

**MARIA JACYELLE DOS SANTOS MUNIZ**

**INFLUÊNCIA DOS INSETICIDAS CIPERMETRINA E METOMIL NO  
DESENVOLVIMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS  
BACTÉRIAS *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97**

**GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL**

**MARÇO DE 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**INFLUÊNCIA DOS INSETICIDAS CIPERMETRINA E METOMIL NO  
DESENVOLVIMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS  
BACTÉRIAS *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97**

**MARIA JACYELLE DOS SANTOS MUNIZ**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como parte das  
exigências do Programa de Pós  
Graduação em Produção Agrícola,  
para obtenção do título de *Mestre*.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL**

**Co-orientador: Prof. Dr. CÉSAR AUGUSTE BADJI**

**GARANHUNS, PERNAMBUCO – BRASIL**

**MARÇO – 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**INFLUÊNCIA DOS INSETICIDAS CIPERMETRINA E METOMIL NO  
DESENVOLVIMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS  
BACTÉRIAS *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97**

**MARIA JACYELLE DOS SANTOS MUNIZ**

**GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL**

**MARÇO – 2016**

**INFLUÊNCIA DOS INSETICIDAS CIPERMETRINA E METOMIL NO  
DESENVOLVIMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS  
BACTÉRIAS *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97**

**MARIA JACYELLE DOS SANTOS MUNIZ**

**APROVADA EM: 16 DE MARÇO DE 2016**

---

**Dra. ERIKA VALENTE DE MEDEIROS**

---

**Dra. LUCIANA MAIA MOSER**

---

**Dra. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL**  
(orientadora)

---

**Dr. CÉSAR AUGUSTE BADJI**  
(co-orientador)



Confie no SENHOR de todo o seu coração e não se apoie na sua própria capacidade e entendimento; lembre-se de colocar Deus em primeiro lugar, em todos os seus caminhos, e ele guiará os seus passos, e você andarรก pelo caminho certo. Não fique cheio de si, pensando que a sua própria sabedoria é a razão do seu sucesso. A verdadeira sabedoria é temer o SENHOR e evitar o mal.

**Provérbios 3.5-7**

A mulher que me inspira, e que é o exemplo mais ativo de provérbios 31, a você minha mãe, **DEDICO**.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu melhor Amigo que sempre cuidou e me faz querer ser dependente dEle: Jesus. A ti, minha gratidão por estar comigo em todos os processos da vida, obrigada pelo suporte e providência em mais dois anos, e por me mostrar que não há absolutamente nada impossível para Ti.

À melhor e mais amada BASE que possuo: Luzia, Jocasta, Adriano e Wênio (mãe, irmã, coroa e cunhado, respectivamente), por todo apoio, incentivo, alegria que vocês me proporcionam e por me fazerem sentir amada, sempre os amarei.

À minha família, Joselito, Jovanna, Joabi e Marleide (pai, irmãos e boadrasta), todos os tios (as) e meus avós, Liquinha e João Barbeiro, meus primos (as), pelos momentos de descontração, pelos abraços e apoio que me dão, amo vocês.

Aos amigos pessoais: Ávila, irmã Liquinha (*in memorian*), dona Ritinha, Laís, Jancleyton e Tayná, pelas conversas, orações, abraços e palavras de incentivos durante a caminhada, vocês são presentes de Deus para mim.

Aos amigos acadêmicos que construí: Raquel (em especial pelo apoio e ajuda mesmo à distância), Ariely e Zumba, pela companhia nos estudos, conversas, saídas e muitas risadas, vocês são amigos pós instituição que levarei no coração.

À professora Júlia, por toda confiança demonstrada em mais uma etapa, pelas conversas, orientações e por sua amizade.

À equipe do LGBM: Yasmin, Jesimiel, Lucianne, Marcos, Caio, Alyson, Tiago, Claudineide, Gessyka, Everthon e Marcio, pela companhia diária, auxílio nas atividades, inúmeras e distintas conversas, sempre foi um prazer trabalhar com vocês.

