



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Campus UFRJ-Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade**  
**Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia**

Juliana Fidelis dos Santos

**ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS CACTÁCEAS E DO  
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS NA  
RESISTÊNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E À SALINIDADE.**

Duque de Caxias - RJ

2023



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Campus UFRJ-Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade**  
**Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia**

Juliana Fidelis dos Santos

Trabalho de monografia apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Diogo De Azevedo Jurelevicius

Duque de Caxias - RJ

2023

## CIP - Catalogação na Publicação

S237 Santos, Juliana Fidelis dos  
ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS CACTÁCEAS E DO  
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS NA  
RESISTÊNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E À SALINIDADE. /  
Juliana Fidelis dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2023.  
65 f.

Orientador: Diogo De Azevedo Jurelevicius.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus  
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel  
em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Restinga. 2. Cactáceas. 3. PGPB. 4.  
Salinidade. 5. Estresse hidrico. I. Jurelevicius,  
Diogo De Azevedo , orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**Juliana Fidelis dos Santos**

**ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS CACTÁCEAS E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E À SALINIDADE.**

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas - Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas (Biotecnologia).

**Aprovada em: 24 de agosto de 2023**

---

**Dr. Diogo De Azevedo Jurelevicius**  
**(Membro titular, presidente da banca)**

---

**Dr. Silas Pessini Rodrigues, UFRJ**  
**(Membro titular)**

---

**Dr. Jakline Rossetti Mateus, UFRJ**  
**(Membro titular)**

---

**MSc. Carolline S. Fazolato Barbosa, UFRJ**  
**(Revisor e Membro suplente)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS DUQUE DE CAXIAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOTECNOLOGIA

Aluno(a): **Juliana Fidelis dos Santos**

Registro na DRE: **118141879**

Título: "ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS CACTÁCEAS E AO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E À SALINIDADE."

MEMBRO DA BANCA	NOTA
Sílas Pessini Rodrigues	10
Jackeline Rossetti Mateus	10
Diogo De Azevedo Jurelevicius (Orientador)	10
Nota Final	10

Declaro que a aluna **Juliana Fidelis dos Santos** foi aprovada com nota 10, por esta banca.

Duque de Caxias, 24 de agosto de 2023.

Sílas Pessini Rodrigues

Jackeline Rossetti Mateus

Diogo De Azevedo Jurelevicius

Juliana Fidelis dos Santos

Coordenador Luiz Gustavo Feijó Dubois  
Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia

**Com gratidão, dedico esta pesquisa ao meu Deus, causa primordial de todas as coisas. Devo a Ele tudo o que sou e sem Ele nada seria possível. Ele que foi o meu maior sustento durante todo esse trajeto e continuará sendo, por toda eternidade! Que tudo que eu fizer seja para Sua honra e glória, e nada mais.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, pois sem Sua infinita graça e misericórdia eu nada seria. Que todos os momentos que passei e todo o caminho que hei de trilhar daqui para frente sejam para Sua honra e glória.

À minha família, meus pais Geni Fidelis e Jose Ribamar, e aos meus irmãos, Jose Raimundo e Israel Fidelis, por seu apoio incondicional nessa trajetória, tive a sorte de crescer em um lar de pessoas que sempre acreditaram em mim e que nunca mediram esforços por minhas aspirações. Agradeço por toda paciência em minhas crises existenciais, eternas lamentações, e por sempre me motivarem a ver o melhor da vida.

Ao grande amor da minha vida, meu noivo, Carlos Mateus, meu raio de sol e meu acalento. Que sempre me incentivou nos momentos difíceis e compreendeu, sempre com um sorriso no rosto, a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos e padrinhos, Alice, Luma, Caio, Aline, Guilherme, Leni e Duda, pelas conversas e conselhos até tarde da noite que me ajudaram a levar com mais leveza este processo.

Ao meu orientador, Diogo de Azevedo Jurelevicius por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

Aos amigos que fiz durante estes anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica e pessoal, em especial a Marianna Carvalho, Camila Nogueira, amigas que levarei para toda vida.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado, em especial ao meu co-orientador Raphael Pereira por todo apoio, ensinamentos e compreensão.

Aos professores que aceitaram o convite de contribuir com esse trabalho, participando da banca de defesa. Prof. Dr. Silas Pessini Rodrigues e Dra. Jackeline Rossetti Mateus e MSc. Carolline S. Fazolato Barbosa, UFRJ, o trabalho de vocês é sem dúvida inspirador e certamente serão as contribuições mais valiosas.

À FAPERJ por ter me concedido uma bolsa de iniciação científica permitindo a conclusão deste trabalho.

Ao LABEM, onde desenvolvi a maior parte desse trabalho. E aos professores e professoras do curso de Biotecnologia da UFRJ-Duque de Caxias, pela excelência e todo o conhecimento transmitido.

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode.” - Isaac Newton



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização do Parque Estadual da Costa do Sol: (A) Região do Núcleo Massambaba do Parque Estadual da Costa do Sol; (B) Limites do Núcleo Massambaba no município de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Adaptado de Carvalho et al., 2018. 19
- Figura 2 - Espécies estudadas neste presente estudo (i) *Pilosocereus arrabidae* Lem., (A) (ii) *Melocactus violaceus* Pfeiff (B) (iii) *Cereus fernambucensis* (C). Situadas no Parque Estadual da Costa do Sol (APA de Massambaba), Arraial do Cabo - RJ. (Fonte: arquivo pessoal) 22
- Figura 3 - Diagrama de promoção de crescimento vegetal por bactérias (via direta e indireta): os círculos representam as PGPBs, a seta representa a atuação direta das PGPBs nas plantas, ⊥ representa a atuação indireta e os triângulos representam os patógenos. (Fonte: adaptado de Gamalero & Glick, 2011) 24
- Figura 4 - Diagrama dos mecanismos produzidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal halotolerantes (HT - PGPB) no crescimento de plantas e na atenuação da salinidade. A placa representada potenciais HT-PGPB (rizobactérias e endófitas) (Fonte: adaptado de Teo et al., 2020) 27
- Figura 5 - Fluxograma das etapas que foram realizadas na metodologia do presente estudo. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Canva) 30
- Figura 6 - Área de estudo: A figura 1 representa: (A) representação ilustrativa do município de Arraial do Cabo e pontos de coleta; (B) Imagem da localização via satélite da área de amostragem, Parque Estadual da Costa do Sol (APA de Massambaba), Arraial do Cabo-RJ. (Fonte: adaptado de freepik.com e Google Earth) 31
- Figura 7 - Coleta da espécie vegetal *Melocactus violaceus* Pfeiff. : (a) imagem de um dos exemplares coletados em seu habitat no ponto coleta com floração, (b) imagem da retirada do exemplar do solo para processamento. (Fonte: arquivo pessoal) 32
- Figura 8 - Coleta da espécie vegetal *Pilosocereus arrabidae* (Lem.): (a) imagem de um dos exemplares coletados em seu habitat no ponto coleta, (b) imagem do corte transversal da parte superior do exemplar para fins de processamento. (Fonte: arquivo pessoal) 33

- Figura 9 - Coleta da espécie *Cereus fernambucensis* Lem. :(a) um dos exemplares coletados em seu habitat no ponto de coleta, (b) um exemplar jovem de *Cereus fernambucensis* Lem. (Fonte: arquivo pessoal) 34
- Figura 10 - Coleta de solo rizosférico: solo de um dos exemplares em tubos do tipo Falcon de 50 ml estéreis coletados com sonda estéril no ponto de coleta. (Fonte: arquivo pessoal) 35
- Figura 11 - Coleta de frutos das cactáceas *Pilosocereus arrabidae* e *Melocactus violaceus* Pfeiff. (a) imagem de um dos exemplares de fruto da espécie *Pilosocereus arrabidae* coletados do cacto no ponto de coleta. (b) imagem de um dos exemplares de frutos da espécie *Melocactus violaceus* Pfeiff. (Fonte: arquivo pessoal) 35
- Figura 12 - Esquema com as etapas do processamento das amostras de tecido vegetal das espécies vegetais *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) para fins de isolamento de bactérias endofíticas e análise molecular. (Fonte: imagem gerada na plataforma Biorender) 36
- Figura 13 - Processamento das amostras em laboratório (a) imagem de um dos exemplares de *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) livre de espinhos, limpo e esterilizado em UV, (b) imagem de um exemplar *Pilosocereus arrabidae* (Lem.). (Fonte: arquivo pessoal) 37
- Figura 14 - Esquema do processamento das amostras de solo rizosférico das espécies vegetais *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) para fins de isolamento de bactérias rizosféricas e análise molecular. (Fonte: Imagem gerada na plataforma Biorender) 38
- Figura 15 - Etapas do processamento para crescimento bacteriano das estirpes do solo rizosférico. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender). 39
- Figura 16- Etapas do processamento para crescimento bacteriano das estirpes de tecido vegetal. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender). 40
- Figura 17- Figura ilustrativa das etapas do teste de crescimento bacteriano em ambientes salinos. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender) 41
- Figura 18 - Figura ilustrativa das etapas do teste de crescimento bacteriano para determinação da resistência hídrica e da produção de exopolissacarídeos. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender) 43

- Figura 19 - Crescimento microbiano em placas de Petri contendo meio TSA (50%) ilustrando as diferentes morfologias e morfotipos de colônias bacterianas obtidas. (Fonte: arquivo pessoal) 44
- Figura 20 - placas de Petri meio TSA (50%) com crescimento microbiano obtidas a partir da diluição seriada de bactérias rizosféricas de *C. fernambucensis*. (Fonte: arquivo pessoal) 45
- Figura 21- Gráfico do número de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) nas espécies *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*: representação ilustrativa do quantitativo de Unidades Formadoras de Colônia por espécie de planta do solo rizosférico. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST) 46
- Figura 22 - Gráfico do número de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) nas espécies *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*: representação ilustrativa do quantitativo de Unidades Formadoras de Colônia por espécie de planta de cepas endofíticas. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST) 47
- Figura 23 - Gráfico de colunas do número de estirpes bacterianas isoladas por espécie de cactácea: representação ilustrativa da quantidade de isoladas rizosféricas de cada espécie das plantas coletadas. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST) 48
- Figura 24 - Gráfico de colunas do número de estirpes resistentes a temperatura e salinidade por espécie de cactácea: representação ilustrativa do quantitativo de estirpes capazes de resistir à salinidade na concentração NaCl de 131 g/L e a temperatura de 40 °C. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST) 49
- Figura 25 - Gráfico de colunas do número de estirpes produtoras de EPS por espécie das cactáceas *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST) 50
- Figura 26 - Testes da produção de exopolissacarídeos: (a) formação de halo ao redor do disco de filtro de 5mm nas estirpes P45 podem indicar a produção de EPS. (b) formação de halo ao redor do disco de filtro de 5mm nas estirpes P35 potencial produtor de EPS. (Fonte: arquivo pessoal) 51
- Figura 27 - Testes de confirmação da produção de EPS partir da imersão da substância mucoide em um tubo de ensaio contendo etanol absoluto. (a) a

estirpe P45 foi positivo ao teste, líquido translúcido e formação de precipitado  
(b) a estirpe P35 foi apresentou resultado negativo, dada a turbidez do líquido.

(Fonte: arquivo pessoal)

51

Figura 28 - Gráfico de pizza correspondendo ao quantitativo de estirpes isoladas e porcentagem positivas aos testes de salinidade e déficit hídrico das espécies *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*. (Fonte: gráfico gerado através da plataforma Biorender)

52

Figura 29 - Diagrama de Venn demonstrando os resultados gerais obtidos neste presente estudo (Fonte: Imagem gerada pela plataforma Biorender)

53

Figura 30 - Experimentos que se pretende executar no projeto. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Canva)

57

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
AIA	Ácido indolacético
APA	Área de Proteção Ambiental
CDVC	Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EPS	Exopolissacarídeos
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza (do inglês, <i>International Union for Conservation of Nature</i> )
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PAST	do inglês <i>PAleontological STatistics</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i> )
PGPB	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (do inglês, <i>Plant Growth Promoting Bacteria</i> )
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês, <i>ribosomal RNA</i> )
TSA	Agar Triptona de Soja (do inglês, <i>Tryptic Soy Agar</i> )
TSB	Caldo Triptona Soja (do inglês, <i>Trypticase Soy Broth</i> )
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

## Sumário

### Sumário

Resumo .....	xvi
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	17
1.1 Restinga .....	17
1.2 Restinga de Massambaba.....	18
1.3 Cactaceae .....	21
1.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	23
1.5 Bactérias Halotolerantes .....	25
1.6 Bactérias produtoras de exopolissacarídeos.....	27
2 - Objetivos.....	29
2.1 Objetivos específicos.....	29
3 - Metodologia .....	30
3.1 Coleta de espécies vegetais.....	30
3.2 Processamento das amostras .....	36
3.5 Teste de resistência à salinidade .....	41
3.6 Teste da produção de exopolissacarídeos (EPS) .....	42
3.7 Análises estatística.....	43
4 - Resultados.....	44
4.1 Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) bacterianas rizosféricas e endofíticas de cada espécie vegetal estudada.....	44
4.2 Isolamento bacteriano da rizosfera de cada planta estudada .....	47
4.3 Teste de resistência à salinidade e temperatura dos isolados rizosféricos.....	48

4.5	Resultados gerais.....	51
5	- Discussão .....	54
6	- Perspectivas futuras .....	58
7	- Conclusão.....	59
8	- Referências bibliográficas.....	60

## Resumo

Santos, Juliana Fidelis. **ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS CACTÁCEAS E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E À SALINIDADE.** Duque de Caxias, 2023. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas - Biotecnologia) - Campus Duque de Caxias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023.

As restingas correspondem a um ecossistema situado em terrenos arenosos sob influência marinha, constituído por comunidades vegetais distintas. É um ecossistema diverso, responsável por abrigar uma grande biodiversidade de espécies vegetais e animais, a preservação desse habitat para a conservação de sua diversidade é de extrema relevância. A baixa retenção de água no solo, salinidade e ventos constantes são alguns dos fatores que possuem influência negativa no desenvolvimento vegetal nesses ambientes. Microrganismos associados às plantas e a sua rizosfera, podem promover o crescimento vegetal por diversos mecanismos sendo conhecidos como “bactérias promotoras de crescimento vegetal” (PGPB). Um desses mecanismos é a produção de exopolissacarídeos (EPS) e a halotolerância, que auxiliam as plantas na resistência à seca e à salinidade. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi de isolar bactérias promotoras de crescimento vegetal de três espécies de cactáceas *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* presentes na restinga Parque Estadual da Costa do, localizado no município de Arraial do Cabo (RJ). Para atingir esse objetivo, foram coletadas amostras, em quintuplicata, do tecido vegetal e de solo rizosférico das cactáceas (i) *Cereus fernambucensis* Lem., (ii) *Melocactus violaceus* Pfeiff. e (iii) *Pilosocereus arrabidae*. O isolamento de bactérias rizosféricas e endofíticas foi realizado em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA), contendo o antifúngico Nistatina na concentração de 1,6 mL/L. A resistência das bactérias isoladas da rizosfera à salinidade e a produção de EPS foi avaliada através do crescimento em meio TSB contendo 131g/L de NaCl, sob temperatura de 40 °C, por 48 horas. A produção de exopolissacarídeos pelas estirpes bacterianas rizosféricas isoladas foi avaliada em meio EPS em pH 7,5. Foi obtido um total de 107 estirpes de bactérias rizosféricas, sendo 30 estirpes bacterianas isoladas de *C. fernambucensis*, 30 estirpes bacterianas isoladas de *M. violaceus* e 47 estirpes bacterianas isoladas de *P. arrabidae*. Os resultados mostraram que das 107 estirpes isoladas, 34 foram resistentes à elevada temperatura e à salinidade. Além disso, 23 estirpes bacterianas isoladas foram produtoras de EPS. Os resultados obtidos mostraram a associação de diferentes PGPBs com as diferentes espécies de cactos avaliadas. Os conhecimentos gerados neste trabalho poderão ser utilizados para a manutenção e proteção da vegetação presente no ecossistema da restinga.

Palavras-chave: Restinga, Cactáceas, PGPB, Salinidade e Estresse hídrico.



## Abstract

Santos, Juliana Fidelis. **STUDY OF THE MICROBIOTA ASSOCIATED WITH CACTACEAE AND THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF BACTERIAL STRAINS IN RESISTANCE TO WATER STRESS AND SALINITY.** Duque de Caxias, 2023. Monograph (Bachelor of Biological Sciences - Biotechnology) - Campus Duque de Caxias, Federal University of Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023.

The restingas correspond to an ecosystem located in sandy terrains under marine influence, constituted by different plant communities. It is a diverse ecosystem, responsible for harboring a great biodiversity of plant and animal species, the preservation of this habitat for the conservation of its diversity is extremely important. Low water retention in the soil, salinity and constant winds are some of the factors that have a negative influence on plant development in these environments. Microorganisms associated with plants and their rhizosphere can promote plant growth by various mechanisms known as “plant growth promoting bacteria” (PGPB). One of these mechanisms is the production of exopolysaccharides (EPS) and halotolerance, which help plants resist drought and salinity. Therefore, the objective of this work was to isolate bacteria that promote plant growth from three species of cactus *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. and *Pilosocereus arrabidaei* present in the restinga Parque Estadual da Costa do, located in the municipality of Arraial do Cabo (RJ). To achieve this objective, samples were collected, in quintuplicate, from plant tissue and rhizospheric soil of cacti (i) *Cereus fernambucensis* Lem., (ii) *Melocactus violaceus* Pfeiff. and (iii) and *Pilosocereus arrabidaei*. The isolation of rhizospheric and endophytic bacteria was performed in Tryptic Soy Agar (TSA) medium, containing the antifungal Nystatin at a concentration of 1.6 mL/L. The resistance of bacteria isolated from the rhizosphere to salinity and EPS production was evaluated through growth in TSB medium containing 131g/L of NaCl, at a temperature of 40 °C, for 48 hours. The production of exopolysaccharides by isolated rhizospheric bacterial strains was evaluated in EPS medium at pH 7.5. A total of 107 strains of rhizospheric bacteria were obtained, with 30 bacterial strains isolated from *C. fernambucensis*, 30 bacterial strains isolated from *M. violaceus* and 47 bacterial strains isolated from *P. arrabidaei*. The results showed that of the 107 strains isolated, 34 were resistant to high temperature and salinity. In addition, 23 isolated bacterial strains were EPS producers. The results obtained showed the association of different PGPBs with the different species of cactus evaluated. The knowledge generated in this work can be used for the maintenance and protection of the vegetation present in the restinga ecosystem.

Keywords: Restinga, Cactaceae, PGPB, Salinity and Water stress.

## 1. Introdução

### 1.1 Restinga

A restinga é um ecossistema costeiro da mata atlântica que detém uma das biodiversidades mais singulares do Brasil (Carvalho; Sá, 2011). "Restinga" é um termo polissêmico, isto é, apresenta vários significados e tem sido utilizado de diversas maneiras por diferentes áreas da geologia, biologia, botânica e ecologia, o que gera muitas discussões e controvérsias nos meios acadêmicos (Souza *et al.*, 2008). Mas de modo geral, o termo "restinga" é comumente utilizado no Brasil e em outros países da América do Sul para designar uma faixa de terra alta e estreita, que tem sua extensão dada ao longo do litoral costeiro, fazendo a separação do oceano e do continente (Zaluar & Scarano, 2000; Souza *et al.*, 2008). Essas faixas elevadas de terra são produzidas por sedimentos costeiros, como areia, cascalho e conchas, e são descritos por uma vegetação específica que é capaz de adaptar-se às condições ambientais particulares do habitat de restinga (Scarano *et al.*, 2001). Contudo, restingas são encontradas também em várias partes do mundo, incluindo África, Austrália e Ásia, e são consideradas ecossistemas costeiros importantes e únicos devido à sua biodiversidade e aos serviços ecossistêmicos que fornecem, como proteção contra tempestades e erosão costeira (Silva; Souza, 2018). O conceito ecológico dado à restinga é de um conglomerado de vegetações majoritariamente arbustivas e perenes, onde se encontram também plantas herbáceas e vegetação arbórea, que se formam em bolsões arenosos na costa marinha (Scarano *et al.*, 2005). Martin e colaboradores (1993), explicam sob o conceito geomorfológico, que a origem da restinga se deu de variações datadas no Quaternário, ocorridas no nível do mar, o que influenciaram na formação regiões de dunas e planície arenosas (Resolução CONAMA 261/1999; Martin; Suguio; Flexor, 1993; Pimentel *et al.*, 2007). Segundo Scarano (2009), esse ecossistema pode ser compreendido como um mosaico vegetal, que está sob um habitat de planícies de características seca, arenosa, e que é fortemente influenciado pela salinidade acentuada nos solos que é se dá por fazer parte de regiões litorâneas.

