

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS HALOTOLERANTES DE INTERESSE AGRÍCOLA

Dalila da Costa Gonçalves, Wilian Rodrigues Ribeiro, Lucas Romão Gava, Serli de Oliveira Cabral, Laiane Silva Maciel, Willian Bucker Moraes, André da Silva Xavier.

Universidade Federal do Espírito Santo - Campus Alegre, Alto Universitário, s/n Guararema, Alegre - ES, 29500-000- Brasil, dalilant@hotmail.com, wilianrodrigues@msn.com, lucasrgava@hotmail.com, biologiaserli@gmail.com, laianesm@gmail.com, willian.fito@gmail.com, andre.s.xavier@ufes.br

Resumo

Os microrganismos promotores de crescimento de plantas são potenciais candidatos capazes de minimizar os efeitos deletérios da salinidade nas plantas. Objetivou-se selecionar microrganismos halotolerantes com potencial biotecnológico. A partir do isolamento foram realizados testes *in vivo* com linhagens fenotipicamente distintas. Para avaliar o limite de tolerância ao sal, 10 µL da suspensão bacteriana foi semeado em meio líquido de Agar Triptona de Soja (TSA) a 10%, suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl: 45 g L⁻¹, 90 g L⁻¹, 180 g L⁻¹ e 360 g L⁻¹ (4,5%, 9,0%, 18%, 36%). As culturas foram incubadas a 28 ± 2°C por 48 - 72 horas. Foram encontrados 66 microrganismos e 52 sobreviveram e cresceram em concentrações de NaCl a 4,5%, e um isolado se desenvolveu em NaCl a 9% e em atividade de água de 0,912 Aw aplicada usando sorbitol a 52%. Com base nesses achados, a bioprospecção de isolados de ambientes extremos contribui para aumentar o acervo microbiológico no BIOTA, podendo servir de base para futuras pesquisas sobre os movimentos de tolerância à salinidade utilizados por esses microrganismos.

Palavras-chave: Halotolerância. Salinidade. Estresse osmótico. Proteção de plantas. Biotecnologia.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônoma

Introdução

A agricultura contribui satisfatoriamente para incrementos na produção de alimentos e na segurança alimentar mundial, no entanto sofre muitas perdas por influências agroclimáticas. Porém o uso indiscriminado e falhas no manejo de práticas como fertilização e irrigação, estão contribuindo para aumentar os níveis de salinização e sodicidade dos solos e das águas, resultando em um esgotamento demasiado da produção agrícola em todo o mundo (OMUTO *et al.*, 2020).

Dentre os estresses abióticos mais importantes na agricultura, a salinidade é uma das preocupações mais prementes. Essa relevância é devido aos efeitos prejudiciais que vão desde a germinação e fisiologia da planta até a reprodução, podendo ainda afetar drasticamente a população microbiana na rizosfera e as características físicas, químicas e biológicas do solo (ISAYENKOV; MAATHUIS, 2019; GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2022). Estima-se que a salinidade dos solos agrícolas está aumentando a uma taxa de até 10% ao ano (LI *et al.*, 2021), e se não mitigado, será responsável por impedir que as culturas alcancem o seu rendimento máximo.

A salinização, muitas vezes é potencializada pelas condições de baixa precipitação e alta temperaturas, além disso, semelhante ao estresse causado por deficiência hídrica, a salinidade reduz a absorção de água pelas raízes e elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas, pois os íons competem com enzimas de absorção e translocação (FORNI; DUCA; GLICK, 2017). Em razão disso, a salinidade induz e/ou intensifica outros tipos de estresses nas plantas, como estresse hídrico provocado pelo déficit hídrico, estresse oxidativo e nutricional (ISAYENKOV; MAATHUIS, 2019).

A aplicação de microrganismos promotores de crescimento em plantas MPCP é uma estratégia ecológica e sustentável capaz de reduzir o efeito adverso do estresse salino na agricultura, aumentar a tolerância aos estresses e promover o crescimento vegetal. No entanto, chegar às espécies

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

microbiológicas relevantes e preparar os inoculantes e/ou seus consórcios apropriados, ou utilizá-las individualmente é desafiador.

