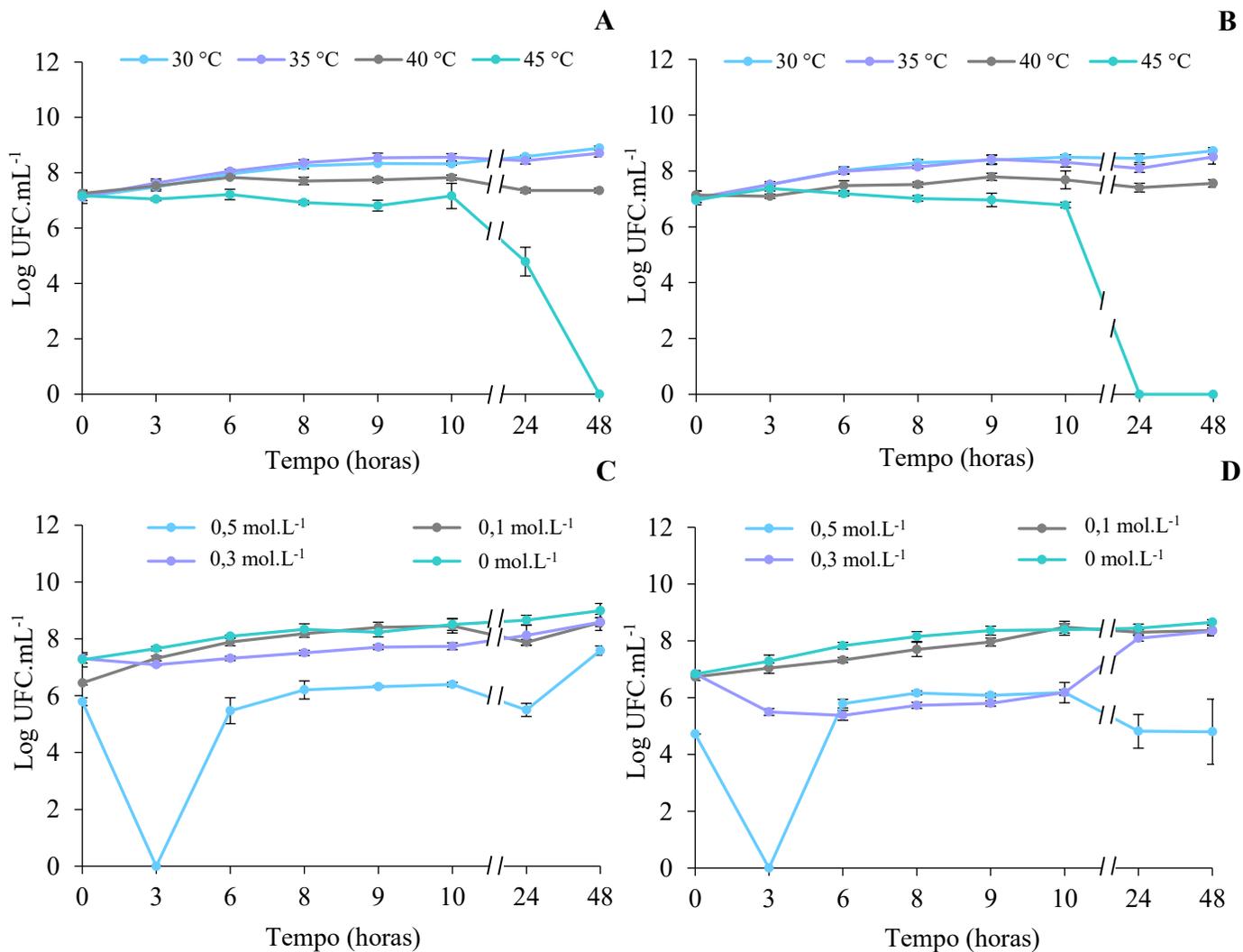


Figura 3.3 - Curva de crescimento (Log UFC.mL⁻¹ versus tempo) bacteriano sob aplicação de estresse térmico (30, 35, 40 e 45°C) e salino (NaCl 0, 0,1, 0,3 e 0,5M) obtido a partir de contagens em placas para estirpe de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (A e C) e Ab-V6 (B e D). Os valores correspondem à média ± SD de quatro réplicas biológicas (n=4). Medições realizadas em quadruplicata, sendo cada placa uma unidade experimental. Fonte: Autora (2023).

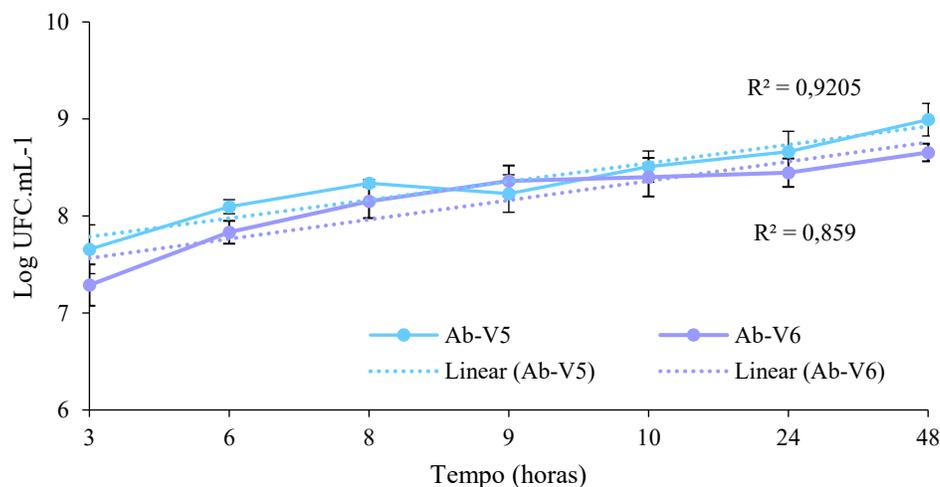


Figura 3.4 – Amplitude da fase exponencial de *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em crescimento a 30°C sem adição de salinidade (condições ideais), obtido a partir de contagens em placas. Os valores correspondem à média \pm SD de quatro réplicas biológicas (n=4). Medições realizadas em quadruplicata, sendo cada placa uma unidade experimental. Fonte: Autora (2023).

O tempo de geração foi determinado para cada estirpe sob condição de estresse avaliada durante a fase exponencial de crescimento considerando intervalo de crescimento de 48 h (Tabela 3.1). Observou-se aumento no tempo de geração para ambas as estirpes com o aumento da salinidade no meio ou temperatura. Nas condições de estresse térmico mais altas (45°C) observou-se tempo de geração negativo, indicando que houve maior morte celular do que geração de novas células durante o crescimento.

Tabela 3.1 – Tempo de geração para *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em condições de estresse.

| Condição de Crescimento | Tempo de Geração (horas) | | Condição de Crescimento | Tempo de Geração (horas) | |
|-------------------------|--------------------------|-------|-------------------------|--------------------------|-------|
| | Ab-V5 | Ab-V6 | | Ab-V5 | Ab-V6 |
| Estresse Salino | | | Estresse Térmico | | |
| 0 mol.L ⁻¹ | 8,35 | 7,94 | 30 °C | 8,2 | 8,1 |
| 0,1 mol.L ⁻¹ | 6,78 | 8,86 | 35 °C | 9,2 | 9,8 |
| 0,3 mol.L ⁻¹ | 11,2 | 9,63 | 40 °C | 131,0 | 34,0 |
| 0,5 mol.L ⁻¹ | 8,03 | 144,0 | 45 °C | -2,0 | -2,1 |

Fonte: Autora (2023)

As diferenças estatísticas entre os tratamentos de estresse foram avaliadas por análise de variância e teste de separação de médias. Foram utilizados os dados obtidos para o inoculante coletado após 8 horas de cultivo em condições salinas e de estresse térmico (Figura 3.5).

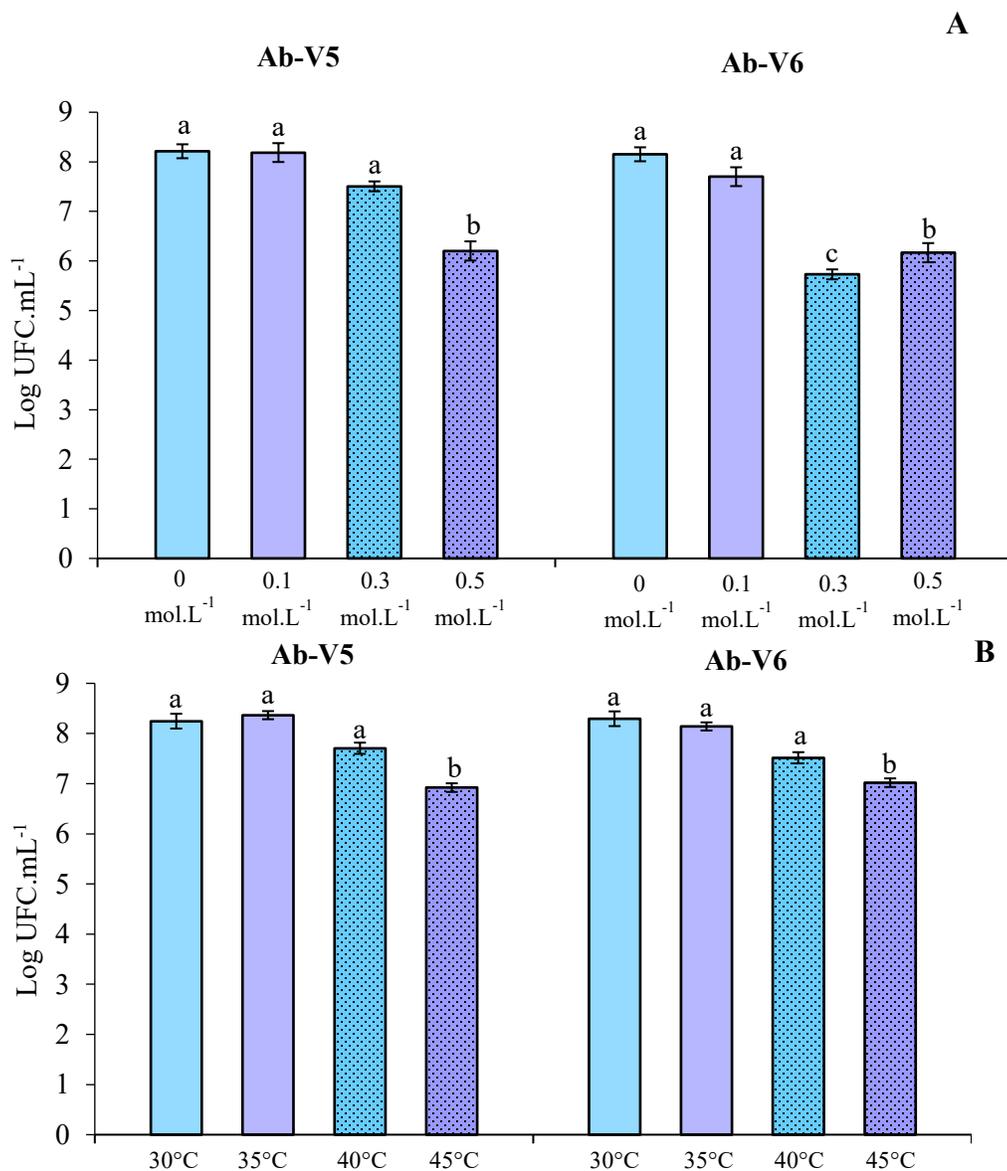


Figura 3.5 - Contagem bacteriana (Log.CFU.mL⁻¹) obtida para *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 sob estresse salino com NaCl (A) ou estresse térmico (B) após 8 horas de cultivo. As barras representam a média ± SD de quatro réplicas biológicas (n=4) e letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05). Fonte: Autora (2023).

Observou-se diferença significativa para o estresse salino (Figura 3.5A) em relação às condições ideais de cultivo (controle) apenas para a concentração de 0,5 mol.L⁻¹ de NaCl durante o cultivo para a estirpe Ab-V5. A estirpe Ab-V6 apresentou diferenças significativas para as concentrações de 0,3 e 0,5 mol.L⁻¹ em relação ao controle sem adição de sal, demonstrando que houve maior sensibilidade ao estresse osmótico para a estirpe Ab-V6. Para o estresse térmico (Figura 3.5B), foram observadas diferenças significativas em relação ao controle apenas para a temperatura de 45 °C de cultivo para ambas as estirpes Ab-V5 e Ab-V6. Nenhuma das condições estressantes avaliadas teve uma contagem de UFC maior que o controle.

5.4.3 Parâmetros de reação para quantificação de células viáveis de *A. brasilense* em inoculantes

Os parâmetros da reação (eficiência, *slope* e coeficiente de correlação) do ensaio qPCR usando primers AznifA foram determinados com base em duas curvas padrão independentes obtidas de DNA isolado de culturas de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 ou de misturas do inoculante preparado e raízes de milho (Apêndice 3). A eficiência das curvas padrões obtidas de culturas isoladas de *A. brasilense* atingiu 89%. As curvas obtidas das misturas atingiram 147%, e os *slopes* variaram de -2,54 a -3,62. Todas as curvas padrão apresentaram correlação linear adequada ($R^2 > 0,95$). O limite de detecção (LOD) usando amostras de culturas puras de estirpes de *A. brasilense* foi estabelecido em 10² cópias do genoma, correspondendo a 7,7 x 10⁻⁴ ng (0,77 pg) de DNA, conforme descrito anteriormente (Faleiro et al., 2013).

