

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE AGRONOMIA

INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL DOS GENÊROS *Bacillus* E *Pantoea*

ALYSON DA SILVA AMORIM

Monografia apresentada ao curso de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, como parte de requisitos para obtenção do diploma de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral

Garanhuns – PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns-PE, Brasil

A524i Amorim, Alyson da Silva

Influência de fatores abióticos sobre o desenvolvimento
de bactérias promotoras de crescimento vegetal dos gêneros
Bacillus e Pantoea / Alyson da Silva Amorim. – 2019.

43 f. : il.

Orientadora: Júlia Kuklinsky Sobral

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Agronomia)
– Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Agronomia, Garanhuns, BR - PE, 2019.

Inclui referências

1. Biorremediação 2. Pesticidas 3. Bactérias 4. Salinidade
5. Agronomia I. Sobral, Júlia Kuklinsky, orient. II. Título

CDD 631.52

ALYSON DA SILVA AMORIM

**INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL DOS
GENÊROS *Bacillus* E *Pantoea***

Monografia apresentada ao curso de Agronomia da
Universidade Federal Rural de Pernambuco-Unidade
Acadêmica de Garanhuns, como parte dos requisitos para
obtenção do diploma de Engenheiro Agrônomo.

Monografia Apresentada e aprovada em 05 de Fevereiro de 2019

Claudineide Florêncio da Silva
(Zootecnista- UFRPE)

César Auguste Badji
(Professor, Dr. da UAG-UFRPE)

Júlia Kuklinsky Sobral
(Orientadora, Professora. Dra. da UAG-UFRPE)

Garanhuns – PE
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS, por sempre ser o meu guia e iluminador, ao meu pai, Eliatã Marquês de Amorim que sempre esteve no apoio da minha caminhada.

Aos meus irmãos, Melkzedek Amorim, Rizoleta Amorim e Elyã Amorim que sempre esteve torcendo nesta minha jornada;

À minha orientadora, Profa. Dr. Júlia Kuklinsky Sobral, pelos ensinamentos, palavras e acolhimento, meu muito obrigado;

À família LGBM, pelos momentos de descontração e aprendizado;

Ao PET- Biotecnologia, que me trouxe uma melhor formação em minha vida pessoal e profissional;

E aos meus amigos e irmãos residentes que guardarei em meu coração com amor e carinho as vossas amizades;

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse e alcançasse mais este objetivo de vida.

Obrigado!!!

SUMÁRIO

Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	10
2.REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	12
2.2 Importância da interação bactéria-solo-planta	12
2.3 Exopolissacarídeos (EPSs)	13
2.4 Solubilização de fosfato	13
2.5 Fixação biológica de nitrogênio	14
2.6 Inseticida (Metomil)	14
2.7 Influência dos pesticidas sobre a microbiota associada à planta.....	15
2.7 Biorremediação e tolerância microbiológica a inseticidas	16
2.8 Salinidade	16
2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
3.1 INTRODUÇÃO.....	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.2.2 Inseticida metomil	25
3.2.3 Metodologia para avaliar a tolerância bactérias do gênero <i>Bacillus</i> ao inseticida metomil.	25
3.2.4 Metodologia para avaliar a biodegradação das bactérias do gênero <i>Bacillus</i> ao inseticida metomil.....	26
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.3.1 Tolerância bacteriana na presença do inseticida metomil.....	26
4.3.3 Potencial de degradação bacteriana a diferentes concentrações do inseticida metomil.	28
4.4 CONCLUSÃO	30
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SALINO SOBRE O DESENVOLVIMENTO NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL DO GÊNERO <i>PANTOEA</i>.....	33
5.1 INTRODUÇÃO.....	33
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.2.1 Linhagens bacterianas	35
5.2.2 Produção de exopolissacarídeos	36

5.2.3 Avaliar o potencial de tolerância das 5 linhagens bacterianas, do gênero bacteriano <i>Pantoeaa</i> diferentes concentrações salina,NaCl.	36
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.4 CONCLUSÃO.....	40

RESUMO

O manejo incorreto durante a aplicação da maioria dos pesticidas agrícolas vem causando contaminação em solos, lençóis freáticos, fauna e flora nos agroecossistemas brasileiros, além de aumentar os custos na produção agrícola. A microbiota quando submetida a dosagens acima do recomendado de certos pesticidas sofre efeitos deletérios em suas populações. E como uma forma de amenizar os custos nos insumos e a busca de uma produção agrícola mais sustentável, o uso de bactérias promotoras de crescimento e biorremediadoras é uma ferramenta biotecnológica de grande potencial. Outro fator com influência na produção agrícola é a salinidade, é um termo que qualifica uma situação de excesso de sais solúveis ao solo no ambiente. Este problema é um dos principais causadores de degradação de solos em regiões de clima árido e semiárido, culminado em sérios prejuízos no rendimento agrícola. Para contribuir com recuperação desses solos degradados, as bactérias promotoras de crescimento vegetal tem demonstrado úteis no desenvolvimento de estratégias na promoção de crescimento de plantas em solos salinos. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar a tolerância ao pesticida metomil e a potencial capacidade de biodegradação deste pesticida por bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Bacillus*; e ii) avaliar a produção de exopolissacarídeos sob estresse salino por bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Pantoea*. Para avaliação da tolerância ao pesticida, as bactérias de *Bacillus* (UAGAT35 e UAGAT71) foram inoculadas em Meio Mínimo Mineral (MMM) líquido modificado, acrescido de glicose como fonte de carbono, seguido de diferentes concentrações do Metomil. E para avaliar o potencial de biodegradação, a fonte de carbono não foi acrescida. Já no experimento sobre a salinidade foram utilizadas cinco linhagens bacterianas do gênero *Pantoea* (UAGC 906, UAGC 977, UAGC 858, UAGC 907 e UAGC 972), que foram cultivadas em meio sólido com sacarose, e adicionado diferentes concentrações de NaCl, em cada tratamento. Durante 10 dias, o crescimento do halo foi medido com auxílio de um paquímetro, sendo feito cinco leituras, em intervalos de 48 horas. As duas linhagens do gênero *Bacillus* demonstraram tolerância e biodegradação ao inseticida metomil, em suas diferentes concentrações. Enquanto que as 5 linhagens bacterianas, do gênero *Pantoea*, submetidas as diferentes concentrações de NaCl apresentaram produção de Exopolissacarídeos (EPS), mostrando sua sobrevivência em ambientes sob estresse

salino. Portanto, as bactérias avaliadas apresentaram potencial para estudos futuros visando promoção de crescimento em ambientes adversos.

Palavras chave: biorremediação, salinidade, pesticida, bactérias promotoras de crescimento.

ABSTRACT

Incorrect handling during the application of most agricultural pesticides has been causing contamination in soils, groundwater, fauna and flora in Brazilian agroecosystems, in addition to increasing costs in agricultural production. The microbiota when subjected to dosages above the recommended level of certain pesticides suffers deleterious effects on their populations. And as a way to reduce input costs and the search for more sustainable agricultural production, the use of growth promoting bacteria and bioremediators is a biotechnological tool of great potential. Another factor that influences agricultural production is salinity. It is a term that qualifies a situation of excess soluble salts in the environment. This problem is one of the main causes of soil degradation in regions of arid and semi-arid climate, culminating in serious agricultural income. To contribute to the recovery of these degraded soils, plant growth promoting bacteria have been shown to be useful in the development of strategies to promote plant growth in saline soils. In view of the above, the present work had as objectives: i) to evaluate the tolerance to the methomyl pesticide and the potential biodegradation capacity of this pesticide by *Bacillus* plant growth promoting bacteria; and ii) to evaluate the production of exopolysaccharides under saline stress by plant growth promoting bacteria of the genus *Pantoea*. For the evaluation of pesticide tolerance, the *Bacillus* bacteria (UAGAT35 and UAGAT71). were inoculated in modified Minimal Mineral Medium (MMM), plus glucose as carbon source, followed by different concentrations of Methomyl. And to assess the potential for biodegradation, the carbon source has not been increased. In the experiment on salinity, five bacterial strains of the genus *Pantoea* were used (UAGC 906, UAGC 977, UAGC 858, UAGC 907 and UAGC 972), which were grown in solid medium with sucrose and added different concentrations of NaCl in each tr. For 10 days, the growth of the halo was measured with the aid of a pachymeter, being done five readings, in intervals of 48 hours. The two strains of the genus *Bacillus* demonstrated tolerance and biodegradation to methomyl insecticide, in their different concentrations. While the 5 bacterial strains of the genus *Pantoea* submitted to the different concentrations of NaCl presented production of Exopolysaccharides (EPS), showing their survival in environments under

salt stress. Therefore, the evaluated bacteria presented potential for future studies aiming to promote growth in adverse environments.

Key words: bioremediation, salinity, pesticide, growth promoting bacteria.

1. INTRODUÇÃO

O manejo incorreto durante a aplicação da maioria dos pesticidas agrícolas, vem causando contaminação em solos, lençóis freáticos, fauna e flora nos agroecossistemas brasileiros. A microbiota quando submetida a dosagens acima do recomendado de certos pesticidas sofre efeitos deletérios em suas populações, podendo causar alterações em seus DNAs, inibição de proteínas, destruição de membranas, entre outros (PROCÓPIO et al. 2010). Dentre os insumos agrícolas usados na produção agrícola do milho está o metomil, pesticida usado no controle da *Spodoptera frugiperda*, o mesmo faz parte do grupo químico metil carbamato de oxima, provoca a passagem contínua dos impulsos nervosos, levando o inseto à fadiga e, conseqüentemente, a morte (GALLO et al., 2002),sendo classificado como um produto muito perigoso ao meio ambiente,classe II (AGROFIT, 2003).

