

**PROJETO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGANHARIA AGRÍCOLA**

Mestranda: Heila Silva de Araújo Alencar
Orientadora: Glaciela Kaschuk

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES EM SOLOS DO
LITORAL PARANAENSE E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA
MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO E SALINO EM PLANTAS**

INTRODUÇÃO

Os impactos da degradação dos solos, consequências diretas das mudanças climáticas e da ação humana, já são observadas em escala global. Destacam-se a crescente ocorrência de eventos climáticos extremos, como secas e inundações, processos de salinização do solo, contaminação por metais pesados, aumento da erosão do solo, doenças, perdas de biodiversidade, fragmentação de paisagens, entre outras (LANNA et al., 2021; TANG et al., 2024).

A salinização de solos é um destes fenômenos causados tanto por ações antrópicas quanto por causas ambientais (PAN et al., 2024; FAO, 2024). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2024) mais de 10% dos solos do planeta já são afetados pela salinidade e este número tende a aumentar para entre 24% e 32%. Este avanço da salinidade coloca em risco a estabilidade do meio ambiente e a produtividade agrícola, sendo este desafio agravado no cenário mundial, pois o consumo de água aumentou seis vezes neste último século, mas a sua disponibilidade diminuiu, tornando o uso de águas salobras ou salgadas cada vez mais comum na agricultura (PAN et al., 2024; TAROLLI et al., 2024; FAO, 2024).

A seca e o déficit hídrico são considerados por Abdelaal (2021) um dos fatores mais impactantes no crescimento de plantas, e a FAO (2024) e Tarolli (2024) realçam que a salinidade reduz diretamente a fertilidade dos solos, podendo ocasionar perdas de produtividade de até 70%, são, portanto algumas das ameaças à segurança alimentar e a saúde dos ecossistemas (TANG et al., 2024; PAN et al., 2024).

Neste cenário de desafios, a agricultura se choca com a necessidade de garantir a produção sustentável de alimentos para uma população mundial crescente, enquanto enfrentamos a degradação dos recursos naturais mais básicos, como solo e a água (KUMAR et al., 2020; LANNA et al., 2021; FAO, 2024; TAROLLI et al., 2024). Assim, é imprescindível o desenvolvimento de estratégias e tecnologias que promovam não apenas a recuperação das funções do solo, mas que também permitam a resiliência no desenvolvimento das plantas mesmo em meio aos estresses do ambiente.

Alguns recursos já conhecidos são a utilização de plantas tolerantes a seca e salinidade e a biorremediação, utilizando fungos, bactérias, plantas e animais na remoção das substâncias indesejadas (FAO, 2024). Arora (2016) e Zhu (2024) mencionam como os microrganismos são importantes na

manutenção e estabilidade dos ecossistemas e das funções do solo, pois tem a capacidade de se adaptar rapidamente às mudanças ambientais por mais desafiadoras que sejam, como a salinidade.

Tarolli (2024) descreve uma combinação de tecnologias baseadas na natureza como estratégias para mitigação da salinidade, entre elas está o uso de microrganismos tolerantes, que agem como protetores, promovem o crescimento das plantas, aumentam a disponibilidade e absorção de nutrientes pois atuam nos ciclos biogeoquímicos, melhoram a tolerância ao estresse, e são capazes de fazer a remoção de sal (ARORA et al., 2016; KUMAR et al., 2020; TANG et al., 2024; PAN et al., 2024).

Algumas características celulares podem ser avaliadas para a seleção de microrganismos promotores de crescimento de plantas. A alta produção de exopolissacarídeos e formação de biofilme, por exemplo, permitem seu crescimento em ambientes hostis e fortalecem as defesas naturais (LANNA et al., 2021; ZHU et al., 2024), uma maior produção de ácido indol acético proporciona maior crescimento de raízes podendo aumentar a disponibilidade de água, e a síntese de sideróforos mais elevada aumenta a disponibilidade de Fe assimilável (GODINHO et al., 2019, ABDELAAL et al., 2021), são algumas das características que melhoram a comunidade microbiana e também auxiliam na estrutura do solo e saúde das plantas sob estresses (KUMAR et al., 2020; PAN et al., 2024).

Em solos naturalmente salinos espera-se encontrar bactérias adaptadas a este meio, que possuam características de resistência que podem ser úteis para proporcionar o crescimento de plantas de forma mais saudável e mais produtivo mesmo em condições adversas, podendo estes microrganismos multifuncionais serem utilizados no enfrentamento de degradação de solos pela salinização, aridez e mudanças climáticas, agindo como biorremediadores e garantindo a produção de alimentos, fortalecendo a segurança alimentar mundial (ARORA et al., 2016; ABDELAAL et al., 2021; TAROLLI et al., 2024).

Considerando isso, a hipótese desse projeto é que a rizosfera de plantas nativas de solos salinos do litoral paranaense abriga bactérias com alto potencial de promoção de crescimento vegetal sob estresse hídrico e salino.