5.4.4 Quantificação de células viáveis *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em raízes de milho crescidas *in vitro*

O inoculante preparado da mistura das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 foi quantificado em raízes de milho (controle e inoculado) cultivadas *in vitro* por contagem em placas e PMA-qPCR (Figura 3.6). As contagens bacterianas em Log UFC.g⁻¹ foram obtidas por PMA-qPCR a partir dos valores de C_q e curvas padrão construídas. A enumeração foi

realizada usando as curvas padrão Cq versus Log UFC plotadas com base na média de UFC obtida de culturas puras de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (Apêndice 3A). Uma enumeração adicional foi obtida a partir de curvas padrão de misturas de culturas e raízes de milho (Apêndice 3A). O DNA isolado de raízes de milho controle não-inoculadas (C) apresentou ausência de amplificação ou valores tardios de Cq (abaixo do LOD) correspondendo a amplificações não específicas.

A enumeração obtida por contagem em placa de amostras de raízes cultivadas *in vitro* não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de estresse térmico subletal, T1 ($6,16 \pm 0,71$ Log UFC.g⁻¹), T2 ($6,50 \pm 0,66$ Log UFC.g⁻¹) e tratamento controle inoculado (IN) ($6,52 \pm 0,13$ Log UFC.g⁻¹). Para os tratamentos de estresse salino, apenas o estresse com inoculante cultivado em meio com adição de $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl (S1) foi significativamente diferente ($7,07 \pm 0,33$ Log UFC.g⁻¹) do grupo controle inoculado, enquanto o tratamento de estresse salino com $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl (S2) ($6,84 \pm 0,27$ Log UFC.g⁻¹) não mostrou diferença significativa. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle não inoculado (Figura 3.5A).

A enumeração por PMA-qPCR usando ambas as curvas padrão (cultivo puro e misturas de cultivo com raízes de milho) mostrou que existem diferenças significativas entre os tratamentos de estresse subletal aplicados (Figura 3.6 B). O tratamento de estresse térmico com inoculante cultivado a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (T1) ($6,45 \pm 0,47 / 6,15 \pm 0,61$ Log UFC.g⁻¹) não foi significativamente diferente do grupo controle inoculado (IN) ($6,13 \pm 0,95 / 5,72 \pm 1,33$ Log UFC.g⁻¹). Tratamentos de estresse térmico com inoculante cultivado a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (T2) ($6,30 \pm 0,29 / 5,79 \pm 0,42$ Log UFC.g⁻¹) e estresse salino com inoculante cultivado em meio com NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (S2) ($6,49 \pm 0,59 / 6,17 \pm 0,80$ Log UFC.g⁻¹) não diferiram estatisticamente entre si ou em relação ao grupo controle inoculado (IN). O tratamento de estresse salino com inoculante cultivado em meio com NaCl $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ (S1) ($7,51 \pm 0,54 / 7,57 \pm 1,02$ Log UFC.g⁻¹) apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle inoculado (IN). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do grupo controle não inoculado (C). De todos os tratamentos de estresse subletal aplicados, o tratamento de salinidade com inoculante cultivado em meio com $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl (S1) foi o que apresentou os maiores

valores de contagem de células viáveis (Log UFC) de *A. brasilense* em amostras de milho após cultivo *in vitro* por 7 DAI.

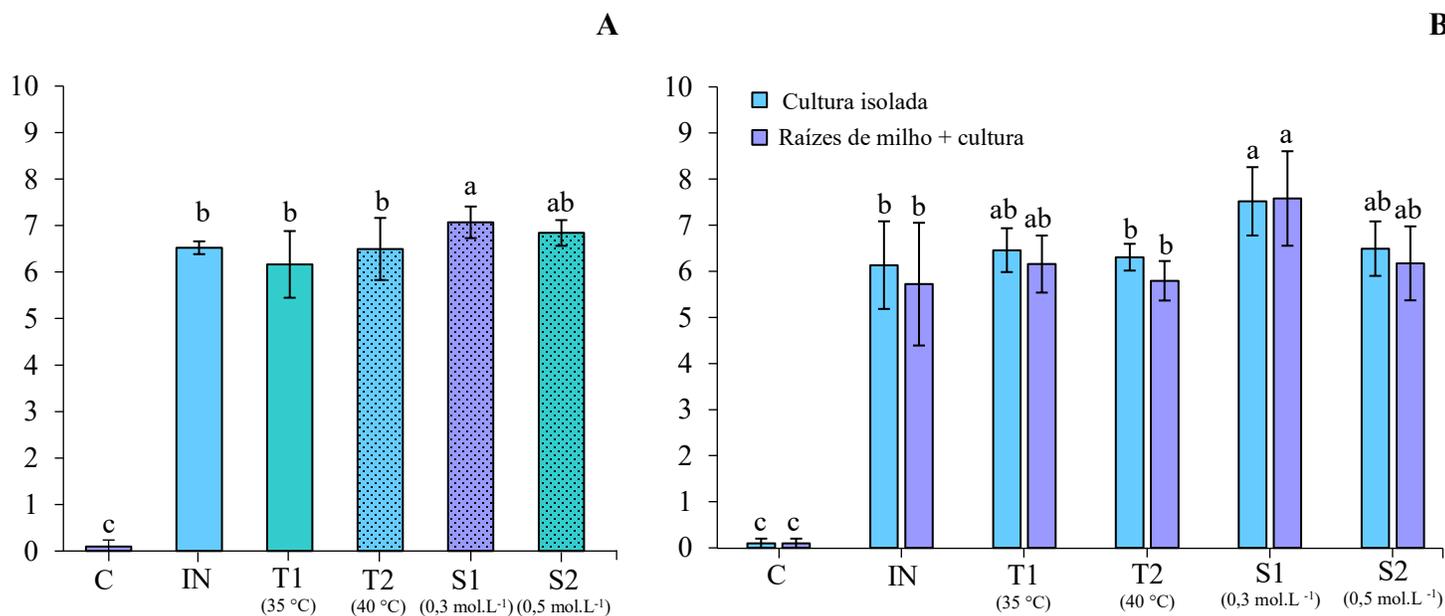


Figura 3.6 – Enumeração (Log UFC.g⁻¹) do inoculante preparado de *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 após aplicação de estresse subletal (salino e térmico) em raízes de milho cultivadas *in vitro* obtidas por contagem em placa (A) e PMA-qPCR (B). Quantificação por PMA-qPCR obtida pela curva padrão de cultura isolada ou de misturas de cultura com raízes de milho. As barras representam a média \pm SD de quatro réplicas biológicas (n=4) e letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: Autora (2023).

A análise de correlação foi realizada para estabelecer a relação entre os resultados de enumeração obtidos por PMA-qPCR e a contagem em placas para amostras de raízes de milho cultivadas *in vitro*. Os valores de inclinação e interceptação e o coeficiente de correlação de Pearson foram obtidos com intervalo de confiança (IC) de 95% (Apêndice 4). O gráfico de dispersão e o coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,7$) obtidos mostraram uma alta relação entre PMA-qPCR e contagem em placa.

5.5 DISCUSSÃO

Diversos inoculantes foram desenvolvidos para uso na agricultura em todo o mundo, contendo microrganismos potencialmente benéficos que contribuem para o crescimento de diferentes espécies vegetais economicamente essenciais. Apesar de ser um mercado em constante expansão, o sucesso do uso desses produtos pode ser comprometido devido a fatores externos que prejudicam sua viabilidade, como condições ambientais desfavoráveis (BERNINGER et al., 2018; KOUR et al., 2020; MOHANRAM; KUMAR, 2019; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Aumentar o desempenho, a persistência e a eficácia da inoculação com microrganismos do solo é uma prioridade para superar esses desafios e pode ser alcançado adotando estratégias de formulação para obter inoculantes estáveis e funcionais que resultem em alta produtividade e agricultura sustentável (QIU et al., 2019; SZOPA et al., 2022; THAKUR, 2018). A aplicação de estresse subletal é uma estratégia atualmente proposta para melhorar a sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes e amplamente estudada para diversos gêneros bacterianos de interesse agrônômico, como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*. Vários tipos de estresse são usados para induzir a resposta adaptativa de sobrevivência das células presentes nos inoculantes, sendo os mais comumente aplicados os estresses salino e térmico (DA CUNHA; PEDROLO; ARISI, 2023). No presente estudo, avaliamos os efeitos do estresse subletal térmico e salino na sobrevivência das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* em diferentes condições durante o cultivo, além de monitorar a viabilidade do inoculante previamente estressado após a inoculação em milho cultivado *in vitro* usando PMA-qPCR.

Apesar das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* apresentarem desempenho semelhante (Figura 3.2), os efeitos da aplicação de estresse subletal foram avaliados separadamente para cada estirpe. Os efeitos do estresse térmico acima de 35 °C e do estresse salino com concentrações de NaCl superiores a 0,3 mol.L⁻¹ para ambas as estirpes resultaram em declínio na taxa de crescimento bacteriano (Figura 3.3). Após um período de 3 horas de crescimento na concentração de NaCl de 0,5 mol.L⁻¹ as estirpes não apresentaram colônias na contagem em placa, indicando que essa concentração causou inibição do crescimento ao induzir uma resposta adaptativa nas células, em resposta a condição de estresse, conhecida como estado viável mas não cultivável (VMNC). Este tipo de comportamento foi

anteriormente observado para *A. brasilense* estirpe FP2 expostas à condições de tratamento térmico durante períodos de tempo acima de 60 minutos (DA CUNHA et al., 2020).

No entanto, nenhum tratamento apresentou contagem de bactérias maior que o grupo controle (Figura 3.4), indicando que inicialmente não houve aumento na sobrevivência das estirpes em condições de estresse. A diminuição da taxa de crescimento bacteriano durante a aplicação de estresse subletal é uma das principais respostas observadas em espécies presentes em formulações de inoculantes (DA CUNHA; PEDROLO; ARISI, 2023) e tem sido relatada para várias espécies, incluindo *Azospirillum formosense*, *Azospirillum lipoferum*, *Glucanacetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus endophyticus*, *Bacillus tequilensis* e *Burkholderia mesoacidophila* (DRAGHI et al., 2016; GHOSH; GUPTA; MOHAPATRA, 2019; HACHICHO; BIRNBAUM; HEIPIEPER, 2017; JAYASURYA; GROVER, 2023; LEANDRO et al., 2021a; LIN et al., 2014; MAZHAR et al., 2016; MHAMDI et al., 2015; MOODY et al., 2019; SOLMI et al., 2023; TANG et al., 2020). Aparentemente, a aplicação de estresse subletal afeta o metabolismo das células bacterianas, causando um estado estacionário ou de crescimento lento (PANDEY et al., 2022). Apesar da diminuição na taxa de crescimento, as estirpes de *A. brasilense* foram capazes de sobreviver em condições de estresse subletal térmico e salino. Após observar os efeitos do estresse térmico e salino no crescimento das estirpes de *A. brasilense*, foram selecionadas as condições de estresse mais favoráveis para induzir o aumento da viabilidade após a inoculação. A sobrevivência de células previamente estressadas nas condições selecionadas foi avaliada após a inoculação de plantas de milho cultivadas *in vitro* por 7 dias por PMA-qPCR e contagem em placa.

Um ensaio confiável de PMA-qPCR foi estabelecido para enumerar células viáveis de *A. brasilense* pré-estressado após a inoculação em plantas de milho cultivadas *in vitro*. Os parâmetros de reação para o ensaio qPCR foram definidos usando curvas padrão obtidas de culturas isoladas e misturas de inoculante preparado e raízes de milho. Estudos anteriores demonstraram que a presença de tecido vegetal diminui o limite de detecção (LOD) para quantificação de *Azospirillum* spp., inclusive para raízes de milho inoculadas. A presença da

matriz na curva padrão permite que a quantificação fique mais próxima da realidade (DA CUNHA et al., 2020; STETS et al., 2015). Neste presente trabalho, as curvas padrão apresentaram eficiência de 89% para as curvas de cultivos puros e 147% para as curvas de misturas de inoculante com raízes de milho (Apêndice 3). Esses resultados foram semelhantes aos resultados já observados no ensaio de qPCR usando primers AznifA para quantificação da estirpe FP2 de *A. brasilense* desenvolvido por FALEIRO et al. (2013): as eficiências das curvas padrão obtidas a partir de curvas de cultivo puro de *A. brasilense* variaram de 90 a 100%; as eficiências das curvas obtidas das misturas de cultivo puro de *A. brasilense* com raízes de milho variaram de 104 a 120%. Para este trabalho, foi observada uma quantificação confiável do DNA das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* por ensaio PMA-qPCR. A faixa dinâmica das curvas padrão foi de 10^6 (7,70 ng) a 10^2 (770 fg) cópias do genoma usando culturas isoladas como molde de DNA e 10^8 - 10^2 UFC.g⁻¹ de raiz de milho usando misturas de raízes de milho e cultivo puro como DNA molde, mostrando a alta sensibilidade deste método.