E como uma forma de amenizar os custos nos insumos e a busca de uma produção agrícola mais sustentável,o uso de bactérias promotoras de crescimento e biorremediadoras é uma ferramenta biotecnológica de grande potencial, pois trás uma produção agrícola econômica e de alta qualidade, sendo usadas como critérios de preservação ambiental e saúde humana (DARTORA et al., 2013; SANTOS,VARAVALLO, 2011; FIGUEIREDO et al., 2010).

Outro fato abiótico com influência na produção agrícola a ser considerado neste trabalho será a salinidade. A salinidade é um termo que qualifica uma situação de excesso de sais solúveis ao solo no ambiente .Este problema é um dos principais causadores de degradação de solos em regiões de clima árido e semiárido, culminado em sérios prejuízos no rendimento agrícola (LIMA JÚNIOR et al., 2010; MAPELLI et al., 2013).

Este problema é mundial, em nosso país, Brasil, a região do nordeste se destaca com tal problemática; Para contribuir com recuperação desses solos degradados, as bactérias promotoras de crescimento vegetal tem demonstrado úteis no desenvolvimento de estratégias na promoção de crescimento de plantas em solos salinos, com o intuito de

melhorar a produção de material vegetal e ,com isso, a extração de sais(NIA et al., 2012).

As bactérias, levando em consideração seus habitats naturais, podem colonizar o interior e exterior dos órgãos das plantas. Se mostrando benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas (MARIANO et al., 2004). Na ultima década, estudos com bactérias diazotróficas endofíticas ganharam força e maior atenção devido às potencialidades como agentes de promoção de crescimento e proteção de plantas (JÚNIOR et al., 2008).

As bactérias, que possuem algum tipo de associação com plantas, podem colonizar diferentes nichos, como a rizosfera e o rizoplano (epifíticas da raiz) e endofiticamente nos mais variados órgãos, como raízes e folhas, por exemplo. Concluindo-se que estes, são ambientes ideais para o desenvolvimento bacteriano, por apresentarem a deposição de substâncias secretadas, que favorecem o desenvolvimento destes micro-organismos. Essas substâncias são ricas em fontes de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento e nutrientes que estimulam a atividade microbiana e a diversidade de espécies ali existentes (RAMOS, 2011).

O crescimento em plantas, a partir de bactérias promotoras de crescimento vegetal, pode ser realizado de forma direta, pela produção de hormônios de crescimento, ou indiretamente, quando se tem uma alteração na microbiota do solo. Várias espécies bacterianas podem induzir o crescimento radicular de maneira direta, este fator está atrelado à capacidade que estes organismos possuem em produzir fitomônios (SABINO et al., 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho teve objetivos:i) avaliara tolerância ao pesticida metomil e a potencial capacidade de biodegradação deste pesticida por bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Bacillus*;e ii) avaliar a produção de exopolissacarídeos sob estresse salino porbactérias promotoras de crescimento vegetal do *Pantoea*.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

O crescimento de plantas, a partir de bactérias promotoras de crescimento é sem dúvida uma ferramenta biotecnológica baseada na sustentabilidade ambiental e na inovação da produção agrícola, aprimorando o aperfeiçoamento no uso dos insumos e na sustentabilidade da produção vegetal, além de fixarem nitrogênio, produzirem fitohormônios, solubilizarem fósforo etc para as plantas (OLIVEIRA et al., 2017).

Além da sustentabilidade as bactérias promotoras de crescimento ,como por exemplo, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* ,e entre outras, possuem a capacidade de biodegradar pesticidas agrícolas (JOUTEY et al., 2013).Mostrando assim a grande importância de se conhecer mais sobre tais microrganismos e melhor compreendê- los , para melhor uso da sua relação bactéria- planta.

2.2 Importância da interação bactéria-solo-planta

A interação entre bactérias e plantas ocorre em diferentes nichos, no solo perto da superfície das raízes(comunidade rizosférica) ou no interior das plantas (comunidade endofítica) (HARTMANN et al., 2008) nos distintos órgãos (raiz,caule,folha,flores), podendo contribuir benéficamente com o crescimento e desenvolvimento vegetal (ANDREOTE, 2009).

As comunidades microbianas do solo e a microbiota associadas às plantas desempenham importante papel em funções vitais do ecossistema, atuando na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, degradação de xenobióticos, solubilização de nutrientes, produção de exopolissacarídeos e promoção de crescimento vegetal, dentre outras (COTTA, 2016).

2.3 Exopolissacarídeos (EPSs)

Os exopolissacarídeos (EPSs) são polímeros de carboidratos encontrados em uma ampla variedade de bactérias, que também possibilitam vida livre a bactéria, permitindo a aderência e colonização de superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (COSTERTON et al., 1987).

Envolvem as membranas da célula protegendo as do dessecação e outros estresses ambientais, e devido às cápsulas de natureza iônica, podem ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos a célula da bactéria. (SUTHERLAND, 1988; WHITFIELD, 1988, WEINER, et al, 1995). Segundo WEINER et al., (1995), os fatores ambientais que podem afetar a síntese de EPS incluem oxigenação, limitação de nitrogênio e cátions (magnésio, cálcio), dessecação, baixa temperatura, crescimento em meio mínimo e fase de crescimento, limitação de nutrientes.

Deacordo com Xavier (2009), a produção dos EPSs é muito comum em diversos gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio, apresentando relevância na interação bactéria-planta. Eles apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas, na indústria farmacêutica, como anticarcinógeno, e na indústria cosmética e alimentícia, como agente espessante e adoçante. Segundo Schiavão-souza et al (2007), os EPSs podem ser adicionados em vários produtos, especialmente em leites fermentados, atuando como agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou geleificantes.

2.4 Solubilização de fosfato

O solo é um dos maiores reservatório de fósforo, geralmente encontrado retido como, por exemplo, em solos intemperizados, onde o P é pouco disponível e encontrado na forma inorgânica não lábil. Algumas bactérias promotoras do crescimento possuem a habilidade de solubilizar fosfato inorgânico tornando-o disponível para as plantas podendo aumentar a produtividade da cultura (RODRIGUEZ et al., 2007).

A literatura relata que a capacidade dos micro-organismos em realizar a solubilização de fosfato está ligada aos ciclos biogeoquímicos (REITH et al., 2007). Souza et al. (2007) relatam que há maior disponibilidade de fosfato depende da fonte de

fosfato utilizada e do aumento do pH do meio. A solubilização de fosfato também é dita como uma característica fenotípica bacteriana que é geralmente usada para a caracterização de micro-organismos correlacionados com a promoção de crescimento das plantas (DIAS et al., 2009; JHA et al., 2011).

2.5 Fixação biológica de nitrogênio

As plantas absorvem o nitrogênio(N) na forma de NH_4 ou de NO_3 ou por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico. A fonte primária de nitrogênio para as plantas é o N_2 atmosférico, que corresponde a aproximadamente 78% dos gases da atmosfera, mas este é altamente estável devido a sua tripla ligação covalente, ficando indisponível para as plantas. Contudo, o N_2 pode torna-se disponível quando fixados através de reações químicas por processos industriais ou naturais. Entre os processos naturais, o de maior representatividade é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), no qual o N_2 atmosférico é reduzido até a forma de NH_3 (TAIZ E ZIEGER. 2004)

A fixação biológica de nitrogênio é um processo realizado por várias espécies bacterianas que podem se associar a diversas plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias de vida livre e associativas que podem ser endofíticas facultativas ou endofíticas obrigatórias(Oliveira et al., 2008; SENTHILKUMAR et al., 2011).Esses procariontes possuem um complexo enzimático chamado de nitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 atmosférico e provocar a sua redução até amônia (NH_3) (HUNGRIA et al ., 1997).

2.6 Inseticida (Metomil)

Uma das principais pragas do milho é pertencentes à ordem Lepidoptera, da família Noctuidade, a espécie *Spodoptera frugiperda*(J. E. Smith), conhecida vulgarmente como a lagarta do cartucho (FERNANDES et al., 2014). O inseto ataca a parte aérea, onde após a eclosão dos ovos, as lagartas, efetuam umas raspagens nas folhas (ROSA, 2011), e conforme os insetos vão crescendo fazem perfurações nas folhas, penetrando o cartucho, podendo danificar as espigas da cultura (MAPA, 2017).

Dentre os insumos agrícolas usados na produção agrícola do milho está o metomil, pesticida usado no controle da *Spodoptera frugiperda*, o mesmo faz parte do grupo químico metil carbamato de oxima, que atua na transmissão sináptica inibindo a enzima acetil colinesterase, ou seja, não permite a catalisação do neurotransmissor acetilcolina através de sua enzima, provocando assim a passagem contínua dos impulsos nervosos, levando o inseto à fadiga e, conseqüentemente, a morte (GALLO et al., 2002).

Ainda é comum usar somente o inseticidas na agricultura, objetivando uma maior praticidade e eficiência no controle da *Spodoptera frugiperda*. Existem vários inseticidas registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003) , como por exemplo estão os organofosforados, espinosinas, metilcarbamatos e entre outros e por conta do mal uso destes xenobióticos é bem visível a contaminação de solos, fontes hídricas, rios, lagos etc.Com isso o uso da biodegradação de pesticidas por bactérias é bastante importante e procurada nos estudos relacionados à remediação ambiental (JOUTEY et al., 2013).