Ao professor César, pela co-orientação e pelo suporte durante os experimentos.

À Cataliny, pela paciência em ajudar no experimento da respirometria.

As professoras Erika e Luciana, pela aceitação de compor a banca e contribuir nessa etapa de hoje.

À UFRPE/UAG, pela oportunidade de cursar o mestrado em Produção Agrícola.

À CAPES pela concessão da bolsa fornecida durante todo o período do mestrado.

## **BIOGRAFIA**

Maria Jacyelle dos Santos Muniz, filha de Joselito Francisco Muniz e Luzia Maria dos Santos Silva, nasceu no dia 3 de fevereiro de 1991, na cidade de Palmares, estado de Pernambuco. Iniciou o Ensino Fundamental na Escola Fábio da Silveira Barros – Maraial/PE, e o Ensino Médio em 2006 no Centro de Ensino Experimental dos Palmares – Palmares/PE. Ingressou na Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco no primeiro semestre de 2009 iniciando o Curso Superior em Agronomia, onde recebeu o título de Engenheira Agrônoma no segundo semestre de 2013. No ano seguinte iniciou o mestrado em Produção Agrícola, também na Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, concluindo o mesmo no primeiro semestre de 2016.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
RESUMO GERAL.....	16
GENERAL SUMMARY.....	18
INTRODUÇÃO GERAL.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

## CAPÍTULO I

### **INFLUÊNCIA DOS INSETICIDAS CIPERMETRINA E METOMIL NO DESENVOLVIMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS BACTÉRIAS *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97**

RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Linhagens bacterianas.....	36
2.2 Inseticidas.....	36
2.3 Tolerância bacteriana a diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil.....	36
2.4 Potencial de degradação bacteriana dos inseticidas cipermetrina e metomil.....	37
2.5 Formação de microcosmos e análise respirométrica para avaliação da interação inseticida cipermetrina X inoculantes bacterianos.....	37

2.6 Influência do inseticida cipermetrina sobre a produção <i>in vitro</i> do ácido indol acético (AIA) bacteriano.....	40
2.7 Influência da inoculação bacteriana, cultivada em meio com cipermetrina, sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho.....	41
2.8 Análise estatística.....	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1 Tolerância bacteriana a diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil.....	44
3.2 Potencial de degradação bacteriana dos inseticidas cipermetrina e metomil.....	47
3.3 Análise respirométrica para avaliação da interação inseticida cipermetrina X inoculantes bacterianos em ambiente de microcosmos.....	50
3.4 Influência do inseticida cipermetrina sobre a produção <i>in vitro</i> do ácido indol acético (AIA) bacteriano.....	52
3.5 Influência da inoculação bacteriana, cultivada em meio com cipermetrina, sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho.....	55
4. Conclusões.....	60
5. Referências bibliográficas.....	61

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manipulação do solo utilizado no experimento: **A** – coleta de solo; **B** – disposição do experimento em casa de vegetação; **C** – secagem ao ar do solo.....39
- Figura 2.** Montagem do experimento de respirométria: **A** – pesagem do solo nos potes; **B** – solo umedecido em potes hermeticamente fechado contendo NaOH; **C** – disposição dos potes em laboratório.....40
- Figura 3.** Produções de C-CO<sub>2</sub> de três coletas de solo (antes da inoculação, 24 horas depois da inoculação e 7 dias depois da inoculação) acumuladas aos 21 dias de avaliação, do solo inoculado com as linhagens bacterianas UAGC97 e UAGC867, e diferentes concentrações do inseticida cipermetrina: 0, 25, 50, 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup>.....51
- Figura 4.** Análise de componentes principais das variáveis: bactérias (B=*Burkholderia* sp. UAGC867; P=*Pseudomonas* sp. UAGC97 e S=ausente de inoculo) e concentrações de cipermetrina (0 mg.L<sup>-1</sup>; 25 mg.L<sup>-1</sup>; 50 mg.L<sup>-1</sup>; 100 mg.L<sup>-1</sup> e 200 mg.L<sup>-1</sup>) inoculadas em solo sob ambiente de microcosmos.....52
- Figura 5.** Indicativo da síntese de ácido indol acético por bactérias, em meio de cultivo sem e com o inseticida cipermetrina. Coloração rósea indica produção de AIA: **A** – controle; **B** – produção na ausência do inseticida; **C** – produção na presença do inseticida.....53
- Figura 6.** Produção do ácido indol acético (AIA) pelas bactérias *Pseudomonas* sp. UAGC97 (**A**) e *Burkholderia* sp. UAGC867 (**B**) nas concentrações 0 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de cipermetrina, em função do tempo de cultivo. Colunas em cada tempo de cultivo, com letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.....54

