

Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus* e *Priestia* tolerantes a estresse hídrico e salino

Jéssica Marques Dionísio⁽¹⁾, Isabella de Cássia Baldoni⁽²⁾, Chainheny Gomes de Carvalho⁽³⁾, Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽⁴⁾, Ariana Elisei Vilela⁽⁵⁾, Sílvia Moraes de Sousa Tinoco⁽⁶⁾, Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽⁶⁾ e Eliane Aparecida Gomes⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Estudante de graduação, Faculdade Ciências da Vida, bolsista Pibic/CNPq na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁽²⁾ Bolsista CNPq. ⁽³⁾ Bolsista DTI B do Convênio Embrapa/CNPq. ⁽⁴⁾ Analista, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ⁽⁵⁾ Bolsista CNPq. ⁽⁶⁾ Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Resumo – Este estudo investigou o potencial biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes ecossistemas brasileiros diante do estresse hídrico e da salinidade. A partir de amostras de solo da coleção da Embrapa Milho e Sorgo, 805 cepas bacterianas foram isoladas e selecionadas com base em suas características morfológicas distintas. Testes em meios de cultura contendo altas concentrações de NaCl (10%) e sorbitol (520 g/L) revelaram a existência de 205 cepas capazes de se adaptar a condições adversas. Ampliando as concentrações para 15% e 20% de NaCl e 780g/L de sorbitol, 34 cepas promissoras foram identificadas. Destacam-se espécies como *Priestia megaterium* e *P. aryabhattai*, com distribuição geográfica abrangente, além de outras como *Lysinibacillus agricola* e *Bacillus xiamensis*. Esses resultados indicam adaptações significativas dessas bactérias a condições extremas, sugerindo um potencial aplicativo na agricultura. Testes complementares, incluindo a avaliação da produção de biofilme e da solubilização de fosfato, serão conduzidos para identificar microrganismos eficazes. A continuidade desses estudos em ambientes controlados visa validar os resultados obtidos e desenvolver estratégias de manejo agrícola mais eficientes. Este estudo não apenas contribui para a compreensão da microbiota do solo brasileiro, mas também avança no desenvolvimento de insumos biológicos aplicáveis a cultivares suscetíveis ao estresse hídrico e à salinidade elevada.

Termos para indexação: bactéria, crescimento vegetal, estresse hídrico, salinidade, agricultura sustentável, insumo biológico, microbiota do solo.

Isolation and characterization of *Bacillus* and *Priestia* strains tolerant to water and salt stress

Abstract – This study investigated the biotechnological potential of bacteria isolated from different Brazilian ecosystems in the face of water stress and salinity. From soil samples from the Embrapa Maize and Sorghum collection, 805 bacterial strains were isolated and selected based on their distinct morphological characteristics. Tests in culture media containing high concentrations of NaCl (10%) and sorbitol (520 g/L) revealed the existence of 205 strains capable of adapting to adverse conditions. By increasing the concentrations to 15% and 20% NaCl and 780g/L sorbitol, 34 promising strains were identified. Species such as *Priestia megaterium* and *P. aryabhattai*, with a wide geographic distribution, stand out, in addition to others such as *Lysinibacillus agricola* and *Bacillus xiamensis*. These results indicate significant adaptations of these bacteria to extreme conditions, suggesting a potential application in agriculture. Additional tests, including evaluation of biofilm production and phosphate solubilization, will be conducted to identify effective microorganisms. The continuation of these studies in controlled environments aims to validate the results obtained and develop more efficient agricultural management strategies. This study not only contributes to the understanding of

the Brazilian soil microbiota, but also advances the development of biological inputs applicable to cultivars susceptible to water stress and high salinity.

Index terms: bacteria, plant growth, drought stress, salinity, sustainable agriculture, biological inputs, soil microbiota.

Introdução

A escassez hídrica é comumente classificada em duas categorias: escassez física, que ocorre quando a falta de água é determinada pelas condições ecológicas locais, e escassez econômica, que se manifesta em razão da infraestrutura hídrica inadequada (Gomes, 2019).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), em 2021, aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas em todo o mundo habitavam áreas agrícolas com níveis de escassez de água variando de alta a muito alta (FAO, 2024). Dentre essas pessoas, cerca de 1,2 bilhão, equivalente a aproximadamente um sexto da população global, enfrentava severas restrições hídricas em suas regiões agrícolas.