Sob o estresse de salinidade, os microrganismos desencadeiam fluxos rápidos de água e acumulam grandes quantidades de osmólitos orgânicos como trealose e prolina, esse acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos a nível celular, tenta manter as propriedades de turgor das células, evitando assim sua desnaturação, os microrganismos também podem atuar regulando positivamente a expressão de genes de plantas envolvidos na biossíntese desses osmólitos (ILYAS *et al.*, 2020). Quando expostos à alta salinidade a expressão dos transcritos de aquaporinas (proteínas da membrana celular que permitem a translocação de água entre o interior da célula e o meio externo) diminui, e as PGPB sob estresse salino pode regular a expressão destas proteínas, facilitando o movimento da água para as células vegetais, melhorando assim as relações hídricas da planta (MISHRA; MISHRA; ARORA, 2021).

Devido às suas múltiplas características, a prospecção de microrganismos halotolerantes é uma abordagem promissora e abre novas possibilidades para o emprego de estratégias sustentáveis contra a salinidade, como a produção de bioinsumos, a introdução de genes halófitos por meio da engenharia genética, além da contribuição ecológica, ampliando o conhecimento acerca da biodiversidade de microrganismos e conservação de espécie. Objetiva-se com este estudo isolar e preservar microrganismos halotolerantes com características desejáveis para o aumento dos rendimentos e futuras aplicações biotecnológicas em plantas cultivadas.

Metodologia

Os microrganismos foram obtidos a partir de amostras de solo, regiões rizosféricas, partes vegetativas de plantas saudáveis e nódulos de leguminosas. No total foram 7 amostras diferentes originárias de 3 regiões distintas com ecossistemas altamente dinâmicos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fontes Amostrais

Tipo de amostra	Local	Coordenadas (UTM)		Complemento
Musgo	Vargem Alta - ES	7720219.34	290135.19	Tronco de árvore
Raiz de orquídea	Vargem Alta - ES	7720219.34	290135.19	Tronco de árvore
Rizosfera de samambaia	Vargem Alta - ES	7720219.34	290135.19	Sob superfície pedregosa
Nódulo de raiz	Tamandaré - PE	9035945.04	270373.43	Leguminosa
Rizosfera de xerófilas	Anchieta - ES	7698660.84	334784.78	Rocha na costa litorânea Sul capixaba
Rizosfera de gramíneas	Anchieta - ES	7695275.03	323809.25	Rocha na costa litorânea Sul capixaba
Solo	Anchieta - ES	7695275.03	323809.25	Rocha na costa litorânea Sul capixaba

Fonte: Autor

A partir das amostras coletadas, foi realizado a técnica de isolamento dos microrganismos seguindo a metodologia proposta por Kavamura *et al.* (2013) onde, se utilizou 1g de solo homogeneizado em 10 mL de solução salina (NaCl 0.8%; KCl 0.02%; Na₂HPO₄ 0.14%; KH₂PO₄ 0.024%). A partir da suspensão obtida, efetuou-se diluições seriadas (10⁻¹ até 10⁻⁵) seguido do espelhamento em placas de Petri. O meio utilizado foi o Tryptone Soya Agar (TSA) a 10% (1,5 g/L de tripton, 0,5 g/L de peptona de soja, 1,5 g/L de NaCl, 15 g/L de ágar, pH 7,3) e as placas foram incubadas em estufa de crescimento a 28°C durante 3 dias.

O isolamento dos microrganismos endofíticos foram realizadas conforme descrito por Costa *et al.* (2012) com adaptações onde, 2 g de partes vegetativas foram desinfetadas por 1 minuto em álcool 70%, 4 minutos em hipoclorito de sódio (NaCl 2,5%) e 30 segundos em etanol seguindo por 3 lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. As amostras foram maceradas com 6 mL de solução salina

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(0,85% NaCl), o extrato foi incubado a 28°C por 3h. Após a incubação, a amostra foi diluída em NaCl 0,85% e, as diluições de 10^{-1} e 10^{-2} , alíquotas de 100 μ L plaqueadas em meio TSA (10%). Após o período de incubação as colônias que apresentaram características morfológicas distintas dentro de uma mesma placa, foram repicadas afim de obter colônias isoladas.