A influência da salinidade é bem explorada em estudos e se mostra um fator considerável para a constituição estrutural e metabólica das plantas de restinga, visto

que sua localização se dá por toda extensão costeira sendo localizada principalmente entre as regiões do sul e sudeste do Brasil (Lourenço Junior *et al.*, 2013; Marques; Silva; Liebsch, 2015). Zaluar e colaboradores (2003), sugerem que algumas das espécies vegetais presentes na restinga possuem um potencial genético elevado e plasticidade fenotípica mediada geneticamente, o que permite uma melhor adaptação a condições ambientais variadas e, não obstante, propicia especiações em alguns casos. Outro agente modulador que promove a ampla diversidade vegetal da restinga é a baixa retenção de água e elevada incidência solar, o que eleva as temperaturas no solo de restinga (Liebig *et al.*, 2001; Pimentel *et al.*, 2007). Mas de modo geral, a floresta de restinga é um ecossistema bem adaptado a tais condições adversas, utilizando de modo eficiente os nutrientes presentes a partir majoritariamente de plantas oligotróficas e xerófitas (Araújo *et al.*, 2009).

Não obstante, a vegetação da restinga é responsável pela conservação e manutenção de recursos hídricos e da estabilidade dos sedimentos arenosos presentes nas planícies (Carvalho *et al.*, 2018). É válido também ressaltar que a restinga é um habitat único e frágil, visto que ocorre em substratos arenosos que sofrem com a influência das marés. Essas circunstâncias tornam a restinga um ambiente vulnerável a muitas variações, tais como a erosão costeira, a salinização do solo e a invasão de espécies exóticas. Sendo assim, a deterioração desses habitats estimula a diminuição da diversidade biológica (Nepomuceno *et al.*, 2022). Sendo um ecossistema diverso, responsável por abrigar uma grande biodiversidade de espécies vegetais e animais, a preservação desse habitat para a conservação de sua diversidade é de extrema relevância. As intensivas pressões antropogênicas, tais como: especulação imobiliária, extração de depósitos arenosos para uso em construção civil, queimadas artificiais (causadas por ação humana) e outras atividades vêm provocando processos de deterioração de maneira desenfreada, o que procede em prejuízos ambientais irreparáveis, afetando o ecossistema como um todo (Rocha *et al.*, 2007; Carvalho & Sá, 2011). Sendo assim, se faz necessário de modo urgente a aplicação de medidas de proteção ambiental desses habitats (Rocha *et al.*, 2009)

## 1.2 Restinga de Massambaba

A restinga de Massambaba é uma região que compreende três municípios do estado do Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil, sendo estes Araruama, Arraial do Cabo e Saquarema, tendo uma extensão de aproximadamente 76,3 km<sup>2</sup> de restinga

(Araujo *et al.*, 2009). A região observada neste presente estudo, se concentrou na área de proteção ambiental de Massambaba (APA) que está localizada no município de Arraial do Cabo (figura 1 - A). Local caracterizado por uma vegetação diversa, sendo considerada uma das mais representativas das restingas.



**Figura 1** - Localização do Parque Estadual da Costa do Sol: (A) Região do Núcleo Massambaba do Parque Estadual da Costa do Sol; (B) Limites do Núcleo Massambaba no município de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.*, 2018.

A distribuição da vegetação é bastante diversificada, tendo um aglomerado vegetal bem difundido (figura 1 - B), com formações arbustivas abertas e fechadas, florestas não inundáveis e herbáceas em baixos inundáveis e um tipo especial de herbáceas (psamófilas reptantes) que são resistentes à salinidade elevadas, baixos níveis de nutrientes do solo, altas temperaturas, elevada incidência solar e alta mutabilidade dos compostos arenosos (Arruda, Viglio & Barros, 2009; Carvalho *et al.*, 2018). A disposição destas espécies é variada, onde certas espécies ocorrem exclusivamente em matagais, outras espécies estão apenas em regiões abertas ou ocasionalmente em matagais pequenos e bastante abertos (Davis *et al.*, 1997; Araújo *et al.*, 2009; Carvalho & Sá, 2011). A reserva detém um quantitativo aproximado de mais de 600 espécies de plantas vasculares, que se difundem em 118 famílias em cerca de dez tipos diferentes de vegetação provenientes de restinga (Scarano *et al.*, 2001; Carvalho & Sá, 2011). A APA de Massambaba se enquadra no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio (CDVC), sendo um dos centros que apresenta grande diversidade de espécies e grande concentração de espécies endêmicas, tendo uma área total de 1.562 km<sup>2</sup> (Bohrer *et al.* 2009), sendo reconhecida pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) como um dos 14 centros de diversidade vegetal do Brasil (Davis *et al.*, 1997). Devido às características climáticas da região e à heterogeneidade do ambiente físico, a APA de Massambaba é uma área de elevada relevância biológica, com grande diversidade florística e alto nível de endemismo.

O seu solo é do tipo Neossolo Quartzarênico e há um mosaico de vegetação arbórea, arbustiva e herbácea, com predominância de vegetação arbustiva aberta (Bohrer *et al.*, 2009). A heterogeneidade da restinga aberta é marcada pelas moitas de diversos tamanhos, misturadas à vegetação esparsa e solo desnudo. Por isso, a APA de Massambaba é reconhecida como prioridade de conservação e classificada como Centro de Diversidade Vegetal (MMA/Portaria N° 9 de 23/01/2007; Araújo *et al.*, 2009). Segundo Scarano (2001), a APA de Massambaba é marcada por um clima quente e semiárido, com temperaturas elevadas. Na porção da restinga aberta é predominantemente sazonal, tendo taxas de precipitação chegando a 800mm por ano, o que ocorre principalmente no verão, que vai do mês de novembro até fevereiro (Scarano *et al.*, 2001; Liebig *et al.*, 2001).

Scarano (2001), salienta como determinadas plantas da região da restinga, desempenham o papel de “enfermeiras”, isto é, e auxiliam na colonização do habitat de restinga, por meio da germinação de certas espécies em ambientes com fatores abióticos estressores, tais como as temperaturas elevadas, e alta radiação. Das espécies da família cactácea são citadas, sendo estas: *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) e *Cereus fernambucensis* Lem. Estas plantas dispõem de mecanismos intrínsecos e extrínsecos para lidar com as adversidades nessas regiões, tais como seca, alta incidência de raios solares e baixos índices de pluviômetro. Naturalmente, no decorrer da evolução, essas espécies já desenvolveram estratégias, de modo a lidar com uma variedade de fatores hostis, não obstante, estes organismos já são reconhecidos na literatura por sua plasticidade.

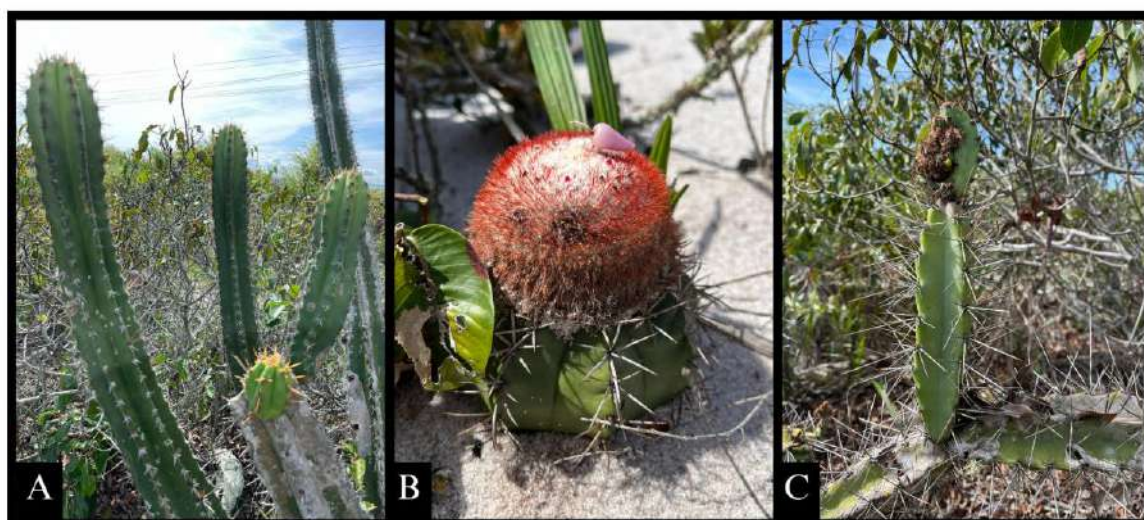
### 1.3 Cactaceae

As cactáceas são um grupo importante de plantas xerófitas e oligotróficas (capazes de se adaptar a ambiente com baixos níveis de nutrientes), que ocorrem na região da restinga e vêm sendo estudadas por pesquisadores locais (Davis *et al.*, 1997; Scarano 2001; Araújo *et al.*, 2009; Bohrer *et al.*, 2009; Carvalho & Sá, 2011; Araújo *et al.*, 2018;). Este grupo de plantas apresenta características ímpares de espécies vegetais, e demonstra alta capacidade de sobrevivência em ambientes áridos e adversos. Essa família botânica é observada em diversas partes do mundo, sendo desde as áreas do deserto da América do Norte até as florestas tropicais da América do Sul. A família Cactaceae é representada por plantas perenes, suculentas e geralmente espinhosas. Possui 130 gêneros compostos por aproximadamente 2.000 espécies. A maior diversidade de espécies encontradas nesta família é situada no México, mas o terceiro maior centro de diversidade de Cactáceas no continente americano é encontrado no Brasil, com 37 gêneros nativos de espécies da família (Santos-Díaz *et al.*, 2019; Beraldo-Borrazzo *et al.*, 2021). No Brasil, as cactáceas são muito comuns nas regiões de restinga, como a restinga de Massambaba, no Rio de Janeiro, a qual foi a região do presente estudo (Garcia *et al.*, 2021)

Os cactos possuem mecanismos inerentes para a sobrevivência em habitats áridos e semiáridos com índices pluviométricos anuais baixos e variáveis, alta taxa de evaporação e temperaturas inconstantes (Gibson & Nobel 1986). Além disso, os cactos desenvolveram várias adaptações, no decorrer da evolução, de modo a superar condições adversas. Como a capacidade de realizar o armazenamento da

água do solo em seus tecidos e a presença de espinhos substituindo as folhas que permitem diminuição da perda de água via transpiração (Barthlott & Hunt, 1993). Ademais, algumas espécies de cactos são capazes de sobreviver em solos com altos níveis de salinidade, desenvolvendo uma conformação radicular compacta ao corpo vegetal, e propícia à retirada de água e nutrientes do solo salino de modo mais eficaz (Nobel 1988). Entretanto, como sugerido por Puente & Bashan (2009), além dos mecanismos inerentes aos cactos, a microbiota associada a essas plantas também pode exercer funções relevantes na mitigação desses estressores (Puente & Bashan 2009).

As espécies estudadas no presente estudo (i) *Pilosocereus arrabidae* (figura 2 - A), (ii) *Melocactus violaceus* Pfeiff (figura 2- B). e (iii) *Cereus fernambucensis* (figura 2 - C) são frequentemente encontradas em regiões áridas e semiáridas brasileiras. As espécies da família cactaceae possuem uma gama de diversidade de tamanhos e formas, com grande parte das espécies apresentando o caule suculento com alguns frutos comestíveis. Ademais seu uso é bastante utilizado como plantas ornamentais, além de terem seu cultivo vinculado a obtenção de forragens e hortaliças (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020)



**Figura 2** - Espécies estudadas no presente estudo (i) *Pilosocereus arrabidae* Lem., (A) (ii) *Melocactus violaceus* Pfeiff (B) (iii) *Cereus fernambucensis* (C). Situadas no Parque Estadual da Costa do Sol (APA de Massambaba), Arraial do Cabo - RJ. (Fonte: arquivo pessoal)

Contudo, é importante ressaltar, que plantas da família Cactaceae apresentam o maior número de espécies vegetais ameaçadas em território brasileiro. Um exemplo,

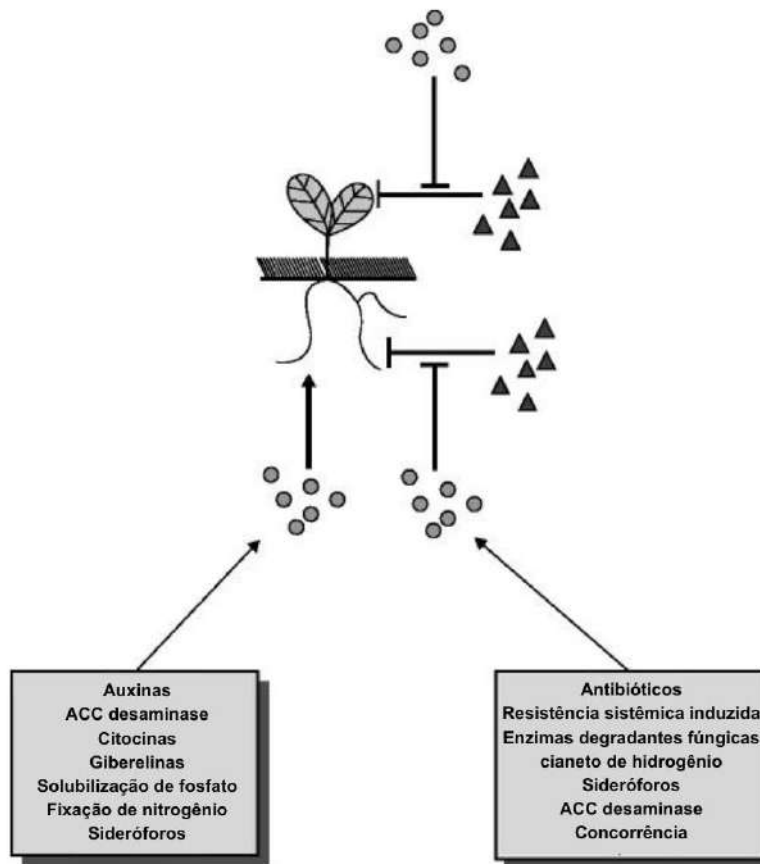
é a espécie *Melocactus violaceus*, de nome popular “coroa-de-frade” (Zamith *et al.*, 2013), que é uma espécie endêmica do Brasil e está classificada como vulnerável na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Os principais motivos dessas espécies de cactos estarem ameaçadas são: (i) a degradação do habitat natural pela exploração da terra (exploração imobiliária ou do agronegócio), (ii) a extração de plantas de seu habitat de modo ilegal, e (iii) a falta de estratégias de manejo e conservação vegetal e ambiental (de Abreu-Caitano *et al.*, 2020). Estudos anteriores já mostraram o uso de microrganismos endofíticos, epifíticos e rizosféricos em associação com plantas na mitigação de estresse por salinidade e seca (Lh *et al.*, 2017; Ercole *et al.*, 2023; Pandey *et al.*, 2023; Cruz *et al.*, 2023). É sabido que microrganismos associados a essas plantas auxiliam essas espécies vegetais a tolerarem fatores de estresse como o déficit hídrico, solos salinos, alta incidência de raios solares e restrição nutricional (Dickison 2000; Souto *et al.*, 2005). Sendo assim, uma das hipóteses levantadas por pesquisadores é a de que bactérias promotoras de crescimento vegetal colonizam as raízes, o tecido e, até mesmo, as sementes destas plantas, auxiliando na resistência a estressores ambientais característicos dos solos e vegetação de restinga (Scarano *et al.*, 2000; 2001).

#### 1.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Diferentes microrganismos do solo e associados as plantas podem auxiliá-las na mitigação de fatores abióticos limitantes ao desenvolvimento vegetal, sendo conhecidas como “bactérias promotoras de crescimento vegetal” (PGPB, do inglês “*Plant Growth Promoting Bacteria*”). As PGPBs são bactérias capazes de se desenvolver na rizosfera, na superfície das plantas ou no interior de tecidos vegetais, que, através de seu metabolismo, podem promover o crescimento da planta. Por exemplo, PGPBs podem: (i) minimizar fatores de estresse bióticos e abióticos; (ii) promover a fixação de nitrogênio (Cheng, *et al.*, 2023); (iii) Produzir exopolissacarídeos (EPS) que auxiliam na resistência à dessecação e salinidade (Paulo *et al.*, 2012; Kavamura *et al.*, 2013); (iv) produzir ou induzir a produção de fitohormônios tais como ácido indol acético (AIA). A colonização das PGPBs nas plantas se dá geralmente em duas vias: (i) através do solo para as raízes (bactérias



rizosféricas ou do rizoplasma); (ii) via colonização do tecido vegetal (bactérias endofíticas e epífitas, que colonizam os tecidos externos e internos de plantas em simbiose) (Figura 3)(Glick, 2012; Akhtar *et al.*, 2022).



**Figura 3** - Diagrama de promoção de crescimento vegetal por bactérias (via direta e indireta): os círculos representam as PGPBs, a seta representa a atuação direta das PGPBs nas plantas, ⊥ representa a atuação indireta e os triângulos representam os patógenos. (Fonte: adaptado de Gamalero & Glick, 2011)

Glick e Gamalero (2011), descrevem que as PGPBs podem facilitar o crescimento das plantas de maneira direta ou indireta. De maneira direta, as PGPBs atuam ativamente na produção de compostos que promovem o crescimento vegetal (nitrogênio, fitormônios, solubilização de fosfato, entre outras). Por outro lado, de maneira indireta, as PGPBs podem combater possíveis patógenos ou pragas vegetais. Algumas das características/mecanismos bacterianos que contribuem para a promoção direta e indireta do crescimento vegetal são destacadas como a produção de fitohormônios, como ácido indol-3 acético, citocininas e giberelinas, a produção da enzima ACC deaminase e o provimento de nutrientes via fixação de nitrogênio (Cheng

*et al.*, 2023), solubilização de fosfato e potássio e a produção de sideróforos. A literatura também descreve as PGPB como agentes fundamentais no biocontrole de patógenos nas raízes e folhas das plantas (Gamelero & Glick 2011; Dragojević *et al.*, 2023). As PGPB também são amplamente conhecidas por sua atuação na mitigação e proteção de plantas contra estresses ambientais, como salinidade, seca e temperaturas extremas (Hamane *et al.*, 2023; Poria *et al.*, 2002).

Em relação a estresse de plantas em condições de restrição hídrica, esse grupo microbiano age como atenuantes no estresse, aumentando os solutos compatíveis, como açúcares solúveis, polióis, glicina, betaína, prolina e aminoácidos livres, que promove a melhora na ação de água das células vegetais e mantém as atividades metabólicas normais sob condições de estresse salino (Ali & Baber. 2022). As PGPBs também aumentam a produção de antioxidantes, como catalase, ascorbato peroxidase e glutathione peroxidase, que ajudam a reduzir as espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo nas plantas sob condições de estresse (Peng *et al.*, 2023).