No contexto brasileiro, a seca é um fenômeno recorrente e característico, especialmente nas regiões semiáridas e áridas (Meneses et al., 2006). Essas áreas apresentam temperaturas elevadas, chuvas escassas e desigualmente distribuídas, e longos períodos de estiagem, que impactam negativamente as culturas agrícolas. Esses fatores reduzem a produtividade das plantas por causa de desequilíbrios fisiológicos, nutricionais e hormonais, limitando o potencial produtivo delas (Santos; Carlesso, 1998).

A salinidade do solo e o déficit hídrico estão entre os principais fatores de estresse para as plantas, podendo limitar o crescimento e a produção (Ahmad; Sharma, 2008). Diante deste cenário, torna-se imprescindível buscar soluções que possam mitigar os efeitos adversos da seca nas culturas agrícolas. Entre as opções viáveis, destacam-se o uso de insumos biológicos baseados em microrganismos benéficos, tais como as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (Andrade et al., 2019; Silva et al., 2020). As BPCPs oferecem uma abordagem sustentável para a agricultura, destacando-se pela redução do uso de produtos químicos e fertilizantes sintéticos. Esses microrganismos desempenham um papel crucial ao liberar substâncias como hormônios de crescimento, enzimas e metabólitos, que estimulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Miransari, 2013). A interação entre as BPCPs e as plantas envolve processos complexos, incluindo a colonização das raízes pelas bactérias e a ativação de rotas metabólicas específicas. Além de promover a absorção de nutrientes do solo pelas plantas, as BPCPs secretam enzimas que solubilizam nutrientes insolúveis, como o fósforo (P), tornando-os mais acessíveis (Fracasso et al., 2020). Além disso, esses microrganismos desempenham um papel importante no controle de patógenos do solo, estimulando a formação de agregados e melhorando a estrutura do solo para favorecer a infiltração de água e aeração das raízes. Portanto, ao contribuir para a redução da compactação do solo, as BPCPs desempenham um papel crucial na conservação dos recursos naturais e na preservação do meio ambiente (Scarsanella, 2022).

Partindo do entendimento de que a microbiota presente no solo desempenha um papel fundamental na absorção de nutrientes e na mitigação dos efeitos do estresse hídrico e salino nas plantas, a identificação e seleção de microrganismos com essas características surgem como uma

fonte promissora de insumos biológicos. Esse cenário tem despertado um interesse crescente na comunidade agrícola, dado o potencial desses microrganismos em promover o crescimento saudável das plantas e em minimizar os efeitos de condições adversas.

Dentro desse contexto, este estudo tem como objetivo principal avaliar *in vitro* o potencial biotecnológico e agrônomico de microrganismos provenientes do solo de diversos ecossistemas brasileiros. A ênfase da pesquisa recai sobre a resposta desses microrganismos ao estresse hídrico e à alta salinidade, buscando contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e cultivo de plantas.

Este trabalho contribui para o atendimento do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável - ODS 2 da Agenda 2030 do Brasil das Nações Unidas: Fome zero e agricultura sustentável: Erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável, mais especificamente para com a meta 2.4:

Até 2030, garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo (Nações Unidas, 2024).

Neste sentido, a ênfase da pesquisa recai sobre a resposta de microrganismos ao estresse hídrico e à alta salinidade, buscando contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e cultivo de plantas mais resilientes frente às mudanças climáticas.

Material e métodos

As amostras de solo utilizadas estão armazenadas na soloteca da Embrapa Milho e Sorgo e foram coletadas em diversas regiões geográficas do Brasil.

O isolamento dos microrganismos teve início com a pesagem de 0,5 g solo, seguida da adição de 2,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e agitação constante por 24 horas para assegurar a dispersão dos microrganismos presentes no solo. Após um período de repouso de 30 minutos para a sedimentação de resíduos sólidos, uma alíquota de 500 µL foi retirada e transferida para tubos estéreis, os quais foram submetidos a um choque térmico em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, foram resfriadas em gelo por 5 minutos.