2.7 Influência dos pesticidas sobre a microbiota associada à planta

O uso de micro-organismos vem sendo estudado quanto a biorremediação ambiental, visto que muitos dos solos agrícolas estão contaminados por xenobióticos nocivos ao meio ambiente, como por exemplo, os pesticidas. Dentre estes microrganismos estão as bactérias, do gênero *Bacillus*, que possuem capacidade de sobreviver em condições adversas, como a presença de xenobióticos e ainda expressarem características como a promoção de crescimento vegetal, além disso, possuem habilidade de preservar o meio ambiente usando os xenobióticos como fonte de carbono, biodegradando as substâncias poluentes.

2.7 Biorremediação e tolerância microbiológica a inseticidas

A aplicação de bactérias em sistemas agrícolas e ambientais está sendo explorado em diversos aspectos, inclusive visando a biorremediação ambiental, visto que muitas bactérias são versáteis quanto a tolerância e até biodegradação de compostos químicos, como os resíduos dos pesticidas que contaminam os solos agrícolas. Dentre tais bactérias, o gênero *Bacillus* se destaca por apresentar a capacidade de crescer em variados ambientes, possuindo habilidade de conservar o meio ambiente, através de sua habilidade em biodegradar compostos poluentes (PEREIRA et al., 2012).

Biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou micro-organismos são utilizados biotecnologicamente para remover ou reduzir poluentes no ambiente. Esse processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas subterrâneas, superficiais e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterros e áreas de contenção (GAYLARDE et al., 2005).

Detectar meios que promovam biodegradação de xenobióticos nos solos e, conseqüentemente, nas águas subterrâneas estão sendo alvos de estudos, e uma das alternativas que contribuem para essa questão são o uso de bactérias (JING-LIANG et al., 2009; MENDOZA et al., 2011). Entre muitos gêneros bacterianos descritos na literatura, quanto a degradarem hidrocarbonetos totais de petróleo, pesticidas e metais pesados tóxicos, estão inclusas bactérias do gênero *Bacillus* (MENEZES et al., 2003; NITSCHKE; PASTORE, 2002), que apresentam potencial de biorremediação de solos contaminados.

2.8 Salinidade

O termo salinidade ou caráter salino do solo refere-se à presença de sais mais solúveis em água fria que o sulfato de cálcio (gesso), em quantidade que interfere no desenvolvimento da maioria dos vegetais, que se expressa em uma condutividade do solo em alguma época do ano entre 4 e 7dS/m.), a salinidade pode ser oriunda de ações antrópicas e naturais.

Assim o processo de salinização do solo pode ocorrer, de uma maneira geral, em solos situados em regiões de baixas precipitações pluviais, alto déficit hídrico e que tenham deficiências naturais de drenagem interna. No Brasil, levando-se em consideração tão somente as precipitações pluviais e a distribuição destas ao longo do ano, pode-se separar regiões em: Semi-áridas - com período de seca igual ou superior a 6 meses por ano e precipitações médias anuais menores que 800mm; nesta classe situa-se 50% da área do Nordeste brasileiro. Semi úmidas - período de 4 a 5 meses por ano. Úmidas - período de 1 a 3 meses por ano. Muito úmida - sem seca.

Quanto menor o valor das precipitações médias anuais de uma região e maior a evapotranspiração potencial, maior é a possibilidade de salinização de seus solos quando irrigados, pois como resultado do maior déficit hídrico, menor é a possibilidade da lixiviação dos sais para horizontes mais profundos do solo (MANZOTTA et al., 2017).

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT: **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. 2003. Acessado em 15 de Janeiro. 2019. Disponível em : <http://extranet.agricultura.gov.br>

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.;AZEVEDO, J.L. **Diversidade molecular de microrganismos endofíticos**. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD; N. P.; SILVA SANTOS, C. E. R. *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1Ed. Guaíba.Agrolivros, 2008. P. 233-258.

BALDANI, V.L.D; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALADANI, J.L.; KIRCHHOF, G. DOBEREINER, J. *Burkholderiabrasilensissp. Nov.*, uma nova espécie de bactérias diazotróficaendofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 69:116, 1997.

COSTERTON, J. W.,et al. **Bacterial biofilms in nature and disease**. *AnnualReviewMicrobiology*. v. 41, p. 435-464, 1987.

DARTAORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D. e SANDER, G. **Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. V. 17, n. 10. 1023-1-29 p. Campina Grande. 2013.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, L. S.; **Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion.** World Journal Microbiol Biotechnol. 25: 189- 195, 2009.

FERNANDES, O.D.; PARRA, J.R.; NETO, A.F.; PÍCOLI, R.; BORGATTO, A.F. e DEMÉTRIO, C.G.B. **Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).** Revista Brasileira de Milho e Sorgo. V.2, n.2. 25-35 p. Piracicaba. 2003.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SANTOS, C.E.R.S e STAMFORD, N.P. **Biotecnologia aplicada à agricultura.** Textos de apoio e protocolos experimentais. Embrapa Agrobiologia. Primeira ed. 761 p. 2010.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. **Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos.** Biotecnologia ciência e desenvolvimento n.34, Janeiro-junho, 2005.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola.** 920 p. FEALQ. Piracicaba, 2002.

GOLDSTEIN, A. H. **Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects.** American Journal of Alternative Agriculture, Greenbelt, v. 1, n. 2, p. 51-57, 1986.

HARTMANN, A.; LEMANCEAU, P.; PROSSER, J.L. Multitrophic interactions in the rhizosphere. *Rhizosphere microbiology: at the interface of many disciplines and expertises*. FEMS Microbiology Ecology. 65:179, 2008.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A. T.; CAMPO, R.J.; GALERANI, P.R. **Adubação nitrogenada na soja**, Londrina: Embrapa Soja (Comunicado Técnico, 57), 1997. 4 p.

JOUTEY, N.T.; BAHAFID, W.; SAYEL, H. e GHACHTOULI, N.E. Biodegradation: **involved microorganisms and genetically engineered microorganisms**. Life of Science. Chapter 11. 289-320 p. 2013.

JHA, B.; GONTIA, L.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**. 346: 1-400, 2011.

JIN-LIANG, XU; JUN, WU; ZHI-CHUN, WANG; KUN, WANG; MENG-YING, LI; JIAN-DONG, JIANG; JIAN, HE e SHUN-PENG, LI. **Isolation and Characterization of a Methomyl-Degrading *Paracoccus* sp. Mdw-1**. *Pedosphere*. 238-243 p. China, 2009.

LIMA JÚNIOR, J.A.; SILVA, A.L.P. **Estudo do processo de salinização para indicar medidas de prevenção de solos salinos**. *Enciclopédia Biosfera*, v.6, n.11, p.1-21, 2010.

MANZATTO, C.V.; CELSO, E.F.; VAINER, J.R. **Uso agrícola dos solos brasileiros**. Editora- Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 174, 2017.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons_principal_agrofit_cons. Acesso em 17 de setembro de 2018.

MAPELLI, F.; MARASCO, R.; ROLLI, E.; BARBATO, M.; CHERRIF, H.; AMEL, G.; OUZARI, I.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. **Potential For Plant Growth**

Promotion of Rhizobacteria Associated With Salicornia Growth in Tunisian Hypersaline Soils. BioMed Research International, v.13, n 24, p.1-13, 2013.

MENDOZA, JOSÉ C.; PEREA, YAZMIN S.; SALVADOR, JAME A.; MORALES, JANETTE A. e PÉREZ, GABRIELA. **Biodegradación Bacteriana de Plaguicidas Permetrina Y Cipermetrina em Cultivo Lote.** Avances em Ciências e Ingeniería, vol. 2, n.3. 45-55 p. Puebla, México. 2011.

MENEZES, ANASTÁCIO F.; OKEKE, THOMAS W. **Biorremediação de Solos Contaminados por óleo Diesel.** Braz. J. Microbiol. vol.34 suppl.1 São Paulo Nov. 2003.

NIA, S.H; ZAREA, M.J.; REJALI, F.; VARMA, A. **Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil.** Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, v.11, p.113-121, 2012.

NITSCHKE, M.; PASTORE, GM. **Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações.** Quim. Nova, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002., Capinas-SP, 2002.

OLIVEIRA, A.L.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de mecanismos sobre o crescimento vegetal.** Embrapa Agrobiologia. Rio de Janeiro - 2017, documento 161.

OLIVEIRA, P.J.; SILVA, M.L.R.B.; LIRA, M.C.C.P.; BURITY, H.A. **FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO associativa e em vida livre.** In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N, P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura.** 2008, p 97-118.

PROCÓPIO, S.O.; FERNANDES, M.F.; TELES, D.A.; FILHO, J.G.S.; FILHO, A.C. REIS, V.M. **Efeitos de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar sobre a fixação biológica do nitrogênio in vitro da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.** In: **Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 29. 2010. Anais.** Guarapari, 2010.

PEREIRA, A.P.A.; SILVA, M.C.B.; OLIVEIRA, J.R.S.; RAMOS, A.P.S.; FREIRE, M B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de Burkholderia spp. Endofíticas de cana - de - açúcar.** Bioscience Journal, v.28, p. 112-121, 2012.

REITH, F.; LENGKE, M. F.; FALCONER, D.; CRAW, D.; SSOUTHAM, G. The geomicrobiology of gold. **The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal.** 1:567-584, 2007.

ROSA, G.S. **Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 160 p. 2006.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Developments in Plant and Soil Sciences.** 102: 15-21, 2007.