- Figura 7.** Comprimento da parte aérea **(A)** e comprimento da raiz **(B)** de plântulas de milho inoculadas com as bactérias *Pseudomonas* sp. UAGC97 e *Burkholderia* sp. UAGC867, cultivadas com e sem o inseticida cipermetrina.....57
- Figura 8.** Massa fresca da parte aérea **(A)** e massa fresca da raiz **(B)** de plântulas de milho inoculadas com *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, cultivadas com e sem inseticida.....58
- Figura 9.** Massa seca da parte aérea **(A)** e massa seca da raiz **(B)** plântulas de milho inoculadas com *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, cultivadas com e sem inseticida.....59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características químicas e físicas do solo utilizado no experimento.....38
- Tabela 2.** Tratamentos da inoculação bacteriana com diferentes concentrações do inseticida cipermetrina na formação dos microcosmos.....38
- Tabela 3.** Identificação dos tratamentos da inoculação bacteriana em diferentes concentrações do inseticida cipermetrina no meio TSA líquido, para avaliação da produção de AIA.....41
- Tabela 4.** Tratamentos utilizados na avaliação da germinação e desenvolvimento de plântulas de milho, da variedade São José.....42
- Tabela 5.** Densidade ótica (600 nm) das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97 em meio de cultura MMM, sob os tratamentos de diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil, durante 9 dias.....46
- Tabela 6.** Densidade ótica (600 nm) das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97 em meio de cultura MMM, sob os tratamentos de diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil, durante 9 dias.....49
- Tabela 7.** Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de milho, sob diferentes tratamentos.....56