Posteriormente, uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi distribuída e espalhada em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB) sólido e as placas foram incubadas a 45 °C por 24 horas. Ao final desse período, as colônias formadas foram avaliadas quanto às suas características morfo-fisiológicas, incluindo tamanho, forma e cor.

As colônias selecionadas foram repicadas em meio LB líquido e incubadas a 28 °C por 24 horas sob agitação constante. Após este período, as bactérias foram cultivadas a 28 °C por 24 horas em meios LB sólidos com diferentes concentrações de NaCl (6%, 8% e 10%) e sorbitol (405 g/L e 520 g/L) para simular condições de alta salinidade e estresse hídrico. Ao final deste período, as bactérias que cresceram nestas condições foram criopreservadas em glicerol 50% v/v e armazenadas no ultrafreezer a -80 °C.

Para avaliar a diversidade genética, um grupo de bactérias que cresceram em altas concentrações de NaCl e de sorbitol foi selecionado para extração de DNA utilizando o kit “Wizard Genomic DNA

Purification” (Promega, EUA). A análise da diversidade genética foi realizada utilizando o marcador ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e os primers ERIC 1R e ERIC F. As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. Com base no padrão de similaridade dos fragmentos de DNA entre as amostras, foram selecionadas aquelas que apresentavam diferenças e, em seguida, sequenciadas utilizando primers específicos 8F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Turner et al., 1999) e 1492R (5'- TACGYTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991). As sequências foram comparadas com o banco de dados GenBank utilizando a ferramenta BLASTN “Basic Local Alignment Search Tools” para análise de similaridade de nucleotídeos (Altschul et al., 1997).

Após a observação de uma proporção significativa de bactérias que proliferaram nas concentrações especificadas e um alto número de cepas do mesmo gênero/espécie, deliberou-se ampliar tais concentrações. Foram selecionadas todas as cepas bacterianas que cresceram em altas concentrações de meio LB sólidos contendo NaCl a 10%, quanto em meio com sorbitol 520 g/L para serem avaliadas nas concentrações de NaCl a 15% e 20%, assim como sorbitol a 780 g/L.

Resultados e discussão

Com base nas amostras de solo catalogadas na coleção da Embrapa Milho e Sorgo, um total de 805 bactérias morfologicamente distintas foi isolado. Essas bactérias foram selecionadas seguindo critérios, que incluem diferenças em sua coloração, forma e tamanho das colônias.

Após o cultivo em meios contendo altas concentrações de NaCl (10%) ou sorbitol (520 g/L), um total de 205 bactérias foram selecionadas. Essas cepas foram identificadas por sua capacidade de crescer em condições de estresse osmótico ou salinidade elevada, demonstrando adaptações significativas a ambientes adversos. A seleção incluiu tanto bactérias que cresceram em uma única concentração quanto aquelas que foram capazes de prosperar em ambas as condições, indicando a resistência desses microrganismos às variações ambientais.

Visando aprimorar a seleção de cepas bacterianas com capacidade de mitigar os efeitos adversos do estresse hídrico e da salinidade, optou-se por aumentar as concentrações de NaCl e sorbitol. As novas concentrações empregadas foram de 15% e 20% para NaCl, juntamente com 780 g/L para sorbitol, o que levou à seleção de 34 bactérias (Figura 1).

O cultivo das bactérias em condições de alta salinidade (10%, 15%, 20% de NaCl) e estresse osmótico (520 g/L, 780 g/L de sorbitol) revelou uma diversidade notável de espécies, destacando-se *Priestia megaterium* e *P. aryabhattai*. Essas cepas são conhecidas por sua capacidade de formar endósporos, o que lhes confere resistência a condições ambientais adversas, como secas e alta salinidade (Rosa, 2024). A presença dessas espécies em diversos biomas do Brasil, como a Caatinga, a Mata Atlântica e o Cerrado, sugere que elas possuem mecanismos fisiológicos que lhes permitem adaptar-se a diferentes ambientes. Além dessas, *Lysinibacillus agricola*, uma espécie com propriedades promissoras para a promoção do crescimento vegetal (Godoy, 2020), e *Bacillus siamensis*, que possui ampla capacidade de fixar nitrogênio (Celestino, 2019), foram identificadas, reforçando a diversidade microbiana em condições extremas.

