

Isolamento, caracterização e identificação molecular de microrganismos tolerantes aos estresses hídrico e salino

Jessica Marques Dionisio⁽¹⁾, Douglas Venâncio Alexandre da Silva⁽²⁾, Chainheny Gomes de Carvalho⁽³⁾, Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽⁴⁾, Ariana Elisei Vilela⁽⁵⁾, Sylvia Moraes de Sousa Tinoco⁽⁶⁾, Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽⁶⁾ e Eliane Aparecida Gomes⁽⁶⁾

⁽¹⁾Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽²⁾ Estudante de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas. ⁽³⁾ Bolsista DTI B do Convênio Embrapa/CNPq. ⁽⁴⁾ Analista da Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁵⁾ Bolsista de Pós-doutorado do Convênio Embrapa/CNPq. ⁽⁶⁾ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O estresse hídrico causa perdas significativas no rendimento da produção agrícola em todo o mundo. As consequências climáticas imprevisíveis e óbvias do aquecimento global aumentam ainda mais a preocupação crescente com a disponibilidade limitada de água para a agricultura. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal apresenta-se como uma alternativa promissora para aumentar a produção agrícola em condições desfavoráveis, principalmente pelo baixo custo e reduzido impacto ambiental. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar, avaliar a diversidade genética e identificar molecularmente microrganismos isolados de solos de diferentes ecossistemas brasileiros, com ênfase na resposta desses microrganismos aos estresses hídrico e salino. Um total de 718 cepas bacterianas termotolerantes foi isolado de amostras de solo e selecionado com base em características morfológicas e capacidade de crescimento em concentrações elevadas de sorbitol e NaCl, indicando sua capacidade de sobreviver e se adaptar às condições de estresses hídrico e salino. Entre essas amostras, 27 cepas do gênero *Priestia* ou *Bacillus*, identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentaram maior potencial de tolerância à seca. Além disso, pela amplificação das sequências de DNA, utilizando os primers ERIC, foi possível observar padrões distintos de fragmentos amplificados, fornecendo uma visão abrangente sobre a variabilidade genética entre as bactérias isoladas. Os resultados deste estudo revelaram um potencial biotecnológico significativo dos microrganismos isolados a partir de amostras de solos de diferentes ecossistemas brasileiros.

Termos para Indexação: *Bacillus*, *Priestia*, seca, bactérias promotoras do crescimento de plantas

Isolation, characterization and molecular identification of tolerant microorganisms water and saline stress

Abstract - Water stress causes significant losses in agricultural production yields throughout the world. The unpredictable and obvious climate consequences of global warming increase growing concern about the limited availability of water for agriculture. The use of plant-growing promoting bacteria presents as an alternative to increase agricultural production under unfavorable conditions, mainly due to its low cost and reduced environmental impact. This work aimed to isolate, characterize, evaluate genetic diversity and molecularly identify microorganisms isolated from soils of different Brazilian ecosystems, with an emphasis on the response to these microorganisms to water and saline stress. A total of 718 bacterial strains thermotolerants were isolated from the soil samples

and selected based on morphological characteristics and growth capacity in high concentrations of sorbitol and NaCl, showing their ability to survive and adapt to water and saline stress conditions. Among these samples, 27 strains of the genus *Priestia* or *Bacillus*, identified by sequencing of the 16S rRNA gene, showed greater potential for drought tolerance. Furthermore, by amplification of DNA sequences using ERIC primers, it was possible observe distinct patterns of the amplified fragments, providing comprehensive insight into the genetic variability between the isolated bacteria. The results of this study revealed a significant biotechnological potential of microorganisms isolated from samples of soils from different Brazilian ecosystems.

Index terms: *Bacillus*, *Priestia*, drought, plant growth-promoting bacteria

Introdução

O estresse hídrico é um desafio significativo enfrentado pela agricultura, não apenas no Brasil, mas também em várias regiões do mundo. No contexto nacional, esse desafio é particularmente acentuado nas regiões nordeste e norte de Minas Gerais, onde as condições climáticas são mais áridas e as precipitações pluviométricas são escassas (Silva; Andrade, 2003). Essas regiões apresentam altas temperaturas, chuvas escassas e mal distribuídas, com longos períodos de estiagem, o que causa impacto negativo nas plantas, diminuindo sua produtividade por desequilíbrios fisiológicos, nutricionais e hormonais, limitando o seu potencial produtivo (Santos; Carlesso, 1998).

Diante desse quadro, torna-se necessária a busca por soluções que possam minimizar os efeitos da seca nas culturas. Dentre as alternativas, o uso de insumos biológicos à base de microrganismos benéficos, como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), promovem melhorias no desenvolvimento das culturas sem danificar o meio ambiente (Andrade et al., 2019; Silva et al., 2020).