A eficiência do tratamento com PMA na presença de matriz radicular de milho já foi avaliada em plântulas cultivadas *in vitro* e colhidas após 7 da inoculação com a estirpe FP2 de *A. brasilense*. A quantificação de PMA-qPCR mostrou resultados confiáveis em concordância com a enumeração de bactérias por contagem em placa, indicando que o ensaio de PMA-qPCR representa um método adequado para a quantificação de células viáveis de *A. brasilense* em amostras de raízes de milho (DA CUNHA et al., 2020). Neste presente trabalho, a enumeração de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foi desenvolvida para raízes de milho cultivadas *in vitro* por PMA-qPCR (Figura 3.6). A enumeração por contagem em placa revelou diferenças entre os tratamentos de estresse subletal apenas para o inoculante cultivado em meio com 0,3 mol.L⁻¹ NaCl (S1) ($7,07 \pm 0,33$ Log UFC.g⁻¹) em relação ao controle inoculado (IN) ($6,52 \pm 0,13$ Log UFC .g⁻¹) (Figura 3.6 A). Em concordância, a enumeração por PMA-qPCR utilizando ambas as curvas padrão (cultivos puros e misturas de raízes de milho com cultivo puro) mostrou diferenças significativas entre o tratamento com inoculante cultivado em meio com NaCl 0,3 mol.L⁻¹ (S1) ($7,51 \pm 0,54$ / $7,57 \pm 1,02$ Log UFC.g⁻¹) e controle inoculado (IN) ($6,13 \pm 0,95$ / $5,72 \pm 1,33$ Log UFC .g⁻¹) (Figura 3.6 B).

A enumeração mostrou que há um alto número de células viáveis no inoculante quando utilizado o tratamento de estresse subletal salino, o que significa que as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* tiveram maior capacidade de adaptação às condições de crescimento (0,3 mol .L⁻¹ NaCl), mostrando potencial para osmoadaptação das estirpes. Estudos relatam que outras espécies de *Azospirillum* já demonstraram capacidade de osmoadaptação após a aplicação de uma condição de estresse osmótico. *Azospirillum formosense* apresentou tolerância ao crescimento em meio com adição de polietileno glicol (PEG 6000) como agente indutor de estresse osmótico, apresentando principalmente acúmulo de osmólitos, além de apresentar efeitos positivos na germinação de sementes e no índice de vigor em plantas de milho cultivadas em condições *in vitro* (JAYASURYA; GROVER, 2023). *Azospirillum lipoferum* também apresentou tolerância ao crescimento em meio salino (NaCl), além do acúmulo de osmólitos protetores (MAZHAR et al., 2016). Embora o conteúdo de osmólitos intracelulares não tenha sido avaliado neste presente trabalho, está bem estabelecido que na presença de pressão osmótica externa (causada pelo ambiente salino), vários mecanismos intracelulares bacterianos, como o acúmulo de osmólitos, solutos compatíveis ou osmoprotetores, estão ativados. Esses osmólitos são responsáveis pela osmorregulação celular, o que ajuda as células a sobreviverem nessas condições estressantes (DA CUNHA; PEDROLO; ARISI, 2023; HOSSEINIYAN KHATIBI et al., 2019; PANDEY et al., 2022; PATIL et al., 2017).

Neste trabalho, resultados semelhantes foram obtidos para ambas as técnicas de enumeração (contagem em placa e PMA-qPCR) indicando a existência de uma alta correlação entre elas. As análises de correlação realizadas para estabelecer a relação entre os métodos de enumeração confirmaram essas semelhanças ao demonstrar um coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,7$), indicando que existe uma semelhança de até 70% entre a enumeração (Log UFC .g⁻¹) para as técnicas, o que indica que tanto a contagem em placa quanto a PMA-qPCR foram eficazes no monitoramento de células viáveis das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*.

5.6 CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos que a aplicação de estresse subletal salino em inoculantes preparados com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* resultou no aumento da

sobrevivência celular após a inoculação em plantas de milho. A aplicação da estratégia resultou na osmo Adaptação das células, o que pode ter auxiliado na melhor sobrevivência do inoculante após a inoculação das plantas. O estresse térmico inicialmente apresentou resultados promissores quando aplicado diretamente no cultivo bacteriano, porém, após a inoculação no milho, não diferiu dos tratamentos controle, demonstrando que a aplicação desse tipo de estresse não foi suficiente para induzir uma resposta adaptativa nas células. Como consequência dos resultados aqui observados, estudos futuros sobre o processo de colonização e sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes sob aplicação de estresse subletal em condições de campo deveriam ser conduzidos. Este trabalho contribuiu para alcançar formulações de inoculantes mais eficazes e conseqüentemente para melhores resultados de promoção do crescimento das plantas associadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou novas informações acerca das tecnologias utilizadas para aumento de sobrevivência das células presentes em inoculantes formulados com BPCV. Neste contexto, diversos pesquisadores e grupos de pesquisa no Brasil e no mundo têm desenvolvido estudos da aplicação das mais diversas técnicas protetivas nas células presentes nos inoculantes, com o objetivo de melhorar a sobrevivência e efetividade destes produtos no solo em associação com as mais diversas espécies de plantas e conseqüentemente, contribuir para melhoria da produtividade agrícola ao usar estes inoculantes. O presente trabalho buscou realizar sua contribuição para que o objetivo final da união com estes diversos e importantes outros estudos seja atingido, contribuindo assim para uso dos recursos genéticos potenciais e adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis.

Desta forma, com o primeiro artigo deste trabalho, foi possível realizar uma síntese da literatura através de uma revisão sistemática sobre os efeitos e eficácia da estratégia protetiva de aplicação do estresse subletal para melhoria da sobrevivência de inoculantes bacterianos. Por meio da revisão sistemática, foram reunidos 34 estudos os quais foram profundamente analisados e permitiram a identificação das principais lacunas de pesquisa e possíveis aplicações relacionadas ao estresse subletal. O levantamento mostrou que as estratégias mais utilizadas incluíram estresse osmótico, térmico, oxidativo e nutricional, e o principal mecanismo de resposta celular ao estresse foi o acúmulo de osmólitos, fitormônios e exopolissacarídeos (EPS). Foi possível observar que sob estresse subletal, a sobrevivência do inoculante mostrou incrementos positivos após processos de liofilização, dessecação e armazenamento de longo prazo.

Com o segundo artigo deste trabalho, foi possível avaliar a sobrevivência de inoculantes de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 após aplicação de estresse subletal em meio de cultura e em plantas de milho crescidas *in vitro* utilizando ferramentas moleculares. Foi possível observar com a enumeração obtida por PMA-qPCR para raízes de milho inoculadas cultivadas *in vitro* por 7 dias que há um aumento no número de células viáveis no inoculante quando utilizado o tratamento de estresse salino subletal, o que significa que as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram maior capacidade de adaptação às condições de crescimento com meio contendo 0,3 mol.L⁻¹ NaCl. Os

resultados encontrados mostraram que as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram potencial para osmo Adaptação e resultaram em aumento da sobrevivência celular após a inoculação em plantas de milho.

Como consideração final, destacamos que seria muito positivo a condução de estudos futuros sobre o processo de colonização e sobrevivência de bactérias presentes em inoculantes sob aplicação de estresse subletal em condições de campo, a fim de dar continuidade ao estudo da eficácia observado neste trabalho com a colonização *in vitro*. Este trabalho contribuiu alcançando resultados que favorecem a produção de formulações de inoculantes mais eficazes e conseqüentemente para melhores resultados de promoção do crescimento das plantas associadas.

7 REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; ZAHIR, Z. A.; NAZLI, F.; AKRAM, F.; ARSHAD, M.; KHALID, M. Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). **BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 1341–1348, 2013. DOI: 10.1590/S1517-83822013000400045.

- AL-DAOUD, Fadi; GOSSEN, Bruce D.; ROBSON, Justin; MCDONALD, Mary Ruth. Propidium monoazide improves quantification of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* with qPCR. **Plant disease**, [S. l.], v. 101, n. 3, p. 442–447, 2017. DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0715-RE.
- ALVES, Luis Paulo Silveira et al. Importance of Poly-3-Hydroxybutyrate Metabolism to the Ability of *Herbaspirillum seropedicae* To Promote Plant Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 85, n. March 2019, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02586-18>.
- AMBARDAR, Sheetal; VAKHLU, Jyoti. Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 2271–2279, 2013. DOI: 10.1007/s11274-013-1393-2.
- ANDREOLLI, Marco; ZAPPAROLI, Giacomo; LAMPIS, Silvia; SANTI, Chiara; ANGELINI, Elisa; BERTAZZON, Nadia. In vivo endophytic, rhizospheric and epiphytic colonization of *Vitis vinifera* by the plant-growth promoting and antifungal strain *Pseudomonas protegens* MP12. **Microorganisms**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 1–14, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9020234.
- ANDREWS, M.; EDWARDS, G. R.; RIDGWAY, H. J.; CAMERON, K. C.; DI, H. J.; RAVEN, J. A. Positive plant microbial interactions in perennial ryegrass dairy pasture systems. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 79–92, 2011.
- ANPII. **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**. 2022. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 5 maio. 2020.
- ARKHIPOVA, T. ...; PRINSEN, E.; VESELOV, S. ...; MARTINENKO, E. ...; MELENTIEV, A. ...; KUDOYAROVA, G. ... Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant Soil**, [S. l.], p. 305–315, 2007. DOI: 10.1007/s11104-007-9233-5.
- ARORA, Naveen K.; KHARE, Ekta; MAHESHWARI, Dinesh K. Plant Growth and Health Promoting Bacteria - Bioformulation and Future Strategies. [S. l.], v. 18, p. 97–116, 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13612-2>.
- ARORA, Naveen Kumar; FATIMA, Tahmish; MISHRA, Isha; VERMA, Maya; MISHRA, Jitendra; MISHRA, Vaibhav. **Environmental sustainability: challenges and viable solutions**. [s.l.] : Springer Singapore, 2018. v. 1 DOI: 10.1007/s42398-018-00038-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42398-018-00038-w>.
- ARRUDA, Leticia; BENEDUZI, Anelise; MARTINS, Adriana; LISBOA, Bruno; LOPES, Cristiane; BERTOLO, Fernanda; PASSAGLIA, Luciane Maria P.; VARGAS, Luciano K. 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**, [S. l.], v. 63, p. 15–22, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.09.001.
- ATIENO, M.; LESUEUR, D. Opportunities for improved legume inoculants: enhanced stress tolerance of rhizobia and benefits to agroecosystems. **SYMBIOSIS**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 191–205, 2019. DOI: 10.1007/s13199-018-0585-9.

BACKER, Rachel; ROKEM, J. Stefan; ILANGUMARAN, Gayathri; LAMONT, John; PRASLICKOVA, Dana; RICCI, Emily; SUBRAMANIAN, Sowmyalakshmi; SMITH, Donald L. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 9, n. October, p. 1–17, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01473.

BALDANI, José I.; BALDANI, Vera L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BARROS, José F. C.; CALADO, José G. DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA A Cultura do Milho. **Book**, [S. l.], p. 1–52, 2014.

BASHAN, Yoav. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 1089–1098, 1986.

BASHAN, Yoav; BIOL, Investigaciones; BASHAN, Yoav. Bacteria / Plant growth-promotion. **Encyclopedia of soils in the environment**, [S. l.], n. April, 2005.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E. **How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth-a critical assessment**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2010. v. 108 DOI: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8).

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, Juan Pablo. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, [S. l.], v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x.

BASHAN, Yoav; HOLGUIN, Gina; DE-BASHAN, Luz E. Azospirillum-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004. DOI: 10.1139/w04-035.

BASTIÁN, Fabiola; COHEN, Ana; PICCOLI, Patricia; LUNA, Virginia; BARALDI, Rita; BOTTINI, Rubén. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 7–11, 1998. DOI: 10.1023/A:1005964031159.

BAZIRE, A.; DIAB, F.; JEBBAR, M.; HARAS, D. Influence of high salinity on biofilm formation and benzoate assimilation by *Pseudomonas aeruginosa*. **JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 5–8, 2007. DOI: 10.1007/s10295-006-0087-2.

BEGLEY, Máire; HILL, Colin. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 6, p. 191–210, 2015. DOI: 10.1146/annurev-food-030713-092350.

BELLO, Aminu; WIEBE, Natasha; GARG, Amit; TONELLI, Marcello. Evidence-based

decision-making 2: systematic reviews and meta-analysis. **Clinical Epidemiology**, [S. l.], p. 397–416, 2015.

BERNINGER, T.; LOPEZ, O. G.; BEJARANO, A.; PREININGER, C.; SESSITSCH, A. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **MICROBIAL BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 277–301, 2018. a. DOI: 10.1111/1751-7915.12880.

BERNINGER, Teresa; GONZÁLEZ LÓPEZ, Óscar; BEJARANO, Ana; PREININGER, Claudia; SESSITSCH, Angela. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 277–301, 2018. b. DOI: 10.1111/1751-7915.12880.

BISUTTI, I. L.; HIRT, K.; STEPHAN, D. Influence of different growth conditions on the survival and the efficacy of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153. **BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 1269–1284, 2015. DOI: 10.1080/09583157.2015.1044498.

BOMFETI, Cleide Aparecida; FLORENTINO, Ligiane Aparecida; GUIMARÃES, Ana Paula; CARDOSO, Patrícia Gomes; GUERREIRO, Mário César; MOREIRA, Fatima Maria de Souza. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 657–671, 2011. DOI: 10.1590/s0100-06832011000300001.

BONATERRA, Anna; CABREFIGA, Jordi; CAMPS, Jaume; MONTESINOS, Emilio. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 185–195, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00313.x.

BOONEN, Miet; MERTENS, Jelle; MICHIELS, Jan; SMOLDERS, Erik. 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**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 2342–2344, 2010. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.09.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.004>.

BOTELHO, Gloria R.; MENDONÇA-HAGLER, Leda Cristina. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 37, p. 401–416, 2006.