Cepas como *B. siamensis* da Amazônia e *Priestia sp.* do Cerrado indicam uma possível adaptação evolutiva a nichos ecológicos variados. Isso tem implicações práticas significativas para a agricultura, especialmente em áreas sujeitas a condições ambientais adversas, onde essas cepas podem

ser exploradas como biofertilizantes ou agentes de biocontrole. Seu uso pode promover práticas agrícolas mais sustentáveis em face das mudanças climáticas e da salinização dos solos (Tabela 1).

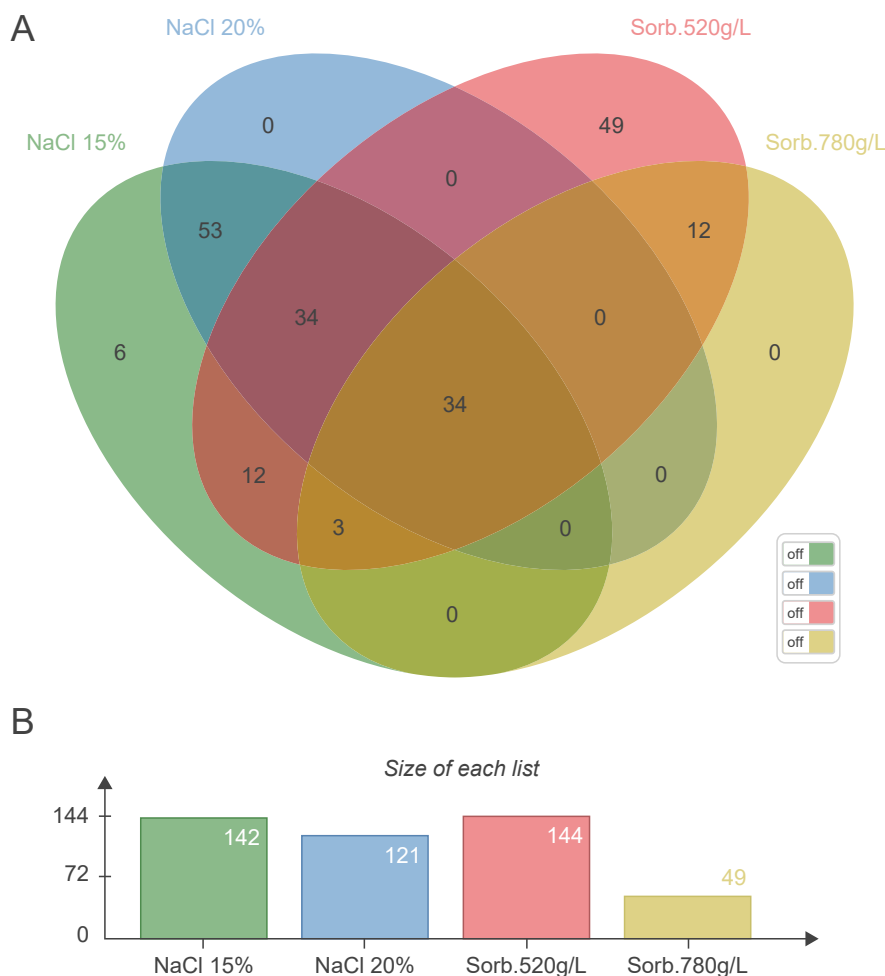


Figura 1. Representação do número de bactérias que apresentaram crescimento em elevadas concentrações de NaCl e sorbitol. (A) Diagrama de Venn e (B) Gráfico mostrando o número de bactérias (eixo Y) que cresceu em cada concentração de NaCl e de sorbitol (eixo X).

Este estudo identificou uma variedade de bactérias com alta tolerância a estresse hídrico e salinidade, incluindo *Priestia megaterium*, *P. aryabhattai*, *Lysinibacillus agricola* e *Bacillus siamensis*. A presença dessas cepas em diferentes biomas brasileiros sugere uma capacidade de adaptação a variados nichos ecológicos, conforme indicado por estudos anteriores sobre suas adaptações a condições adversas. Esses resultados evidenciam o potencial dessas bactérias para o desenvolvimento de biofertilizantes.