Uma das principais vantagens das BPCP é a redução do uso de produtos químicos e fertilizantes sintéticos. Esses microrganismos têm a capacidade de liberar substâncias, como hormônios de crescimento, enzimas e metabólitos, que estimulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Dessa forma, eles podem aumentar a absorção de nutrientes presentes no solo pelas plantas, promovendo uma maior eficiência na utilização dos recursos disponíveis (Miransari, 2013). Essa interação satisfatória entre o BPCP e as plantas ocorre por meio de processos complexos, como a colonização das raízes pelas bactérias e a ativação de rotas metabólicas específicas. As BPCP podem secretar enzimas que auxiliam na solubilização de nutrientes insolúveis, como o fósforo (P), tornando-os mais disponíveis para as plantas (Fracasso et al., 2020). Esses microrganismos também podem auxiliar no controle de patógenos do solo, estimular a formação de agregados e melhorar a estrutura do solo, favorecendo a infiltração de água e a aeração das raízes. Dessa forma, as BPCP podem ajudar a reduzir a compactação do solo, garantindo a conservação dos recursos naturais e a preservação do meio ambiente (Scarsanella, 2022).

Além dos benefícios para as plantas e o solo, o uso das BPCP também pode resultar em ganhos tecnológicos para os agricultores. A redução do uso de fertilizantes sintéticos e pesticidas químicos reduz os custos de produção e melhora a qualidade das culturas, o que gera consequentemente maiores rendimentos e valorização dos produtos agrícolas.

Seguindo o princípio de que a microbiota do solo desempenha um papel fundamental na promoção do crescimento das plantas e na resistência ao estresse, a identificação e a seleção

de microrganismos com essas características tornam-se fonte promissora de insumos biológicos, despertando interesse na busca por soluções na agricultura.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo isolar, caracterizar e avaliar a diversidade genética e identificar molecularmente microrganismos isolados de solos de diferentes ecossistemas brasileiros, com ênfase na resposta desses microrganismos aos estresses hídrico e salino.

Material e métodos

As amostras de solos utilizadas pertencem à coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo e foram coletadas em diferentes regiões geográficas brasileiras, incluindo os biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal.

O processo de isolamento dos microrganismos iniciou-se com a pesagem de 0,5 g de solo, seguida da adição de 2,5 mL de solução salina (NaCl 0,85% m/v) e agitação constante por 24 horas, promovendo a suspensão dos microrganismos presentes no solo.

Para a realização do choque térmico, as amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos para a decantação de resíduos sólidos. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi retirada, evitando a coleta da parte sedimentada, e transferida para microtubos estéreis. Essas amostras foram mantidas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Após esse processo, foram resfriadas em gelo por 5 minutos.

Após o choque térmico, uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi cuidadosamente depositada e espalhada, com o auxílio de uma alça de Drigalsk, em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani) sólido. As placas foram incubadas a 45 °C por 24 horas. Ao final desse período, as colônias formadas foram avaliadas em relação às suas características morfológicas, incluindo tamanho, forma, cor e elevação.

Em seguida, as colônias selecionadas foram repicadas em tubos de 15 mL contendo 4 mL de meio LB líquido e incubadas a 28 °C por 24 horas sob agitação constante. Posteriormente, as bactérias foram cultivadas em meios LB sólido contendo NaCl 10% (m/v) ou sorbitol 405 g/L ou sorbitol 520 g/L, que simulam condições de alta salinidade e estresse hídrico, respectivamente. As bactérias selecionadas foram então criopreservadas em glicerol 25% (v/v) e armazenadas a -80 °C.

Diante da grande variabilidade encontrada, um grupo de 27 bactérias com diferentes origens, morfologias e diversidade genética foi selecionado para a extração de DNA, utilizando-se o kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A análise da diversidade genética das bactérias isoladas foi realizada por meio da metodologia ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) utilizando os primers ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3' e ERIC F- 5'- AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'. As amostras foram amplificadas em um volume de 20 µL contendo 1 x tampão de reação (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 0,5mM de dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada primer e 1 U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, seguidos pela extensão final de 65 °C por 16 min. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com gel red (Biotium Inx., EUA). Para o sequenciamento de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e os ciclos de amplificação foram preparados de acordo com Abreu et al. (2017) utilizando-se os primers 8F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Turner et al., 1999) e 1492R (5'

TACGYTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991).

As reações de PCR foram purificadas com o kit ExoSap IT (Affymetrix, EUA) e sequenciadas utilizando-se o kit "Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing" (ThermoFisher, EUA) com os primers 8F, 1492R, 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Turner et al., 1999) e 902R (5'-GTCAATTCITTTGAGTTTYARYC-3') (Hodkinson; Lutzoni, 2009), de acordo com as recomendações dos fabricantes. As amostras foram purificadas e injetadas no sequenciador de DNA 3500XL Genetic Analyzer (Hitachi, Japão). Para análise das sequências, foi utilizado o software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, EUA). As sequências foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul et al., 1997).