## RESUMO GERAL

O uso de Bactérias Promotoras de Crescimentos em Plantas (BPCP) vem sendo estudado quanto a remediação ambiental, visto que muitos dos solos agrícolas estão contaminados pelo resíduo dos pesticidas. Dentre tais bactérias, estão os gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, que possuem a capacidade de crescer em variados ambientes, possuindo habilidade de conservar o meio ambiente, através de sua atividade em biodegradar compostos poluentes. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de tolerância e degradação das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, quanto aos inseticidas cipermetrina e metomil utilizados no controle da *Spodoptera frugiperda*; avaliar a taxa respirométrica do solo quando influenciada com o inseticida cipermetrina e as linhagens bacterianas; avaliar a influência da cipermetrina sobre a produção do ácido indol acético pelas BPCP e avaliar a influência da inoculação bacteriana, cultivada com cipermetrina, em sementes de milho. Para o teste de tolerância aos inseticidas cipermetrina e metomil pelas bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, foi utilizado o meio mínimo mineral líquido modificado acrescido de glicose, onde cada tratamento recebeu 25-50-100 e 200 mg L<sup>-1</sup> de cada inseticida, além do tratamento controle, isento de inseticida. Para o teste de degradação dos inseticidas cipermetrina e metomil pelas bactérias avaliadas, seguiu-se a mesma metodologia, diferindo apenas da ausência da glicose nos tratamentos. Para o teste da influência do inóculo bacteriano e das diferentes concentrações de cipermetrina (0-25-50-100-200 mg L<sup>-1</sup>) no solo, o experimento foi conduzido em microcosmos instalados em casa de vegetação, sendo posteriormente coletados 100g do solo e transferidos para potes afim de avaliar a taxa respiratória do solo, em laboratório. Também foi avaliado a produção do ácido indol acético (AIA) pelas BPCP, através da influência do inseticida cipermetrina na concentração de campo. E por fim, as bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, foram cultivadas em meio na presença e na ausência do cipermetrina (100 mg L<sup>-1</sup>) afim de serem utilizados na avaliação de germinação e desenvolvimento do milho, sendo inculadas em sementes. As duas bactérias avaliadas conseguiram expressar crescimento na presença das concentrações dos inseticidas, demonstrando sua tolerância quanto ao mesmo. A *Burkholderia* sp. UAGC867 degradou o metomil em todas as concentrações, e mostrou degradação em 25 mg L<sup>-1</sup>, do inseticida cipermetrina, pelo método avaliado. Já a *Pseudomonas* sp. UAGC97 exibiu degradação apenas na concentração 25 mg L<sup>-1</sup> do inseticida metomil. Houve oscilações de dióxido de carbono capturado entre os tratamentos avaliados, no entanto, não foi observado desagrupamento entre os tratamentos através da análise de componentes principais. A síntese do AIA produzido pelas BPCP, não foi inibido pelo inseticida cipermetrina, contudo, houve destaque da produção de AIA pela *Pseudomonas* sp. UAGC97 no sétimo dia de avaliação. Não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados no índice de velocidade de germinação e na percentagem de germinação, contudo, nas avaliações de promoção de crescimento vegetal observou que o cultivo da *Burkholderia* sp. UAGC867 na presença de 100 mg L<sup>-1</sup> cipermetrina estimulou o crescimento da parte aérea das plântulas de milho, além de apresentar resultados significativos na massa fresca e seca da parte aérea. As

bactérias avaliadas exibem características de promoção de crescimento vegetal, apresentando potencial para exploração mais minuciosa da sua interação com a planta.

**Palavras-chave:** pesticidas, *Zea mays*, lagarta do cartucho, sementes, interação bactéria-planta.

## GENERAL SUMMARY

Bacteria Plant Growth Promoting (BPGP) has been studied as environmental remediation, as many agricultural soils are contaminated by residue of pesticides. Among these bacteria are *Burkholderia* and *Pseudomonas*, which have the ability to grow in different environments, having the ability to conserve the environment through their activity to biodegrade polluting compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential of tolerance and degradation of bacteria *Burkholderia* sp. UAGC867 and *Pseudomonas* sp. UAGC97, in relation to the cypermethrin and methomyl insecticides, used to control *Spodoptera frugiperda*; the respirometric rate ground when influenced with the cypermethrin insecticide and bacterial strains; the effect of cypermethrin on the indole acetic acid production by BPGP and the influence of bacterial inoculation with cypermethrin in corn seeds. For the tolerance test in relation to cypermethrin and methomyl insecticide, the strains UAGC867 and UAGC97 were cultivated in mineral liquid medium plus glucose and each treatment received 25-50-100 and 200 mg L<sup>-1</sup> of each insecticide. The treatment control was free insecticide. The degradation test of insecticides by bacteria followed the same methodology, differing only in the absence of glucose treatments. The influence of bacterial inoculum and concentrations different of cypermethrin (0-25-50-100-200 mg L<sup>-1</sup>) in the soil, the experiment was conducted in microcosms installed in a greenhouse, and later collected 100 g ground and transferred to pots in order to evaluate the respiration rate of the soil in the laboratory. It was also evaluated the production of indole acetic acid (IAA) by BPGP, through the influence of cypermethrin insecticide in the field concentration. Finally, the strains *Burkholderia* sp. UAGC867 and *Pseudomonas* sp. UAGC97 were cultured in the presence and absence of cypermethrin (100 mg L<sup>-1</sup>) to evaluate the germination and growth of corn seed. The two bacteria evaluated were able to express growth in the presence of pesticides concentrations, demonstrating their tolerance for the same. *Burkholderia* sp. UAGC867 was able to degrade all methomyl concentrations, and 25 mg L<sup>-1</sup> of the insecticide cypermethrin. *Pseudomonas* sp. UAGC97 exhibited degradation only in 25 mg L<sup>-1</sup> methomyl insecticide. There carbon dioxide captured oscillations throughout the experiment, however, was not observed between treatments unclustering by principal component analysis. The IAA synthesis by BPGP was not inhibited by the insecticide cypermethrin, however, there was prominent production by *Pseudomonas* sp. UAGC97 on the seventh day of evaluation. There was no statistical difference between treatments evaluated in the germination speed index and the germination percentage. The assessments of plant growth promotion revealed that the cultivation of *Burkholderia* sp. UAGC867 in the presence of 100 mg L<sup>-1</sup> cypermethrin stimulated the growth of shoots of corn seedlings, in addition to presenting significant results in fresh and shoot dry. The evaluated bacteria exhibit promoting