Além disso, as bactérias promotoras do crescimento vegetal desempenham o papel biofertilizante promovendo o crescimento das plantas sob estresse salino (Lh *et al.*, 2017). Outro mecanismo de atuação das PGPB em condições de estresse abiótico é de aumento de polissacarídeos extracelulares, e a produção compostos orgânicos voláteis que induzem resistência a doenças e tolerância ao estresse abiótico (Paulo *et al.*, 2012; Kavamura *et al.*, 2013).

### 1.5 Bactérias Halotolerantes

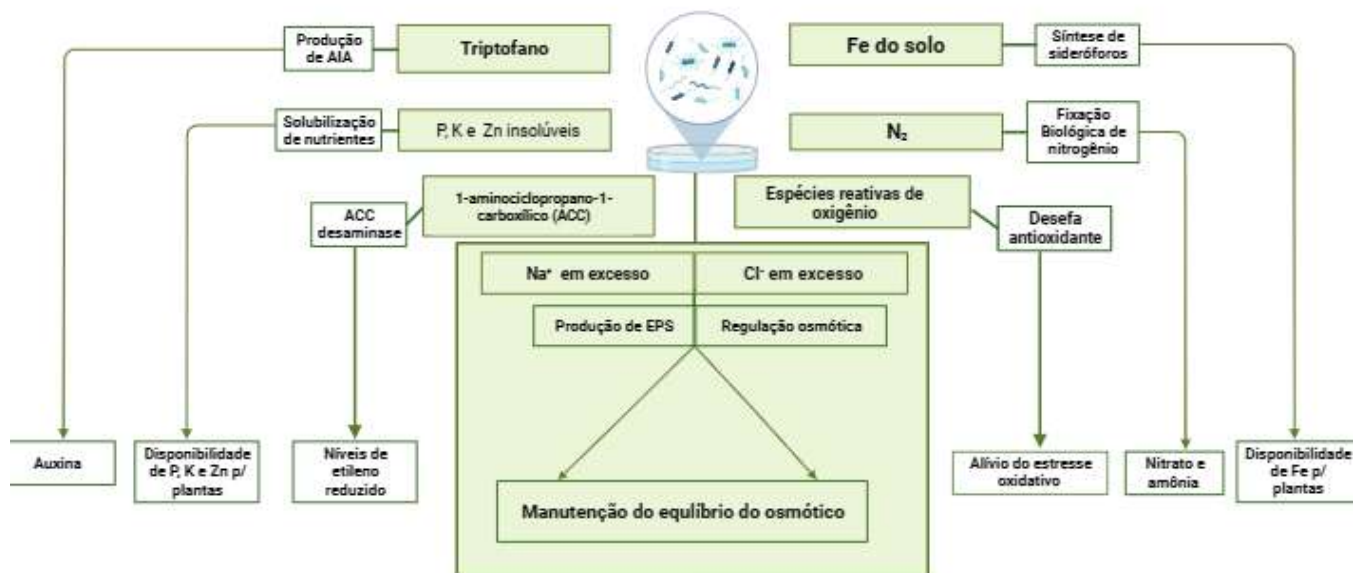
A salinidade é um fator modulador para espécies presentes na vegetação de restinga. As névoas salinas e a alta mobilidade dos depósitos arenosos são exemplos de fatores que dificultam o estabelecimento de espécies com necessidades nutricionais maiores (Silva & Dória, 2020; Lourenço *et al.*, 2021).

Devido à alteração nas propriedades osmóticas do ambiente, a salinidade afeta, de modo significativo, o desenvolvimento de plantas e de microrganismos. O aumento da salinidade ambiental pode levar ao efluxo de água do citoplasma celular, causando desidratação. Por outro lado, a diminuição da salinidade do ambiente pode resultar em influxo água, podendo gerar lise celular. (Phour & Sindhu, 2022). A alteração na pressão osmótica causada pela salinidade, inibe a absorção de água

pelas raízes das plantas, o que provoca o déficit hídrico nas plantas, o que por consequência causa danos drásticos no crescimento e desenvolvimento vegetal, provocando a degeneração do tecido radicular e em casos mais severos, a morte celular evocada pelas elevadas concentrações de sais solúveis nas paredes celulares vegetais (Teo *et al.*, 2022; Hu & Schmidhalter, 2005).

Contudo, espécies oligotróficas e xerófitas como as cactáceas são amplamente conhecidas pela sua capacidade de maior tolerância a esses estressores ambientais. No entanto, infere-se que altas concentrações de sais solúveis, podem culminar em uma diminuição do crescimento e desenvolvimento destas plantas. Entretanto, estudos demonstram que estas plantas podem estabelecer associações simbióticas com bactérias halófitas, que são espécies tolerantes a sais, atenuando assim os efeitos nocivos a esses estressores ambientais (Flowers & Colmer, 2008; Dickison, 2000).

As bactérias halotolerantes promotoras de crescimento de plantas mitigam o estresse salino por meio de mecanismos diversos que consistem em respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares que atuam de modos distintos, dependendo da planta hospedeiras (Navarro-Torre *et al.*, 2023; Teo *et al.*, 2022). Bactérias halotolerantes conseguem adaptar-se a uma ampla faixa de salinidade, excluindo o sal do seu citoplasma e/ou aumentando a osmolaridade do seu citoplasma para neutralizar o estresse salino (Margesin & Schinner, 2001). Ademais, as bactérias halotolerantes promotoras de crescimento de plantas aumentam a disponibilidade de nutrientes, regulando as concentrações dos hormônios vegetais, elevando os níveis de hormônios tais como giberelinas e citocininas, enquanto diminuem os níveis de etileno através da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase. O que aprimora o crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições de estresse salino (Amirjani, 2011).



**Figura 4** - Diagrama dos mecanismos produzidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal halotolerantes (HT - PGPB) no crescimento de plantas e na atenuação da salinidade. A placa representa potenciais HT-PGPB (rizobactérias e endófitas) (Fonte: adaptado de Teo *et al.*, 2020)

### 1.6 Bactérias produtoras de exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros extracelulares de alto peso molecular que podem ser secretados por plantas ou microrganismos. Os exopolissacarídeos bacterianos têm sua composição dada por carboidratos, como glicose, galactose e manose, além de outros monossacarídeos e ácidos urônicos. No entanto, a complexidade dos EPS pode variar conforme a espécie que a produz (Arayes *et al.*, 2023). Além de carboidratos, EPSs também podem ter em sua composição grupos funcionais tais como sulfatos e acetilas. A estrutura química dos exopolissacarídeos é complexa e variada, o que pode implicar em suas propriedades físicas e biológicas. Os EPS de origem bacterianos, são produzidos principalmente em decorrência de sinais de estresse abiótico, causados por alguns fatores como elevados níveis de salinidade no meio, a presença de metais pesados, temperatura e estresse hídrico (Salimi & Farrokh, 2023).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) ajuda a reduzir a toxicidade do sal, promove o crescimento radicular e leva a ativação de genes que aumentam a tolerância da planta ao estresse salino. Bactérias halotolerantes secretam EPS em circunstâncias de estresse osmótico, na tentativa de promover adesão superficial, isto é, a produção de biofilme, o que propicia a agregação no solo rizosférico, o que eleva a retenção de água (Upadhyay *et al.*, 2011; Kasim *et al.*, 2016).

Os exopolissacarídeos bacterianos têm sido amplamente estudados como agentes mitigadores do estresse salino em plantas. Diferentes estudos já mostraram a produção de EPS por diversas bactérias do solo, como bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Pseudomonas*, entre outras (Bhagat *et al.*, 2021).

Alaoui e colaboradores (2019) analisaram em um estudo recente, a capacidade de bactérias produtoras de EPS em mitigar o estresse salino em plantas de milho. Os resultados indicaram que as plantas tratadas com EPS demonstraram maior crescimento e conteúdo de clorofila em comparação com as plantas não tratadas. Além disso, foi observada uma quebra na assimetria iônica nas raízes das plantas, o que pode ser um indicativo de uma resposta adaptativa ao estresse salino (Alaoui *et al.*, 2019). Em termos de mecanismos de ação, os EPS têm sido associados a uma melhor absorção de nutrientes, bem como uma maior tolerância à salinidade através da regulação do equilíbrio iônico e da redução do estresse oxidativo nas plantas. Além disso, a presença de EPS no solo pode promover a formação de agregados de solo que melhoram a aeração e aumentam a disponibilidade da água para as plantas (Bhagat *et al.*, 2021). Na área da biotecnologia, as bactérias promotoras de crescimento vegetal e produtoras de exopolissacarídeos são consideradas uma alternativa sustentável aos estimulantes e fertilizantes químicos na agricultura.

## 2 - Objetivos

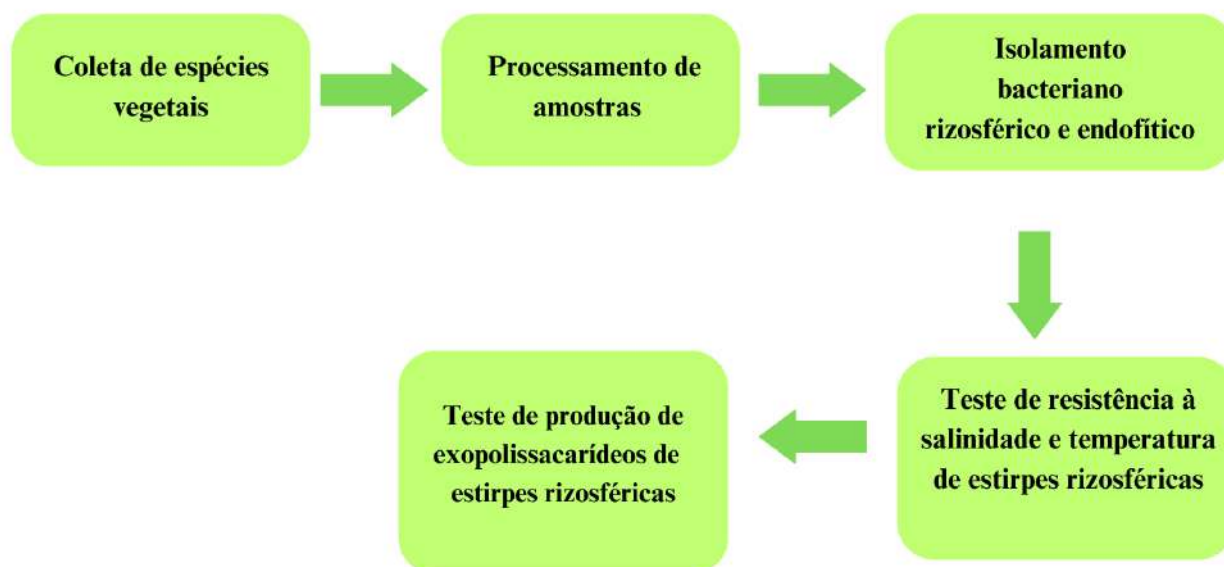
O objetivo principal deste trabalho foi a bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a cactáceas das espécies *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.).

### 2.1 Objetivos específicos

- Isolar bactérias associadas *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.);
- Avaliar a capacidade das bactérias isoladas em produzir exopolissacarídeos;
- Avaliar a capacidade de halotolerância das bactérias isoladas.

### 3 - Metodologia

Para fins de uma visualização melhor, abaixo se apresenta um fluxograma contendo as etapas das metodologias realizadas neste projeto até o momento.



**Figura 5** - Fluxograma das etapas que foram realizadas na metodologia do presente estudo. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Canva)

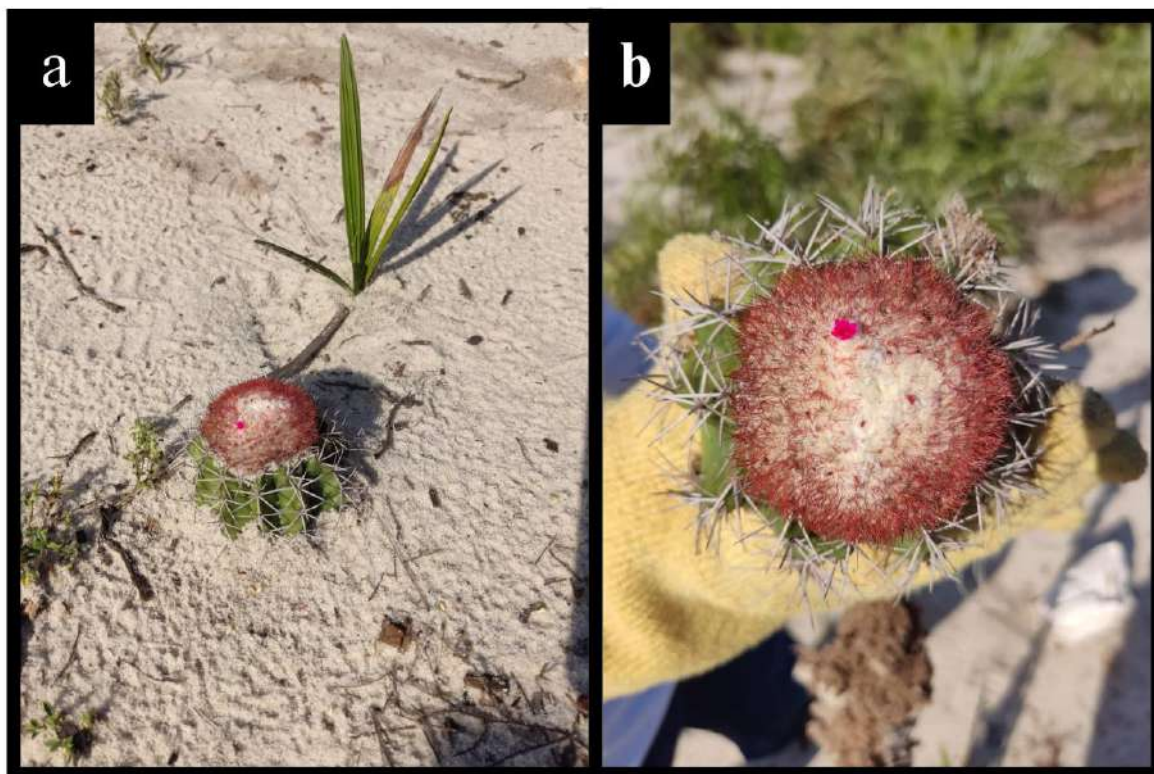
#### 3.1 Coleta de espécies vegetais

Foram coletados 50 gramas de solo rizosférico de cada planta e exemplares do tecido vegetal associado a três espécies vegetais da família Cactaceae, sendo essas: *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidaei* (Lem.). Todas as amostras foram coletadas em quintuplicatas. A área de estudo corresponde ao Parque Estadual da Costa do Sol (Área de Proteção Ambiental de Massambaba), localizado no município de Arraial do Cabo, RJ (coordenadas geográficas: 22° 55 '34.6" S; 42° 15' 50.1" W) (Figura 6). A identificação das espécies vegetais com auxílio dos dados do mapeamento da diversidade de cactáceas presentes na restinga de Massambaba foi descrita por Carvalho e colaboradores (2018).



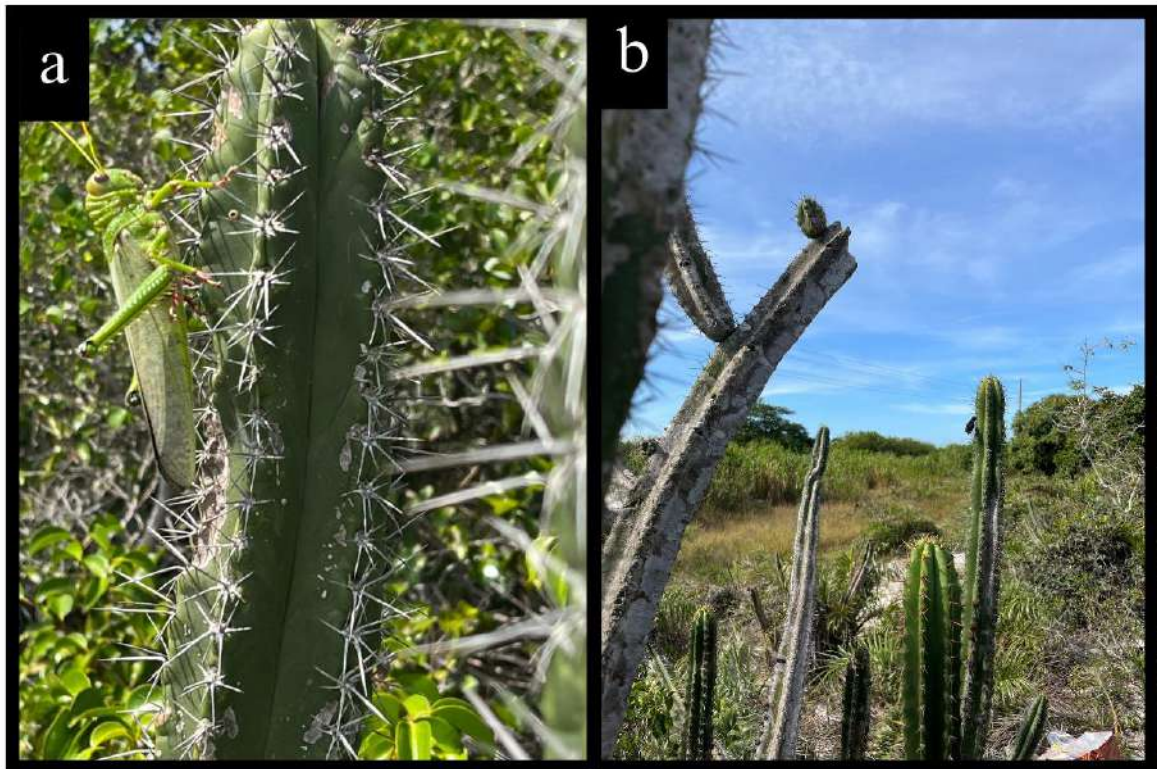
**Figura 6** - Área de estudo: A figura 1 representa: (A) representação ilustrativa do município de Arraial do Cabo e pontos de coleta; (B) Imagem da localização via satélite da área de amostragem, Parque Estadual da Costa do Sol (APA de Massambaba), Arraial do Cabo-RJ. (Fonte: adaptado de freepik.com e Google Earth)





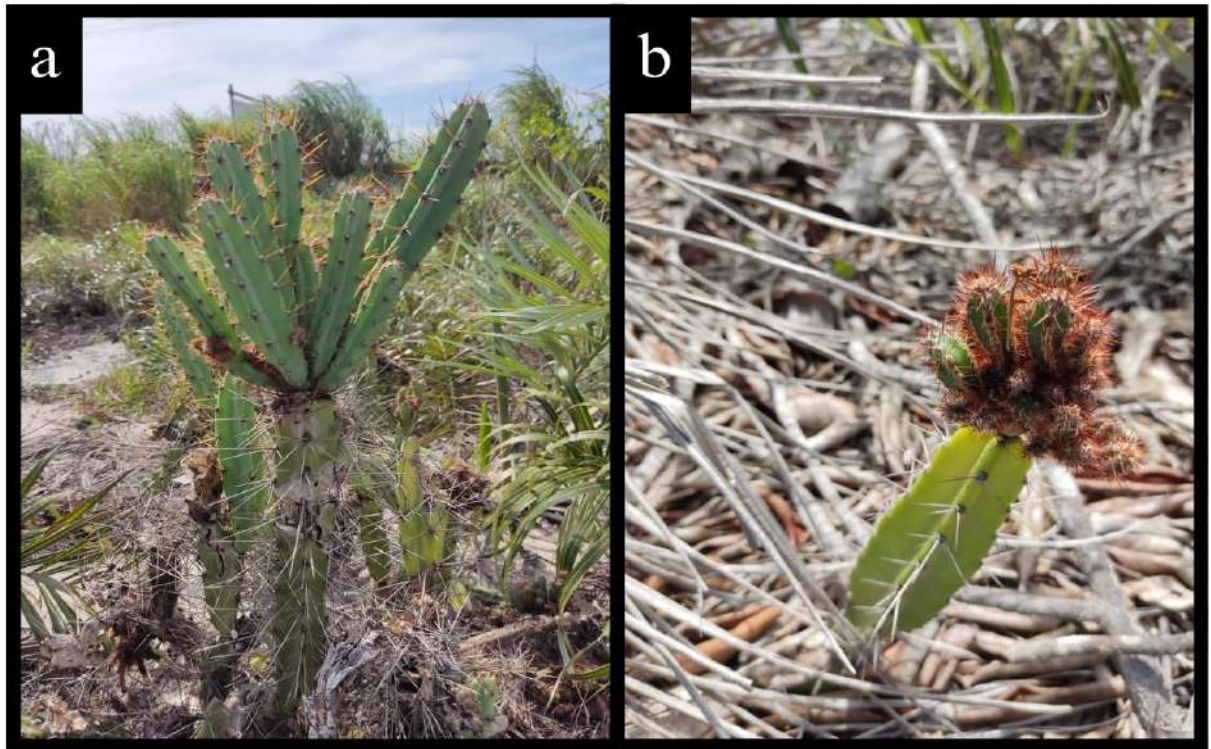
**Figura 7** - Coleta da espécie vegetal *Melocactus violaceus* Pfeiff. :(a) imagem de um dos exemplares coletados em seu habitat no ponto coleta com floração, (b) imagem da retirada do exemplar do solo para processamento. (Fonte: arquivo pessoal)

A coleta da porção do tecido vegetal da espécie de *Melocactus violaceus* Pfeiff. (figura 7) foi realizada com auxílio de uma pá para jardinagem, onde foi cavado ao redor da planta, de modo que fosse feita a retirada com cuidado para que não afetasse a integridade da planta. Posteriormente, com uma luva tricotada em fio 100% aramida, a planta foi retirada e enrolada em papel para que os espinhos não encostassem nos outros exemplares a fim de preservar o tecido vegetal dos exemplares. (figura 7- b) . Para a coleta do solo rizosférico a porção abaixo da planta foi cortada com auxílio de um estilete estéril e colocada em tubo tipo falcon de 50 ml estéril (figura 10).