Resultados e discussão

Foram isoladas e preservadas 718 bactérias para análises subsequentes. Ao se avaliar as colônias bacterianas formadas após o cultivo em meio sólido, observou-se uma variedade de características morfológicas entre as diferentes colônias. As colônias apresentaram uma ampla gama de tamanhos, formas e cores. Foram observadas colônias pequenas, grandes e difusas, circulares, irregulares e filamentosas. Além disso, a cor das colônias variou consideravelmente, com tonalidades desde branco, creme e amarelo até tons mais escuros (Figura 1).



Figura 1. Caracterização morfológica de cepas bacterianas isoladas de amostras de solo.

Dentre essas bactérias, foram identificadas 89 colônias que cresceram em concentrações elevadas de NaCl e sorbitol, indicando sua capacidade de sobreviver e se adaptar às condições de estresses hídrico e salino.

Ao analisar a amplificação das sequências utilizando o primers ERIC, foi possível observar padrões distintos de fragmentos amplificados, fornecendo uma visão abrangente sobre a variabilidade genética entre as bactérias isoladas (Figura 2).

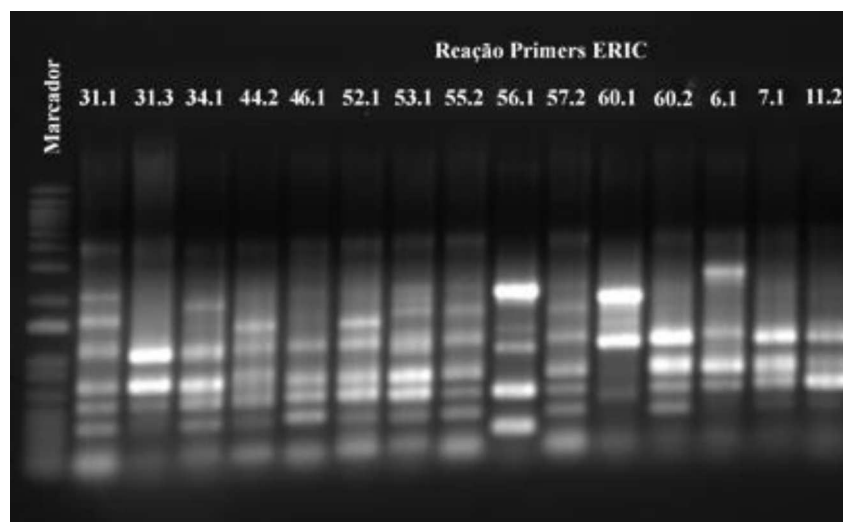


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por ERIC-PCR para análise da diversidade genética bacteriana. Os números indicam a identificação dos isolados. A partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR, bem como da análise da diversidade morfológica e de origem das bactérias selecionadas, um grupo de 27 estirpes foi escolhido para o sequenciamento do gene 16S rRNA. Esses primers foram selecionados estrategicamente para amplificar regiões específicas do gene 16S rRNA, que são altamente conservados em todas as células bacterianas, mas também contêm regiões variáveis que permitem a diferenciação entre gêneros ou espécies. Os resultados dessas análises foram compilados e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação molecular baseada no sequenciamento do gene 16S rDNA de isolados bacterianos capazes de

Isolado	Local de coleta	Identificação Molecular
3.2	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
6.1	Mombaça, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
7.1	São Miguel, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
9.1	Quiterianópolis, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
9.2	Quiterianópolis, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
9.4	Quiterianópolis, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
10.2	Piquet Carneiro, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
11.1	Arneiroz, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
11.2	Arneiroz, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
17.1	Piranji, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
17.2	Piranji, CE	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
19.2	Aceguá, RS	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
23.1	Rio Verde, GO	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
23.2	Rio Verde, GO	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
24.1	Rio Verde, GO	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
31.1	Ipiaçu, MG	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
31.3	Ipiaçu, MG	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
34.1	Ipiaçu, MG	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhattai</i>
44.2	Antonina de Norte, CE	<i>Priestia megaterium</i>
46.1	Sertão, CE	<i>Priestia megaterium</i>
52.1	Amazônia	<i>Bacillus safensis</i>
53.1	Amazônia	<i>Bacillus</i> sp.
55.2	Caatinga, CE	<i>Bacillus licheniformis</i>
56.1	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i>
57.2	Caatinga, CE	<i>Priestia aryabhattai</i>
60.1	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i>
60.2	Caatinga, CE	<i>Priestia megaterium</i>

crescer em meio de cultura LB sólido contendo NaCl 10% (m/v) e sorbitol 520 g/L.