BRAEKEN, K.; FAUVART, M.; VERCRUYSSSE, M.; BEULLENS, S.; LAMBRICHTS, I.; MICHIELS, J. Pleiotropic effects of a rel mutation on stress survival of *Rhizobium etli* CNPAF512. **BMC MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 8, 2008. DOI: 10.1186/1471-2180-8-219.

BRANKATSCHK, Robert; BODENHAUSEN, Natacha; ZEYER, Josef; BÜRGMANN, Helmut. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S. l.], v. 78, n. 12, p. 4481–4489, 2012.

BRASIL. Decreto nº 4.954, 14 de janeiro de 2004. Dispõe sobre a inspeção e fiscalização

da produção e comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes.2004.

CABREFIGA, J.; FRANCÉS, J.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Improvement of Fitness and Efficacy of a Fire Blight Biocontrol Agent via Nutritional Enhancement Combined with Osmoadaptation. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 77, n. 10, p. 3174–3181, 2011. a. DOI: 10.1128/AEM.02760-10.

CABREFIGA, J.; FRANCÉS, J.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Improvement of Fitness and Efficacy of a Fire Blight Biocontrol Agent via Nutritional Enhancement Combined with Osmoadaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 77, n. 10, p. 3174–3181, 2011. b. DOI: 10.1128/aem.02760-10.

CABREFIGA, J.; FRANCÉS, J.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 117, n. 4, p. 1122–1131, 2014. a. DOI: 10.1111/jam.12582.

CABREFIGA, J.; FRANCÉS, J.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS 62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant. **Journal of applied microbiology**, [S. l.], v. 117, n. 4, p. 1122–1131, 2014. b.

CALABI-FLOODY, Marcela; MEDINA, Jorge; RUMPEL, Cornelia; CONDRON, Leo M.; HERNANDEZ, Marcela; DUMONT, Marc; MORA, Maria de la Luz. **Smart Fertilizers as a Strategy for Sustainable Agriculture**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. v. 147 DOI: 10.1016/bs.agron.2017.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2017.10.003>.

CANTO, Graziela de Luca. **Revisões Sistemáticas da Literatura - Guia Prático**. [s.l.] : Publishing, Editora Brazil, 2020.

CARON, G. Nebe-von. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. **Journal of applied microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 6, p. 988–998, 1998.

CASTERIANO, A.; WILKES, M. A.; DEAKER, R. Physiological Changes in Rhizobia after Growth in Peat Extract May Be Related to Improved Desiccation Tolerance. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 79, n. 13, p. 3998–4007, 2013. a. DOI: 10.1128/AEM.00082-13.

CASTERIANO, Andrea; WILKES, Meredith A.; DEAKER, Rosalind. Physiological changes in rhizobia after growth in peat extract may be related to improved desiccation tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 79, n. 13, p. 3998–4007, 2013. b. DOI: 10.1128/AEM.00082-13.

CHAMAM, Amel; SANGUIN, Hervé; BELLVERT, Florian; MEIFFREN, Guillaume; COMTE, Gilles; WISNIEWSKI-DYÉ, Florence; BERTRAND, Cédric; PRIGENT-COMBARET, Claire. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum*–*Oryza sativa* association. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 87, p. 65–

77, 2013.

CHANG, Woo-Suk; LEE, Hae-In; HUNGRIA, Mariangela. Soybean production in the Americas. *In: Principles of plant-microbe interactions*. [s.l.] : Springer, 2015. p. 393–400.

CHANRATANA, Mak; HAN, Gwang Hyun; CHOUDHURY, Aritra Roy; SUNDARAM, Seshadri; HALIM, Md Abdul; KRISHNAMOORTHY, Ramasamy; KANG, Yeongyeong; SA, Tongmin. Assessment of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 aggregates for salt tolerance and plant growth promoting characteristics for bio-inoculant development. **AMB Express**, Department of Environmental and Biological Chemistry, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Republic of Korea ; Department of Environmental and Biological Chemistry, College of Agriculture, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-017-0518-7>.

CHIEN, C. C.; WANG, L. J.; LIN, W. R. Polyhydroxybutyrate accumulation by a cadmium-resistant strain of *Cupriavidus taiwanensis*. **JOURNAL OF THE TAIWAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 1164–1169, 2014. DOI: 10.1016/j.jtice.2014.02.004.

CHOUDHURY, B.; AZAD, P.; KALITA, M. C. **Variability in symbiotic effectiveness of native rhizobia in acid stress**, 2010.

CIBICHAKRAVARTHY, B.; PREETHA, R.; SUNDARAM, S. P.; KUMAR, K.; BALACHANDAR, D. Diazotrophic diversity in the rhizosphere of two exotic weed plants, *Prosopis juliflora* and *Parthenium hysterophorus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 605–613, 2012. DOI: 10.1007/s11274-011-0853-9.

CIEŚLA, Jolanta; KOPYCIŃSKA, Magdalena; ŁUKOWSKA, Małgorzata; BIEGANOWSKI, Andrzej; JANCZAREK, Monika. Surface properties of wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain 24.2 and Its derivatives with different extracellular polysaccharide content. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1–21, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0165080.

COCOLIN, Luca; ALESSANDRIA, Valentina; DOLCI, Paola; GORRA, Roberta; RANTSIOU, Kalliopi. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 167, n. 1, p. 29–43, 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008.

COHEN, Ana C.; BOTTINI, Rubén; PONTIN, Mariela; BERLI, Federico J.; MORENO, Daniela; BOCCANLANDRO, Hernán; TRAVAGLIA, Claudia N.; PICCOLI, Patricia N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia plantarum**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 79–90, 2015.

COHEN, Ana C.; TRAVAGLIA, Claudia N.; BOTTINI, Ruben; PICCOLI, Patricia N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, [S. l.], v. 87, n. 5, p. 455–462, 2009.

CONAB. Acompanhamento da Safra brasileira de grãos. **Boletim da Safra 2021**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 60, 2022. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; GARCIA, N.; VINAS, I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 89, n. 5, p. 793–800, 2000.

COUILLEROT, Olivier; BOUFFAUD, Marie Lara; BAUDOIN, Ezékiel; MULLER, Daniel; CABALLERO-MELLADO, Jesus; MOËNNE-LOCCOZ, Yvan. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 2298–2305, 2010. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.09.003.

CRESPO-SEMPERE, Ana; ESTIARTE, Núria; MARÍN, Sonia; SANCHIS, Vicente; RAMOS, Antonio J. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 165, n. 3, p. 214–220, 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.017.

CROCKFORD, A. J.; BEHNCKE, C.; WILLIAMS, H. D. The adaptation of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli to oxidative stress and its overlap with other environmental stress responses. **MICROBIOLOGY-SGM**, [S. l.], v. 142, p. 331–336, 1996. DOI: 10.1099/13500872-142-2-331.

CYTRYN, Eddie J. et al. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 189, n. 19, p. 6751–6762, 2007.

DA CUNHA, E. T.; PEDROLO, A. M.; PALUDO, F.; SCARIOT, M. C.; ARISI, A. C. M. *Azospirillum brasilense* viable cells enumeration using propidium monoazide-quantitative PCR. **Archives of Microbiology**, [S. l.], 2020. a. DOI: 10.1007/s00203-020-01877-0.

DA CUNHA, Elisandra Triches; PEDROLO, Ana Marina; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. Effects of sublethal stress application on the survival of bacterial inoculants: a systematic review. **Archives of microbiology**, [S. l.], v. 205, n. 5, p. 190, 2023. DOI: 10.1007/s00203-023-03542-8.

DA CUNHA, Elisandra Triches; PEDROLO, Ana Marina; PALUDO, Franciele; SCARIOT, Mirella Crhistine; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. *Azospirillum brasilense* viable cells enumeration using propidium monoazide-quantitative PCR. **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 202, n. 7, p. 1653–1662, 2020. b. DOI: 10.1007/s00203-020-01877-0.

DAHLLÖF, Ingela; BAILLIE, Harriet; KJELLEBERG, Staffan. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S. l.], v. 66, n. 8, p. 3376–3380, 2000.

DAZZO, Frank B.; YANNI, Youssef G. The natural *Rhizobium*-cereal crop association as an example of plant-bacteria interaction. **Biological approaches to sustainable soil systems**. CRC Press, Boca Raton, [S. l.], p. 109–127, 2006.

DE SOUZA, Gabriela K.; SAMAPAIO, Jamilla; LONGONI, Leticia; FERREIRA, Silviane; ALVARENGA, Samuel; BENEDUZI, Anelise. Soybean inoculants in Brazil: an

overview of quality control. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 205–211, 2019. DOI: 10.1007/s42770-018-0028-z.

DE SOUZA, Rocheli; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciane M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.

DEAKER, Rosalind; ROUGHLEY, Rodney J.; KENNEDY, Ivan R. Legume seed inoculation technology—a review. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 1275–1288, 2004.

DEL CERRO, Pablo; PÉREZ-MONTAÑO, Francisco; GIL-SERRANO, Antonio; LÓPEZ-BAENA, Francisco Javier; MEGÍAS, Manuel; HUNGRIA, Mariangela; OLLERO, Francisco Javier. The Rhizobium tropici CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. May, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/srep46712.

DEL MAR LLEÒ, Maria; PIEROBON, Sabrina; TAFI, Maria Carla; SIGNORETTO, Caterina; CANEPARI, Pietro. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an Enterococcus faecalis viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. 4564–4567, 2000.

DELAMUTA, Jakeline Renata Marçon; RIBEIRO, Renan Augusto; ORMEÑO-ORRILLO, Ernesto; MELO, Itamar Soares; MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza; HUNGRIA, Mariangela. Polyphasic evidence supporting the reclassification of Bradyrhizobium japonicum group Ia strains as Bradyrhizobium diazoefficiens sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 63, n. PART9, p. 3342–3351, 2013. DOI: 10.1099/ijs.0.049130-0.

DENARDIN, Norimar D. Avila. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**, [S. l.], v. 5, p. 35–37, 2006.

DIAPER, Julian P.; EDWARDS, Clive. Survival of Staphylococcus aureus in lakewater monitored by flow cytometry. **Microbiology**, [S. l.], v. 140, n. 1, p. 35–42, 1994.

DO AMARAL, Fernanda P.; PANKIEVICZ, Vânia C. S.; ARISI, Ana Carolina M.; DE SOUZA, Emanuel M.; PEDROSA, Fabio; STACEY, Gary. Differential growth responses of Brachypodium distachyon genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 90, n. 6, p. 689–697, 2016. DOI: 10.1007/s11103-016-0449-8.

DOBBELAERE, Sofie; VANDERLEYDEN, Jos; OKON, Yaacov; DOBBELAERE, Sofie; VANDERLEYDEN, Jos; OKON, Yaacov. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere**. [S. l.], v. 2689, 2010. DOI: 10.1080/713610853.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION 1976, **Anais [...]**. : Washington State University Press Pullman, 1976. p. 518–538.

DOBEREINER, Johanna; PEDROSA, Fábio O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. **Science Tech Publishers**, [S. l.], 1987.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>.

DORJEY, Stanzin; DOLKAR, Disket; SHARMA, Richa. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Pseudomonas : A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 882–886, 2017. DOI: 10.20546/ijcmas.2021.1004.093.

DRAGHI, W. O. et al. **A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium Sinorhizobium meliloti**, 2016. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84978393092&doi=10.1038%2Fsrep29278&partnerID=40&md5=b3aa8a583631e6794aabed2ec6c573d2>.

DROUIN, P.; PRÉVOST, D.; ANTOUN, H. Physiological adaptation to low temperatures of strains of Rhizobium leguminosarum bv. viciae associated with Lathyrus spp.(1). **FEMS microbiology ecology**, England, v. 32, n. 2, p. 111–120, 2000. a. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00705.x.

DROUIN, Pascal; PRÉVOST, Danielle; ANTOUN, Hani. Physiological adaptation to low temperatures of strains of Rhizobium leguminosarum bv. viciae associated with Lathyrus spp. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 111–120, 2000. b. DOI: 10.1016/S0168-6496(00)00020-9.

DUCA, Daiana; LORV, Janet; PATTEN, Cheryl L.; ROSE, David; GLICK, Bernard R. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

DUNGAIT, Jennifer A. J. et al. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 434, p. 39–50, 2012.

EGENER, Tanja; HUREK, Thomas; REINHOLD-HUREK, Barbara. Endophytic expression of nif genes of Azoarcus sp. strain BH72 in rice roots. **Molecular plant-microbe interactions**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 813–819, 1999.

ELIZAQUÍVEL, Patricia; SÁNCHEZ, Gloria; AZNAR, Rosa. 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**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 704–708, 2012. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.12.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.003>.

ESPINDULA, Eliandro; FALEIRO, Alexandro César; PEREIRA, Tomás Pellizzaro; DO AMARAL, Fernanda Plucani; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. Azospirillum brasilense

FP2 modulates respiratory burst oxidase gene expression in maize seedlings. **Indian Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 316–323, 2017.

FAHAD, S. et al. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 4907–4921, 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3754-2.

FALEIRO, Alexandro César; PEREIRA, Tomás Pellizzaro; ESPINDULA, Eliandro; BROD, Fábio Cristiano Angonesi; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 125–133, 2013. DOI: 10.1007/s13199-013-0262-y.

FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021**. Rome. DOI: 10.4060/cb4477en.

FERREIRA, Carlos M. H.; SOARES, Helena M. V. M.; SOARES, Eduardo V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 682, p. 779–799, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.225.

FITTIPALDI, Mariana; NOCKER, Andreas; CODONY, Francesc. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007>.