SANTOS, T.T e VARAVALLO, M.A. **Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico.** Semina: Ciência Biológica e da Saúde. V.32, n.2. 199-212 p. Londrina. 2011.

SOUZA, C. E. S.; **Uso de Inoculantes polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana – de – açúcar.** Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Seropédica: Rio de Janeiro. 2009.

SENTHILKUMAR, M.; ANAADHAM, R.; MADHAIYAN, N.; VENKATESWARAN, V.; SA, T. **Endophytic Bacteria: Perspectives and Applications in Agricultural Crop Production,** 61-96 p. in: MAHESHESHWARI, D.K. Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems. 2011, 434 p.

SUTHERLAND, I. W. **Bacterial surface polysaccharides: structure and function.** International Review of Cytology, v. 113, p. 187-231, 1988.

TAÍZ,L.; ZIEGER. E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R et al., terceira edição., Porto Alegre: Artemed, 2004, 719 p.

WEINER, R.;LANGILLE, S. and QUINTERO, E. **Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides**. Journal of Industrial Microbiology, v.15, p.339-346, 1995.

WHITFIELD, C. **Bacterial extracellular polysaccharides**. Canadian Journal Microbiology v. 34, p. 415-420,1988.

XAVIER, T. F. 2009. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos (EPSs) sintetizados por microrganismos diazotróficos**.Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia, Recife.

CAPÍTULO 1: INFLUÊNCIA DO INSETICIDA METOMIL SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL DO GÊNERO *BACILLUS*.

3.1 INTRODUÇÃO

A previsão da segunda maior colheita de grãos do Brasil, com uma produção de 232,6 milhões de toneladas, está mantido no levantamento da Safra de Grãos 2017/2018. A estimativa de área é também destaque, com a entrada de números das culturas de inverno e outras, podendo se tornar a maior da série histórica, ou seja, 61,5 milhões de hectares. Os maiores volumes são da soja, responsável pelo bom desempenho produtivo e cujo avanço da colheita vem confirmando a boa produtividade, e do milho total. A leguminosa registra 117 milhões e o cereal 89,2 milhões de toneladas. Já o milho segunda safra responde por 70% de sua colheita (62,9 milhões de t), cabendo ao milho primeira safra 26,3 milhões de toneladas, segundo a CONAB (2018).

O Brasil é um dos maiores líderes mundiais na produção de cereais, legumes, grãos etc e suas estimativas para a safra 2018/19 indicam incremento na agricultura brasileira referente à área de grãos, à produtividade média esperada dessas lavouras e a produção final, quando comparada aos resultados obtidos na temporada passada. Para a área, por exemplo, a expectativa é que sejam utilizados algo entre 61.873,9 mil hectares (limite inferior) e 63.146 mil hectares (limite superior). Esses números representam uma variação positiva entre 0,2% e 2,3% em comparação àquela área utilizada na safra 2017/18. A produção total de grãos apresentará variação, tendo como limite inferior uma estimativa na ordem de 233,6 milhões de toneladas (2,5% maior em relação ao valor final de grãos produzidos na safra anterior) e o limite superior de 238,5 milhões de toneladas, acréscimo de 4,7% em comparação a 2017/18(CONAB, 2018).

Diante da ampliação e contínuo crescimento agrícola brasileiro, o desenvolvimento produtivo deve ocorrer em paralelo com o uso de técnicas agrícolas que visem à viabilidade econômica com minimização da degradabilidade do meio ambiente e aumentos na produtividade. Assim, a busca por sistemas de manejo de

cultivo que propiciem a sustentabilidade das culturas, com aumento de produtividade e diminuição de insumos agrícolas deve nortear as principais culturas brasileiras, buscando sempre o equilíbrio sustentável ao meio ambiente, neste contexto, a aplicação de microrganismos no manejo de sistemas agrícolas representa uma alternativa viável e de grandes perspectivas.

A interação entre bactérias e plantas ocorre em diferentes nichos, no solo perto da superfície das raízes, ou no interior das plantas (HARTMAN et al., 2008) nos distintos órgãos (raiz, caule, folha, flores), podendo contribuir beneficemente com o crescimento e desenvolvimento vegetal (ANDREOTE et al., 2009).

O uso de bactérias vem sendo estudado quanto a biorremediação ambiental, visto que muitos solos agrícolas estão contaminados pelo resíduo dos pesticidas. Dentre tais bactérias, está o gênero *Bacillus*, que possui a capacidade de crescer em diversos ambientes e serem capazes de promover o crescimento em plantas, possuindo habilidade de contribuir com a conservação do meio ambiente, especialmente por biodegradar compostos poluentes (PEREIRA et al., 2012).

Dentre os insumos agrícolas utilizados na produção agrícola, encontram-se os inseticidas, compostos químicos que ao entrarem em contato com os insetos, atuam no bloqueio de algum processo fisiológico ou bioquímico (GALLO et al., 2002). Detectar meios que promovam biodegradação desses resíduos encontrados nos solos e , conseqüentemente, nas águas subterrâneas estão sendo alvos de estudos, e uma das alternativas que contribuem para essa questão são o uso de bactérias (JING-LIANG et al., 2009; MENDOZA et al., 2011).

Entre muitos gêneros bacterianos descritos na literatura, quanto a degradarem hidrocarbonetos totais de petróleo, pesticidas e metais pesados tóxicos, estão inclusas bactérias do gênero *Bacillus* (MENEZES et al.,2003;NITSCHKE; PASTORE, 2002), que apresentam potencial de biorremediação de solos contaminado.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de biodegradação e tolerância de duas linhagens bacterianas promotoras de crescimento

vegetal do gênero *Bacillus* (UAGAT35 e UAGAT71) quanto ao inseticida metomil, utilizado no controle da *Spodoptera frugiperda*, praga chave da cultura do milho.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas duas linhagens bacterianas de *Bacillus* sp., UAGAT35 e UAGAT71, previamente isoladas de Atriplex e caracterizadas como promotoras de crescimento vegetal (SILVA et al., 2016). Essas bactérias foram mantidas em meio TSA (Trypticase Soy Agar) e sob refrigeração de 4 °C, no laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG – UFRPE).

3.2.2 Inseticida metomil

Para a avaliação a biodegradação e a tolerância ao metomil, foi avaliado um inseticida comercial utilizado no controle da *Spodoptera frugiperda* em milho, o Lannate BR, que tem o Metomil como ingrediente ativo (215 g.i.a L), fabricante DuPont.

3.2.3 Metodologia para avaliar a tolerância bactérias do gênero *Bacillus* ao inseticida metomil.

As bactérias foram inoculadas a partir de colônias isoladas em meio TSA (Trypticase Soy Agar) 10% líquido, sendo mantidas sob agitação constante (125 rpm), durante 24-48 horas. Após, retirou-se 2mL do inóculo para a verificação da densidade óptica em espectrofotômetro (600 nm), sendo transferidos 10 microlitros do inóculo bacteriano para tubos contendo 25 mL de Meio Mínimo Mineral (MMM) líquido modificado: 3 g K₂HPO₄ ; 0,5 g KH₂PO₄ ; 1,25 g (NH₄)₂SO₄ ; 10 mg NaCl; 100 mg MgSO₄; 1 mg : FeSO₄ · 7H₂O por litro, com PH 7,3 (MENDONZA et AL. , 2011), acrescido de glicose (10 g.l) como fonte de carbono, seguido dos seguintes tratamentos: 0 mg L⁻¹ – 25 mg L⁻¹ – 50 mg L⁻¹ – 100 mg L⁻¹ – 200 mg L⁻¹ do inseticida Metonil. Em seguida, as amostras foram inoculadas sob agitação constante (124 rpm), à 28 °C.

Durante 11 dias, a densidade Óptica foi verificada em seis leituras, em intervalos de 24 horas para as cinco primeiras leituras e um intervalo final de 6 dias para a última leitura. O experimento foi realizado em triplicata, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.4 (FERREIRA, 2010).

3.2.4 Metodologia para avaliar a biodegradação das bactérias do gênero *Bacillus* ao inseticida metomil.

A metodologia utilizada para avaliar o potencial de biodegradação das duas linhagens bacterianas de *Bacillus* sp., UAGAT35 e UAGAT71, foi a mesma da tolerância, diferindo apenas na questão da fonte de carbono, pois na análise da tolerância foi acrescido em todos os tratamentos, a glicose (10 g.l) como fonte de carbono. Contudo, para avaliar a capacidade de usar o metomil como fonte de carbono, o pesticida deve ser a única fonte de carbono nos meios de cultura, logo, a glicose não foi acrescida.

O experimento foi realizado em triplicata, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.4 (FERREIRA, 2010)

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Tolerância bacteriana na presença do inseticida metomil

Ambas as bactérias ,*Bacillus*UAGAT 35 e UAGAT 71,apresentaram tolerância ao inseticida metomil, uma vez que foram capazes de se desenvolver nas diferentes concentrações avaliadas, tanto quanto no meio sem a presença do inseticida.

Aislabie e Lloyd-Jones(1995) afirmam que um dos fatores de influência da biodegradação é a presença de outras fontes de carbono, o que pode ser um fator que favoreça a degradação desse inseticida pelas bactérias avaliadas no presente trabalho, já que havia como fonte alternativa a glicose a ser usado pelas duas linhagens bacterianas.