**Figura 8** - Coleta da espécie vegetal *Pilosocereus arrabidae* (Lem.): (a) imagem de um dos exemplares coletados em seu habitat no ponto coleta, (b) imagem do corte transversal da parte superior do exemplar para fins de processamento. (Fonte: arquivo pessoal)

Para que fosse possível a coleta do tecido vegetal da espécie *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) (figura 8), foi utilizado um estilete para retirada de uma porção da parte superior dos exemplares, onde se repetiu a metodologia supracitada e o tecido vegetal ainda com espinhos fora enrolado com papel para o transporte. A coleta do solo rizosférico foi realizada com o auxílio de uma sonda para amostra de solo que era introduzida ao redor das plantas e posteriormente inseridos em tubo tipo Falcon de 50 ml estéril (figura 10).

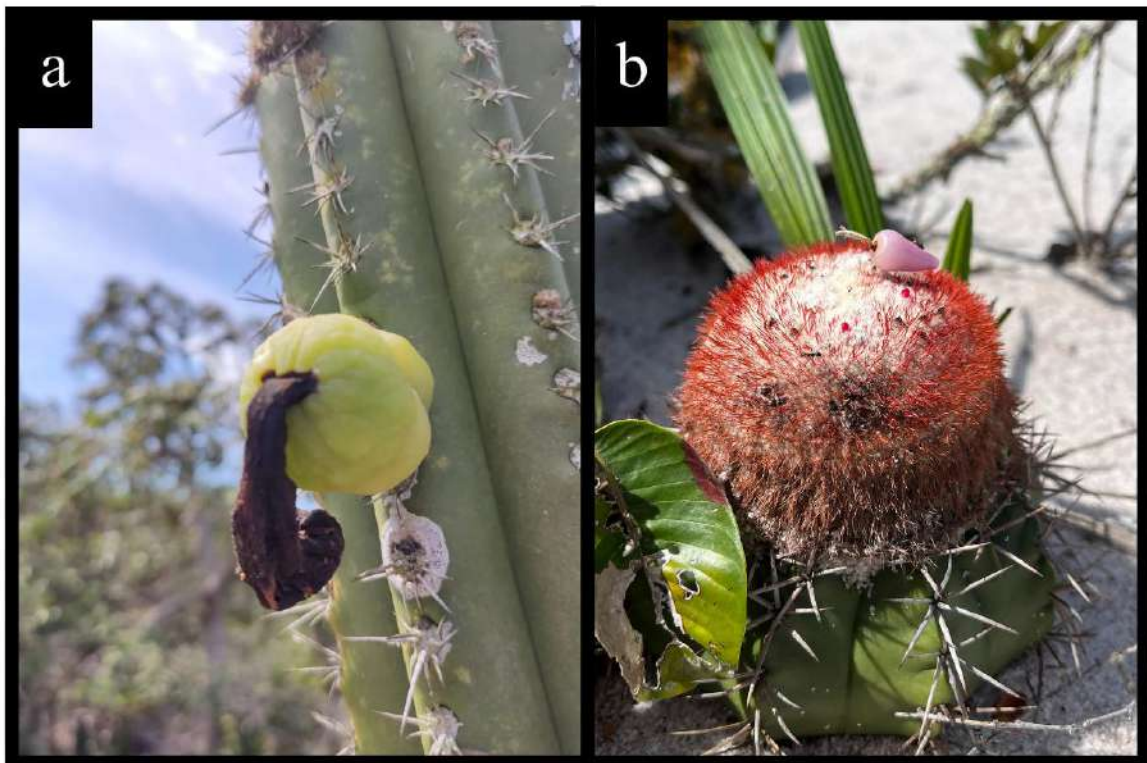


**Figura 9** - Coleta da espécie *Cereus fernambucensis* Lem. : (a) um dos exemplares coletados em seu habitat no ponto de coleta, (b) um exemplar jovem de *Cereus fernambucensis* Lem. (Fonte: arquivo pessoal)

De modo semelhante à abordagem utilizada para coleta de *P. arrabidae* (figura 9), foi utilizado um estilete para retirada da parte superior dos exemplares de *Cereus fernambucensis* Lem. As amostras também foram enroladas em papéis para o transporte. E a coleta do solo rizosférico da espécie também foi realizada com o auxílio de uma sonda estéril para amostra de solo que era inserida ao redor das plantas até a raiz e eram posteriormente inseridos em tubos do tipo falcon de 50 ml estéreis (Figura 10). Para identificação das espécies coletadas neste presente estudo foi utilizado como literatura no livro Restinga de Massambaba: vegetação, flora, propagação e usos (Carvalho *et al.*, 2018).



**Figura 10** - Coleta de solo rizosférico: solo de um dos exemplares em tubos do tipo Falcon de 50 ml estéreis coletados com sonda estéril no ponto de coleta. (Fonte: arquivo pessoal)

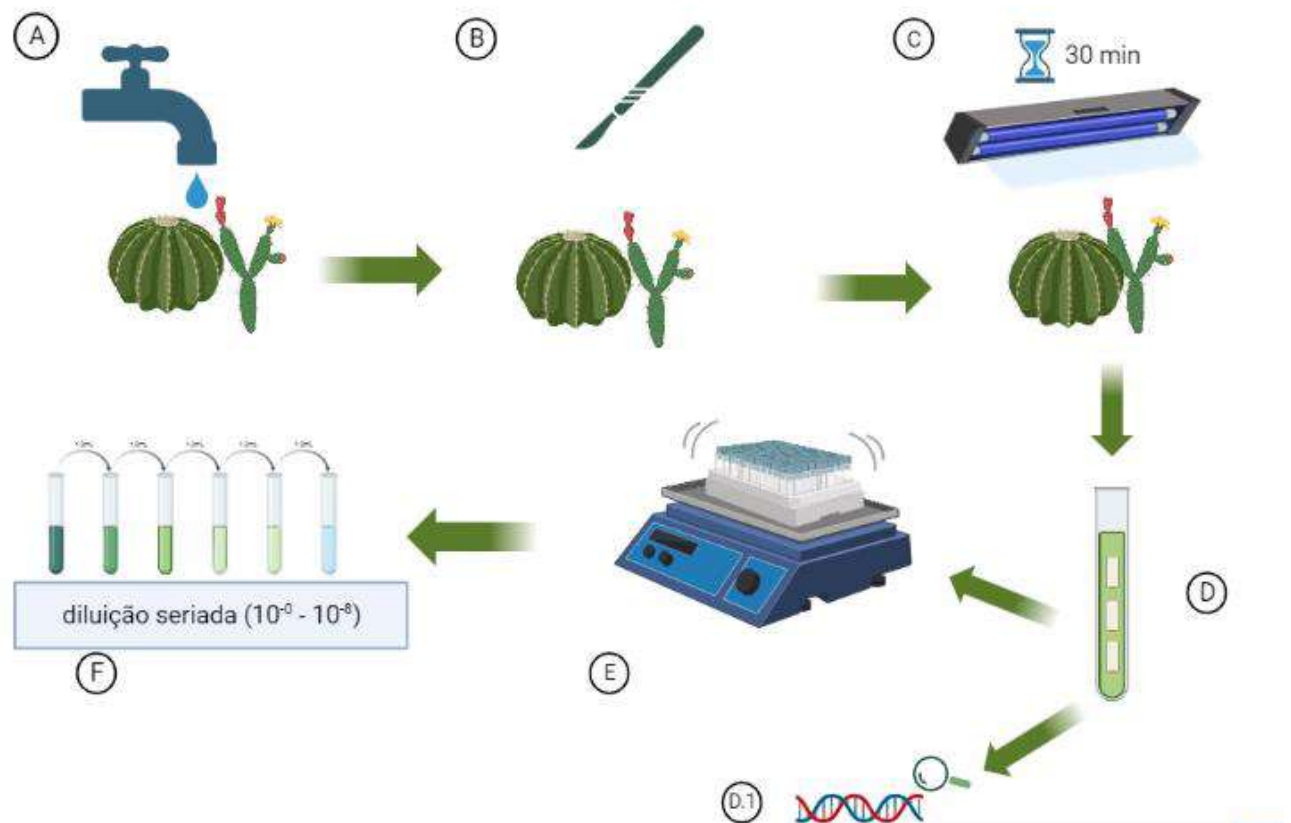


**Figura 11** - Coleta de frutos das cactáceas *Pilosocereus arrabidae* e *Melocactus violaceus* Pfeiff. (a) imagem de um dos exemplares de fruto da espécie *Pilosocereus arrabidae* coletados do cacto no ponto de coleta. (b) imagem de um dos exemplares de frutos da espécie *Melocactus violaceus* Pfeiff coletados da planta. (Fonte: arquivo pessoal)

## 3.2 Processamento das amostras

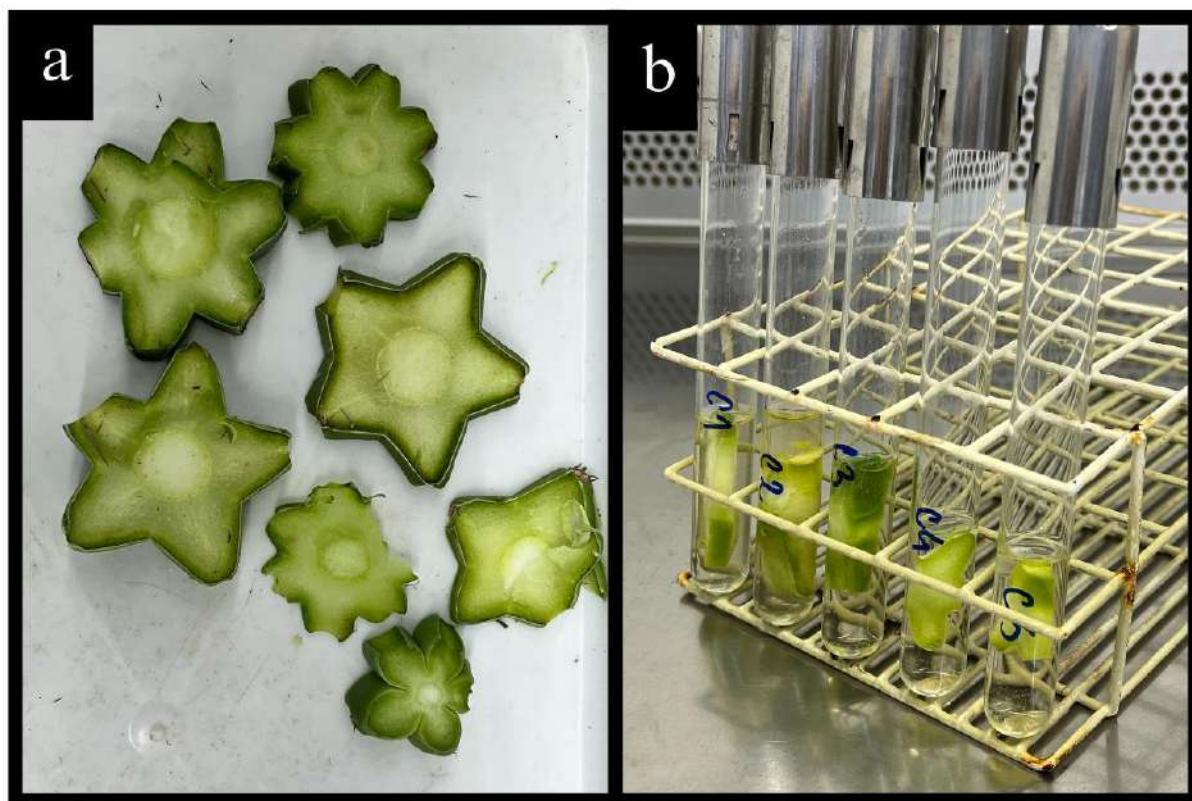
### 3.2.1 Processamento das amostras de tecido vegetal

As amostras de tecido vegetal foram transportadas sob refrigeração constante e processadas em laboratório. Para tanto, a superfície da porção do tecido vegetal dos exemplares foi lavada em água corrente (Figura 12) para retirada de microrganismos epifíticos (dado que não eram o objetivo do presente estudo) e todas as impurezas aparentes presentes nos cactos. Em seguida foram retirados os espinhos de todas as plantas com auxílio de um bisturi e fizeram-se cortes transversais nas amostras. Em um passo posterior, o tecido foi esterilizado sob luz ultravioleta por 30 minutos (Figura 13). Posteriormente, para o isolamento bacteriano de estirpes endofíticas, as amostras de tecidos das plantas foram colocadas em tubos de ensaio contendo meio de triptona de soja e passaram por agitação em *shaker* a 180 rpm e posteriormente diluições seriadas em solução tampão PBS (PBS do inglês, “*phosphate buffered saline*”). O protocolo de processamento foi realizado de acordo com a metodologia de desinfecção superficial adaptada de Araújo e colaboradores (2001).



**Figura 12** - Esquema com as etapas do processamento das amostras de tecido vegetal das espécies vegetais *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.)

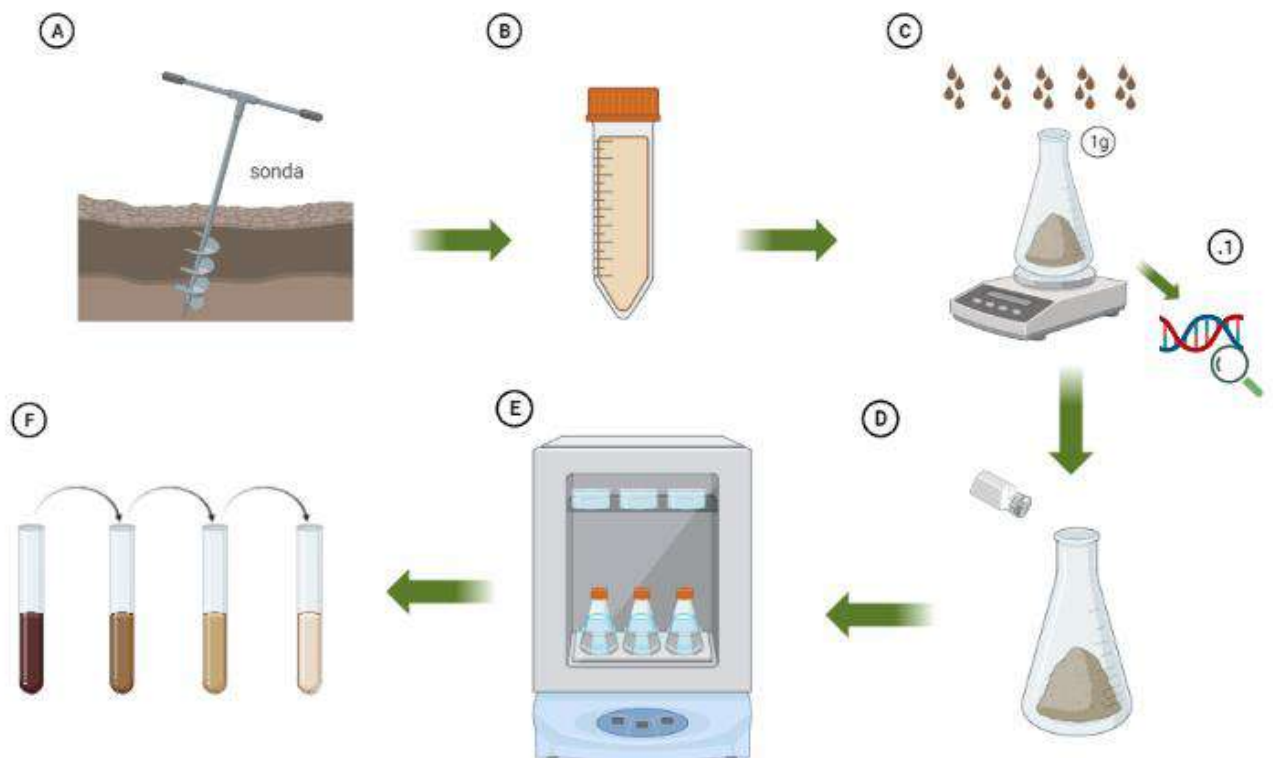
para fins de isolamento de bactérias endofíticas e análise molecular. (Fonte: imagem gerada na plataforma Biorender)



**Figura 13** - Processamento das amostras em laboratório (a) imagem de um dos exemplares de *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) livre de espinhos, limpo e esterilizado em UV, (b) imagem de um exemplar *Pilosocereus arrabidae* (Lem.). (Fonte: arquivo pessoal)

### 3.2.2 Processamento de amostras do solo rizosférico

Após a coleta de solo rizosférico das cactáceas (figura 14), os exemplares de solo foram colocados em tubos tipo *falcon* de 50 g e foram transportados sob refrigeração constante. Ao chegar no laboratório as amostras em quintuplicata foram pesadas, onde cada 1 grama de solo foi colocado em um erlenmeyer para formar um solo composto (5 replicatas, 1 grama de cada uma da espécie) junto com 10 mL de solução salina, que foi submetido à uma hora no *shaker* na agitação de 180 rpm.