OBJETIVO GERAL

Selecionar bactérias resistentes a estresse salino e hídrico capazes de promover a resiliência no desenvolvimento de plantas em condições de estresse.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar, caracterizar e selecionar bactérias com potencial resistência a estresses ambientais;

Avaliar e quantificar o desempenho e resposta a estresses em laboratório;

Testar em casa de vegetação o efeito da inoculação em plantas e suas respostas ao estresse induzido.

MATERIAL E MÉTODOS

Serão realizadas coletas de amostras de solo associadas a rizosfera de plantas nativas da região de Paranaguá, Guaraqueçaba e Guaratuba, no litoral do paraná (ARORA et al., 2016). Cada amostra terá sua caracterização química de rotina conforme Santos et al. (2018), e a análise textural por densímetro de Bouyoucos (GEE e BAUDER, 1986).

A partir das amostras de solo obtidas, será realizado o procedimento de diluição seriada, plaqueamento e incubação para crescimento, e posterior isolamento bacteriano, como proposto por Dionísio et. al., a caracterização fenotípica das colônias microbianas, se dará em função do tamanho (mm), forma, elevação, bordo, estrutura, brilho, cor e presença do muco, (NEDER, 1992).

A partir das colônias isoladas serão realizados uma série de testes e análises bioquímicos e fisiológicos de forma a medir e selecionar bactérias com potencial para a bioprospecção de microrganismos para bioinsumos.

Teste de coloração de gram: Com as colônias bacterianas puras (isoladas) em placa de Petri as amostras serão transferidas para lâminas de microscópio e passarão pelo teste da coloração de Gram para diferenciação das bactérias em Gram- positivas e Gram-negativas (BARTHOLOMEW & MITTWER, 1952), também serão testadas de forma complementar pelo teste de Gram em solubilidade com KOH (DIONÍZIO et al., 2016).

Análise de resistência a salinidade: As bactérias previamente isoladas serão inoculadas em meio de cultura modificado por adição de soluções de NaCl, de forma a ter uma gradação da concentração final do meio de 1; 2; 2,5; 3; 10; 20; 30 e 50 g L⁻¹. Após incubação a 28 °C por 10 dias o comportamento das colônias será avaliado conforme os seguintes valores: 0 = sem crescimento; 1 = pouco crescimento; 2 = crescimento razoável, porém com distribuição heterogênea na placa; 3 = crescimento máximo, com distribuição uniforme por toda a placa, não diferindo do crescimento no meio com sua composição original (NÓBREGA et al., 2004).

Análise de resistência a seca e altas temperaturas: As colônias isoladas serão repicadas em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar) com a adição de sorbitol em diferentes concentrações, obtendo meios de cultura com atividade de água reduzida e incubadas em altas temperaturas (até 40 °C) por sete dias, serão consideradas tolerantes as que apresentarem crescimento neste período (GODINHO et al., 2019; VASQUES et al., 2024).

Análise de colônias solubilizadoras de fosfato em meio sólido: Os microrganismos serão inoculados em meio específico, acrescido de fontes de fosfato (FePO₄, AlPO₄ e CaPO₄), após incubação em 28 °C será determinado o índice de solubilização de fosfato que é obtido pelo diâmetro do halo de solubilização dividido pelo diâmetro da colônia (VASQUES et al., 2024).

Síntese do ácido indol-acético (AIA): A análise de compostos indólicos é realizada por colorimetria conforme protocolo estabelecido por Gordon & Weber (1951). Cada isolado será inoculado em meio de cultura líquido, acrescidos de triptofano, e incubado sob agitação (100 rpm) por sete dias a 28°C. Após centrifugação será acrescido o reagente de Salkowski, reação que deve ser realizada no escuro, para posterior leitura em espectrofotômetro da intensidade de coloração, no comprimento de onda de 540nm. Os valores

serão expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA no sobrenadante. A curva de calibração será realizada com AIA sintético (VASQUES et al., 2024).

Produção de sideróforos: A análise será realizada conforme apresentado por Vasques et al. (2024). As bactérias serão inoculadas em meio específico, acrescido de cromoazurol que permitirá a revelação da reação. Após 24 horas de incubação a 28 °C será observado se houve a formação de halo de cor laranja ou rosa ao redor da colônia, esta metodologia é qualitativa demonstrando a produção ou não de sideróforos. Também será obtido a razão halo/colônia com o auxílio de um paquímetro.

Formação de biofilme: As bactérias a serem avaliadas serão transferidas para microtubos com meio de cultura apropriado (todas deverão estar na mesma concentração para comparação entre as estirpes. Ex. mesma densidade óptica de 0,8), e incubadas por 96 horas a 28 °C. Após, conforme o método de Vasques et al. (2024) adaptado de Lima et al. (2017), as amostras serão descartadas, os microtubos lavados e acrescida a solução de violeta cristal 0,1%. Após 15 minutos de repouso os tubos serão novamente lavados e então adicionado 1 mL de álcool etílico 95% que solubilizará o corante retido no biofilme podendo executar a leitura óptica por espectrofotometria a 560nm.