Do primeiro ao último dia de avaliação não ocorreu diferença estatística entre as duas linhagens (figuras 3 e 4). As duas linhagens até o quinto dia responderam com um crescimento muito lento em relação aos tratamentos 25,50,100 e 200 mgL⁻¹. Porém, do quinto dia até o décimo primeiro dia houve crescimento constante nas duas linhagens a estes tratamentos, como mostram os gráficos. Com isso, conclui-se que às bactérias, até o quinto dia, não possuía alta tolerância ao metomil, porém, ocorrido um intervalo de 6 dias, entre a quinta e sexta leitura, às bactérias apresentaram crescimento, isso demonstrou que houve certa adaptação dos grupos bacterianos no decorrer dessas duas leituras, ou seja, a variável tempo foi crucial para que as duas linhagens mostrassem tolerância.

Com o crescimento bacteriano entre as duas linhagens nos tratamentos, foi possível observar e inferir que a alta concentração do pesticida foi utilizado pelo micro-organismo como substrato extra de carbono para o seu metabolismo (MELO; AZEVEDO, 1997; ROSA, 2006).

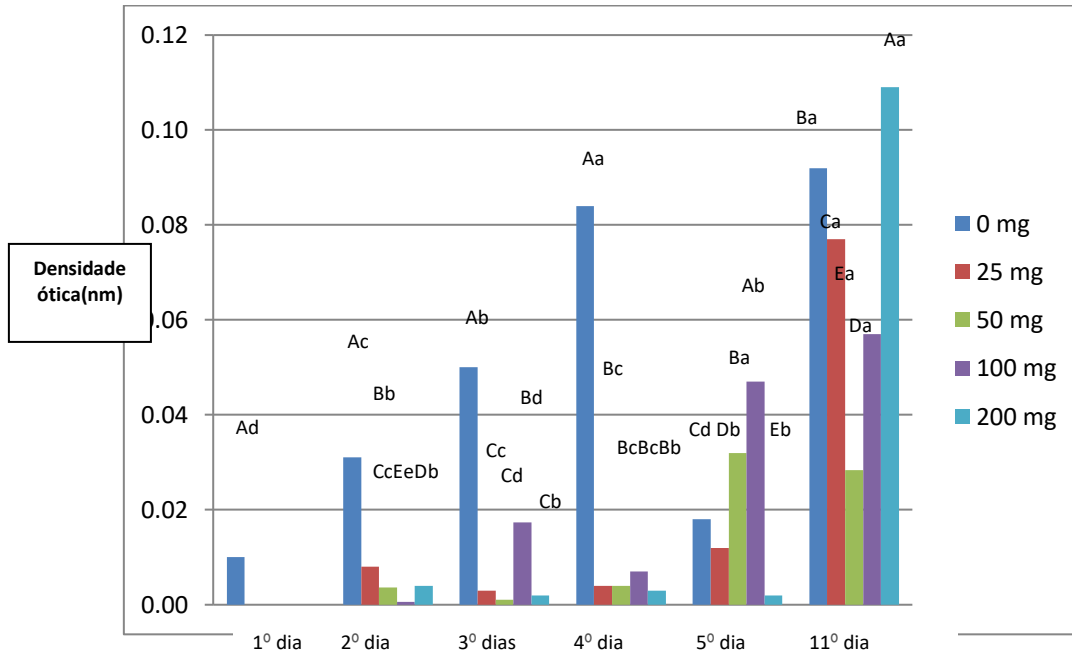


Figura 3. Crescimento bacteriano da linhagem Bacillus UAGAT 35, analisado via espectro fotometro por densidade ótica (600 nm) em 11 dias com seis leituras, com seguintes tratamentos: 0 mg L⁻¹ – 25 mg L⁻¹ – 50 mg L⁻¹ – 100 mg L⁻¹ – 200 mg L⁻¹ do inseticida Metomil. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

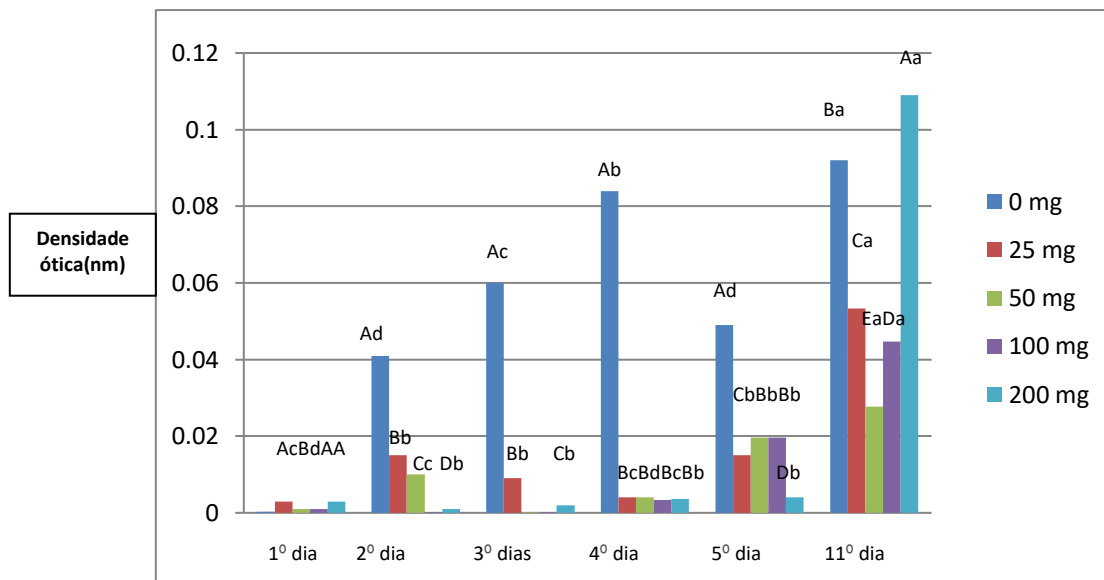


Figura 4. Crescimento bacteriano da linhagem *Bacillus* UAGAT 71 ,analisado via espectro fotometro por densidade ótica (600 nm) em 11 dias com seis leituras, comseguintestratamentos: 0 mg L^{-1} – 25 mg L^{-1} – 50 mgL^{-1} – 100 mgL^{-1} – 200 mgL^{-1} do inseticida Metomil.As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

4.3.3 Potencial de degradação bacteriana a diferentes concentrações do inseticida metomil.

Ambas as bactérias, UAGAT 35 e UAGAT 71, apresentaram biodegradação do inseticida metomil, uma vez que foram capazes de se desenvolverem nas diferentes concentrações avaliadas. Apesar do crescimento das linhagens de *Bacillus* ter sido lento, pois foi observado maior crescimento bacteriano nos últimos dias de avaliação, a única fonte de carbono disponibilizada foi apenas o pesticida metomil, isso mostra que as linhagens foram capazes de utilizar o pesticida como fonte de carbono em seus processos metabólicos de forma eficiente para seu desenvolvimento e sobrevivência (Figura 1).

O gênero bacteriano *Bacillus* sp é mencionado quanto a capacidade de degradar vários compostos químicos (BATISSON et al., 2008; VARGHA et al., 2005 apud; SENE et al., 2010). E neste experimento, os resultados de biodegradação das linhagens de *Bacillus* sp, UAGAT35 e UAGAT71 não foram diferentes, pois ambas bactérias conseguiram realizar o processo de biodegradação do pesticida nas distintas concentrações de metomil submetidas, a partir, principalmente, do quinto dia de cultivo.

Existe um intervalo de 5 dias entre a quinta e sexta leitura, isso foi o suficiente para que ambas as bactérias no tratamento 25,50,100 e 200mgL⁻¹ começassem a responder, pois antes da quinta leitura a resposta a biodegradação não estava sendo tão eficiente nestes tratamentos, isso nos mostra que ao passar dos dias as bactérias foram ativando vias bioquímicas que permitissem a biodegradação do pesticida.

Entre ambas as bactérias, houve melhor resposta na biodegradação e consequentemente no crescimento bacteriano entre o quinto ao décimo primeiro dia de cultivo. E em relação ao desdobramento dos diferentes tratamentos, não houve diferença estatística entre as bactérias.

Ambas bactérias desde o terceiro dia em diante, no tratamento controle, apresentaram crescimento, e em relação aos demais tratamentos as duas linhagens só vieram apresentar um certo crescimento a partir do quinto dia em diante, exceto a linhagem UAGAT 71 no tratamento 50 mgL⁻¹ no terceiro dia de avaliação, pois já tinha demonstrado uma certa resposta na biodegradação do inseticida metomil (tabela 1).