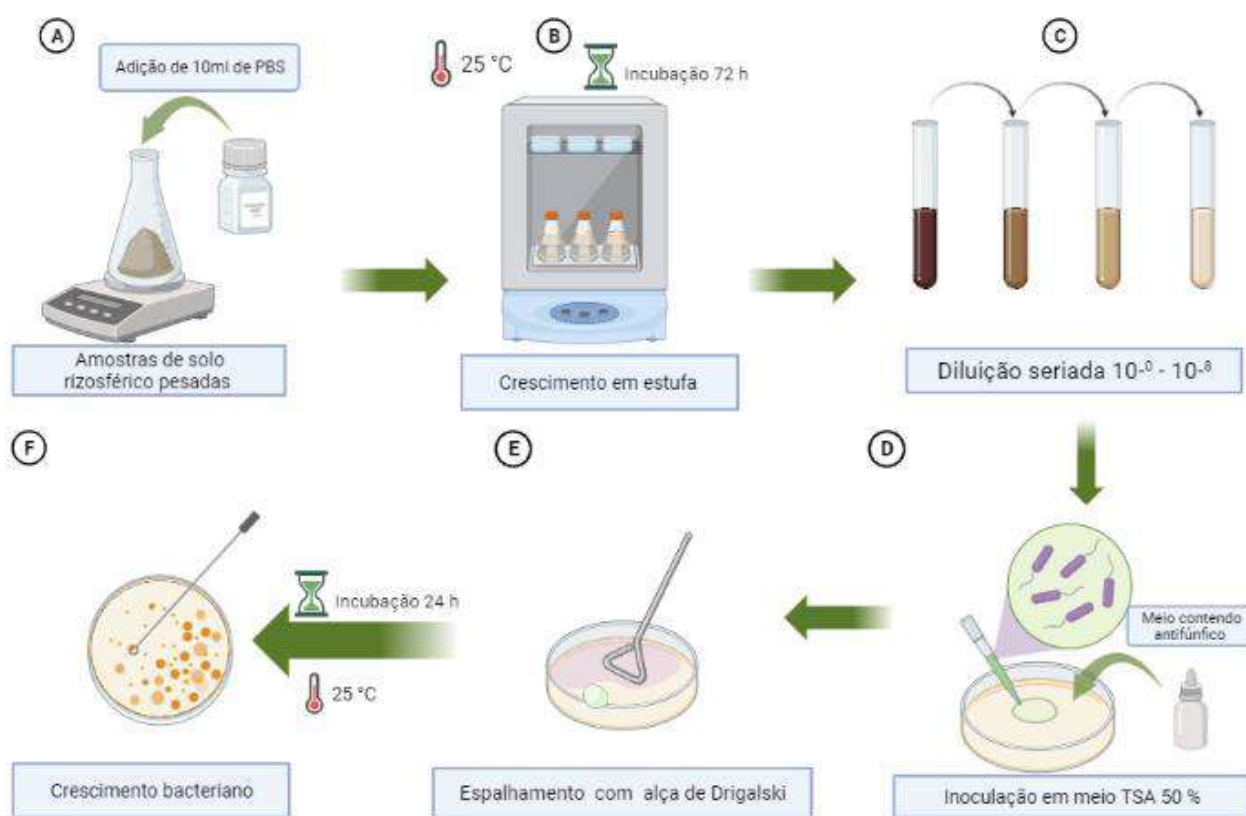
**Figura 14** - Esquema do processamento das amostras de solo rizosférico das espécies vegetais *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) para fins de isolamento de bactérias rizosféricas e análise molecular. (Fonte: Imagem gerada na plataforma Biorender)

### 3.3 Isolamento bacteriano rizosférico

As amostras da rizosfera foram colocadas em solução tampão PBS e foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) (figura 15). Cada diluição foi inoculada em meio de Triptona Soja na concentração de 50% (v/v), a fim de mimetizar as condições limitadas que as bactérias teriam na obtenção de nutrientes na restinga. todas as placas continham o antifúngico Nistatina na concentração de 1,6 mL/L. As placas inoculadas foram colocadas na estufa a 25°C por 24 horas ou até apresentarem crescimento (24 horas a mais). Após o período de crescimento, nas placas em que ocorreu o surgimento de colônias foram fotodocumentadas para a realização da contagem de unidades formadoras de colônia, com o intuito de fazer a estimativa do número de bactérias que foram capazes de crescer mediante a condições controladas.

Em seguida foram isoladas um total de 107 estirpes rizosféricas, sendo: 30 estirpes bacterianas isoladas de *C. fernambucensis*, 30 estirpes bacterianas isoladas de *M. violaceus* e 47 estirpes bacterianas isoladas de *P. arrabidae*. Todas foram isoladas segundo as características morfológicas, tendo como critérios a forma, o

relevo e a cor da colônia. As estirpes selecionadas foram repicadas e inoculadas em meio TSA na técnica de sementeira por esgotamento, onde foram sujeitas ao crescimento em estufa a 25°C por 24 horas. Com o crescimento das estirpes, uma raspagem das placas de cada um dos isolados foi realizada com o auxílio de uma alça descartável estéril e inoculadas em criotubos de 2mL contendo 1,6 mL de meio TSB + 20% (v/v) de glicerol. Os criotubos foram submetidos ao processo de agitação em vórtex por 20 segundos cada criotubo, com a finalidade de homogeneizar a estirpe no meio e em seguida foram estocados a -80°C (figura 15).



**Figura 15** - Etapas do processamento para crescimento bacteriano das estirpes do solo rizosférico. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender).

### 3.4 Isolamento bacteriano endofítico

Para isolamento das colônias de bactérias endofíticas (figura 16), as amostras de tecido vegetal foram cortadas e inseridas em um tubo de ensaio contendo meio de Tripton Soja na concentração de 50% (v/v), a fim de mimetizar as condições limitadas que as bactérias teriam na obtenção de nutrientes na restinga. De modo semelhante ao realizado, com as amostras de solo rizosférico, as amostras de endofíticos foram submetidas à estufa para crescimento a 32 °C durante 72 horas ou até apresentarem



crescimento (24 horas a mais) (figura 16). Posteriormente, o produto das amostras da endofíticas foram colocadas em solução salina tamponada com fosfato e diluídas 8 vezes. Cada diluição foi inoculada em placas contendo o meio de cultura TSA 50% contendo o antifúngico Nistatina na concentração de 1,6 mL/L. As placas inoculadas por meio da técnica de espalhamento com auxílio de uma alça de drigalski foram colocadas na estufa a 25°C por 24 horas ou até apresentarem crescimento (24 horas a mais).

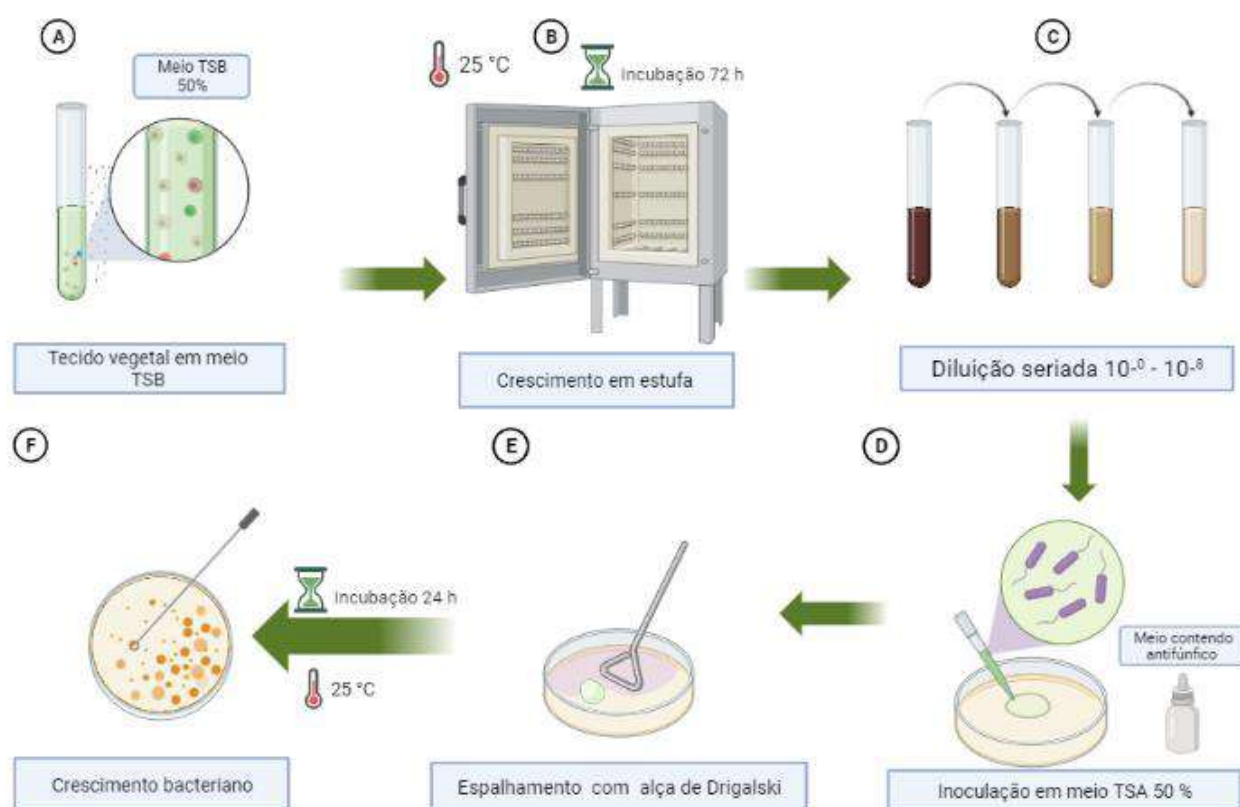


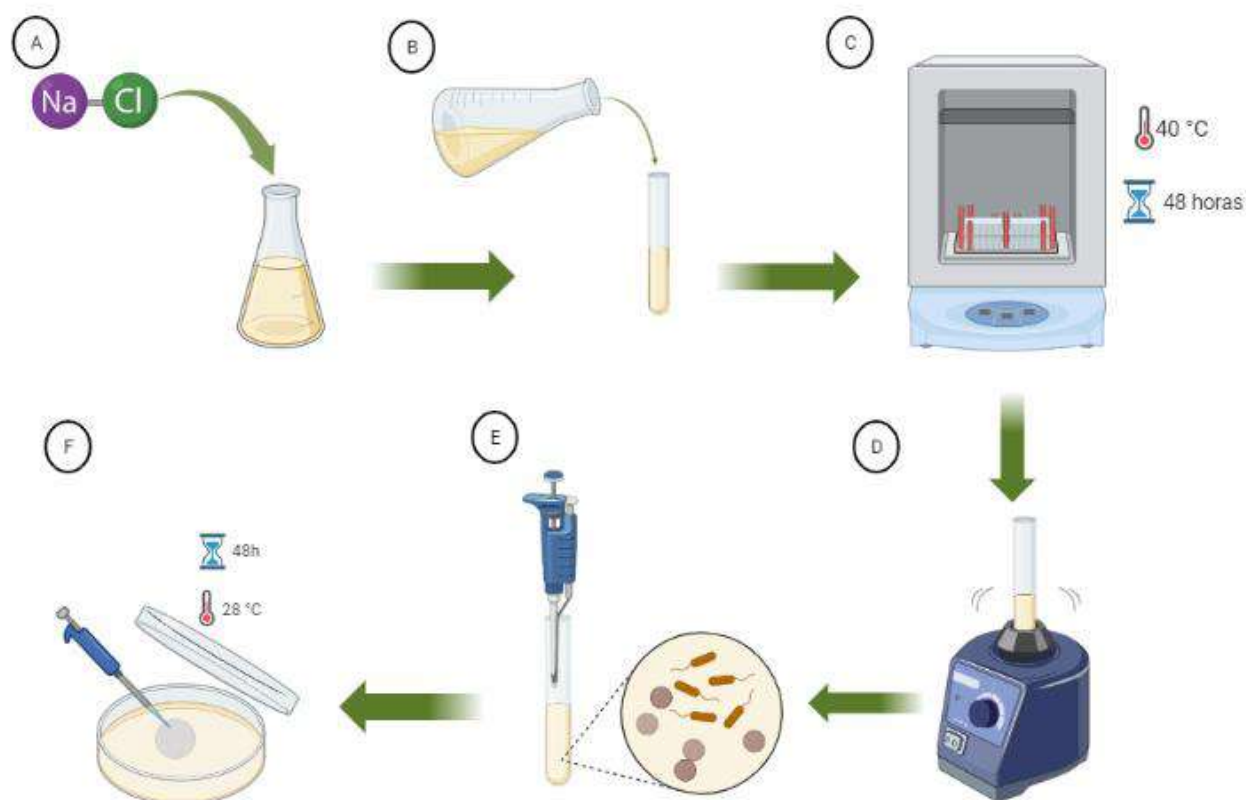
Figura 16- Etapas do processamento para crescimento bacteriano das estirpes de tecido vegetal. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender).

As placas em que ocorreu o surgimento de colônias foram fotodocumentadas para a realização da contagem de unidades formadoras de colônia, com o intuito de fazer a estimativa do número de bactérias que foram capazes de crescer mediante a condições controladas. Em seguida, foram selecionados todos os morfotipos diferentes de colônias observadas por planta estudada. Por fim, foram isoladas um total de 90 estirpes endofíticas, sendo 30 estirpes endofíticas da espécie *P. arrabidae*, 30 estirpes endofíticas de *M. violaceus* e 30 estirpes de *C. fernambucensis*. Todas foram isoladas segundo as características morfológicas, tendo como critérios a forma,

o relevo e a cor da colônia. A metodologia utilizada nessa etapa foi a mesma aplicada no isolamento das bactérias rizosféricas, conforme abordado no tópico anterior.

### 3.5 Teste de resistência à salinidade

As estirpes bacterianas isoladas de solo rizosférico foram submetidas a testes de resistência à salinidade e temperatura (figura 17). Para isso, cada estirpe bacteriana foi inicialmente inoculada em meio TSB com NaCl na concentração de 131 g/L. Com a finalidade de mimetizar as condições de salinidade observadas no habitat de restinga. Posteriormente, as cepas foram incubadas a uma temperatura de 40 °C em agitação constante a 180 rpm por 48 horas, conforme descrito por Kavamura *et al.*, (2013) modificado pela substituição de sorbitol (utilizado originalmente na metodologia) por NaCl. A justificativa da substituição se dá pelo fato de que estudos demonstram que ambos (Sorbitol e NaCl) possuem a mesma particularidade de induzir o estresse hiperosmótico de bactérias (Chandler-Brown *et al.*,2015; Saito & Posas, 2012). Em uma etapa consecutiva, as estirpes foram submetidas a uma homogeneização no meio a partir de agitação em um vórtex multi-tubo por 30 segundos cada. Após isto, as cepas seguiram para triagem do teste de produção de exopolissacarídeos.

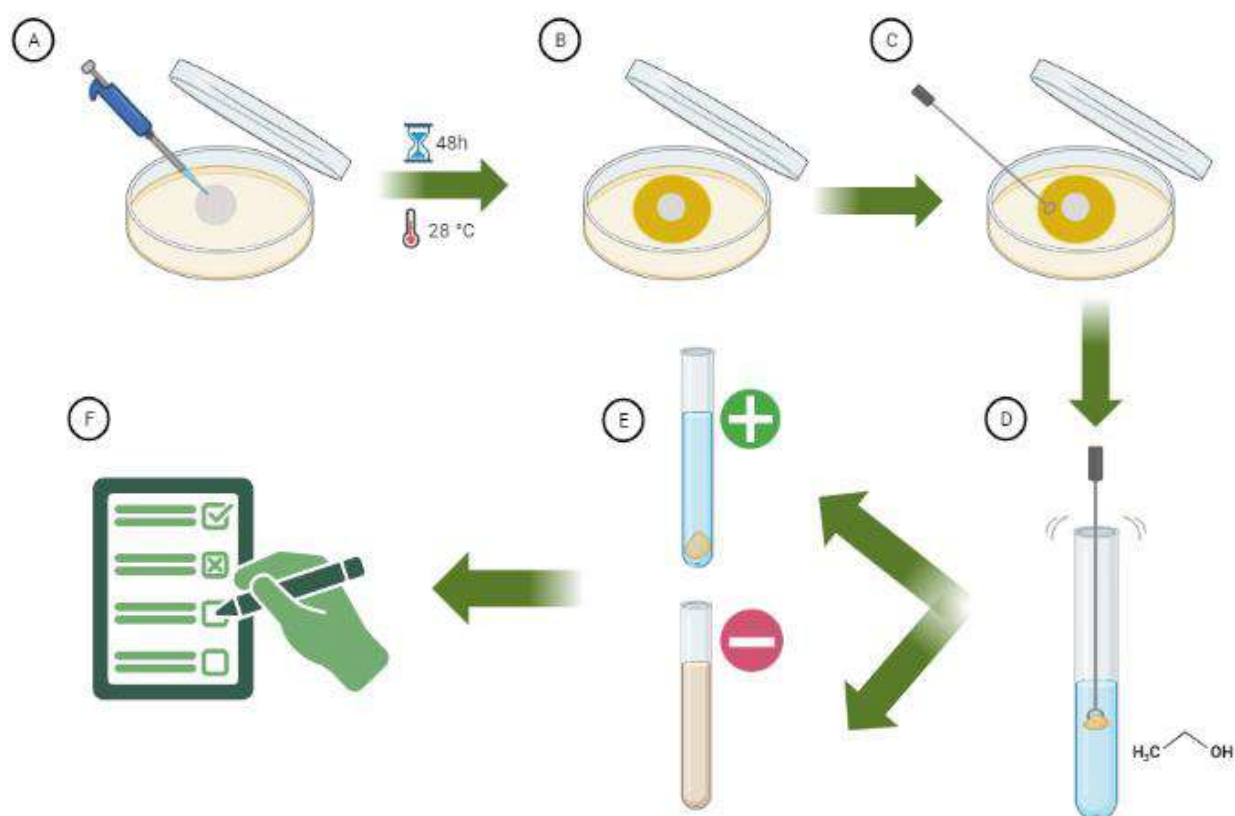


**Figura 17-** Figura ilustrativa das etapas do teste de crescimento bacteriano em ambientes salinos. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender)

### 3.6 Teste da produção de exopolissacarídeos (EPS)

Posteriormente, todas as estirpes bacterianas isoladas foram submetidas aos testes qualitativos para avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS) seguindo a metodologia realizada por Kavamura *et al.*, (2013). Para isso, cada bactéria foi inoculada em discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro (figura 18), dispostos em um meio seletivo para EPS (2% extrato de levedura; 1,5%  $K_2HPO_4$ ; 0,02%  $MgSO_4$ ; 0,0015%  $MnSO_4$ ; 0,0015%  $FeSO_4$ ; 0,003%  $CaCl_2$ ; 0,0015%  $NaCl$ ; 1,5% ágar) modificado pela adição de 10% de sacarose, valor de pH de 7,5. Foram inoculados 5  $\mu$ l da suspensão das bactérias oriundas do teste de salinidade com auxílio de uma pipeta de precisão de 10 $\mu$ l, em placas de Petri contendo o meio seletivo para EPS. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de crescimento bacteriano a 28°C por um período de 48 horas. As colônias que apresentaram uma porção de substância mucóide ao redor dos discos (formação de halo) foram classificadas como possíveis produtoras de EPS. A produção de EPS foi confirmada através do teste de

confirmação, realizada a partir da raspagem da substância com uma alça de inoculação descartável, seguida da imersão da substância mucoide em um tubo de ensaio contendo 2 mL etanol absoluto. A formação do precipitado e translucidez do líquido indicava a presença de EPS, em contrapartida, foram considerados negativos ao teste, quando ocorria a homogeneização da substância e a formação de um líquido turvo. Finalmente, os resultados foram anotados para a plotagem dos resultados em gráficos.