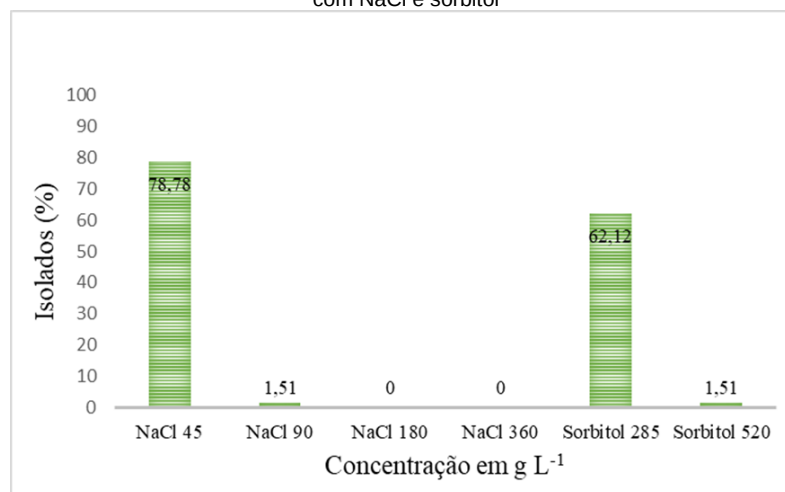
Após o protocolo de isolamento, colônias puras obtidas foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura caldo nutriente (Nutriente Broth) e levados para crescimento em incubadora tipo Shaker regulada para condição de 30 °C $\pm$ 2 °C e 160 RPM, mantidas overnight por 24 horas. A resistência intrínseca das cepas à salinidade foi testada mediante os microrganismos originários das amostras e algumas cepas do acervo biológico do BIOTA (ANL-3, ANL-2, ANL-2.1, SS.1.1, ANL-3, ANL-2, ANL-2.1.1, PiR-21, *Bacillus subtilis*), ao todo 66 cepas foram submetidas ao bioensaio em meio TSA suplementado com concentrações de NaCl conforme a metodologia adaptada descrita por Upadhyay; Maurya; Singh (2012). Onde foram semeados 10 μ L da suspensão bacteriana em meio líquido TSA (10%) suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl: 45 g L⁻¹, 90 g L⁻¹, 180 g L⁻¹ e 360 g L⁻¹ (4,5%, 9,0%, 18%, 36%). As culturas foram incubadas a 28 $\pm$ 2°C por 3 dias. Após este período os microrganismos foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento.

Estes isolados foram adicionalmente testados em meio TSA 10% com reduzida atividade de água (Aw), utilizando Sorbitol nas concentrações de 285 g L⁻¹, 520 g L⁻¹ e 660 g L⁻¹ (28,5%, 52%, 66%) correspondente a Aw de: 0.963, 0.912 e 0.859 respectivamente (KAVAMURA *et al.*, 2013).

Resultados

Foram encontrados 57 isolados microbianos sendo 55 bactérias e 02 fungos. A Figura 1, apresenta em termos percentuais os níveis de tolerância dos microrganismos por meio do crescimento em meio TSA suplementado com NaCl e sorbitol. Dentre os isolados testados 78,78 % podem ser categorizados como microrganismos halotolerantes. Dos 66 isolados utilizados 62,12% cresceram em baixa atividade de água induzida por sorbitol a 25,5% e o isolado D65 se desenvolveu em NaCl a 9% e em atividade de água de 0,912 Aw aplicada usando sorbitol a 52%.

Figura 1. Percentagens de isolados e seus níveis de tolerância em meio TSA suplementado com NaCl e sorbitol