Tabela 1. Crescimento bacteriano da linhagem UAGAT 35 do gênero *Bacillus* sp., analisado via espectro fotometro por densidade ótica (600 nm) em 11 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

<i>Bacillus</i> UAGAT 35					
METOMIL					
DIA	0 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹
1	0,000 B d	0,000 B c	0,000B b	0,000 B b	0,000 B b
2	0,000B d	0,000 B c	0,000B b	0,000 B b	0,000B b
3	0,03667A c	0,000 B c	0,000 B b	0,000 B b	0,000 B b
4	0,04667A c	0,000B c	0,000B b	0,000B b	0,000B b
5	0,09333A b	0,06667B b	0,05000B a	0,0000C b	0,0000C b
11	0,2133A a	0,10333B a	0,07000B a	0,1000B a	0,08000B a

Tabela 2. Crescimento bacteriano da linhagem UAGAT 35 do gênero *Bacillus* sp., analisado via espectro fotometro por densidade ótica (600 nm) em 11 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

Bacillus UAGAT 71					
METOMIL					
DIA	0 mg L⁻¹	25 mg L⁻¹	50 mg L⁻¹	100 mg L⁻¹	200 mg L⁻¹
1	0,000 Bd	0,000 Bc	0,000 Bc	0,000 Bc	0,000 Bc
2	0,000 Bd	0,000 Bc	0,000 Bc	0,000 Bc	0,000 Bc
3	0,0300 Ac	0,000 Bc	0,0200 Ab	0,000 Bc	0,000 Bc
4	0,0400 Ac	0,00 Bc	0,0333 Ab	0,000 Bc	0,000 Bc
5	0,0900 Ab	0,0900 Ab	0,0600 Ba	0,0033 Cb	0,0033 Cb
11	0,240 Aa	0,193 Aa	0,500 Ca	0,096 Ba	0,090 Ba

4.4 CONCLUSÃO

As bactérias UAGAT35 e UAGAT71, do gênero *Bacillus*, foram capazes de crescer em diferentes concentrações do inseticida metomil, ou seja, apresentaram tolerância até concentrações maiores que a aplicação no campo. Com isso, as mesmas podem ser usadas melhor exploradas em programas de manejo integrado, visando até a capacidade de biorremediação de inseticidas. As duas linhagens UAGAT35 e UAGAT71, no que tange a biodegradação, foram igualmente capazes de biodegradar o pesticida metomil nas diferentes concentrações avaliadas, sendo as duas linhagens promissoras para avaliações futuras, visando a biorremediação de ambientes contaminados por pesticidas.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acompanhamento da safra brasileira de grãos: V. 6 - SAFRA 2018/19- N. 1 - Primeiro levantamento | OUTUBRO 2018 – Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab 2018.

ALIZADEH, H.; BEHBOUDI, K.; AHMADZADEHA, M.; JAVAN-NIKKHAHA, M.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C M. J.; BAKKER, P. A. H. M. **Induced systemic resistance in cucumber and Arabidopsis thaliana by the combination of Trichoderma harzianum Tr6 and Pseudomonas sp. Ps14.** Biological Control. V.65, 14-23 p. 2013.

ANDREOTE, F .D.; LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J.L. **Diversidade molecular de microrganismos endofíticos.** In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITTY, H. A.; STAMFORD; N. P.; SILVA SANTOS, C. E. R. Microrganismo e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1Ed. Guaíba. Agrolivros, 2008. P. 233-258.

BATISSON, I; CROUZET, O; BESSE-HOGGAN, P; SANCELME, M; MANGOT, JF; MALLET, C; BOHATIER, J. **Isolamento e Caracterização de Bacillus sp. do Solo.** Editado por Bernd Nowack Volume 157, Edição 4, Páginas 1063-1396 (abril de 2009).

CONAB: **Companhia Nacional de Abastecimento. 2018. 2003. Acessado em 17 de set. 2018.** Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2359-safra-de-graos-volta-a-nivel-historico-com-producao-de-232-milhoes-de-toneladas>

FERREIRA, D.F SISVAR- **Sistema de análise de variância. Versão 5.4** UFPA- MG Lavras, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola.** 920 p. FEALQ. Piracicaba, 2002.

HARDMAN, A. M.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International of general and Molecular Microbiology**. 74:199-210, 1998.

JIN-LIANG, XU; JUN, WU; ZHI-CHUN, WANG; KUN, WANG; MENG-YING, LI; JIAN-DONG, JIANG; JIAN, HE e SHUN-PENG, LI. **Isolation and Characterization of a Methomyl-Degrading Paracoccus sp. Mdw-1**. Pedosphere. 238-243 p. china, 2009.

MENDOZA, JOSÉ C.; PEREA, YAZMIN S.; SALVADOR, JAME A.; MORALES, JANETTE A. e PÉREZ, GABRIELA. **Biodegradación Bacteriana de Plaguicidas Permetrina Y Cipermetrina em Cultivo Lote**. Avances em Ciências e Engenharia, vol. 2, n.3. 45-55 p. Puebla, México. 2011.

MELO, L. S., AZEVEDO, J.L. **Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo. 167-183 p. 1997.

MENEZES, ANASTÁCIO F.; OKEKE, THOMAS W. **Biorremediação de Solos Contaminados por óleo Diesel**. Braz. J. Microbiol. vol.34 suppl.1 São Paulo Nov. 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, GM. **Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações**. Quim. Nova, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002., Capinas-SP, 2002.

PEREIRA, A,R; FREITA, D.A. **Uso de Microorganismos Para a Biorremediação de Ambientes Impactados**. Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. v(6), nº 6, p. 975 – 1006, 2012.

ROSA, G.S. **Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo**. Dissertação, Mestrado. Programa de Pós- graduação em Engenharia Ambiental- Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 160 p. 2006.

SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G.A.R.; SIMAO, R.C.G. **New aspect on atrazine biodegradation**. Braz. Arch. Biol. Technol. 2010, vol.53, n.2.

SILVA, G.F; SANTOS, I.B; SOUSA, A.J; FARIAS, A.R; DINIZ, P.W; SOBRAL, K.S; FREIRE, M.B. **Bioprospecting and plant growth-promoting bacteria tolerant to salinity associated with *Atriplexnummularia* L. in saline soils.** AfricanJournalofMicrobiologyResearch. Vol. 10(31), pp. 1203-1214, 21 August, 2016.

VARGHA, M., TAKATS, Z., MARIALIGETI K. (2005). **Degradação da atrazina em um sistema modelo em escala de laboratório com o rio Danúbio sedimentos.** Wat. Res., 39 , 1560 - 1568.

CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SALINO SOBRE O DESENVOLVIMENTO NA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL DO GÊNERO *PANTOEA*

5.1 INTRODUÇÃO

A salinidade é um termo que qualifica uma situação de excesso de sais solúveis ao solo no ambiente radicular onde as plantas estão se desenvolvendo. Este processo é um dos principais causadores de degradação de solos em regiões de clima árido e semi-árido, culminado em sérios prejuízos no rendimento agrícola (LIMA JÚNIOR et al., 2010; MAPELLI et al., 2013).

Este problema é mundial, em nosso país, Brasil, a região do nordeste se destaca com tal problemática, isso é consequência pelo manejo inadequado nos sistemas de irrigações e abandono de terras, principalmente as próximas do perímetro irrigado, limitando a produção de culturas comerciais e degradando habitat ecossistêmicos.

Para contribuir com recuperação desses solos degradados, as bactérias promotoras de crescimento vegetal tem demonstrado úteis no desenvolvimento de estratégias na promoção de crescimento de plantas em solos salinos, com o intuito de melhorar a produção de material vegetal e, com isso, a extração de sais(NIA et al., 2012).

Diversos gêneros bacterianos, como por exemplo, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea* etc, vivem associadas às plantas, estão relacionadas à promoção do crescimento vegetal, como detectado por Kuklinsky-Sobal et al. (2004). Além dessa relação com às plantas existem fatores abióticos e bióticos no solo que são determinantes na vida destes microrganismos, tais como clima, agroquímicos, salinidade, tipo de solo etc (COMPANT et al., 2010; KUKLINSKY-SOBAL et al., 2005; MALKONES, 2000).

Esses micro-organismos promovem o ajuste direto de mecanismos diretos, como a solubilização de nutrientes, fixação de nitrogênio, síntese de fitohormônio, produção de exopolissacarídeos entre outros, tais características podem atuar na solução de problemas nutricionais e fitossanitários, como também diminuir a utilização de agroquímicos e evitar a salinização dos solos, por excesso de adubos químicos (COMPANT et al., 2010).

As plantas encontram nutrientes essenciais para o seu crescimento no solo, porém para que um elemento nutriente possa ser absorvido, ele deve estar em uma forma solúvel (EPSTEIN et al, 2005). Para obter produtividade em ambientes que estão sob estresse salino, por exemplo, é necessário buscar alternativas de manejo que viabilize a produção nessas áreas.

Os micro-organismos que habitam o sistema biológico do solo possuem funções de grande importância, como a degradação de compostos orgânicos e ciclagem de nutrientes (MIRANSARI, 2013), às plantas na absorção de nutrientes (MIRANSARI, 2013; CHAGNON et al., 2013).

Vários micro-organismos simbióticos são capazes de tolerar essa condição de estresse, possibilitando grande resiliência às plantas. Essa tolerância pode estar em consequência da produção de substâncias que auxiliam nos ajustes osmóticos da planta como os exopolissacarídeos (EPS). Os exopolissacarídeos bacterianos desempenham um importante papel na ecologia de bactérias. Além disso, participam da sinalização molecular no processo de simbiose com plantas e de formação de biofilme (RUMJANEK et al., 2004; FUJISHIGE et al., 2008; RINAUDI & GIORDANO, 2010).

Desempenham também, importante papel na ciclagem do fósforo (P) do solo, disponibilizando este nutriente através de meios biológicos, sendo alternativa viável, com a substituição do fertilizante pelas bactérias solubilizadoras de fosfato (ALIA et al., 2013), podendo proporcionar a disponibilidade de P para as plantas, através da hidrólise de formas orgânicas para formas inorgânicas, em decorrência da ação de enzimas hidrolíticas, principalmente fosfatase ácidas (SANTOS et al., 2012).