**Figura 18** - Figura ilustrativa das etapas do teste de crescimento bacteriano para determinação da resistência hídrica e da produção de exopolissacarídeos. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Biorender)

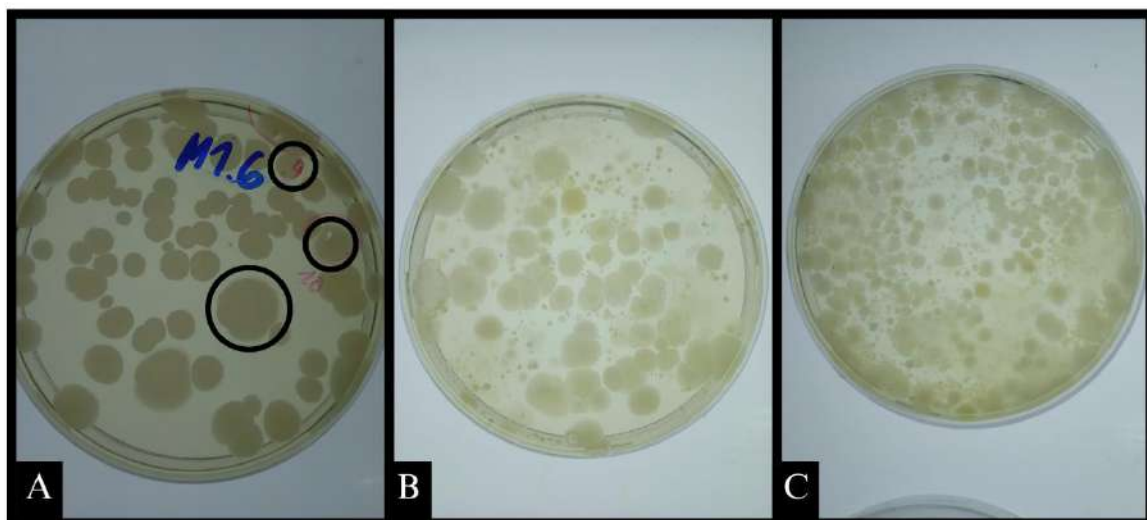
### 3.7 Análises estatística

Os valores de Unidades Formadoras de Colônia observados entre as plantas foram comparados estatisticamente seguida de classificação de médias com teste de Tukey (Teste de Tukey,  $p > 0,05$ ). Os resultados dos testes de salinidade e resistência hídrica foram plotados no software PAST (do inglês, *Paleontological Statistics*) (Hammer *et al.*, 2001), para análise estatística e geração de dados.

## 4 - Resultados

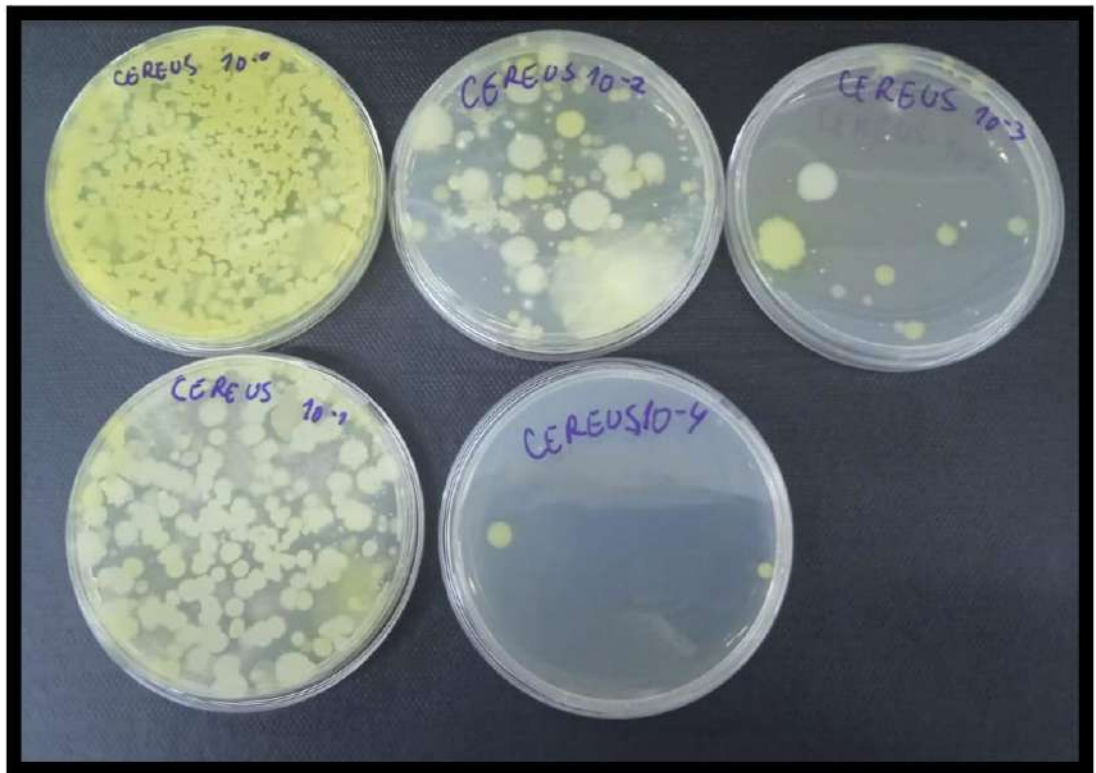
### 4.1 Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) bacterianas rizosféricas e endofíticas de cada espécie vegetal estudada

A figura 19 mostra o crescimento microbiano nas placas de petri posteriores à inoculação da comunidade microbiana associada aos diferentes cactos. Colônias que apresentam morfologias distintas foram obtidas (figura 19). Foi observado, que a morfologia e a coloração das colônias foram diferentes dependendo da espécie de planta e do local amostrado (endofítico ou rizosférico). Essa pequena amostragem representa a grande diversidade encontrada na microbiota das cactáceas.



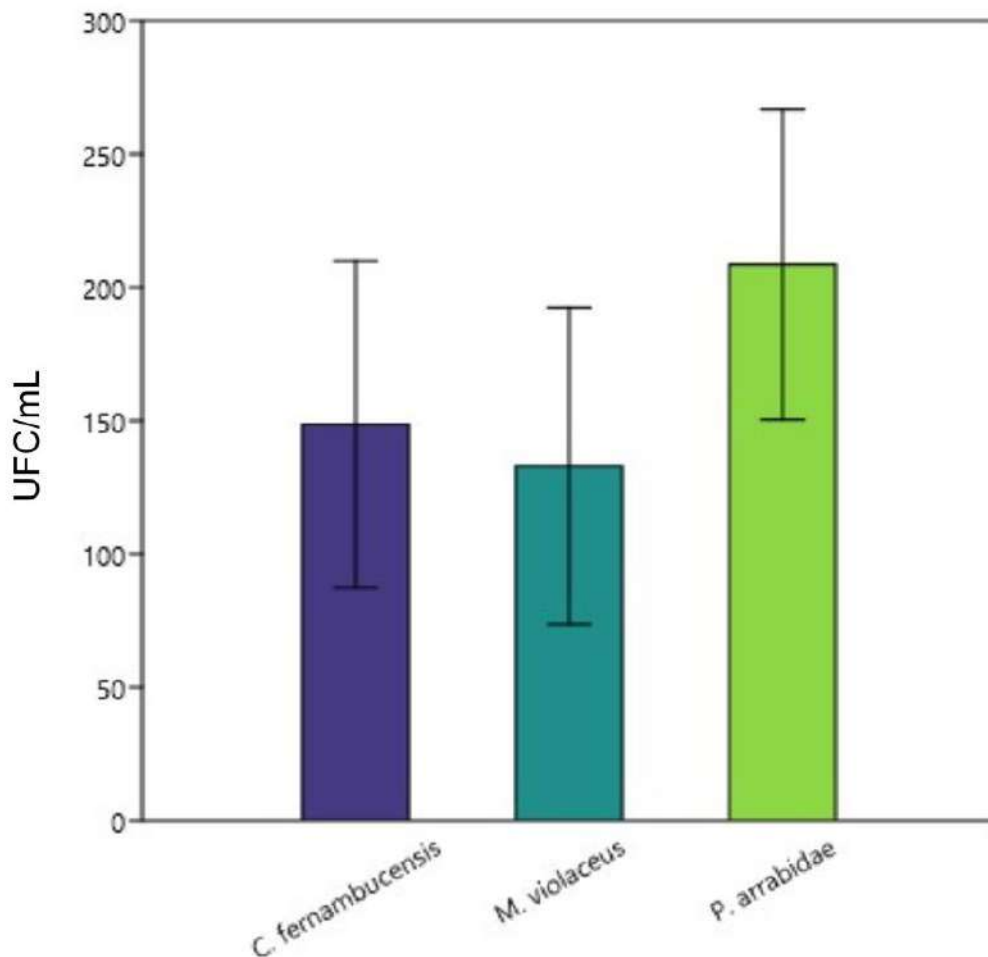
**Figura 19** - Crescimento microbiano em placas de Petri contendo meio TSA (50%) ilustrando as diferentes morfologias e morfotipos de colônias bacterianas obtidas. (Fonte: arquivo pessoal)

A figura 20, ilustra as placas de Petri meio TSA (50%) obtidas a partir do crescimento das células microbianas presentes na diluição seriada das amostras de *C. fernambucensis*. Foram realizadas 8 diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) para contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para as amostras do solo rizosférico de *C. fernambucensis* só foi obtido crescimento bacteriano até a diluição de  $10^{-4}$ .



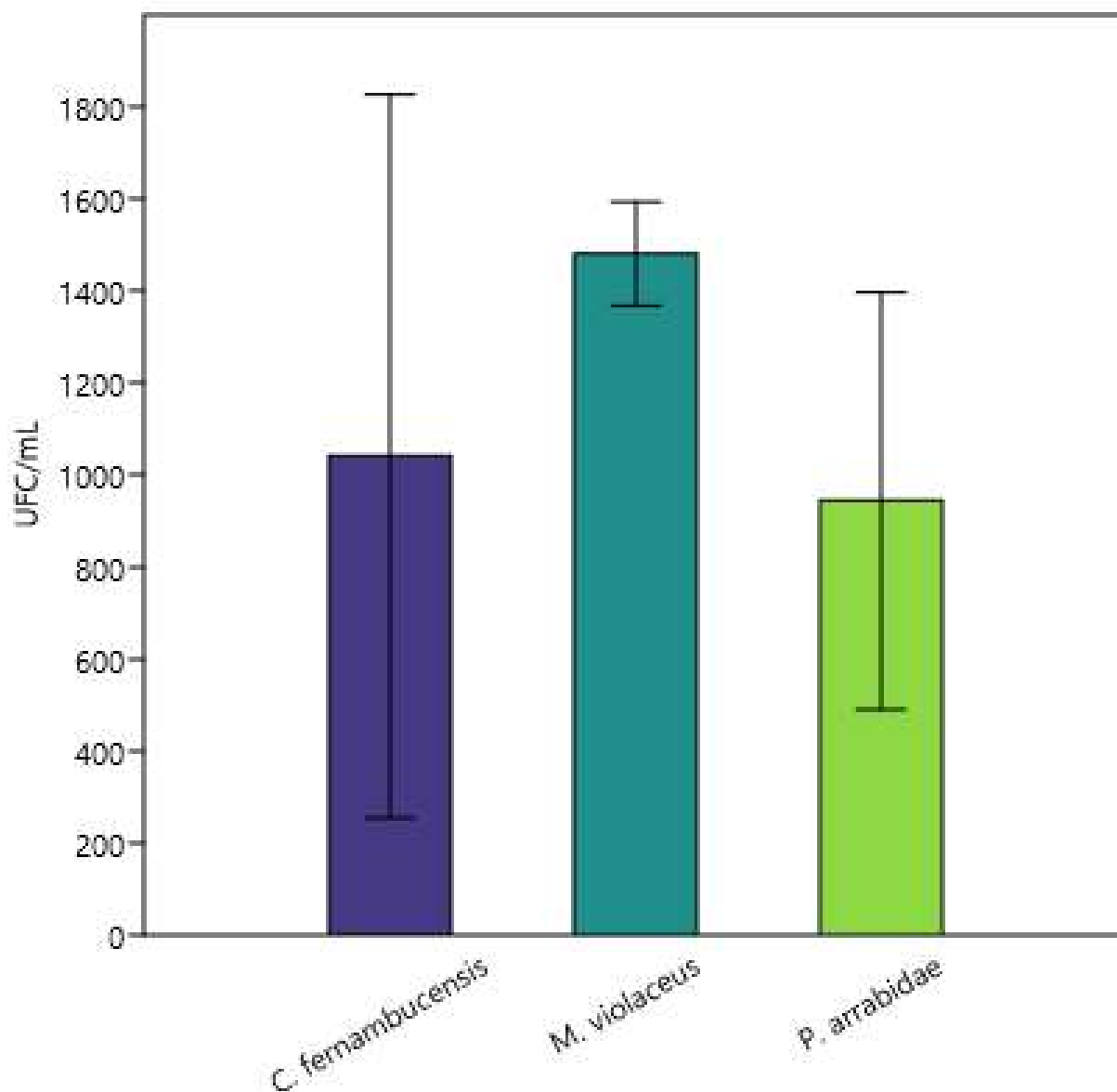
**Figura 20** - placas de Petri meio TSA (50%) com crescimento microbiano obtidas a partir da diluição seriada de bactérias rizosféricas de *C. fernambucensis*. (Fonte: arquivo pessoal)

Com base nos dados obtidos na contagem de UFC do solo rizosférico (Figura 21), foi possível perceber que a espécie de *P. arrabidae* foi a planta com o maior número total de unidades formadoras de colônia, apresentando cerca de  $2 \times 10^{-6}$  UFC/mL, seguido por *C. fernambucensis* ( $2,52 \times 10^{-4}$  UFC/mL) e *Melocactus violaceus* ( $1,78 \times 10^{-4}$  UFC/mL). Entretanto, os valores de UFC observados em cada uma das plantas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey,  $p > 0,05$ ).



**Figura 21-** Gráfico do número de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) nas espécies *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*: representação ilustrativa do quantitativo de Unidades Formadoras de Colônia por espécie de planta do solo rizosférico. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST)

Em relação às bactérias endofíticas, uma média de  $1,48 \times 10^{-3}$  UFC/mL foram observadas na espécie de *M. violaceus*, seguido da espécie *C. fernambucensis*, que mostrou uma média de  $1,04 \times 10^{-3}$  UFC/mL. A espécie *P. arrabidae* foi a espécie que apresentou o menor número de UFC, com uma média de  $9,44 \times 10^{-2}$  unidades formadoras de colônia (Figura 22). Entretanto, assim como observado para a contagem de UFC de bactérias rizosféricas, os valores de UFC observados em cada uma das plantas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey,  $p > 0,05$ ). Os resultados das médias de UFC mostraram que as médias de UFC obtidas da rizosfera dos cactos foram maiores que as médias de UFC obtidas do interior dos tecidos vegetais.



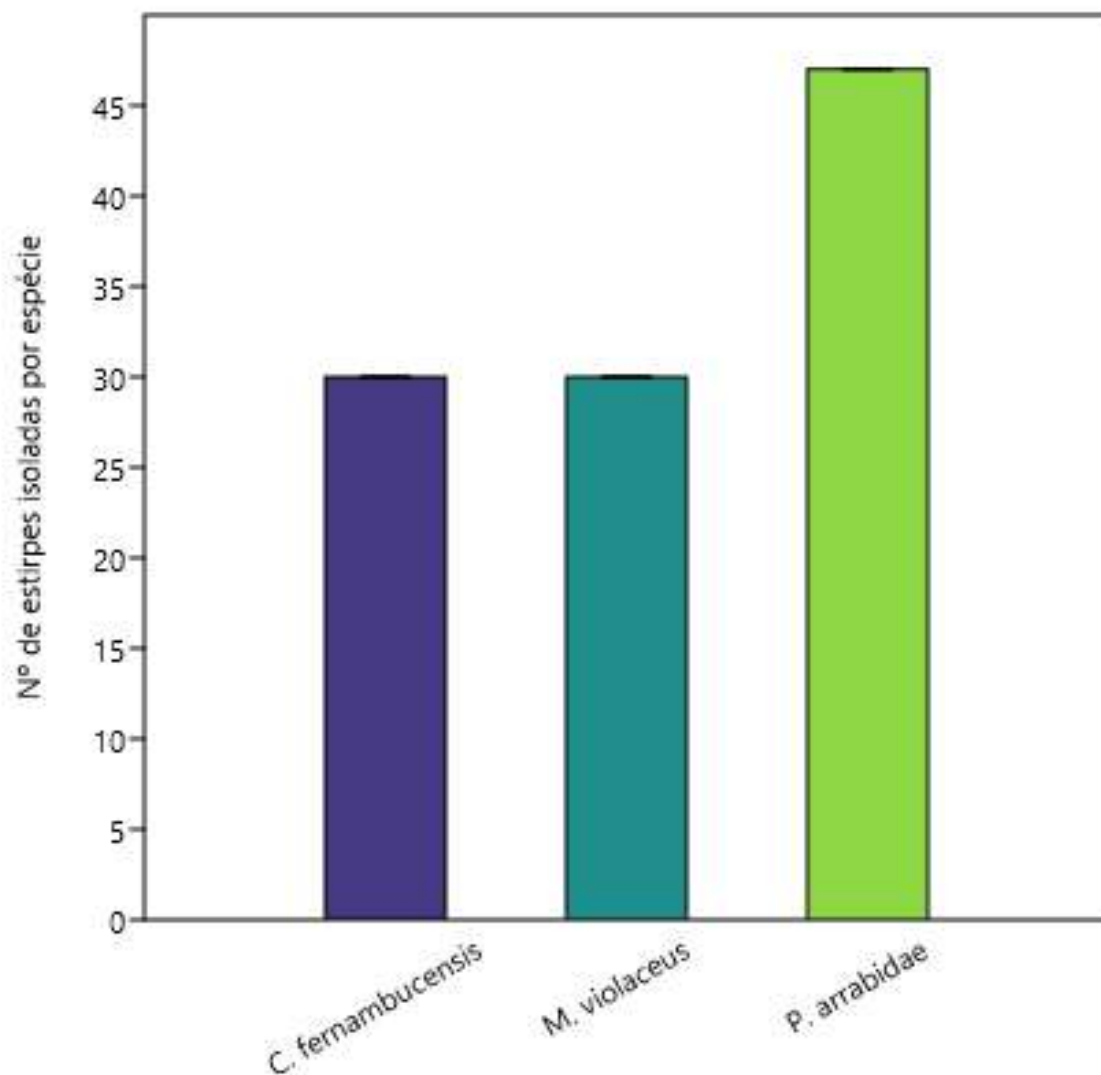
**Figura 22** - Gráfico do número de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) nas espécies *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*: representação ilustrativa do quantitativo de Unidades Formadoras de Colônia por espécie de planta de cepas endofíticas. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST)

#### 4.2 Isolamento bacteriano da rizosfera de cada planta estudada

A figura 23, representa o montante de bactérias rizosféricas isoladas de cada espécie das plantas coletadas. Para fins de isolamento, foram consideradas a morfologia das colônias utilizando de três critérios: forma, elevação e margem das colônias. Dessa maneira, foram selecionados todos os morfotipos diferentes de colônias observadas por planta estudada. Por fim, foram isoladas um total de 107 estirpes, sendo: 30 estirpes bacterianas isoladas de *C. fernambucensis*, 30 estirpes



bacterianas isoladas de *M. violaceus* e 47 estirpes bacterianas isoladas de *P. arrabidae* (Figura 23).