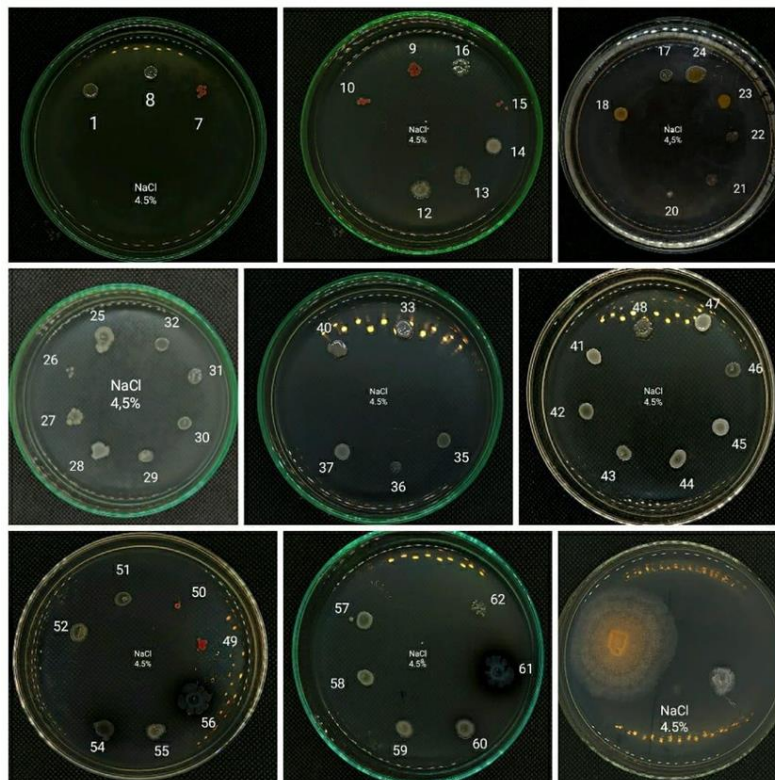


Fonte: Autor

Todos os 66 isolados que se desenvolveram em condições de alta e baixa atividade de água *in vitro* foram preservados e depositados na coleção bacteriológica do BIOTA para experimentos futuros. Os microrganismos que cresceram em condição de 4,5% de NaCl estão dispostos na Figura 2.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2. Crescimento dos isolados em meios contendo 45g L⁻¹ de NaCl.



Fonte: Autor

Discussão

As regiões de onde foram obtidas as amostras são caracterizadas por ecossistemas altamente dinâmicos dependentes das condições climáticas, sendo que as maiores densidades microbianas foram obtidas dos ambientes costeiros, regiões onde organismos vivos estão constantemente expostos a alta incidência de radiação solar, baixa disponibilidade de nutrientes, concentrações elevadas de sais, credita-se que os microrganismos associados a estas plantas também se encontram bem adaptados às condições impostas (KAVAMURA *et al.*, 2013).

Os bioensaios realizados até o momento, não aponta nenhum destes microrganismos como halófilicos, pois estes foram capazes de crescer em meio sem adição de NaCl, porém são microrganismos promissores com alguma tolerância que os permitiu prosperar em condições de salinidade. Os nossos resultados preliminares nos direcionam para os próximos testes e análises em busca de mais respostas destes microrganismos, principalmente no que diz respeito ao comportamento destes microrganismos sob diferentes condições induzidas por estresse, bem como o desenvolvimento de múltiplas redes reguladoras complexas para neutralizar o estresse e reparar os possíveis danos causados.

De acordo com Donn Kushner (1978) microrganismos que prosperam em ambientes hipersalinos e precisam de sal para seu crescimento são denominados de halófilas, e os que toleram e podem se adaptar a condições salinas são organismos halotolerantes. Neste trabalho podemos categorizar os microrganismos selecionados como halotolerantes, pois cresceram tanto na ausência quanto na presença de concentrações relativamente altas de NaCl, e outra observação relevante é que os microrganismos cresceram apenas na menor concentração de NaCl na composição do meio de crescimento, com exceção do D65 que cresceu em 7,69M, sugerindo que a maioria dos microrganismos cultivados poderia ser halotolerante ou moderadamente halófilico. Segundo este mesmo autor microrganismos moderadamente halófilas e os microorganismos extremotolerantes são bastante

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

interessantes, pois são capazes de crescer em amplas faixas de concentrações de soluto, o que pode ser muito útil em termos biotecnológicos (KUSHNER; KAMEKURA, 1988).

Estudos com bioprospecção e triagem de microrganismos extremotolerante a estresses abióticos com características desejáveis para melhorar o desempenho das lavouras perante as adversidades do clima pode ser uma estratégia de aclimação e/ou adaptação, capaz de mitigar os efeitos do estresse nos cultivos. No cenário nacional, a Embrapa vem se destacando juntamente com parceiros da iniciativa privada para disponibilização desses bioinoculantes. Recentemente, o bioinsumo comercial Auras foi registrado no Ministério da Agricultura (MG000757-9.000003), sendo o primeiro na categoria de bioestimulantes relacionados ao aumento da resiliência e da capacidade de aclimação das plantas ao déficit hídrico, reduzindo os efeitos causados pelas estiagens prolongadas, minimizando riscos e expressando o potencial das lavouras. O ingrediente ativo do Auras é o *Bacillus aryabhattai*, isolado a partir de solo rizosférico associado a uma espécie de Cactaceae, popularmente conhecida como mandacaru no bioma Caatinga, este isolado é fruto dos trabalhos de Kavamura *et al.*, (2013).