FLEMMING, Hans Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415.

FOSTER, JOHN W. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 175, n. 7, p. 1981–1987, 1993.

FOSTER, JOHN W. Microbial responses to acid stress. **Bacterial stress responses**, [S. l.], p. 99–115, 2000.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison University of Wisconsin Press, , 1932.

FREEMAN, B. C.; CHEN, C. L.; YU, X. L.; NIELSEN, L.; PETERSON, K.; BEATTIE, G. A. Physiological and Transcriptional Responses to Osmotic Stress of Two *Pseudomonas syringae* Strains That Differ in Epiphytic Fitness and Osmotolerance. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, [S. l.], v. 195, n. 20, p. 4742–4752, 2013. DOI: 10.1128/JB.00787-13.

FUKAMI, Josiane; CEREZINI, Paula; HUNGRIA, Mariangela. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1186/s13568-018-0608-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.

FUKAMI, Josiane; OLLERO, Francisco Javier; MEGÍAS, Manuel; HUNGRIA,

- Mariangela. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0453-7.
- GALISA, Péricles S.; DA SILVA, Helder A. P.; MACEDO, Aline V. M.; REIS, Verônica M.; VIDAL, Márcia S.; BALDANI, José I.; SIMÕES-ARAÚJO, Jean L. 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**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 1–7, 2012.
- GAO, Xinwei; KONG, Jie; ZHU, Hongkang; MAO, Bingyong; CUI, Shumao; ZHAO, Jianxin. Lactobacillus, Bifidobacterium and Lactococcus response to environmental stress: Mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 132, n. 2, p. 802–821, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15251>. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.15251>.
- GARCÍA-CAÑAS, Virginia; CIFUENTES, Alejandro; GONZÁLEZ, Ramón. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. **Critical reviews in food science and nutrition**, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 425–436, 2004.
- GARCÍA-CAYUELA, Tomás; TABASCO, Raquel; PELÁEZ, Carmen; REQUENA, Teresa. 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**, [S. l.], v. 19, n. 6–7, p. 405–409, 2009. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.02.001.
- GHOSH, D.; GUPTA, A.; MOHAPATRA, S. A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in *Arabidopsis thaliana*. **WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 35, n. 6, 2019. DOI: 10.1007/s11274-019-2659-0.
- GIRAFFA, Giorgio; NEVIANI, Erasmo. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International journal of food microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 1–2, p. 19–34, 2001.
- GIULIETTI, Annapaula; OVERBERGH, Lut; VALCKX, Dirk; DECALLONNE, Brigitte; BOUILLON, Roger; MATHIEU, Chantal. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 386–401, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1261.
- GLICK, Bernard R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, [S. l.], v. 2012, p. 1–15, 2012. DOI: 10.6064/2012/963401. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>.
- GLICK, Bernard R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, [S. l.], v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.
- GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET. **GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2022 - 2027)**. 2022. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biofertilizers-market>

industry?gclid=CjwKCAjwvNaYBhA3EiwACgndginPndQHZgk9meuapg0YW9HQT8xdHGQQ0w89aKiKzstncZko1vOgQRoCE2QQAvD_BwE.

GNANAMANICKAM, Samuel S. **Plant-associated bacteria**. [s.l.] : Springer, 2006. v. 1

GOUDA, Sushanto; KERRY, Rout George; DAS, Gitishree; PARAMITHIOTIS, Spiros; SHIN, Han Seung; PATRA, Jayanta Kumar. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 206, n. October 2017, p. 131–140, 2018. DOI: 10.1016/j.micres.2017.08.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.

GRANT, C. A.; WU, R.; SELLES, F.; HARKER, K. N.; CLAYTON, G. W.; BITTMAN, S.; ZEBARTH, B. J.; LUPWAYI, N. Z. 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**, [S. l.], v. 127, p. 170–180, 2012. DOI: 10.1016/j.fcr.2011.11.002.

GREFFE, V. R. G.; MICHIELS, J. Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 104, n. 9, p. 3757–3770, 2020. a. DOI: 10.1007/s00253-020-10501-6.

GREFFE, Vincent Robert Guy; MICHIELS, Jan. Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 104, n. 9, p. 3757–3770, 2020. b. DOI: 10.1007/s00253-020-10501-6.

GRILLO-PUERTAS, M.; DELAPORTE-QUINTANA, P.; PEDRAZA, R. O.; RAPISARDA, V. A. Intracellular Polyphosphate Levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus* Affect Tolerance to Abiotic Stressors and Biofilm Formation. **MICROBES AND ENVIRONMENTS**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 440–445, 2018. DOI: 10.1264/jsme2.ME18044.

GUNDI, Jackson Seiti; SANTOS, Mariana Sanches; OLIVEIRA, André Luiz Martinez; NOGUEIRA, Marco Antônio; HUNGRIA, Mariangela. Development of liquid inoculants for strains of *Rhizobium tropici* group using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 17, n. 13, p. 411–421, 2018. DOI: 10.5897/ajb2018.16389.

GURSKA, Jolanta; GLICK, Bernard R.; GREENBERG, Bruce 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**, [S. l.], v. 226, n. 9, p. 308, 2015.

GUT, Marco; LEUTENEGGER, Christian M.; HUDER, Jon B.; PEDERSEN, Niels C.; LUTZ, Hans. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. **Journal of virological methods**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 37–46, 1999.

HACHICHO, N.; BIRNBAUM, A.; HEIPIEPER, H. J. Osmotic stress in colony and planktonic cells of *Pseudomonas putida* mt-2 revealed significant differences in adaptive

response mechanisms. **AMB EXPRESS**, [S. l.], v. 7, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0371-8.

HALL, Patrick G.; KRIEG, Noel R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 433, 1984.

HALLSWORTH, John E. Stress-free microbes lack vitality. **Fungal Biology**, [S. l.], v. 122, n. 6, p. 379–385, 2018. DOI: 10.1016/j.funbio.2018.04.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.04.003>.

HASSEN, Ahmed Idris; LAMPRECHT, Sandra C.; BOPAPE, Francina L. Emergence of β -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume–rhizobium host specificity dogma. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1007/s11274-020-2811-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2811-x>.

HAYAT, Rifat; ALI, Safdar; AMARA, Ummay; KHALID, Rabia; AHMED, Iftikhar. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010. DOI: 10.1007/s13213-010-0117-1.

HIERRO, Núria; ESTEVE-ZARZOSO, Braulio; GONZÁLEZ, Ángel; MAS, Albert; GUILLAMÓN, Jose M. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S. l.], v. 72, n. 11, p. 7148–7155, 2006.

HOSSEINIYAN KHATIBI, Seyed Mahdi; ZUNUNI VAHED, Fatemeh; SHARIFI, Simin; ARDALAN, Mohammadreza; MOHAJEL SHOJA, Mohammadali; ZUNUNI VAHED, Sepideh. Osmolytes resist against harsh osmolarity: Something old something new. **Biochimie**, [S. l.], v. 158, p. 156–164, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908419300021>.

HUERGO, Luciano F.; MONTEIRO, Rose A.; BONATTO, Ana C.; RIGO, Liu U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, Leonardo M.; CHUBATSU, Leda S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, Fabio O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología**, [S. l.], p. 17–35, 2008.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens J.; SOUZA, Emanuel M.; PEDROSA, Fabio O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.

HUNGRIA, Mariangela; RIBEIRO, Augusto; NOGUEIRA, Antonio. Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-V5 and Ab-V6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil. **Genome Announc** 6: e00393-18, [S. l.], p. 5–6, 2018.

ILANGUMARAN, G.; SMITH, D. L. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in

Amelioration of Salinity Stress: A Systems Biology Perspective. **FRONTIERS IN PLANT SCIENCE**, [S. l.], v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01768.

ILHA, Eunice C.; SCARIOT, Mirella C.; TREML, Diana; PEREIRA, Tomas P.; SANT'ANNA, Ernani S.; PRUDÊNCIO, Elane S.; ARISI, Ana C. M. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016. DOI: 10.1007/s13213-015-1137-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1137-7>.

JAMBHULKAR, Prashant P.; SHARMA, Pratibha; YADAV, Rakesh. Delivery Systems for Introduction of Microbial Inoculants in the Field. *In*: **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications**. [s.l.: s.n.]. p. 199–218. DOI: 10.1007/978-81-322-2644-4.

JAYASURYA, A.; GROVER, M. Studies on Endurance of *Azospirillum formosense* Strains to Osmotic Stress and Modulation of Early Stage Pearl Millet Growth. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 206–215, 2023. DOI: 10.1134/S0003683823020023.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982.

JOSEPHSON, K. L.; GERBA, Charles P.; PEPPER, Ian L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S. l.], v. 59, n. 10, p. 3513–3515, 1993.

KEER, J. T.; BIRCH, L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 175–183, 2003. DOI: 10.1016/S0167-7012(03)00025-3.

KHAN, Khalid S.; KUNZ, Regina; KLEIJNEN, Jos; ANTES, Gerd. Five steps to conducting a systematic review. **Journal of the royal society of medicine**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 118–121, 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**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 1789–1793, 2011. a. DOI: 10.1007/s00284-011-9929-x.

KHARE, Ekta; ARORA, Naveen 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**, United States, v. 62, n. 6, p. 1789–1793, 2011. b. DOI: 10.1007/s00284-011-9929-x. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79958283721&doi=10.1007%2Fs00284-011-9929-x&partnerID=40&md5=c2ffe65d7a06b14e0829d861094b2640>.

KOUR, Divjot; RANA, Kusam Lata; YADAV, Ajar Nath; YADAV, Neelam; KUMAR, Manish; KUMAR, Vinod; VYAS, Pritesh; DHALIWAL, Harcharan Singh; SAXENA, Anil Kumar. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. November 2019, p. 101487, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101487. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>.

KOZYROVSKA, N. O.; NEGRUTSKA, V. V; KOVALCHUK, M. V; VOZNYUK, T. N. Paenibacillus sp., as a promising candidate for development of a novel technology of inoculant production. **Биополимеры и клетка**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 312, 2005.

LANA, Maria do Carmo; DARTORA, Janaína; MARINI, Deniele; HANN, João Elias. Inoculation with Azospirillum, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 399–405, 2012.

LANDA, Blanca B.; MAVRODI, Olga V; RAAIJMAKERS, Jos M.; MCSPADDEN GARDENER, Brian B.; THOMASHOW, Linda S.; WELLER, David M. Differential ability of genotypes of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 68, n. 7, p. 3226–3237, 2002.

LEANDRO, M.; ANDRADE, L.; VESPOLI, L.; MOREIRA, J.; PIMENTEL, V.; SOARES, F.; PASSAMANI, L.; SILVEIRA, V.; DE SOUZA, G. Comparative proteomics reveals essential mechanisms for osmotolerance in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **RESEARCH IN MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 172, n. 1, 2021. a. DOI: 10.1016/j.resmic.2020.09.005.

LEANDRO, M. R. et al. DegP protease is essential for tolerance to salt stress in the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **MICROBIOLOGICAL RESEARCH**, [S. l.], v. 243, 2021. b. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126654.

LIBERATI, Alessandro et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **Journal of clinical epidemiology**, [S. l.], v. 62, n. 10, p. e1–e34, 2009.

LIN, H. R.; CHEN, G. C.; LONG, D. Y.; CHEN, X. C. Responses of unsaturated *Pseudomonas putida* CZ1 biofilms to environmental stresses in relation to the EPS composition and surface morphology. **WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 30, n. 12, p. 3081–3090, 2014. DOI: 10.1007/s11274-014-1735-8.

LIU, Fangchun; XING, Shangjun; MA, Hailin; DU, Zhenyu; MA, Bingyao. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 10, p. 4617–4625, 2013.

LOBO, Constanza Belén; JUÁREZ TOMÁS, María Silvina; VIRUEL, Emilce; FERRERO, Marcela Alejandra; LUCCA, María Ester. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies.

Microbiological Research, [S. l.], v. 219, n. July 2018, p. 12–25, 2019. DOI: 10.1016/j.micres.2018.10.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>.

LÓPEZ, Silvina M. Y.; SÁNCHEZ, Ma Dolores Molina; PASTORINO, Graciela N.; FRANCO, Mario E. E.; GARCÍA, Nicolás Toro; BALATTI, Pedro A. Nodulation and delayed nodule senescence: strategies of two Bradyrhizobium japonicum isolates with high capacity to fix nitrogen. **Current microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 8, p. 997–1005, 2018.

LUND, Peter A. et al. Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. September, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. de O. Excretion of ammonium by Azospirillum brasilense mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian journal of microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 7, p. 549–553, 1991.

MAHANTY, Trishna; BHATTACHARJEE, Surajit; GOSWAMI, Madhuranthi; BHATTACHARYYA, Purnita; DAS, Bannhi; GHOSH, Abhrajyoti; TRIBEDI, Prosun. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 3315–3335, 2017. DOI: 10.1007/s11356-016-8104-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>.

MAIER, Raina M.; PEPPER, Ian L. Bacterial Growth. In: PEPPER, Ian L.; GERBA, Charles P.; GENTRY, Terry J. B. T. Environmental Microbiology (Third Edition) (org.). **Environmental Microbiology**. 3th. ed. San Diego: Academic Press, 2015. p. 37–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012394626300003X>.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1100/2012/491206.

MAPA. Instrução Normativa SDA Nº 13 de 24 de março de 2011/2011.