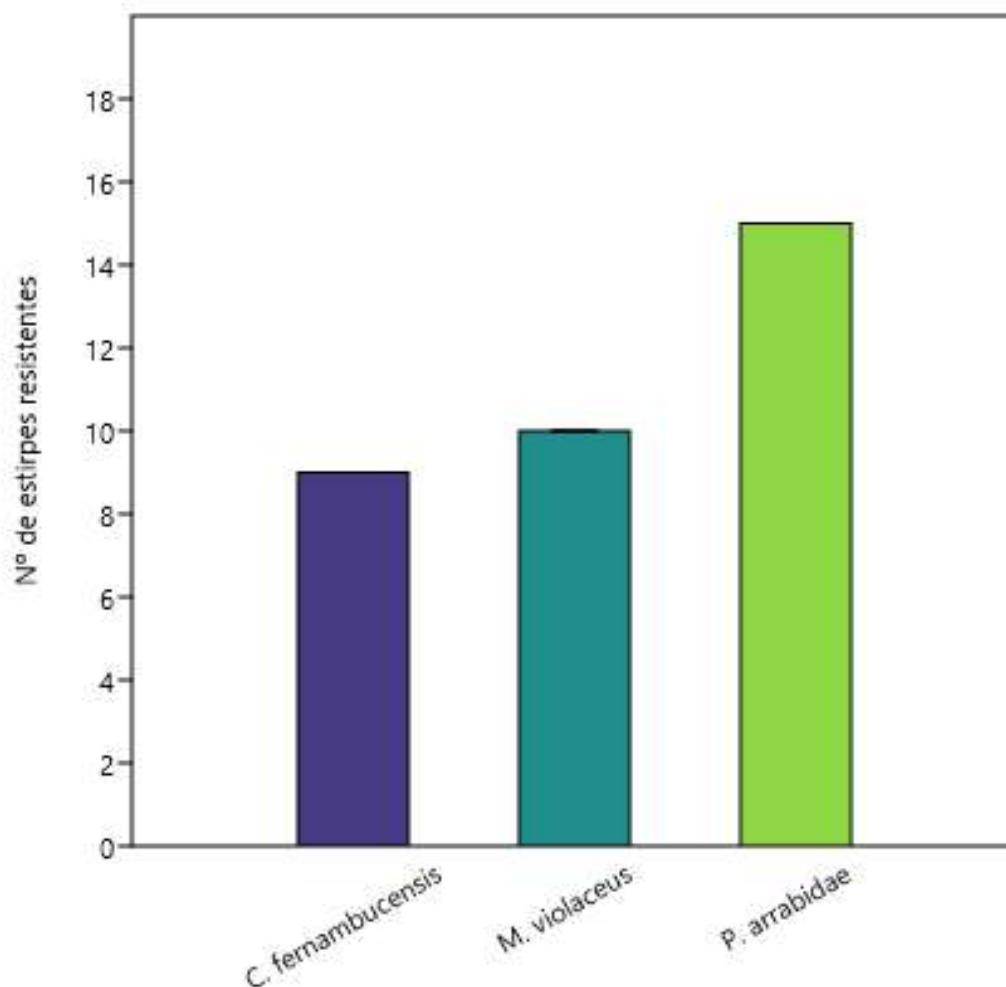


**Figura 23** - Gráfico de colunas do número de estirpes bacterianas isoladas por espécie de cactácea: representação ilustrativa da quantidade de isolados rizosféricos de cada espécie das plantas coletadas. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST)

#### 4.3 Teste de resistência à salinidade e temperatura dos isolados rizosféricos.

As estirpes rizosféricas isoladas foram submetidas a testes de resistência à salinidade. Como pode ser observado na figura 24, os isolados de *P. arrabidae* obtiveram os maiores números de estirpes bacterianas resistentes à salinidade e temperatura, com o total de 15 bactérias isoladas. Em *M. violaceus*, 10 bactérias isoladas foram resistentes ao déficit hídrico, a salinidade e temperatura, enquanto em

*C. fernambucensis* 9 bactérias isoladas foram resistentes ao déficit hídrico e a salinidade (Figura 24).



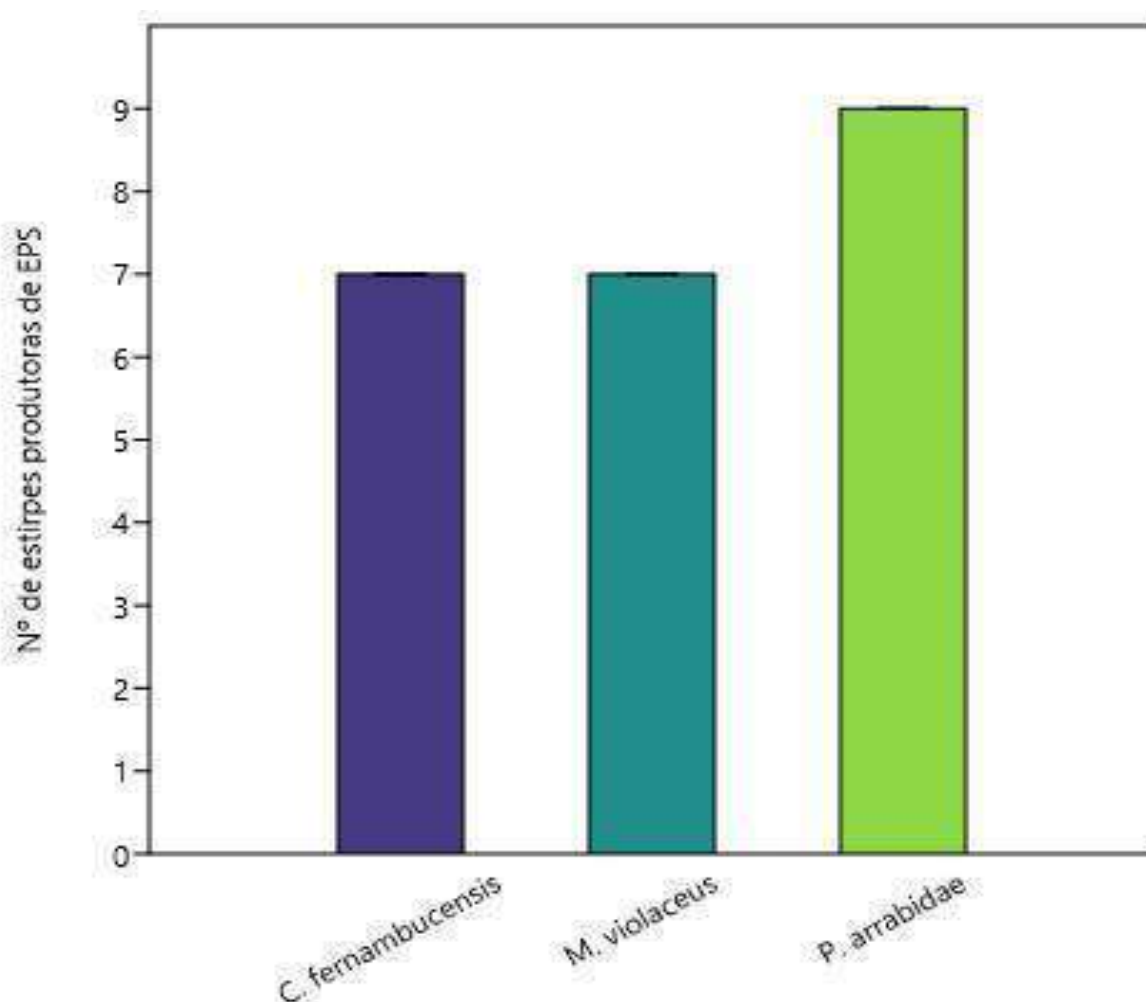
**Figura 24** - Gráfico de colunas do número de estirpes resistentes a temperatura e salinidade por espécie de cactácea: representação ilustrativa do quantitativo de estirpes capazes de resistir à salinidade na concentração NaCl de 131 g/L e a temperatura de 40 °C. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST)

#### 4.4 Teste da produção de exopolissacarídeos (EPS)

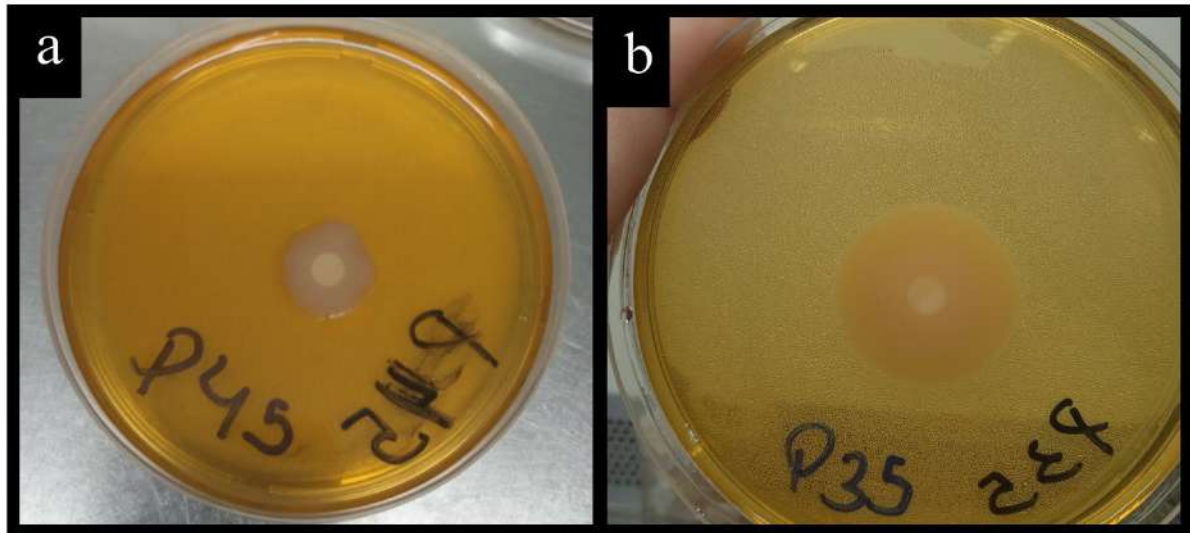
Adicionalmente, todos os isolados foram testados quanto à capacidade de propiciar resistência hídrica por meio de uma análise qualitativa: a produção de exopolissacarídeos. A Figura 26 mostra o resultado dos testes de produção de EPS. Como ilustrado, a estirpe P45 (figura 26 - a) foi capaz de produzir exopolissacarídeos, isso fica visível quando analisamos o precipitado da substância mucóide e do conteúdo líquido translúcido. Diferentemente do que se observa para a bactéria P35

(figura 27 - b), onde a substância foi capaz de promover a turbidez do líquido, apesar de apresentar um precipitado, sendo avaliada como negativa para produção de exopolissacarídeos.

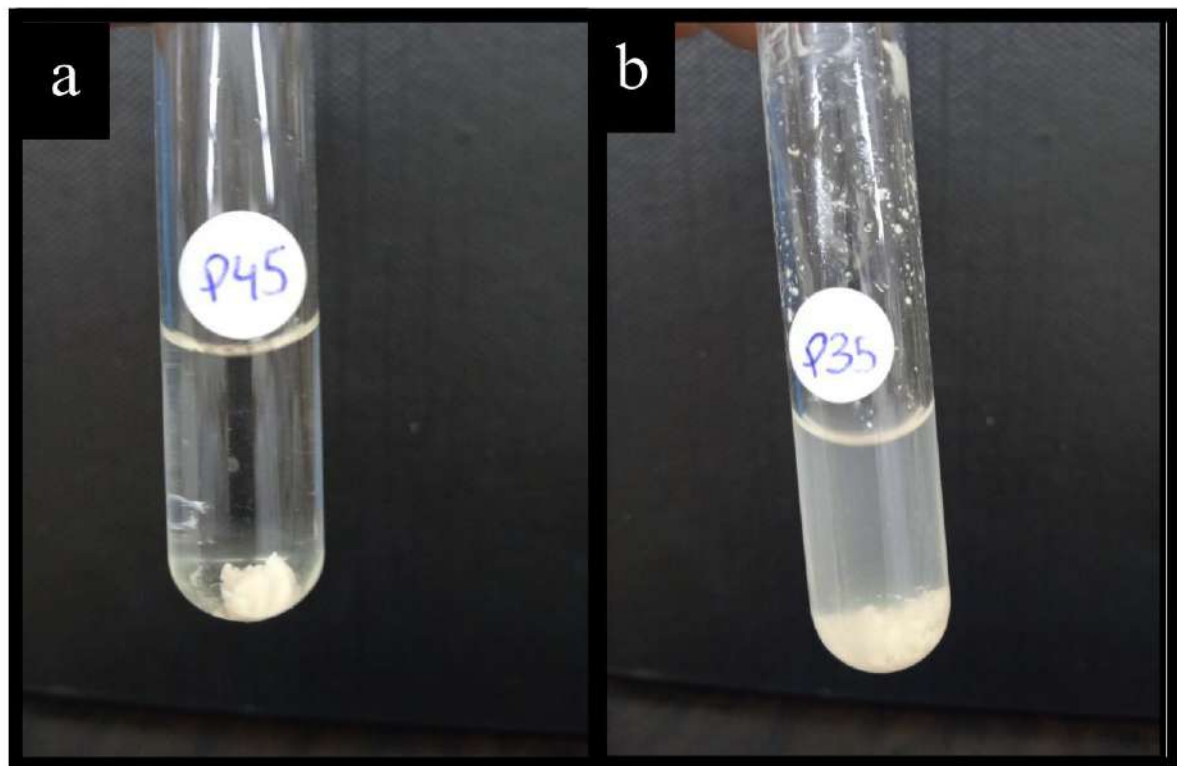
Como é possível observar na Figura 25, das 47 bactérias isoladas da rizosfera de *P. arrabidae*, 9 foram capazes de produzir EPS o que corresponde a 19,1% das estirpes isoladas (figura 25). De *M. violaceus* e de *C. fernambucensis*, 7 isolados de cada espécie foram capazes de produzir EPS (Figura 25). o que corresponde a 23,3% das estirpes isoladas (Figura 25).



**Figura 25** - Gráfico de colunas do número de estirpes produtoras de EPS por espécie das cactáceas *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*. (Fonte: gráfico gerado a partir da plataforma PAST)



**Figura 26** - Testes da produção de exopolissacarídeos: (a) formação de halo ao redor do disco de filtro de 5mm nas estirpes P45 podem indicar a produção de EPS. (b) formação de halo ao redor do disco de filtro de 5mm nas estirpes P35 potencial produtor de EPS. (Fonte: arquivo pessoal)



**Figura 27** - Testes de confirmação da produção de EPS partir da imersão da substância mucoide em um tubo de ensaio contendo etanol absoluto. (a) a estirpe P45 foi positiva para o teste apresentando líquido translúcido e formação de precipitado (b) a estirpe P35 apresentou resultado negativo, dada a turbidez do líquido. (Fonte: arquivo pessoal)

#### 4.5 Resultados gerais

Os resultados gerais observados no presente estudo foram organizados e plotados em gráficos visando uma melhor compreensão dos resultados.



**Figura 28** - Gráfico de pizza correspondendo ao quantitativo de estirpes isoladas e porcentagem positivas aos testes de salinidade, temperatura e déficit hídrico das espécies *C. fernambucensis*, *M. violaceus* e *P. arrabidae*. (Fonte: gráfico gerado através da plataforma Biorender)

Como é possível observar através do gráfico (figura 28), das 30 estirpes isoladas da espécie *C. fernambucensis* 9 cepas foram capazes de resistir a salinidade e temperatura, o que corresponde a 30% total dos isolados e destas, 7 estirpes (23,3%) foram consideradas produtoras de EPS. Na espécie de *Melocactus violaceus* foram isolados 30 estirpes, das quais 10 (33,3%) demonstraram ser resistentes à salinidade e temperatura, onde 7 (23,3%) produzem exopolissacarídeos. Na espécie *P. arrabidae* foram isolados 47 estirpes das quais 15 (31,9%) resistiram a salinidade e temperatura, e 9 (19,1%) produziram EPS. Os dados foram obtidos através de testes qualitativos e semiquantitativos descritos na metodologia (figura 29).



**Figura 29** - Diagrama de Venn demonstrando os resultados gerais obtidos no presente estudo (Fonte: Imagem gerada pela plataforma Biorender)

## 5 - Discussão

Este trabalho teve como objetivo estudar a microbiota associadas a três espécies de cactáceas presentes em ambientes de restinga do Parque Estadual Costa do Sol. A hipótese principal do presente estudo foi de que bactérias podem auxiliar o desenvolvimento de espécies de cactos que habitam a restinga através da mitigação do estresse salino e hídrico para as plantas. Destaca-se ainda que existem poucos estudos da atividade de PGPB associadas a cactáceas e, principalmente, associadas a cactos presentes em ambientes de restinga.

Para tanto foram coletadas três espécies vegetais da família Cactaceae presentes na restinga do Parque Estadual da Costa do Sol (Área de Proteção Ambiental de Massambaba), RJ: *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidae* (Lem.). Considerando as diferentes características morfológicas observadas no microbioma cultivável de cada cactácea estudada, foram isoladas um total 107 estirpes de bactérias. Deste total, 30 estirpes bacterianas foram isoladas de *C. fernambucensis*, 30 de *M. violaceus* e 47 de *P. arrabidae*.

De acordo Patel e colaboradores (2023), as bactérias PGPB associadas a plantas desempenham papéis essenciais em diferentes períodos do desenvolvimento vegetal, que vão desde a germinação das sementes até a planta adulta (Patel et al., 2023). Sendo assim, as bactérias isoladas nesse trabalho podem apresentar um potencial de promover o crescimento de cactáceas em solos de restinga. Como os principais fatores abióticos limitantes do crescimento vegetal encontrados na restinga são a temperatura, a salinidade e o déficit hídrico, todas as estirpes bacterianas isoladas foram, então, testadas quanto a resistência à salinidade e alta temperatura, e, também, quanto à produção de exopolissacarídeos.

Os resultados mostraram, como esperado, a associação de estirpes distintas de bactérias com o sistema radicular das plantas estudadas. Isso é inferido pela diferença da morfologia e morfotipo observada entre as estirpes. A hipótese que levantamos a partir deste resultado é de que a diversidade do microbioma se difere dependendo da espécie cactácea, não obstante, se diferem ainda, por cada planta coletada. Ressalta-se que testes moleculares devem ser posteriormente realizados para apurar a veracidade da colocação. Mas Martirosyan et al., mostra mediante um trabalho que trata das interações planta-microorganismo em arbustos perenes do

deserto, que a composição de ordens bacterianas é específica para cada tipo de planta, o que mostra que cada planta viabiliza um microambiente adequado e único. Ademais, salienta-se que estressores ambientais atuam na modulação de um microbioma vegetal por meio da seleção de microrganismos que possuem características adaptativas que lhes permitem sobreviver em condições adversas. Adicionalmente, Berg e colaboradores (2014), sugerem que o microbioma que vive em associação com as plantas pode ter um impacto significativo na coexistência de diferentes espécies, através da promoção de novas vias nutricionais e de defesa, além de modificar vias bioquímicas. Essas mudanças podem afetar não apenas a planta hospedeira, mas também todo o ecossistema em que ela está inserida (Berg et al., 2014). No presente estudo foi observado que a espécie de cacto estudada não influencia diretamente na abundância de células bacterianas presentes na rizosfera da planta. Isso é observado, pois, embora, *P. arrabidae* tenha apresentado o maior número total de UFC, apresentando cerca de  $2.10^{-6}$  UFC/mL, seguido por *C. fernambucensis* ( $2,52.10^{-4}$  UFC/mL) e *Melocactus violaceus* ( $1,78.10^{-4}$ UFC/mL), não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o número de unidades formadoras de colônias associadas às diferentes cactáceas.