characteristics of plant growth, with potential for more exploration of their interaction with the plant.

**Key words:** pesticides, *Zea mays*, armyworm, seeds, interaction plant-bacteria.

## INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.), pertence à família Poacea e, devido a sua alta adaptabilidade, o milho é uma das culturas agrícolas mais cultivadas e estudadas mundialmente. Sua utilização é muito vasta, sendo usada tanto na alimentação humana, quanto na alimentação animal (GWIRTZ, GARCIA-CASAL, 2013; MEJÍA, 2003). Geralmente, no cultivo do milho são usados muitos produtos químicos, que visam controlar a incidência de pragas ou doenças durante o ciclo da cultura, sendo estes denominados como pesticidas agrícolas (MEISSLE et al., 2009).

Uma das principais pragas do milho é pertencente à ordem Lepidoptera, da família Noctuidae, a espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), conhecida vulgarmente como a lagarta do cartucho (FERNANDES et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2006; MAPA, 2003). A praga pode provocar danos elevados no cultivo, além de ser um inseto de difícil controle (MELO et al., 2014). O inseto é considerado praga-chave do milho que ataca a parte aérea, onde após a eclosão dos ovos, as lagartas, inicialmente muito pequenas, efetuam uma raspagem nas folhas jovens (ROSA, 2011), e conforme os insetos vão crescendo fazem perfurações nas folhas, penetrando o cartucho, podendo também danificar as espigas da cultura (MAPA, 2003).

Embora exista e esteja crescendo os estudos e aplicações de metodologias que visam combinar diferentes práticas agrícolas, como é o caso do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (BIRCH et al., 2011; CHANDLER et al., 2011), ainda é comum usar inseticidas químicos na agricultura, objetivando o controle imediato e econômico da incidência da *Spodoptera frugiperda* (AKTAR et al., 2009; DELCOUR et al., 2014). São muitos os inseticidas registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003), de diversos grupos químicos, entre eles estão os organofosforados, espinosinas, benzoilurías, diacilhidrazinas, éteres difenílicos, metilcarbamato de oximas e os piretróides.

A biodegradação de pesticidas por bactérias é outra característica importante e bastante procurada nos estudos relacionados à remediação ambiental (JOUTEY et al., 2013). Visto que muitos dos solos agrícolas são

contaminados pelo resíduo dos pesticidas utilizados, sejam estes inseticidas, fungicidas ou herbicidas, há hoje uma preocupação em desenvolver técnicas que venham a minimizar esses impactos ocasionados pelas más práticas agrícolas, dando preferência aquelas que causem um menor impacto ambiental possível. Trabalhos como o de Zuo et al. (2015) e Seo et al. (2013), comprovam a eficácia da degradação pelo gênero *Pseudomonas* (*P. putida* KT2440) de pesticidas dos grupos piretróide e o organofosforado, além da degradação pelo gênero *Burkholderia* (*Burkholderia* sp. C3) de inseticidas do grupo N-metilcarbamato.