MARINKOVIĆ, J.; DORDEVIĆ, V.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; BJELIĆ, D.; VUCELIĆ-RADOVIĆ, B.; JOŠIĆ, D. **Osmotic stress tolerance, pgp traits and rapid analysis of bradyrhizobium japonicum strains**, 2013. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84880617215&doi=10.2298%2FGENSR1301075M&partnerID=40&md5=9c93654f73ad07216600908862e6fc38>.

MARKS, Bettina Berquó; MEGÍAS, Manuel; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 21, 2013.

MARTINI, Marta; MORUZZI, Serena; ERMACORA, Paolo; LOI, Nazia; FIRRAO, Giuseppe. 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**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 277–285, 2015. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.10.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.017>.

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**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 73–79, 1994.

MATSUOKA, Yoshihiro; VIGOUROUX, Yves; GOODMAN, Major M.; SANCHEZ, Jesus G.; BUCKLER, Edward; DOEBLEY, John. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 99, n. 9, p. 6080–6084, 2002. DOI: 10.1073/pnas.052125199.

MAZHAR, R.; ILYAS, N.; SAEED, M.; BIBI, F.; BATOOL, N. Biocontrol and Salinity Tolerance Potential of *Azospirillum lipoferum* and its Inoculation Effect in Wheat Crop. **INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE AND BIOLOGY**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 494–500, 2016. DOI: 10.17957/IJAB/15.0115.

MCGOWAN, Jessie; SAMPSON, Margaret; SALZWEDEL, Douglas M.; COGO, Elise; FOERSTER, Vicki; LEFEBVRE, Carol. PRESS Peer Review of Electronic Search Strategies: 2015 Guideline Statement. **Journal of clinical epidemiology**, United States, v. 75, p. 40–46, 2016. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2016.01.021.

MEHNAZ, Samina. *Azospirillum*: A biofertilizer for Every Crop. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. [s.l: s.n.]. p. 297–314. DOI: 10.1007/978-81-322-2068-8.

MHAMDI, R.; NOUAIRI, I.; BEN HAMMOUDA, T.; MHAMDI, R.; MHADHBI, H. Growth capacity and biochemical mechanisms involved in rhizobia tolerance to salinity and water deficit. **JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 451–461, 2015. DOI: 10.1002/jobm.201400451.

MIRANSARI, Mohammad. Soil microbes and plant fertilization. **Applied microbiology and biotechnology**, [S. l.], v. 92, n. 5, p. 875–885, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3521-y.

MIRPURI, R. G.; JONES, W. L.; MCFETERS, G. A.; RIDGWAY, H. F. Physiological stress in batch cultures of *Pseudomonas putida* 54G during toluene degradation. **JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 406–413, 1997. DOI: 10.1038/sj.jim.2900407.

MOHANRAM, Saritha; KUMAR, Praveen. Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. Table 1, 2019. DOI: 10.1007/s13213-019-01448-9.

MOODY, S. C.; BULL, J. C.; DUDLEY, E.; LOVERIDGE, E. J. **The impact of combinatorial stress on the growth dynamics and metabolome of *Burkholderia mesoacidophila* demonstrates the complexity of tolerance mechanisms**, 2019. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85073183382&doi=10.1111%2Fjam.14404&partnerID=40&md5=ff77f71e3ff8298440d7b>

b773798a450.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª edição. **Editora UFLA**, [S. l.], 2006.

MORGAN, Charlotte A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; A review. **Journal of microbiological methods**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 183–193, 2006. a. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017.

MORGAN, Charlotte A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; a review. **Journal of microbiological methods**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 183–193, 2006. b.

MUKHERJEE, Sayani; SEN, Sukanta K. Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 95, n. 7, p. 1491–1499, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6848.

MULLIS, Kary B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, [S. l.], v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.

MULLIS, Kary B.; FALOONA, Fred A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *In: Recombinant DNA Methodology*. [s.l.] : Elsevier, 1989. p. 189–204.

NADEEM, S. M.; NAVEED, M.; AYYUB, M.; KHAN, M. Y.; AHMAD, M.; ZAHIR, Z. A. Potential, limitations and future prospects of *Pseudomonas* spp. for sustainable agriculture and environment: A Review. **SOIL & ENVIRONMENT**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 106–145, 2016. a.

NADEEM, Sajid Mahmood; NAVEED, Muhammad; AYYUB, Mohaimen; KHAN, Muhammad Yahya; AHMAD, Maqshoof; ZAHIR, Zahir Ahmad. Potential, limitations and future prospects of *pseudomonas* spp. For sustainable agriculture and environment: A review. **Soil and Environment**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 106–145, 2016. b.

NAIK, Popavath Ravindra; RAMAN, Gurusamy; NARAYANAN, Kannan Badri; SAKTHIVEL, Natarajan. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent *pseudomonads* isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 8, p. 1–14, 2008. DOI: 10.1186/1471-2180-8-230.

NASEEM, H.; AHSAN, M.; SHAHID, M. A.; KHAN, N. **Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance**, 2018. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85052976176&doi=10.1002%2Fjobm.201800309&partnerID=40&md5=18bb46605dc5660acc296ec211602a08>.

NOCKER, Andreas; CAMPER, Anne K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 72, n. 3, p. 1997–2004, 2006. DOI: 10.1128/AEM.72.3.1997-2004.2006.

NOCKER, Andreas; CAMPER, Anne K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **FEMS Microbiology Letters**, [S.

l.], v. 291, n. 2, p. 137–142, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01429.x.

NOCKER, Andreas; CHEUNG, Ching Ying; CAMPER, Anne K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, [*S. l.*], v. 67, n. 2, p. 310–320, 2006. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.

NOGVA, Hege Karin; DR??MTORP, Signe Marie; NISSEN, Hilde; RUDI, Knut. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'??-nuclease PCR. **BioTechniques**, [*S. l.*], v. 34, n. 4, p. 804–813, 2003.

O'CALLAGHAN, Maureen. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 100, n. 13, p. 5729–5746, 2016. a. DOI: 10.1007/s00253-016-7590-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>.

O'CALLAGHAN, Maureen. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 100, n. 13, p. 5729–5746, 2016. b. DOI: 10.1007/s00253-016-7590-9.

O'CALLAGHAN, Maureen. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied microbiology and biotechnology**, [*S. l.*], v. 100, n. 13, p. 5729–5746, 2016. c.

O'CALLAGHAN, Maureen; BALLARD, Ross A.; WRIGHT, David. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. **Soil Use and Management**, [*S. l.*], n. April, p. 1340–1369, 2022. DOI: 10.1111/sum.12811.

OKON, Yaacov; CAKMAKCI, Lutfu; NUR, Israel; CHET, Ilan. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: a note. **Microbial ecology**, [*S. l.*], v. 6, n. 3, p. 277–280, 1980.

OLDROYD, Giles E. D. Speak , friend , and enter : signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. [*S. l.*], v. 11, n. April, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro2990.

OLIVARES, Fábio Lopes; BUSATO, Jader Galba; DE PAULA, Alessandra M.; DA SILVA LIMA, Livia; AGUIAR, Natália Oliveira; CANELLAS, Luciano Pasqualoto. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [*S. l.*], v. 4, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1186/s40538-017-0112-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>.

OLIVEIRA, M. V. V et al. Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **ARCHIVES OF MICROBIOLOGY**, [*S. l.*], v. 198, n. 3, p. 287–294, 2016. DOI: 10.1007/s00203-015-1176-2. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84961131944&doi=10.1007%2Fs00203-015-1176-2&partnerID=40&md5=775c295071065524d70b81e4309e3c52>.

OTIENO, Nicholas; LALLY, Richard; KIWANUKA, Samuel; LLOYD, Andrew; RYAN, David; GERMAINE, Kieran; DOWLING, David. **Plant growth promotion induced by**

phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates *Frontiers in Microbiology* , 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00745>.

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 333–339, 1973.

PANDEY, Saurabh; RAUNAK; TRIPATHI, Takshashila; KHAWARY, Masuma; TRIPATHI, Deeksha; KANT, Sashi. **Mechanisms of stress adaptation by bacterial communities**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2022. DOI: 10.1016/b978-0-323-99900-7.00013-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99900-7.00013-4>.

PANOFF, Jean-Michel; CORROLER, David; THAMMAVONGS, Bouachanh; BOUTIBONNES, Philippe. Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of bacteriology*, [S. l.], v. 179, n. 13, p. 4451–4454, 1997.

PANPATTE, Deepak G.; JHALA, Yogeshvari K.; SHELAT, Harsha N.; VYAS, Rajababu V. *Pseudomonas fluorescens* : A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives**, [S. l.], p. 1–343, 2016. DOI: 10.1007/978-81-322-2647-5.

PARNELL, J. Jacob; BERKA, Randy; YOUNG, Hugh A.; STURINO, Joseph M.; KANG, Yaowei; BARNHART, D. M.; DILEO, Matthew V. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, [S. l.], v. 7, n. AUG2016, p. 1–12, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01110.

PATEL, Ami; PRAJAPAT, J. B. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, [S. l.], p. 1–8, 2013.

PATIL, Anita; KALE, Ankit; AJANE, Gaurav; RUBINA SHEIKH, A.; PATI, Surendra. Plant Growth-Promoting Rhizobium: Mechanisms and Biotechnological Prospective. *In: Rhizobium Biology and Biotechnology*. [s.l: s.n.].

PATIL, S.; NIKAM, M.; ANOKHINA, T.; KOCHETKOV, V.; CHAUDHARI, A. Multi-stress tolerant plant growth promoting *Pseudomonas* spp. MCC 3145 producing cytostatic and fungicidal pigment. **BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY**, [S. l.], v. 10, p. 53–63, 2017. b. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.02.006.

PAUL, Diby; LADE, Harshad. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 737–752, 2014. DOI: 10.1007/s13593-014-0233-6.

PENNA, Claudio; MASSA, Rosana; OLIVIERI, Florencia; GUTKIND, Gabriel; CASSÁN, Fabricio. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB express*, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 21, 2011.

PEREIRA, Tomás Pellizzaro; DO AMARAL, Fernanda Plucani; DALL’ASTA, Pamela; BROD, Fábio Cristiano Angonesi; ARISI, Ana Carolina Maisonnave; DALL’ASTA, Pamela; BROD, Fábio Cristiano Angonesi; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. Real-time

PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**, [S. l.], v. 56, n. 7, p. 660–670, 2014. DOI: 10.1007/s12033-014-9742-4.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; PENNA, C.; RUIZ, O. A.; CASSÁN, F. D.; LUNA, M. V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 75, n. 5, p. 1143–1150, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-0909-9.

PEZZONI, M.; PIZARRO, R. A.; COSTA, C. S. Protective effect of low UVA irradiation against the action of lethal UVA on *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the *relA* gene. **JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY**, [S. l.], v. 116, p. 95–104, 2012. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.011.

POOLE, Philip; RAMACHANDRAN, Vinoy; TERPOLILLI, Jason. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 291–303, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.171.

PRAKAMHANG, Janpen; TITABUTR, Panlada; BOONKERD, Nantakorn; TEAMTISONG, Kamonluck; UCHIUMI, Toshiki; ABE, Mikiko; TEAUMROONG, Neung. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**, [S. l.], v. 85, p. 38–49, 2015.

PRASHAR, Pratibha; SHAH, Shachi. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. *In: Sustainable Agriculture Reviews*. [s.l.: s.n.]. v. 19p. 331–361. DOI: 10.1007/978-3-319-26777-7.

PRIMAVESI, A. C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L. de A.; CANTARELLA, H.; DA SILVA, A. G. Efeito de doses e de fontes de nitrogênio na composição mineral de capim-marandu. **Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado técnico**, [S. l.], 2005.

QIU, Zhiguang; EGIDI, Eleonora; LIU, Hongwei; KAUR, Simranjit; SINGH, Brajesh K. New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 107371, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975019300461>.

RAAIJMAKERS, Jos M.; MAZZOLA, Mark. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual review of phytopathology**, [S. l.], v. 50, p. 403–424, 2012.

RAINEY, Paul B. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 243–257, 1999.

RAJWAR, A.; SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. Legume–Rhizobia Symbiosis and Interactions in Agroecosystems. *In: Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. [s.l.: s.n.]. p. 233–265. DOI: 10.1007/978-81-322-1287-4.

RAMOS, Juan L.; GALLEGOS, María-Trinidad; MARQUÉS, Silvia; RAMOS-

- GONZÁLEZ, Maria-Isabel; ESPINOSA-URGEL, Manuel; SEGURA, Ana. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. **Current opinion in microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 166–171, 2001.
- RANUM, Peter; PEÑA-ROSAS, Juan Pablo; GARCIA-CASAL, Maria Nieves. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1312, n. 1, p. 105–112, 2014. DOI: 10.1111/nyas.12396.
- REETZ, H. F. **Fertilizers and their efficient use**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/html/pubman/manual.htm>.
- REINA-BUENO, Mercedes; ARGANDOÑA, Montserrat; NIETO, Joaquín J.; HIDALGO-GARCÍA, Alba; IGLESIAS-GUERRA, Fernando; DELGADO, María J.; VARGAS, Carmen. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 207, 2012. DOI: 10.1186/1471-2180-12-207.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, Dulce N.; DARDANELLI, Marta S.; RUÍZ-SAÍNIZ, José E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. **FEMS microbiology letters**, [S. l.], v. 272, n. 2, p. 127–136, 2007.
- RONCATO-MACCARI, Lauren D. B.; RAMOS, Humberto J. O.; PEDROSA, Fabio O.; ALQUINI, Yedo; CHUBATSU, Leda S.; YATES, Marshall G.; RIGO, Liu U.; STEFFENS, Maria Berenice R.; SOUZA, Emanuel M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS microbiology ecology**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 39–47, 2003.
- RYŚ, Przemysław; WŁADYSIUK, Magdalena; SKRZEKOWSKA-BARAN, Iwona; MAŁECKI, Maciej. Review articles, systematic reviews and meta-analyses: which can be trusted? **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej= Polish Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. 119, n. 3, 2009.
- SAH, Stuti; KRISHNANI, Shweena; SINGH, Rajni. *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. **Current Research in Microbial Sciences**, [S. l.], v. 2, p. 100084, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100084>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266651742100064X>.
- SANDERS, Jan Willem; VENEMA, Gerard; KOK, Jan. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 483–501, 1999. DOI: 10.1016/S0168-6445(99)00017-0.
- SANDHYA, V.; ALI, S. Z.; VENKATESWARLU, B.; REDDY, G.; GROVER, M. Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. **ARCHIVES OF MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 192, n. 10, p. 867–876, 2010. DOI: 10.1007/s00203-010-0613-5.
- SANDHYA, V.; Z, A. S. K.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 17–26, 2009. DOI: 10.1007/s00374-009-0401-z.