Inúmeros micro-organismos têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS), e essa aptidão permite a adaptação a várias situações de estresse ambientais como o salino, variações de temperatura e estresse hídrico. No entanto, o EPS possibilita vida livre a bactérias, permitindo a aderência e colonização às superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam, ressaltando-se, ainda, que esta substância envolve as membranas das células protegendo-as do dessecação e de outros estresses ambientais, além de poder ajudar na fixação de nutrientes próximos á bactérias (FLEMMING et al.,2010; BARRETO et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de Exopolissacarídeos por cinco linhagens bacterianas do gênero *Pantoea* (UAGC 906,UAGC 977,UAGC 858, UAGC 907 e UAGC 972) em diferentes concentrações de NaCl(0%, 1%, 2,5%, 5% e 7,5%).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas cinco linhagens bacterianas do gênero *Pantoea* (UAGC 906,UAGC 977,UAGC 858, UAGC 907 e UAGC 972), previamente isoladas de plantas de cana-de-açúcar e caracterizadas como promotoras de crescimento vegetal (LIMA et al., 2018). Essas bactérias foram mantidas em meio TSA (TripcaseSoy Agar) e sob refrigeração de 4 °C, no laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG – UFRPE).

5.2.2 Produção de exopolissacarídeos

Para produção de exopolissacarídeos, as cinco linhagens bacterianas do gênero *Pantoea* foram cultivadas em meio líquido (TSA) 10% e, logo após realizou-se a inoculação de 5 µL do inóculo cultivado em discos de 5 mm de diâmetro em meio de cultura sólido modificado (20 g L⁻¹ de extrato de levedura; 15 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄; 0,015 g L⁻¹ de MnSO₄; 0,015 g L⁻¹ de FeSO₄; 0,03 g L⁻¹ de CaCl₂; 0,015 g L⁻¹ de NaCl; 15 g L⁻¹ de Agar).

5.2.3 Avaliar o potencial de tolerância das 5 linhagens bacterianas, do gênero bacteriano *Pantoea* diferentes concentrações salina, NaCl.

Em seguida, foram adicionados 10% da fonte de carbono, a sacarose, em pH 7,3, sendo cultivadas por 24 horas, no qual foi adicionado diferentes concentrações de NaCl(0%, 1%, 2,5%, 5% e 7,5%), em cada tratamento, para avaliar a tolerância das cinco linhagens bacterianas do gênero *Pantoea* (UAGC 906,UAGC 977,UAGC 858, UAGC 907 e UAGC 972) em temperatura ambiente de 28°C. Durante 10 dias, o crescimento do halo foi medido com auxílio de um paquímetro, sendo feito cinco leituras, em intervalos de 48 horas .

O experimento foi realizado em triplicata, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.4 (FERREIRA, 2010).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostram as (figuras 4,5,6,7 e 8) foi possível observar no experimento que todas as linhagens bacterianas produziram EPS em todas as concentrações de NaCl, mas com um decréscimo na produção em função do aumento da concentração de sal.

Nas concentrações 5 e 7,5% todas as linhagens bacterianas demonstraram comportamento similar, pois a produção de exopolissacarídeo (EPS) foi menor, nesta concentração, quando comparada com as demais concentrações de NaCl, isso se explica por serem as maiores concentrações salinas do experimento, entretanto isso não as inibiu de produzir o EPS.

Pois ao longo dos dias as mesmas aumentaram sua produção de EPS, o tratamento que houve uma melhor resposta na produção de EPS, exceto o tratamento controle que sobressaíram todos os tratamentos, foi o 1% e 2,5% em todas as linhagens bacterianas, entretanto houve uma particularidade nas bactérias UAGC 906 e 977, as mesmas apresentaram na primeira leitura, 2º dia, uma produção de EPS menor, quando comparado a concentração 7,5 de NaCl, porém na segunda leitura em diante, 4º dia, tais bactérias na concentração 5% sobressaíram na produção de EPS, quando comparado a concentração 7,5% de NaCl.

Apesar destas diferenças, todas as linhagens responderam bem as diferentes concentrações de NaCl, mostrando que as linhagens (UAGC 906, UAGC 977, UAGC 858, UAGC 907 e UAGC 972) do gênero *Pantoea* tem um grande potencial a ser mais explorado na categoria da produção de exopolissacarídeos em condições de estresse salino.

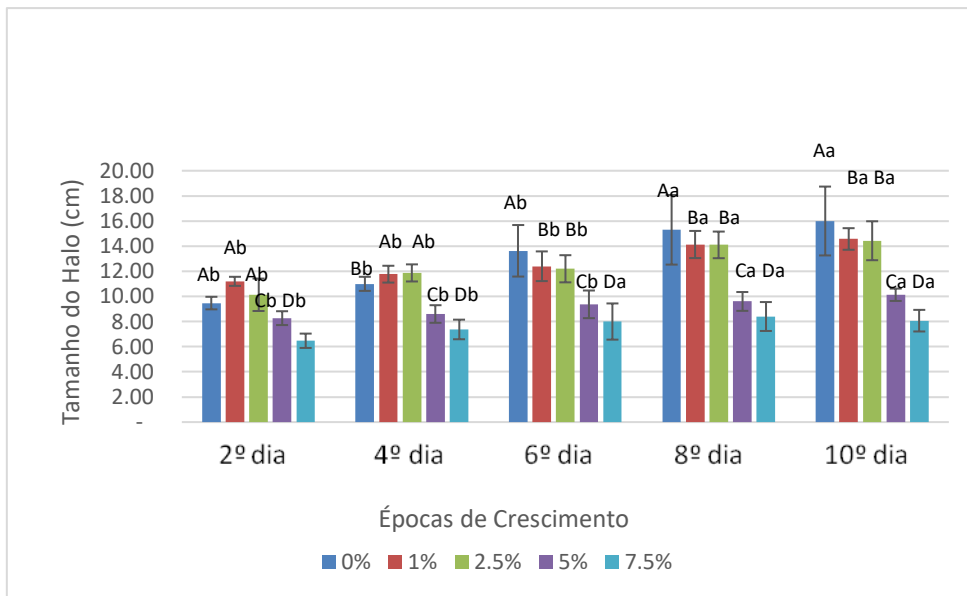


Figura 4. Produção de exopolissacarídeos (EPS), halo em cm, das linhagens bacterianas UAGC 858 *Pantoea*, sob concentrações diferentes de NaCl, durante 10 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

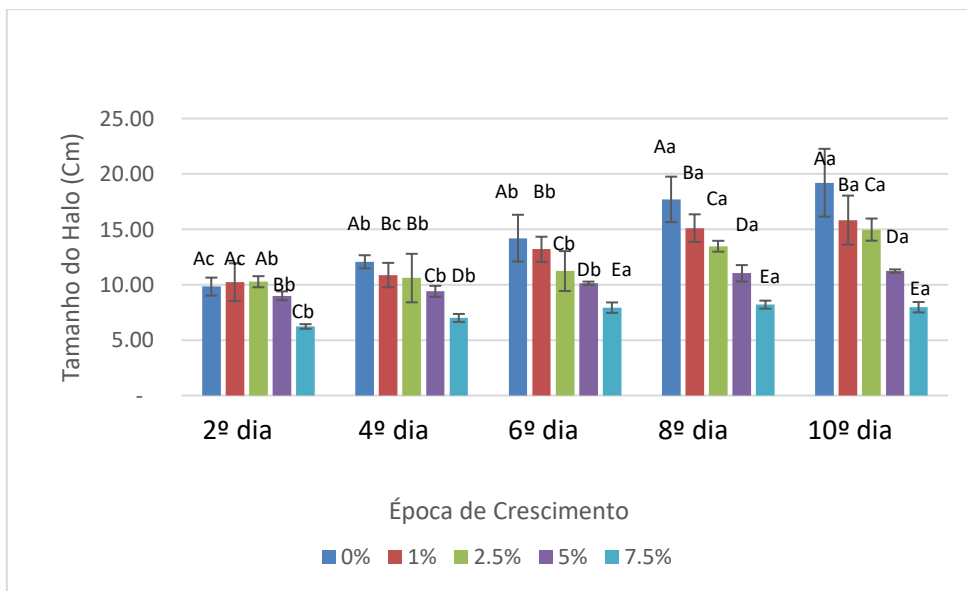


Figura 5. Produção de exopolissacarídeos (EPS), halo em cm, das linhagens bacterianas UAGC 907 *Pantoea*, sob concentrações diferentes de NaCl, durante 10 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

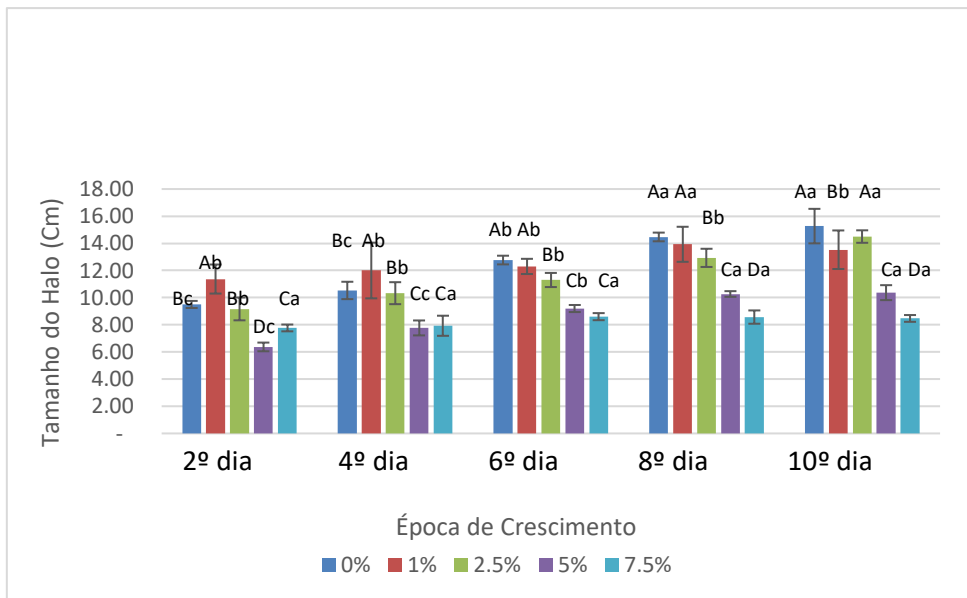


Figura 6 .Produção de exopolissacarídeos (EPS), halo em cm, das linhagens bacterianas UAGC 906 *Pantoea*, sob concentrações diferentes de NaCl, durante 10 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