Atualmente, o uso de Bactérias Promotoras de Crescimentos em Plantas (BPCP) também está sendo uma alternativa muito vantajosa na agricultura, pois além do interesse em conduzir uma produção econômica e de alta qualidade, são usados como critérios de preservação ambiental e saúde humana (DARTORA et al., 2013; SANTOS, VARAVALLO, 2011; FIGUEIREDO et al., 2010). Esse grupo de bactérias se classifica como micro-organismos benéficos, que podem estar localizados endofiticamente (no interior) ou epifiticamente (na superfície) nos vegetais (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; GARCIA et al., 2015; LIRA-CADETE et al., 2012; SILVA et al., 2012). As mesmas recebem o adjetivo de promotoras de crescimento vegetais por desempenharem funções importantes durante a interação bactéria/planta, como por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato inorgânico, produção do ácido indol acético, produção da molécula *quorum sensing*, controle de fitopatógenos, controle biológico de pragas (HAYAT et al., 2010; FARIAS et al., 2012; GLICK, 2012; AHEMAD; KIBRET, 2013; BALCAZAR et al., 2015).

É interessante ressaltar que todas estas e outras características executadas por esse grupo de micro-organismos, dependem de uma relação íntima e direta entre o genótipo da bactéria interagindo com o genótipo da planta (MOCALI et al., 2003; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Além disso, as BPCP se destacam pela capacidade de biodegradar os pesticidas agrícolas (FUENTES et al., 2010; KAFILZADEH et al., 2015).

Tendo em vista os fatos apresentados, o uso de BPCP poderá auxiliar o desenvolvimento dos vegetais, numa relação simbiótica, em uma área de cultivo contaminado com pesticidas agrícolas, podendo também realizar a função de

biodegradação. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de tolerância e degradação da *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UGC97 quanto aos inseticidas cipermetrina e metomil utilizados no controle da *S. frugiperda*; avaliar a taxa respirométrica do solo quando influenciada com o inseticida cipermetrina e as linhagens bacterianas; avaliar a influência da cipermetrina sobre a produção do ácido indol acético pelas BPCP e avaliar a influência da inoculação bacteriana, cultivada com cipermetrina, em plântulas de milho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEMAD, M. e KIBRET, M. **Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective.** Journal of King Saud University – Science. V.26. 20 p. 2013.
- AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D. e CHOWDHURY, A. **Impacto of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards.** Interdisciplinary Toxicology. V.2. 1-12 p. 2009.
- BALCAZAR, W.; RONDÓN, J. RENGIFO, M.; BALL, M.M.; MELFO, A.; GÓMEZ, W. e YARZÁBAL, L.A. **Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria.** Microbiological Research. 7 p. 2015.
- BIRCH, A.N.E.; BEGG, G.S. e SQUIRE, G.R. **How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems.** Journal of Experimental Botany. 1-11 p. 2011.
- CHANDLER, D.; BAILEY, A.S.; TATCHELL, G.M.; DAVIDSON, G.; GREAVES, J. e GRANT, W.P. **The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management.** Philosophical Transactions of The Royal Society. 1987-1998 p. 2011.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C. e SESSITSCH, A. **Plant growth-promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization.** Soil Biology & Biochemistry. 669-678 p. 2010.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D. & 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. 1023-1029 p. Campina Grande. 2013.

- DELCOUR, I.; SPANOGHE, P. e UYTTENDAELE, M. **Literature review: Impact of climate change on pesticide use.** Food Research International. 9 p. 2014.
- FARIAS, A.R.B.; LIMA, D.R.M.; LIRA-CADETE, L.; RAMOS, A.P.S.; SILVA, M.C.B.; FREIRE, F.J. e KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar.** Pesquisa Agropecuária Pernambucana. V.17, n. único. 101-104 p. Recife. 2012.
- 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.L.C.; MARTINS-DIAS, A.M.P. e CRUZ, I. **Relação entre lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. V.41, n.12. 1693-1696 p. 2006.
- 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. 1ª ed. 761 p. 2010.
- FUENTES, M.S.; BENIMELI, C.S.; CUOZZO, S.A. e AMOROSO, M.J. **Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides.** International Biodeterioration & Biodegradation. 434-441 p. 2010.
- GARCIA, T.V.; KNAAK, N. e FIUZA, L.M. **Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura.** Agricultural Microbiology/Article Review. Arquivos do Instituto Biológico. v. 82. 1-9 p. São Paulo. 2015.