Síntese de exopolissacarídeos: A produção de exopolissacarídeos (EPS) será determinada conforme método adaptado apresentado por Vasques et. al. (2024). Dos cultivos incubados por 72 h a 28 °C, 2 mL serão transferidos para microtubos passarão por uma série de centrifugações de forma a concentrar a amostra para leitura. A quantificação é realizada por espectrofotometria partir do método fenol-sulfúrico para dosagem de carboidratos totais, com leitura da densidade óptica a 485 nm. A curva de calibração é obtida com a glicose como substrato padrão.

Após os resultados laboratoriais as cepas bacterianas que apresentaram maior potencial serão testadas na inoculação de cultura comercial onde serão avaliados o desenvolvimento da planta, altura da parte aérea, comprimento da raiz, massa fresca e massa seca da parte aérea e da raiz, e taxas de fotossíntese.

Todos os dados serão submetidos a análise de teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e análise de variância ANOVA a 5% de significância. Caso os dados possuam diferença estatística entre si, serão submetidos ao teste de média de Tukey $\geq 0,05\%$. O software a ser utilizado será o Rstudio®.

CRONOGRAMA

- Levantamento de material bibliográfico e metodologias: Durante o ano de 2026
- Disciplinas para obtenção de créditos: Durante os anos letivos de 2026 e 2027
- Coleta de amostras de solo em campo: Março e Abril de 2026
- Isolamento e seleção de bactérias: Maio a Agosto de 2026
- Testes laboratoriais de estresse: Setembro a Dezembro de 2026
- Ensaio em casa de vegetação com os isolados selecionados: Janeiro a Abril de 2027
- Tabulação de dados: Durante o primeiro semestre de 2027
- Análises estatísticas: Durante o ano de 2027

- Redação da dissertação: Agosto a Novembro de 2027
- Entrega e defesa da dissertação: Fevereiro de 2028

REFERÊNCIAS

ABDELAAL, K., ALKAHTANI, M., ATTIA, K., HAFEZ, Y., KIRÁLY, L., & KÜNSTLER, A. (2021). The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology*, 10(6), 520.

ARORA, S., SINGH, Y. P., VANZA, M., & SAHNI, D. (2016). Bio-remediation of saline and sodic soils through halophilic bacteria to enhance agricultural production. *Journal of Soil and Water Conservation*, 15(4), 302-305.

BARTHOLOMEW, JW, & MITTWER, T. (1952). A coloração de Gram. *Revisões bacteriológicas*, 16 (1), 1-29.

DIONISIO, J. A., PIMENTEL, I. C., SIGNOR, D., DE PAULA, A. M., MACEDA, A., & MATANNA, A. L. (2016). Guia prático de biologia do solo.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Global status of salt-affected soils. Rome, 2024. Disponível em: <<https://openknowledge.fao.org/items/3fba222a-e820-4d1e-a736-12cbef53d699>>. Acesso em: [22/10/2025].

GEE, G. W., & BAUDER, J. W. (1986). Particle-size analysis. *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods*, 5, 383-411.

GODINHO, B. T. V., TAVARES, A. N. G., LANA, U. D. P., DE SOUSA, S. M., OLIVEIRA-PAIVA, C. A., MARRIEL, I. E., & GOMES, E. A. (2019). Isolamento e potencial uso de bactérias do gênero *Bacillus* na promoção de crescimento de plantas em condições de déficit hídrico.

GORDON, S. A., & WEBER, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.

KUMAR, A., SINGH, S., GAURAV, A. K., Srivastava, S., & Verma, J. P. (2020). Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. *Frontiers in microbiology*, 11, 1216.

LANNA, A. C., DE FILIPPI, M. C. C., FERREIRA, C. M., & NASCENTE, A. S. (2021). Mitigação dos estresses abióticos na agricultura mediada pela interação de microrganismos e plantas.

NEDER, R. N. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo: NBL Editora, 1992.

NÓBREGA, R. S. A., MOTTA, J. S., LACERDA, A. M., & MOREIRA, F. M. D. S. (2004). Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. *Ciência e Agrotecnologia*, 28, 899-905.

PAN, J., XUE, X., HUANG, C., YOU, Q., GUO, P., YANG, R., ... & PENG, F. (2024). Effect of salinization on soil properties and mechanisms beneficial to microorganisms in salinized soil remediation—a review. *Research in Cold and Arid Regions*, 16(3), 121-128.

SANTOS, H. G. dos et al. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

TANG, H., DU, L., XIA, C., & LUO, J. (2024). Bridging gaps and seeding futures: A synthesis of soil salinization and the role of plant-soil interactions under climate change. *Iscience*, 27(9).

TAROLLI, P., LUO, J., PARK, E., BARCACCIA, G., & MASIN, R. (2024). Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strategies combining nature-based solutions and bioengineering. *Iscience*, 27(2).

VASQUES, N., CEREZINI, P., NOGUEIRA, M., HUNGRIA, M., VASQUES, N. C., PAULA CEREZINI, S. P. D. C., & DA CUNHA, M. H. Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos.

ZHU, W., GU, S., JIANG, R., ZHANG, X., & HATANO, R. (2024). Saline–alkali soil reclamation contributes to soil health improvement in China. *Agriculture*, 14(8), 1210.