Para avançar na aplicação prática dessas cepas, futuras pesquisas devem focar na avaliação da formação de biofilme e da solubilização de fosfatos, processos relevantes para promover o crescimento das plantas e melhorar a tolerância das culturas a estresses ambientais. Além disso, é necessário realizar experimentos em condições que simulem o ambiente agrícola real para validar a eficácia das cepas identificadas. Esses esforços contribuirão para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais eficazes e sustentáveis, abordando desafios como a salinização dos solos e as mudanças climáticas.

Tabela 1. Genótipos e cultivares de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*; *Arachis repens*) avaliados para tolerância a herbicidas em Sete Lagoas, MG.

Isolado	Gênero/ espécie	Bioma/Local
3.2	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Caatinga – CE
6.1	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Mombaça – CE
10.2	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Piquet Carneiro – CE
11.1	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Arneiroz – CE
17.1	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Pirangi – CE
17.2	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Pirangi – CE
19.2	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Aceguá – RS
23.1	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Rio Verde – GO
23.2	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Rio Verde – GO
24.1	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Rio Verde – GO
24.2	<i>Priestia megaterium</i>	Rio Verde – GO
31.1	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Ipiaçu – MG
46.1	<i>Priestia megaterium</i>	Cedro – CE
56.1	<i>Priestia megaterium</i>	Caatinga – CE
60.1	<i>Priestia megaterium</i>	Caatinga – CE
60.2	<i>Priestia megaterium</i>	Caatinga – CE
125.2	<i>Priestia megaterium</i>	Santa Quitéria – CE
140.1	<i>Priestia megaterium</i>	Caatinga – CE
225.1	<i>Priestia megaterium</i>	Mata Atlântica
240.2	<i>Lysinibacillus agricola</i>	Aceguá – RS
288.2	<i>Bacillus siamensis</i>	Amazônia
294.1	<i>Priestia megaterium</i>	Amazônia
322.2	<i>Priestia sp./Bacillus sp.</i>	Cerrado
322.4	<i>Priestia megaterium</i>	Cerrado
338.2	<i>Priestia megaterium</i> ou <i>P. aryabhatai</i>	Caatinga – CE
353.3	<i>Bacillus weizmannii</i>	Caatinga – CE
354.1	<i>Bacillus sp./Priestia sp.</i>	Caatinga – CE
363.3	<i>Priestia megaterium</i>	Caatinga – CE
392.2	<i>Priestia megaterium</i>	Cerrado
394.1	<i>Priestia megaterium</i>	Cerrado
394.2	<i>Priestia megaterium</i>	Cerrado
405.2	<i>Priestia megaterium</i>	Caatinga – CE
411.3	<i>Priestia megaterium</i>	Goiânia – GO
413.2	<i>Priestia sp.</i>	Sete Lagoas – MG

Agradecimentos

A Embrapa Milho e Sorgo, CNPq, Fapemig.

Referências

- AHMAD, P.; SHARMA, S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. **Plant, Soil and Environment**, v. 54, n. 3, p. 89-99, 2008. DOI: <https://doi.org/10.17221/2774-PSE>.
- 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.; 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, p. 120-128, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>.
- CELESTINO, E. L. F. G. **Bactérias promotoras de crescimento isoladas da caatinga alagoana**. 2019. 91 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.
- FAO. **Water**. Disponível em: <http://www.fao.org/water/en/>. Acesso em: 3 maio 2024.
- 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>.
- GODOY, F. de A. **Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera**. 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.11.2020.tde-18052020-141913>.
- GOMES, V. P. Desordenação do território e poluição hídrica no pólo industrial de Manaus: paradoxo da escassez na abundância. In: BRAVO, A. S. (ed.). **Ordenación del territorio y medio ambiente**. Sevilla: ArCiBel, 2009. p. 233-265.
- 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.
- MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. de M.; LIMA, M. M. de A.; VIDAL, M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, n.2, p. 1039-1072, 2006.
- 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>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2: fome zero e agricultura sustentável: erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 13 maio 2024.
- ROSA, M. S. **Esporulação da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9: aspectos biológicos, bases moleculares e o seu papel na interação com o milho**. 2024. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2024.
- 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* Flüggé cultivado em solo construído para reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão**. 2022. 66 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

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>.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>.