Os trabalhos são iniciantes e já é perceptível a grandiosidade da biodiversidade microbiana desconhecida e valor biológico que estamos prestes a descobrir. Através do resgate e caracterização da biodiversidade microbiana, surgem novas perspectivas para formulação de bioinsumos, em nosso caso, destinados a estimular a resistência e/ou tolerância das plantas sob estresses abióticos. Espera-se com os trabalhos seguintes realizarmos a caracterização destes microrganismos que possam ser utilizados como ingredientes ativos de bioestimulantes com múltiplas aptidões benéficas a agricultura.

Conclusão

Foram encontrados microrganismos potenciais candidatos a serem testados quanto a sua atividade de promoção de crescimento em plantas, sendo o isolado D65 como forte candidato a promover tolerância em plantas, todos estão isolados e preservados compondo o portfólio do BIOTA para pesquisas futuras em biologia molecular.

A prospecção de microrganismos extremotolerantes contribui para o conhecimento da biodiversidade e conservação de espécies, principalmente em ambientes pouco explorados que pode esconder inúmeras biomoléculas com propriedades únicas; além da possibilidade de descobrir novas espécies de microrganismos extremotolerantes com capacidade de promover o crescimento de plantas e contribuir para o uma agricultura mais fortalecida em condições adversas.

Este trabalho contribui para cultivos mais sustentáveis e resilientes às mudanças climáticas, além disso o estudo no campo da halofilicidade pode contribuir para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos utilizados por estes microrganismos e fornecer uma visão expressiva de seus potenciais biotecnológicos e moleculares. Mais estudos nesta área devem ser incentivados em busca de soluções mais sustentáveis ao longo do tempo

Referências

COSTA, L. E. D. O.; QUEIROZ, M. V. D.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A. D.; ARAÚJO, E. F. D. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1562- 1575, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400041>

FORNI, Cinzia; DUCA, Daiana; GLICK, Bernard R. Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 410, n. 1, p. 335- 356, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>

GOPALAKRISHNAN, V.; BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; HELMAN, Y. From the Lab to the Field: Combined Application of Plant-Growth-Promoting Bacteria for Mitigation of Salinity Stress in Melon Plants. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 408, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020408>

ISAYENKOV, Stanislav V.; MAATHUIS, Frans J. M. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 80, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; DA SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; DE MELO, I. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>

KUSHNER, Donn J. **Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria**. Microbial life in extreme environments, Edited by: Kushner DJ. 1978, London: Academic Press, 317-368, 1978.

KUSHNER, D. J.; KAMEKURA, M. **Physiology of halophilic eubacteria**. Halophilic bacteria, p. 109-138, 1988.

LI, H.; LA, S.; ZHANG, X.; GAO, L.; TIAN, Y. Salt-induced recruitment of specific root-associated bacterial consortium capable of enhancing plant adaptability to salt stress. **ISME Journal**, v. 15, n. 10, p. 2865-2882, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00974-2>

MISHRA, Priya; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants—recent developments and prospects: a review. **Microbiological Research**, v. 252, p. 126861, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>

UPADHYAY, S. K.; MAURYA, S. K.; SINGH, D. P. Salinity tolerance in free living plant growth promoting rhizobacteria. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 3, n. 2, p. 73-78, 2012. Disponível em: <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijrs1&volume=3&issue=2&article=013> Acesso em: 10 mai. 2023.

OMUTO, C.T.; VARGAS, R.R.; EL MOBARAK, A.M.; MOHAMED N.; VIATKIN, K.; YIGINI, Y. **Mapping of salt-affected soils: Technical manual**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2020. 112p. <https://doi.org/10.4060/ca9215en>

ILYAS, N.; MUMTAZ, K.; AKHTAR, N.; YASMIN, H.; SAYYED, R. Z.; KHAN, W.; EI ENSHASY, H. A.; DAILIN, D. J.; EI ENSHASY, E. A.; ALI, Z. Exopolysaccharides producing bacteria for the amelioration of drought stress in wheat. **Sustainability**, v. 12, n. 21, p. 8876, 2020. <https://doi.org/10.3390/su12218876>