A capacidade dessas bactérias de crescer em concentrações elevadas de NaCl e sorbitol sugere que elas possuem mecanismos adaptativos para enfrentar condições adversas. Esses mecanismos podem incluir a produção de compostos compatíveis com a tolerância ao estresse, a regulação do balanço osmótico e a ativação de rotas metabólicas específicas que permitem a sobrevivência e o crescimento nessas condições desfavoráveis (Embrapa, 2017). Esses microrganismos podem ter implicações significativas para a agricultura, especialmente quando utilizados em regiões propensas à escassez de água e à elevada salinidade do solo.

A utilização desses microrganismos promissores como agentes promotores de crescimento em culturas agrícolas pode ser uma estratégia viável para aumentar a tolerância das plantas ao estresse hídrico e salino (Espínola, 2020). As BPCP têm sido estudadas pela capacidade de estimular o crescimento das plantas, aumentar a absorção de nutrientes, melhorar a tolerância ao estresse e proteger as plantas contra patógenos (Rezende et al., 2021). Nesse contexto, as cepas selecionadas neste estudo podem ser candidatas potenciais para futuros testes de inoculação de sementes, visando melhorar o rendimento das culturas em condições de estresses hídrico e salino. No entanto, é necessário destacar que os resultados obtidos neste estudo representam uma etapa inicial de investigação. Ainda são necessárias pesquisas adicionais para melhor entendimento dos mecanismos associados à promoção de crescimento de plantas dessas estirpes. É fundamental compreender como elas interagem com as plantas hospedeiras, como afetam o equilíbrio do solo e como podem ser aplicadas de maneira eficiente na agricultura.

Conclusão

Todos os isolados obtidos foram do gênero *Priestia* ou *Bacillus*, indicando que a metodologia utilizada no isolamento foi eficiente na seleção de microrganismos que produzem esporos. Os resultados deste estudo revelaram um potencial significativo biotecnológico dos microrganismos isolados a partir de amostras de solos de diferentes ecossistemas brasileiros. A capacidade dessas bactérias de tolerar os estresses hídrico e salino indica que podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo na agricultura. A aplicação desses microrganismos como agentes promotores de crescimento pode oferecer soluções inovadoras para aumentar a produtividade das culturas e enfrentar os desafios impostos pelas condições adversas do ambiente agrícola.

Agradecimentos

À Embrapa e ao CNPq.

Referências

ABREU, C. S.; FIGUEIREDO, J. E.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. A.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, gmr16019294, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16019294>.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.

J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.

ANDRADE, F. M. de; PEREIRA T. de A.; SOUZA, T. P.; GUIMARÃES, P. H. S.; MARTINS, A. D.; SCHWAN, R. F.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth- promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223/225, p. 120-128, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>.

EMBRAPA. **Scientists use bacteria to help plants resist droughts**. Brasília, DF, 23 maio 2017. Notícia. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/22885691/cientistas-usam-bacterias-para-ajudar-plantas-a-resistir-a-seca>. Acesso em: 31 jul. 2023.

ESPÍNOLA, M. V. P. C. **Identificação e caracterização regulatória de bactérias termofílicas e termotolerantes isoladas do solo da caatinga do cariri paraibano**. 2020. 93 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/17549>. Acesso em: 13 jul. 2023.

FRACASSO, A.; TELÒ, L.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P.; AMADUCCI, S. Physiological beneficial effect of *Rhizophagus intraradices* inoculation on tomato plant yield under water deficit conditions. **Agronomy**, v. 10, n. 1, article 71, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10010071>.

HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis**, v. 49, n. 3, p. 163-180, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed.). **Nucleic acids techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley, 1991. p. 115- 148.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 3075-3084, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1338-2>.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **GenBank**. Disponível em: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 13 jul. 2023.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. de M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C. de; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e50810212725, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12725>.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v2n3p287-294>.

SCARSANELLA, J. D. A. **Microrganismos promotores do crescimento vegetal em *Paspalum notatum* Flüge cultivado em solo construído para reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão**. 2022. 66 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/234713>. Acesso em: 14 jul. 2023.

SILVA, H. P.; ANDRADE, S. M. Brasil um país de terras secas: problemática, dimensão e alternativas de tecnologias apropriadas para o semiárido. In: CIRELLI, A. F.; ABRAHAM, E. (ed.). **El agua en Iberoamérica: aspectos de la problemática de las tierras secas**. Buenos Aires: CYTED, 2003. p. 55-64.

SILVA, M. A.; NASCENTE, A. S.; FILIPPI, M. C. C. D.; LANNA, A. C.; SILVA, G. B. D.; SILVA, J. F. A. E. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>.