Nossos resultados mostraram que 15 bactérias isoladas do cacto *P. arrabidae*, 10 estirpes isoladas do cacto *M. violaceus* e 9 bactérias isoladas de cacto *C. fernambucensis* apresentam a capacidade de tolerar salinidade e temperatura. Essas bactérias podem contribuir, então, para o desenvolvimento desses cactos nos solos salinizados da restinga, minimizando a presença de sal na rizosfera dessas plantas a partir de mecanismos próprios como a produção de exopolissacarídeos. Nocker e colaboradores (2012), evidencia em um trabalho realizado em uma série de ensaios com diferentes parâmetros para análise dos efeitos da dessecação em microrganismos e da viabilidade bacteriana. O estudo observou que o  $MgCl_2$ , um sal diferente do que foi utilizado neste presente trabalho, teve um forte efeito no aumento do estresse de dessecação em concentrações de 50 mM. No estudo, os autores explicam como bactérias, quando em condições de restrição hídrica a partir da indução com estresse salino, são capazes de produzir o EPS a fim de mitigar o estresse através da baixa permeabilidade que os exopolissacarídeos possuem, o que resultam em um "desacoplamento hidráulico" durante eventos rápidos de umedecimento ou secagem, efetivamente protegendo as células incorporadas no EPS



dos efeitos adversos de flutuações extremas nas condições de hidratação. O estudo também observou que a presença de EPS resultou nas maiores atividades redox e esterase entre as amostras estudadas. Além disso, o EPS mostrou um efeito protetor em relação à dessecação, e a concentração de EPS utilizada no estudo (2% w/v) foi considerada dentro da faixa em que se pode esperar um efeito protetor crescente (Nocker *et al.*, 2012). Estudos como este corroboram com a hipótese colocada neste trabalho, de que bactérias em simbiose com os cactos podem auxiliá-los em condições de salinidade elevada.

Eke *et al.* (2019) mostraram que a associação com bactérias tolerantes à seca pode favorecer a manutenção e o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais em ambientes com déficit hídrico. Nesse caso, bactérias produtoras de exopolissacarídeos são capazes, em condições de seca, de produzir polímeros hidrofílicos que promovem a retenção da água do solo. A produção de EPS pelas bactérias rizosféricas, então, diminui os efeitos nocivos da seca, propiciando uma maior tolerância da planta à seca (Bhagat *et al.*, 2021). Nossos resultados mostraram que das 47 bactérias isoladas do solo rizosférico da espécie *P. arrabidae*, 9 foram capazes de produzir EPS. De mesma forma, 30 cepas isoladas de *M. violaceus* e de 30 cepas isoladas de *C. fernambucensis*, 7 isolados de cada espécie foram capazes de produzir exopolissacarídeos e, dessa maneira, podem auxiliar o desenvolvimento de plantas em ambientes de restrição hídrica. Em suma, os resultados dos estudos propõem que os exopolissacarídeos bacterianos demonstram ser uma alternativa promissora para fins de mitigação dos efeitos do estresse salino, temperatura e metais pesados quando em associação com plantas, promovendo o crescimento e a sobrevivência das culturas. Embora a produção de EPS pelas PGPBs seja importante para a sobrevivência das bactérias e das plantas em ambientes secos, ainda não são compreendidos todos os mecanismos envolvidos na produção de exopolissacarídeos por essas bactérias. Portanto, é importante que mais estudos sejam realizados com o objetivo de compreender os mecanismos de produção de EPS (Eke *et al.*, 2019).

Não obstante, a produção de EPS por PGPBs tem importância não só para o desenvolvimento da vegetação local, mas também possui aplicação biotecnológica para a agricultura. Por exemplo, em um estudo realizado pelo Centro de Biotecnologia Nkolbisson, Yaoundé, em Camarões (2019), foi avaliado a capacidade de bactérias

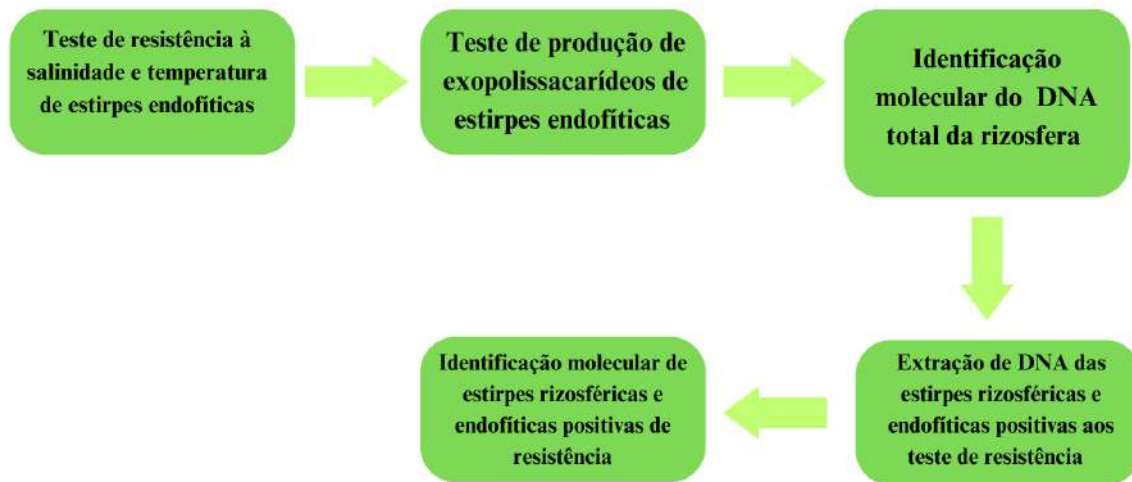
endofíticas isoladas de *Euphorbia antiquorum* em promover tolerância à seca e induzir a promoção do crescimento de tomateiros (Eke *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com resultados previamente obtidos em cactáceas, como o trabalho de Kavamura *et al.*, (2013). Nesse caso, Kavamura *et al.*, (2013), na região semiárida brasileira, isolou e identificou diversas estirpes bacterianas associadas a cactos do sertão brasileiro. Interessantemente, Kavamura *et al.*, (2013) propôs e testou o uso das bactérias isoladas em promover o crescimento de plantas de importância para o agronegócio sob condições de déficit hídrico. Como resultado, foi mostrado que estirpes bacterianas testadas como bioinoculantes foram capazes de melhorar efetivamente o crescimento de diferentes plantas (Kavamura *et al.*, 2013). Foi visto, ainda, que essas estirpes bacterianas isoladas foram capazes de produzir compostos, como exopolissacarídeos bacterianos, que podem ajudar as plantas a tolerarem o estresse hídrico (Kavamura *et al.*, 2013). Esses resultados estão consonantes com os resultados encontrados neste trabalho. Visto que no presente estudo diferentes bactérias isoladas dos cactos demonstraram ser capazes de produzir compostos extracelulares que estão relacionados à resistência hídrica.

Com os resultados que serão gerados neste trabalho, espera-se obter o maior entendimento do microbioma rizosférico e endofítico das cactáceas *Cereus fernambucensis* Lem., *Melocactus violaceus* Pfeiff. e *Pilosocereus arrabidaei* (Lem.). Testes adicionais devem ser realizados com o intuito de validar a inferência do quanto e como bactérias PGPB associadas à rizosfera de cactáceas auxiliam no desenvolvimento vegetal em solos de restinga.

## 6 - Perspectivas futuras

Com o intuito de apresentar uma visualização mais ilustrativa sobre os passos seguintes, apresenta-se um fluxograma abaixo:



**Figura 30** - Experimentos que se pretende executar no projeto. (Fonte: Imagem gerada através da plataforma Canva)

Espera-se seguir para os passos seguintes:

- Os isolados de cepas endofíticas serão sujeitos aos testes de resistência hídrica, salinidade e temperatura.
- Fazer a extração de DNA e a identificação molecular das cepas endofíticas e rizosféricas que apresentaram resultados positivos para resistência à salinidade, temperatura e produção de exopolissacarídeos
- Mapear a composição da comunidade microbiana associada aos diferentes cactos estudados através do sequenciamento do gene que codifica o 16S rRNA.
- Ademais, avaliar a hipótese de transferência vertical da microbiota da rizosfera para as sementes através da extração do DNA total de amostras de sementes coletadas comparando com o DNA total da amostra de solo rizosférico.

## 7 - Conclusão

Diante do que foi exposto, com base nos resultados alcançados e no observável a partir da literatura, foi possível observar que, (i) A espécie de planta *Pilosocereus arrabidae* demonstrou a maior quantidade de estirpes resistentes à salinidade e déficit hídrico. (ii) os exopolissacarídeos bacterianos podem desempenhar um papel importante na mitigação de estresse hídrico. (iii) Embora os mecanismos envolvidos na resistência a salinidade não estejam especificados em sua totalidade, cerca de 30% das estirpes cultivadas neste trabalho foram capazes de sobreviver a uma elevada taxa de salinidade (0,919 de atividade de água), o que sugere que estas podem auxiliar essas espécies de cactos na sua sobrevivência em déficit hídrico e em solos salinos.

## 8 - Referências bibliográficas

- AKHTAR, Saqib Saleem et al. Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1777, 2020.
- ALI, Baber et al. PGPR-mediated salt tolerance in maize by modulating plant physiology, antioxidant defense, compatible solutes accumulation and bio-surfactant producing genes. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 345, 2022.
- AMIRJANI, Mohammad R. et al. Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. **International Journal of Botany**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2011.
- ARAYES, Mervat A. et al. Exopolysaccharide production from *Alkalibacillus* sp. w3: statistical optimization and biological activity. **Biologia**, v. 78, n. 1, p. 229-240, 2023.
- ARAUJO, Dorothy Sue Dunn de et al. Área de Proteção Ambiental de Massambaba, Rio de Janeiro: caracterização fitofisionômica e florística. **Rodriguésia**, v. 60, p. 67-96, 2009.
- ARAÚJO, Welington L. et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian journal of microbiology**, v. 47, n. 3, p. 229-236, 2001.
- ARRUDA, Rosani do Carmo de Oliveira; VIGLIO, Natasha Sanfilippo Fontes; BARROS, Ana Angélica Monteiro de. Anatomia foliar de halófitas e psamófilas reptantes ocorrentes na restinga de Ipitangas, Saquarema, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 333-352, 2009.
- BARTHLOTT, Wilhelm; HUNT, David R. Cactaceae. In: Flowering Plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 1993. p. 161-197.
- BERALDO-BORRAZZO, Jesieli et al. Prospecção biotecnológica de bactérias endofíticas associadas à cactáceas. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 12, n. 2, p. 567-579, 2021.
- BERG, Gabriele et al. The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p. 491, 2014.
- BHAGAT, Neeta et al. Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. 2021.
- BOHRER, Claudio Belmonte de Athayde et al. Mapeamento da vegetação e do uso do solo no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 1-23, 2009.
- CARVALHO, Amanda S. da R. et al. Restinga de Massambaba: vegetação, flora, propagação e usos. Vertente edições, Rio de Janeiro, 2018.
- CARVALHO, Daniele Andrade de; SÁ, Cyl Farney Catarino de. Estrutura do estrato herbáceo de uma restinga arbustiva aberta na APA de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, p. 367-378, 2011.
- CHANDLER-BROWN, Devon et al. Sorbitol treatment extends lifespan and induces the osmotic stress response in *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 316, 2015.
- CHENG, Zeyu et al. Changes in Soil Rhizobia Diversity and Their Effects on the Symbiotic Efficiency of Soybean Intercropped with Maize. **Agronomy**, v. 13, n. 4, p. 997, 2023.
- CIRNE, Paulo; ZALUAR, Henrique Leão Teixeira; SCARANO, Fabio Rubio. Plant diversity, interspecific associations and postfire resprouting on a sandy spit in a Brazilian coastal plain. **Ecotropica**, v. 9, p. 33-38, 2003.

CONAMA (1999) Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 261/1999. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res>

CRUZ, Catarina et al. Application of Plant Growth-Promoting Bacteria from Cape Verde to Increase Maize Tolerance to Salinity. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 488, 2023.

DAVIS, Stephen D.; HEYWOOD, Vernon. Centres of plant diversity: a guide and strategy for their conservation, v. 3. **Americas**. 1997.

DE ABREU CAITANO, Haissa et al. Reintroduction of illegally extracted *Melocactus violaceus* (Cactaceae) in Brazil. **Oryx**, v. 56, n. 1, p. 155-158, 2022.

DICKISON, William C. **Integrative plant anatomy**. Academic press, v. 8 p.306-3010, 2000.

DRAGOJEVIĆ, Milica et al. Endorhizosphere of indigenous succulent halophytes: a valuable resource of plant growth promoting bacteria. **Environmental Microbiome**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2023.

EKE, Pierre et al. Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigona* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological research**, v. 228, p. 126302, 2019.

EL ALAOUI, Abdelkhalek et al. Growth and heavy metals uptake by *Vicia faba* in mining soil and tolerance of its symbiotic rhizobacteria. 2019.

ERCOLE, Tairine Graziella et al. Co-inoculation of *Bacillus velezensis* and *Stenotrophomonas maltophilia* strains improves growth and salinity tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Rhizosphere**, p. 100752, 2023.

FLOWERS, Timothy J.; COLMER, Timothy D. Salinity tolerance in halophytes. **New phytologist**, p. 945-963, 2008.

GAMALERO, Elisa; GLICK, Bernard R. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. **Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management**, p. 17-46, 2011.

GARCIA, Lucieli Moreira et al. Population ecology and conservation status of *Parodia carambeiensis* (Cactaceae). **Rodriguésia**, v. 72, 2021.

GIBSON, Arthur C.; NOBEL, Park S. **The cactus primer**. Harvard University Press, 1986.

GLICK, Bernard R. et al. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

HAMANE, Samia et al. Promoting the growth of *Sulla flexuosa* L. by endophytic root nodule bacteria authors and affiliations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 9, p. 253, 2023.

HAMMER, Øyvind; HARPER, David AT. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 1, 2001.

HU, Yuncai; SCHMIDHALTER, Urs. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 168, n. 4, p. 541-549, 2005.

KASIM, Wedad A. et al. Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 2, p. 217-227, 2016.

KAVAMURA, Vanessa Nessner et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

LI, H. Q.; JIANG, X. W. Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 64, p. 235-241, 2017.

- LIEBIG, Markus et al. Ecophysiological and floristic implications of sex expression in the dioecious neotropical CAM tree *Clusia hilariana* Schltdl. **Trees**, v. 15, p. 278-288, 2001.
- LOURENCO JR, Jehova et al. Soil-associated drivers of plant traits and functional composition in Atlantic Forest coastal tree communities. **Ecosphere**, v. 12, n. 7, p. e03629, 2021.
- LOURENÇO JUNIOR, Jehová et al. Effects that nutritional and saline gradients have on the growth of *Passiflora mucronata* Lam. and *Canavalia rosea* (Sw.) DC. found in the restinga of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 318-326, 2013.
- MARGESIN, Rosa; SCHINNER, Franz. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles**, v. 5, n. 2, p. 73-83, 2001.
- MARQUES, Márcia CM; SILVA, Sandro Menezes; LIEBSCH, Dieter. Coastal plain forests in southern and southeastern Brazil: ecological drivers, floristic patterns and conservation status. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 1-18, 2015.
- MARTIN, Louis; SUGUIO, Kenitiro; FLEXOR, J. M. As flutuações de nível do mar durante o quaternário superior e a evolução geológica de "deltas" brasileiros. **Boletim IG-USP. Publicação Especial**, n. 15, p. 01-186, 1993.
- MARTIROSYAN, Varsik et al. Desert perennial shrubs shape the microbial-community miscellany in lamosphere and phyllosphere space. **Microbial ecology**, v. 72, p. 659-668, 2016.
- NAVARRO-TORRE, Salvadora et al. Halotolerant endophytes promote grapevine regrowth after salt-induced defoliation. **Journal of Plant Interactions**, v. 18, n. 1, p. 2215235, 2023.
- NEPOMUCENO, Álvaro; MIRANDA, Victor Santos; ALVES-ARAÚJO, Anderson. Flora of Itaúnas State Park, Espírito Santo, Brazil: Cactaceae. **Rodriguésia**, v. 73, p. e01862019, 2022.
- NOBEL, Park S. **Environmental biology of agaves and cacti**. Cambridge University Press, 2003.
- NOCKER, Andreas et al. Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. **Journal of microbiological methods**, v. 90, n. 2, p. 86-95, 2012.
- PANDEY, R. P. et al. Stress-tolerant Plant Growth-Promoting Mesorhizobium ciceri Isolates from MID-gangetic Plains. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 349-360, 2023.
- PAULO, Elinalva Maciel et al. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 710-714, 2012.
- PENG, Mu et al. From Salty to Thriving: Plant Growth Promoting Bacteria as Nature's Allies in Overcoming Salinity Stress in Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1169809.
- PHOUR, Manisha; SINDHU, Satyavir S. Mitigating abiotic stress: microbiome engineering for improving agricultural production and environmental sustainability. **Planta**, v. 256, n. 5, p. 85, 2022.
- PIMENTEL, Marina CP et al. Spatial variation in the structure and floristic composition of " restinga" vegetation in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, p. 543-551, 2007.
- PORIA, Vikram et al. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 999866, 2022.
- PUENTE, M. Esther; LI, Ching Y.; BASHAN, Yoav. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 402-408, 2009.

RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, Yadira et al. Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. **Food Chemistry**, v. 312, p. 126073, 2020.

Rocha, C. F. D., et al. "Região turística dos lagos fluminenses." Bergallo, HG; Fidalgo, ECC; Rocha, CFD; **Uzêda**, MC (2009): 313-323.

ROCHA, C. F. D. et al. The remnants of restinga habitats in the Brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: habitat loss and risk of disappearance. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 263-273, 2007.

ROCHA, Carlos FD; SIQUEIRA, Carla da C.; ARIANI, Cristina V. The endemic and threatened lizard *Liolaemus lutzae* (Squamata: Liolaemidae): current geographic distribution and areas of occurrence with estimated population densities. **Zoologia (Curitiba)**, v. 26, p. 454-460, 2009.

SAITO, Haruo; POSAS, Francisc. Response to hyperosmotic stress. **Genetics**, v. 192, n. 2, p. 289-318, 2012.

SALIMI, Fatemeh; FARROKH, Parisa. Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 213, 2023.

SANTOS-DÍAZ, María del Socorro; CAMARENA-RANGEL, Nancy Gabriela. Cacti for production of metabolites: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8657-8667, 2019.

SCARANO, F. R. et al. Ecophysiology of selected tree species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE Brazil I. Performance of three different species of *Clusia* in an array of plant communities. **Trees**, v. 19, p. 497-509, 2005.

SCARANO, Fabio Rubio et al. Four sites with contrasting environmental stress in southeastern Brazil: relations of species, life form diversity, and geographic distribution to ecophysiological parameters. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, n. 4, p. 345-364, 2001.

SCARANO, Fabio Rubio. Plant communities at the periphery of the Atlantic rain forest: rare-species bias and its risks for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1201-1208, 2009.

SILVA, EN da et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 10, p. 1130-1137, 2010.

SILVA, Joyce Avelino; DÓRIA, Karolina Van Sebreeck. Composição florística de forófitos e epífitas em fragmento de Restinga Alta em Caraguatatuba, SP. **Unisanta BioScience**, v. 9, n. 1, p. 25-37, 2020.

SILVA, Karla JP; SOUZA, Alexandre F. Common species distribution and environmental determinants in South American coastal plains. **Ecosphere**, v. 9, n. 6, p. e02224, 2018.

SOUZA, CR de G. et al. Restinga: conceitos e empregos do termo no Brasil e implicações na legislação ambiental. São Paulo: **Instituto Geológico**, v. 104, 2008.

TEO, Han Meng et al. Setting a plausible route for saline soil-based crop cultivations by application of beneficial halophyte-associated bacteria: A review. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 657, 2022.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, J. S.; SINGH, D. P. Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. **Pedosphere**, v. 21, n. 2, p. 214-222, 2011.

ZALUAR, H. L. T.; SCARANO, F. R. Facilitação em Restingas de moitas: Um século de buscas por espécies Focais. 2000. Esteves, FA & Lacerda, LD Ecologia de restingas e lagoas costeiras. **Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé**, RJ, p. 3-25, 2000.



ZAMITH, Luiz R.; CRUZ, Denise D.; RICHERS, Barbara TT. The effect of temperature on the germination of *Melocactus violaceus* Pfeiff.(Cactaceae), a threatened species in restinga sandy coastal plain of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 615-622, 2013.