- SANTI, Carole; BOGUSZ, Didier; FRANCHE, Claudine. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of botany**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.
- SANTOS, KFDN F. D. N. et al. Wheat colonization by an Azospirillum brasilense ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 415, n. 1–2, p. 245–255, 2017. DOI: 10.1007/s11104-016-3140-6.
- SANTOS, Mariana Sanches; HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antônio. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and biofilm by Azospirillum brasilense aiming at the development of liquid inoculants with high performance. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 37, p. 1855–1862, 2017. DOI: 10.5897/ajb2017.16162.
- SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0932-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.
- SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Outstanding impact of azospirillum brasilense strains ab-v5 and ab-v6 on the brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, [S. l.], v. 45, p. 1–31, 2021. DOI: 10.36783/18069657RBCS20200128.
- SARITHA, B.; PANNEERSELVAM, P.; GANESHAMURTHY, A. N. Antagonistic potential of mycorrhiza associated Pseudomonas putida against soil borne fungal pathogens. **Plant Archives**, Etawah, v. 15, n. 2, p. 763–768, 2015.
- SAVCI, Serpil. An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. **International Journal of Environmental Science and Development**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 73–80, 2012. DOI: 10.7763/ijesd.2012.v3.191.
- SCHOUG, Åsa; FISCHER, Janett; HEIPIEPER, Hermann J.; SCHNÜRER, Johan; HÅKANSSON, Sebastian. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of Lactobacillus coryniformis Si3. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 175–181, 2008. DOI: 10.1007/s10295-007-0281-x.
- SHAHZAD, Raheem; KHAN, Abdul Latif; BILAL, Saqib; WAQAS, Muhammad; KANG, Sang-Mo Mo; LEE, In-Jung Jung. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in Oryza sativa. **Environmental and Experimental Botany**, [S. l.], v. 136, p. 68–77, 2017. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2017.01.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.010>.
- SHAIENDRA SINGH, Govind Gupta. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, [S. l.], v. 07, n. 02, p. 96–102, 2015. DOI: 10.4172/1948-5948.1000188. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open->

access/plant-growth-promoting-rhizobacteria-pgpr-current-and-future-prospects-for-development-of-sustainable-agriculture-1948-5948-1000188.php?aid=51029.

SHAMEER, Syed; PRASAD, T. N. V. K. V. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 603–615, 2018. DOI: 10.1007/s10725-017-0365-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>.

SHAMSEER, Larissa; MOHER, David; CLARKE, Mike; GHERSI, Davina; LIBERATI, Alessandro; PETTICREW, Mark; SHEKELLE, Paul; STEWART, Lesley A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. **BMJ : British Medical Journal**, [S. l.], v. 349, p. g7647, 2015. DOI: 10.1136/bmj.g7647. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/349/bmj.g7647.abstract>.

SHAMSELDIN, Abdelaal; ABDELKHALEK, Ahmed; SADOWSKY, Michael J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 91–109, 2017. DOI: 10.1007/s13199-016-0462-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-016-0462-3>.

SHARMA, Pallavi; JHA, Ambuj Bhushan; DUBEY, Rama Shanker; PESSARAKLI, Mohammad. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, [S. l.], v. 2012, 2012.

SINDHU, S. ...; SHARMA, R.; SINDHU, S.; SEHRAWAT, A. Soil Fertility Improvement by Symbiotic Rhizobia for Sustainable Agriculture. *In: Soil Fertility Management for Sustainable Development*. [s.l: s.n.]. p. 101–163. DOI: 10.1007/978-981-13-5904-0.

SINGH, Shweta; KAYASTHA, Arvind M.; ASTHANA, Ravi K.; SRIVASTAVA, Punit K.; SINGH, S. P. Response of Rhizobium leguminosarum to nickel stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 667–672, 2001.

SIQUEIRA, Arthur Fernandes et al. Comparative genomics of Bradyrhizobium japonicum CPAC 15 and Bradyrhizobium diazoefficiens CPAC 7: Elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 420, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-420.

SOLMI, Leandro; ROSSI, Franco R.; ROMERO, Fernando. M.; BACH-PAGES, Marcel; PRESTON, Gail M.; RUIZ, Oscar A.; GÁRRIZ, Andrés. Polyamine-mediated mechanisms contribute to oxidative stress tolerance in Pseudomonas syringae. **Scientific Reports 2023 13:1**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–16, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-31239-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-31239-x>.

SOMASEGARAN, Padma; HOBEN, Heinz J. **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology**. [s.l: s.n.]. v. 53 DOI: 10.1007/978-1-4613-8375-8.

SORENSEN, Jan; NICOLAISEN, Mette Haubjerg; RON, Eliora; SIMONET, Pascal. Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. **Plant and soil**, [S. l.], v. 321, n. 1–2, p. 483–512, 2009.

SORIA, M. A.; PAGLIERO, F. E.; CORREA, O. S.; KERBER, N. L.; GARCIA, A. F.

Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* E109 to osmotic stress and the stability of liquid inoculants depend on growth phase. **WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**, [*S. l.*], v. 22, n. 11, p. 1235–1241, 2006. DOI: 10.1007/s11274-006-9166-9.

SOTO-MUÑOZ, Lourdes; TEIXIDÓ, Neus; USALL, Josep; VIÑAS, Inmaculada; CRESPO-SEMPERE, Ana; TORRES, Rosario. Development of PMA real-time PCR method to quantify viable cells of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist to control the major postharvest diseases on oranges. **International Journal of Food Microbiology**, [*S. l.*], v. 180, p. 49–55, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.011>.

SOUMARE, Abdoulaye; BOUBEKRI, Kenza; LYAMLOULI, Karim; HAFIDI, Mohamed; OUHDOUCH, Yedir; KOUISNI, Lamfeddal. From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 7, n. January, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00425.

SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos; REMANS, Roseline. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, [*S. l.*], v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R. G. E.; TRÜPER, H. G. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [*S. l.*], v. 38, n. 3, p. 321–325, 1988.

STETS, Maria Isabel; CAMPBELL ALQUERES, Sylvia Maria; SOUZA, Emanuel Maltempi; PEDROSA, Fábio de Oliveira; SCHMID, Michael; HARTMANN, Anton; CRUZ, Leonardo Magalhães. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, [*S. l.*], v. 81, n. 19, p. 6700–6709, 2015. DOI: 10.1128/AEM.01351-15.

STRASSER, S.; NEUREITER, M.; GEPPL, M.; BRAUN, R.; DANNER, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, [*S. l.*], v. 107, n. 1, p. 167–177, 2009.

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, [*S. l.*], v. 95, n. 3, p. 484–491, 2003.

SZOPA, Daniel; MIELCZAREK, Małgorzata; SKRZYPCZAK, Dawid; IZYDORCZYK, Grzegorz; MIKULA, Katarzyna; CHOJNACKA, Katarzyna; WITEK-KROWIAK, Anna. Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. **Industrial Crops and Products**, [*S. l.*], v. 181, n. November 2021, 2022. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114846.

TANG, D. Y.; WANG, X. B.; WANG, J.; WANG, M. F.; WANG, Y. P.; WANG, W. Choline-betaine pathway contributes to hyperosmotic stress and subsequent lethal stress

resistance in *Pseudomonas protegens* SN15-2. **JOURNAL OF BIOSCIENCES**, [S. l.], v. 45, n. 1, 2020. DOI: 10.1007/s12038-020-00060-3.

TARRAND, Jeffrey J.; KRIEG, Noel R.; DÖBEREINER, Johanna. 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**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 967–980, 1978.

TAWFIK, Gehad Mohamed; DILA, Kadek Agus Surya; MOHAMED, Muawia Yousif Fadlemola; TAM, Dao Ngoc Hien; KIEN, Nguyen Dang; AHMED, Ali Mahmoud; HUY, Nguyen Tien. A step by step guide for conducting a systematic review and meta-analysis with simulation data. **Tropical Medicine and Health**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1186/s41182-019-0165-6.

TEMPLE, Todd N.; DU TOIT, Lindsey J.; DERIE, Michael L.; JOHNSON, Kenneth B. Quantitative molecular detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment. **Plant disease**, [S. l.], v. 97, n. 12, p. 1585–1592, 2013.

TEWARI, S.; ARORA, N. K. Talc based exopolysaccharides formulation enhancing growth and production of *Helianthus annuus* under saline conditions. **Cell Mol Biol**, [S. l.], v. 60, n. 5, p. 73–81, 2014.

TEWARI, S.; ARORA, N. K. Soybean Production Under Flooding Stress and Its Mitigation Using Plant Growth-Promoting Microbes. In: **Environmental Stresses in Soybean Production**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2016. p. 23–40. DOI: 10.1016/B978-0-12-801535-3.00002-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801535-3.00002-4>.

THAKUR, Seema. Studies on the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, physiological parameters, yield and fruit quality of strawberry cv. chandler. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [S. l.], n. March, 2018.

TIMMUSK, Salme; BEHERS, Lawrence; MUTHONI, Julia; MURAYA, Anthony; ARONSSON, Anne Charlotte. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, n. February, p. 1–10, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00049.

TURAN, Metin; GULLUCE, Medine; VON WIRÉN, Nicolaus; SAHIN, Fikrettin. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth–promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [S. l.], v. 175, n. 6, p. 818–826, 2012.

VACHERON, Jordan; DESBROSSES, Guilhem; BOUFFAUD, Marie Lara; TOURAINE, Bruno; MOËNNE-LOCCOZ, Yvan; MULLER, Daniel; LEGENDRE, Laurent; WISNIEWSKI-DYÉ, Florence; PRIGENT-COMBARET, Claire. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 4, n. SEP, p. 1–19, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00356.

VAISHNAV, Anukool; SHUKLA, Awadhesh K.; SHARMA, Anjney; KUMAR, Roshan;

CHOUDHARY, Devendra K. Endophytic Bacteria in Plant Salt Stress Tolerance: Current and Future Prospects. **Journal of Plant Growth Regulation**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 0, 2018. DOI: 10.1007/s00344-018-9880-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-018-9880-1>.

VAN OOSTEN, Michael James; PEPE, Olimpia; DE PASCALE, Stefania; SILLETTI, Silvia; MAGGIO, Albino. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1186/s40538-017-0089-5.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; LOPEZ, A.; MARTOS, V.; REYES, A.; MAKSIMOVIC, I.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; MALUSÀ, E. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 99, n. 12, p. 4983–4996, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6656-4.

VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, R. Proteobacteria forming nitrogen fixing symbiosis with higher plants. **Nova Science Publishers, Inc., NY, USA**, [S. l.], p. 37–56, 2010.

VERMA, Maya; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-981-10-7284-0.

VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003. DOI: 10.1023/A:1026037216893.

VURUKONDA, SSKP; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **MICROBIOLOGICAL RESEARCH**, [S. l.], v. 184, p. 13–24, 2016. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.

WALKER, Vincent; BERTRAND, Cédric; BELLVERT, Floriant; MOËNNE-LOCCOZ, Yvan; BALLY, René; COMTE, Gilles. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, [S. l.], v. 189, n. 2, p. 494–506, 2011.

WANG, Dali; NING, Qing; DENG, Ziqing; ZHANG, Meng; YOU, Jing. Role of environmental stresses in elevating resistance mutations in bacteria: Phenomena and mechanisms. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 307, p. 119603, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119603>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974912200817X>.

WANG, En Tao; TIAN, Chang Fu; CHEN, Wen Feng; YOUNG, J. Peter W.; CHEN, Wen Xin. **Ecology and Evolution of Rhizobia**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-981-32-9555-1.

WANG, X. B.; TANG, D. N.; WANG, W. Hyperosmotic Adaptation of *Pseudomonas protegens* SN15-2 Helps Cells to Survive at Lethal Temperatures. **BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 403–413, 2020. a. DOI: 10.1007/s12257-019-0430-x.

WANG, X. B.; TANG, D. Y.; WANG, W. Improvement of a dry formulation

of *Pseudomonas protegens* SN15-2 against *Ralstonia solanacearum* by combination of hyperosmotic cultivation with fluidized-bed drying. **BIOCONTROL**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 751–761, 2020. b. DOI: 10.1007/s10526-020-10042-x.

WEIGHARDT, F. Quantitative PCR for the detection of GMOs. **Training course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. Luxembourg, Luxembourg: Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities**, [S. l.], p. 1–19, 2006.