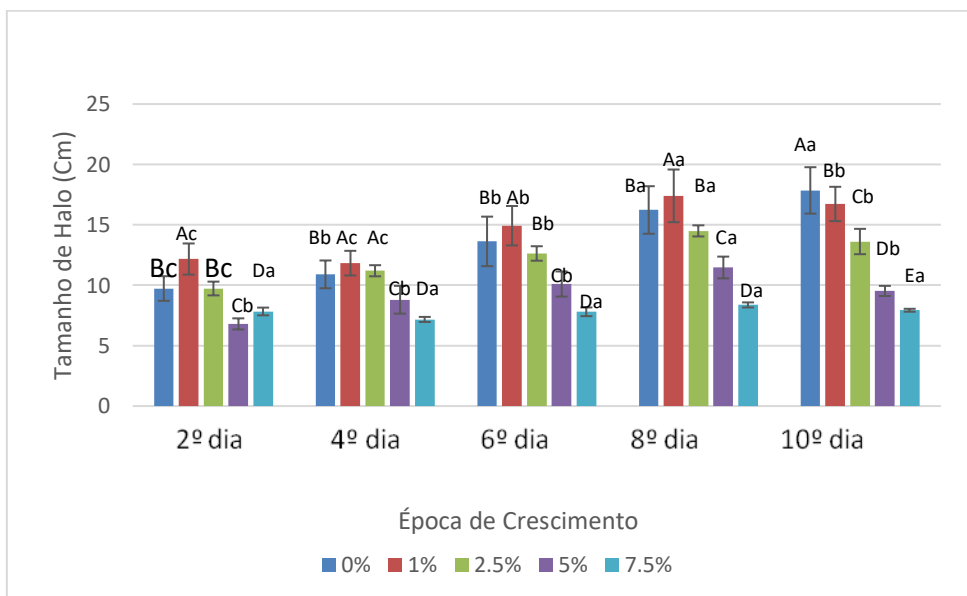


Figura 7 .Produção de exopolissacarídeos (EPS), halo em cm, das linhagens bacterianas UAGC 977 *Pantoea*, sob concentrações diferentes de NaCl, durante 10 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

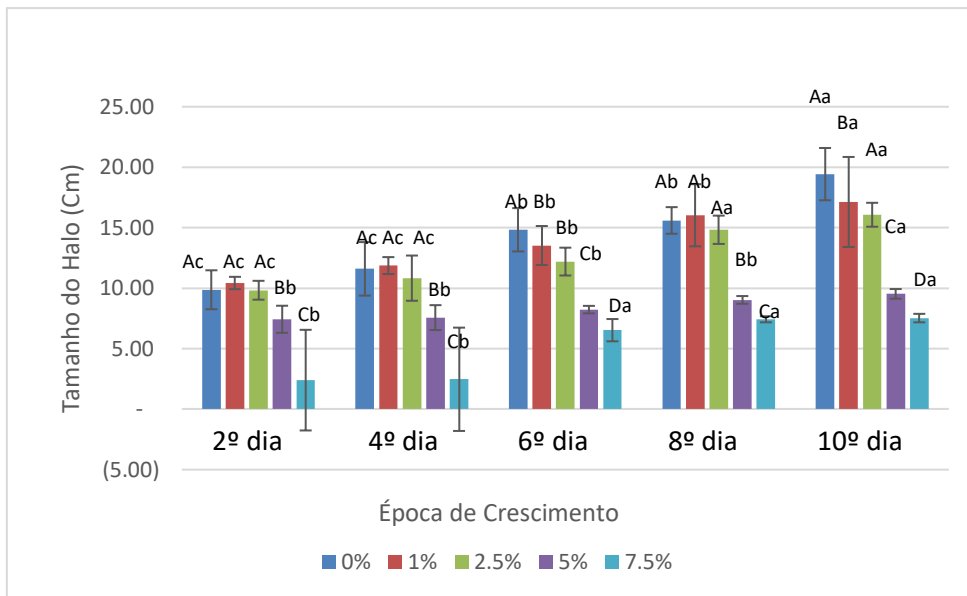


Figura 8. Produção de exopolissacarídeos (EPS), halo em cm, das linhagens bacterianas UAGC 972 *Pantoea*, sob concentrações diferentes de NaCl, durante 10 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam o melhor tratamento em cada dia e as minúsculas o melhor crescimento entre os dias, em cada tratamento.

5.4 CONCLUSÃO

As bactérias do gênero *Pantoea* são promotoras de crescimento vegetal, propiciando para as planta um maior rendimento produtivo em biomassa e consequentemente uma maior rentabilidade para o produtor, e mesmo estando em condições de estresse ,que no nosso caso foi em estresse salino,foi possível demonstrar que tais linhagens (UAGC 906,UAGC 977,UAGC 858, UAGC 907 e UAGC 972) do gênero *Pantoea* foram capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS), podendo assim trazer benefícios produtivos mesmo em condições de estresse para a planta.Tornando-se uma das ferramentas biotecnológicas ,que sendo mais exploradas,viáveis e benéficas nas produções agrícolas sob condições adversas,como por exemplo, a seca e solos salinos.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIA, A. A.; KHOKHAR, S. N.; JABEEN, B. ASAD, S. **A. Phosphatesolubilizingbacteriaassociatedwithvegetables roots in differentecologies.** PakistanJournalofBotany, v. 45, p 535-544. 2013.
- BARRETO, M.C.S; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H. A.; SILVA, M.L.R.B.;LIMA-FILHO.J.L.**Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genérica.** RevistaBrasileiraAgrociência, v,17, n,2-4, p. 221-227, 2011.
- CHAGNON, P.L; BRADLEY, R., MAHERALI, H.; KINONOMOS, J. N.**A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi.**Trends in Plant Science, Oxford, v. 18, p. 484-491, 2013.
- COMPANT, S; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. **Plant growth promoting bactéria in the rhizo- and endosphere of plans: Their rolo, colonization, mechasnisms involved and prospects for utilization.**Soil Biology e Biochemistry, v 30,p. 669-678,2010.
- FERREIRA, D.F SISVAR- **Sistema de análise de variância. Versão 5.4** UFLA- MG Lavras, 2010.
- FUJISHIGE, N.A.; LUM, M.R.; DE HOFF, P.L.; WHITELEGGE J.P.; FAULL K.F.; HIRSCH A.M. *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.67, p.504-515, 2008.
- FLEMMING, H.; WINGENDER,J.**The biofilm matrix.** Nature Reviews Microbiology,v.8,p. 623-633, 2010.
- LIMA JÚNIOR, J.A.; SILVA, A.L.P.**Estudo do processo de salinização para indicar medidas de prevenção de solos salinos.**EnciclopédiaBiosfera, v.6,n,11,p.1-21,2010.

MAPELLI, F.; MARASCO, R.; ROLLI, E.; BARBATO, M.; CHERRIF, H.; AMEL, G.; OUZARI, I.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. **Potential For Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated With Salicornia Growth in Tunisian Hypersaline Soils.** BioMed Research International, v.13, n 24, p.1-13, 2013.

MALKONES, H. P. **Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities.** A review. J. Plant Dis. Protect., 8: 781-789, 2000.

MIRANSARI, M. **Soil microbes and the availability of soil nutrients.** Acta Physiologiae Plantarum, Paris, v. 35, n. 11, p. 3075-3084, 2013.

NIA, S.H; ZAREA, M.J.; REJALI, F.; VARMA, A. **Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil.** Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, v.11, p.113-121, 2012.

KUKLINSKY-SOBRAL, J., ARAUJO, W. L., MENDES, R., PIZZIRANIKLEINER, A. A., AZEVEDO, J.L. **Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide.** Plant and Soil, 273: 91 – 99, 2005.

LIMA MOREIRA, D.R.; SANTOS, I.B.; OLIVEIRA CORREIA, J.T.; BARBOSA, J.G.; DINIZ, W.R.; FARIAS, A.R.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane.** Archives of Agronomy and Soil Science. 1476-3567 Journal homepage, 26 Feb 2018.

RINAUDI, L.V.; GIORDANO, W. **An integrated view of biofilm formation in rhizobia.** FEMS Microbiology Letters, v.304, p.1-11, 2010.

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C. da; XAVIER, G.R. **Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procaríoto via comunicação intercelular.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n.33, p.35-50, 2004.

SANTOS, I.B.; LIMA, D.R. M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J. **Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana –de- açúcar: Solubilização de fosfato inorgânico e tolerância á salinidade.** Bioscience Journal, v. 28, n.1, p. 142-149, 2012.

KUKLINSKY-SOBRAL, J., ARAUJO, W. L., MENDES, R., PIZZIRANIKLEINER, A. A., AZEVEDO, J.L. **Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (Glycine max) grown in soil treated with glyphosate herbicide.** Plant and Soil, 273: 91 – 99, 2005.