WESSMAN, Per; MAHLIN, Denny; AKHTAR, Sultan; RUBINO, Stefano; LEIFER, Klaus; KESSLER, Vadim; HÅKANSSON, Sebastian. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 91, n. 14, p. 2518–2528, 2011.

WHITMAN, William B. et al. Genomic Encyclopedia of Bacterial and Archaeal Type Strains, Phase III: the genomes of soil and plant-associated and newly described type strains. **Standards in genomic sciences**, England, v. 10, p. 26, 2015. DOI: 10.1186/s40793-015-0017-x.

WILLEMS, Anne. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and soil**, [S. l.], v. 287, n. 1–2, p. 3–14, 2006.

XU, Wentao. The Identification and Detection Technology of Research in Microorganisms Including Living or Dead Bacteria. *In*: **Functional Nucleic Acids Detection in Food Safety**. [s.l.] : Springer, 2016. p. 343–364.

YAMAMOTO, Satoshi; KASAI, Hiroaki; ARNOLD, Dawn L.; JACKSON, Robert W.; VIVIAN, Alan; HARAYAMA, Shigeaki. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenetic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are: *gyrB*, D37926, D37297, D86005–D86019 and AB039381–AB03. **Microbiology**, [S. l.], v. 146, n. 10, p. 2385–2394, 2000.

YANG, Jungwook; KLOEPPER, Joseph W.; RYU, Choong-Min. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in plant science**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–4, 2009.

YANG, Youjun 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**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 418–424, 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2013.01.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.004>.

YANNASCOLI, Sarah M.; SCHENKER, Mara L.; CAREY, James L.; AHN, Jaimo; BALDWIN, Keith D. How to write a systematic review: A step-by-step guide. **University of Pennsylvania Orthopaedic Journal**, [S. l.], v. 23, p. 64–69, 2013. Disponível em: <http://www.crd.york.ac.uk/>.

YOUSEF, Ahmed E.; COURTNEY, Polly D. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. **Microbial stress adaptation and food safety**, [S. l.], v. 1, p. 1–30, 2002. DOI: 10.1201/9781420012828.ch1.

ZAMIOUDIS, Christos; MASTRANESTI, Parthena; DHONUKSHE, Pankaj; BLILOU, Ikram; PIETERSE, Corné M. J. J. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. **Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 162, n. 1, p. 304–318, 2013. DOI: 10.1104/pp.112.212597.

8 APÊNDICES

Apêndice 1 – Protocolo de pesquisa da revisão sistemática de acordo com o guia PRISMA-P (2015)

| Informações administrativas | | | | | |
|------------------------------------|--|---|--|---------------------|---|
| <i>Título</i> | Efeitos do estresse fisiológico adaptativo na sobrevivência de inoculantes bacterianos: uma revisão sistemática | | | | |
| <i>Data de início</i> | 23/06/2021 | | | | |
| <i>Data de início protocolo</i> | 13/09/2021 | | | | |
| <i>Última atualização</i> | 29/06/2022 | | | | |
| <i>Data das buscas</i> | 18/11/2021 | | | | |
| <i>Data início da triagem</i> | 29/11/2021 | | | | |
| <i>Data da seleção final</i> | 29/06/2022 | | | | |
| <i>Conflito de interesses</i> | Todos os autores declararam que não existem conflitos de interesse | | | | |
| <i>Equipe de Revisores</i> | Revisor | Afiliação | e-mail | ORCID | Contribuições |
| | Elisandra Triches da Cunha (R1) | CAL CCA UFSC, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina | elisandratc91@gmail.com | 0000-0002-0215-2601 | R1 (Primeiro revisor): planejamento do estudo, buscas e seleção, extração e análise de dados, escrita do manuscrito |
| | Ana Marina Pedrolo (R2) | CAL CCA UFSC, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina | anapedrolo@gmail.com | 0000-0003-4006-4140 | R2 (Segundo revisor): buscas e seleção, revisão do processo e do manuscrito |
| | Ana Carolina Maisonnave Arisi (R3) | CAL CCA UFSC, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina | ana.arisi@ufsc.br | 0000-0001-6077-7960 | R3 (Terceiro revisor): coordenador, revisão do processo e do manuscrito |
| | Cláudio Roberto Fônseca Sousa Soares (R4) | MIP CCB UFSC, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina | erfsoares@gmail.com | 0000-0002-5443-6614 | R4 (Quarto revisor): subcoordenador, revisão do manuscrito |
| <i>Autor correspondente</i> | Ana Carolina Maisonnave Arisi, e-mail: ana.arisi@ufsc.br | | | | |
| Introdução | | | | | |
| <i>Resumo</i> | Atualmente, diferentes estratégias são propostas na literatura para fornecer proteção dos inoculantes a fatores ambientais e estresses abióticos que causam perda de viabilidade, estas geralmente são baseadas em mecanismos bacterianos naturais de proteção fisiológica. O estresse adaptativo é sugerido como estratégia para aumentar a tolerância e adaptação dos inoculantes a condições não controladas. A estratégia é baseada em adaptações intracelulares que ocorrem naturalmente durante situações de estresse subletal e que resultam na modulação da fisiologia celular. Alguns estudos relatam o aumento da sobrevivência de diferentes espécies de microrganismos devido ao aumento da tolerância ao estresse e sugerem que sua pré-aplicação desencadeia uma série de respostas de sobrevivência, como a síntese de proteínas responsivas ao estresse e metabólitos secundários, que conferem proteção celular . | | | | |

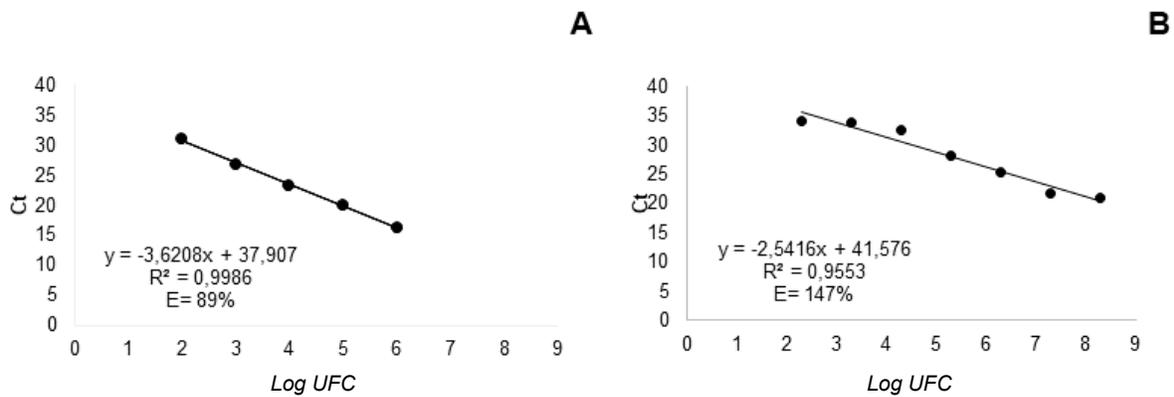
| | |
|--|--|
| <i>Objetivos</i> | O principal objetivo do desenvolvimento desta revisão é identificar os efeitos da aplicação de estratégias de pré-condicionamento de estresse na sobrevivência de inoculantes bacterianos, a fim de garantir que a aplicação dessas estratégias aumente ou não a sobrevivência desses inoculantes ou se a resposta final de a interação entre bactérias e plantas são afetadas positivamente. Além de verificar se o desenvolvimento de estudos com essas estratégias é viável. |
| Métodos | |
| <i>Pergunta de Pesquisa</i> | Em inoculantes bacterianos associativos de plantas, qual é o efeito das estratégias de pré-condicionamento de estresse em sua sobrevivência? |
| <i>P = população alvo</i> | P = inoculantes bacterianos |
| <i>I = intervenção</i> | I = estratégias de estresse adaptativo |
| <i>C = grupo controle</i> | C = controle (não tratado) |
| <i>O = outcome/desfecho</i> | O = efeitos na sobrevivência e efetividade |
| Critérios de Elegibilidade | |
| <i>Critérios de Inclusão</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudos escritos em inglês 2. Estudos da literatura científica, indexados em periódicos, capítulos, revisados por pares e disponíveis em bases de dados 3. Estudos relatando/medindo efeitos de estratégias de estresse no crescimento bacteriano, germinação ou variáveis de crescimento de plantas 4. Estudos com bactérias pertencentes a bactérias associativas e classificação taxonômica de microrganismos especificados |
| <i>Critérios de Exclusão</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Título e/ou resumo irrelevantes para o tema 2. Estudos não disponíveis em bancos de dados 3. Estudos não escritos em inglês, espanhol ou português 4. Estudos de revisão 5. Estudos com resumo não disponíveis 6. Estudos com classificação taxonômica não especificada, com espécies que não são microrganismos ou com outros que não são bactérias 7. Estudos com bactérias que não pertencem ao grupo dos associativos, agente de biocontrole, fixador de nitrogênio ou promotor de crescimento 8. Aplicação do estresse em outro momento que não seja durante o crescimento bacteriano, não sendo, portanto, uma estratégia de adaptação. 9. Houve aplicação de estresse, mas apenas visando adaptações metabólicas e não fisiológicas. 10. Dados incompletos ou falta de metodologia utilizada. 11. Estudos que não relatam/medem o efeito de estratégias de estresse na melhora da sobrevivência bacteriana associativa |
| <i>Fontes de Informação (Bases de dados)</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Web of Science 2. Scopus 3. Pubmed 4. Proquest |
| Informações adicionais | |
| <i>Gerenciamento dados</i> | State of the Art through Systematic Review: Start Software, - Lapes UFSCar (v 3.3 Beta 03) e Microsoft Excel pra extração manual dos dados |
| <i>Seleção dos estudos</i> | Todos os estudos serão selecionados por dois revisores independentes nesta fase da revisão: triagem e elegibilidade. R1 decidirá a seleção final e inclusão de estudos na revisão. |
| <i>Extração dos dados</i> | Todos os dados serão extraídos independentemente por R1 e revisados pelos demais autores. |
| Fonte: Autora (2023) | |

Apêndice 2 – Critérios definidos para os parâmetros de avaliação do risco de viés dos estudos

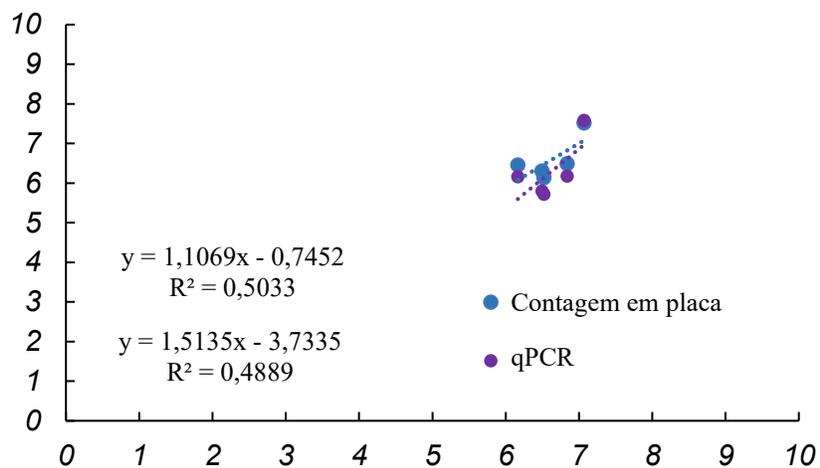
| Viés | Abrangência Alta | Abrangência Média | Abrangência Baixa |
|-----------------------|--|--|---|
| Viés de confundimento | Mais de uma estirpe testada, grupo controle | Uma única estirpe testada, grupo controle | Uma única estirpe testada, sem grupo controle |
| Viés de seleção | Mesmo número de amostras em cada grupo E grupos separados fisicamente para evitar contaminações | Mesmo número de amostras em cada grupo E grupos separados fisicamente para evitar contaminações | Número diferente de amostras OU representatividade baixa das amostras OU contaminação entre os grupos |
| Viés de atrito | Sem atrito, mesmo número de amostras nas medições iniciais e finais | Baixo atrito E justificado pelos autores | Baixo atrito mas não justificado pelos autores OU alto atrito |
| Viés de relato | Metodologia E resultados reportados de forma clara | Metodologia OU resultados reportados de forma clara | Metodologia E resultados não-reportados de forma clara |
| Viés analítico | Estratégias adaptativas com estresse explicitamente mencionado E avaliação direta da sobrevivência bacteriana durante/depois da aplicação do estresse (D.O., UFC, % de sobrevivência, n° de células, etc.) | Estratégias adaptativas com estresse explicitamente mencionado E avaliação indireta da sobrevivência bacteriana durante/depois da aplicação do estresse (osmólitos, fitormônios, EPS e outros metabólitos) | Estratégias adaptativas com estresse não mencionado explicitamente OU avaliação da sobrevivência bacteriana não realizada |

Fonte: Autora (2023)

Apêndice 3 - Curvas padrão (Cq versus Log UFC) para PMA-qPCR de inoculante de *A. brasilense* preparado com primers AznifA. Quantificação realizada utilizando DNA extraído de (A) cultura pura das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* e (B) misturas de cultura pura e raízes de milho.



Apêndice 4 - Gráfico de dispersão e regressão linear dos valores de Log UFC.mL⁻¹ obtidos por contagem em placa e PMA-qPCR para quantificação de inoculante preparado com *A. brasilense* em amostras de raízes de milho cultivadas *in vitro*.



Fonte: Autora (2023)