- GLICK, B.R. **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.** Hindawi Publishing Corporation Scientifica. 15 p. 2012.
- GWIRTZ, J.A.; GARCIA-CASAL, M.N. **Processing maize flour and corn meal food products.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 66-75 p. New York Academy of Sciences. 2013.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R. e AHMED, I. **Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review.** Annals of Microbiology – Springer. 20 p. 2010.
- 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.
- KAFILZADEH, F.; EBRAHIMNEZHAD, M. e TAHERY, Y. **Isolation and identification of endosulfan-degrading bacteria and evaluation of their bioremediation in Kor River, Iran.** Osong Public Health Res Perspect. 39-46 p. Iran. 2015.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO, J.L. **Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion.** Environmental Microbiology. v.6. 1244-1251 p. 2004.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B.; RAMOS, A.P.S.; COSTA, D.P.; FREIRE, F.J. e KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico.** Bioscience Journal. v. 28. 122-129 p. Uberlândia. 2012.
- MAPA – MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2003. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2015.

- MEISSLE, M.; MOURON, P.; MUSA, T.; BIGLER, F.; PONS, X.; VASILEIADIS, V.P.; OTTO, S.; ANTICHI, D.; KISS, J.; PÁLINKÁS, Z.; DORNER, Z.; WEIDE, VAN DER R.; GROTEN, J. CZEMBOR, E.; ADAMCZYK, J.; THIBORD, J.B.; MELANDER, B.; CORDSEN NIELSEN, G.; POULSEN, R.T.; ZIMMERMANN, O.; VERSCHWELW, A. & OLDENBURG, E. **Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects.** Journal of Applied Entomology. 357-375 p. 2009.
- MEJÍA, D. **Maize: Post-Harvest Operation.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), AGST. 100 p. 2003.
- MELO, E.P.; DEGRANDE, P.E.; JUNIOR, I.S.L.; SUEKANE, R.; KODAMA, C. e FERNANDES, M.G. **Disposição espacial e injúrias da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho.** Revista Ceres. V.61, n.3. 343-349 p. Viçosa. 2014.
- MOCALI, S.; BERTELLI, E.; CELLO, F.D.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G. e FANI, R. **Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during diferente seasons and from different plant organs.** Research in Microbiology. 105-114 p. 2003.
- ROSA, A.P.S.A. **Monitoramento da lagarta-do-cartucho do milho.** Exemplares da Embrapa Clima Temperado. 2 p. 2011.
- SANTOS, T.T. e VARAVALLO, M.A. **Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. V.32, n.2. 199-212 p. Londrina. 2011.
- SEO, J.S.; KEUM, Y.S. e LI, Q.X. **Metabolomic and proteomic insights into carbaryl catabolism by *Burkholderia* sp. C3 and degradation of ten N-methylcarbamates.** Springer Science. Biodegradation. 17 p. 2013.

- SILVA, M.O.; FREIRE, F.J.; JUNIOR, M.A.L.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; COSTA, D.P. e LIRA-CADETE, L. **Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida.** Revista Brasileira de Ciência do Solo. 36: 1113-1121 p. 2012.
- ZUO, Z.; GONG, T.; CHE, Y.; LIU, R.; XU, P.; JIANG, H.; QIAO, C.; SONG, C. e YANG, C. **Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil.** Springer Science. Biodegradation: 26. 223-233 p. 2015.

## **CAPÍTULO I:**

**INFLUÊNCIA DOS INSETICIDAS CIPERMETRINA E METOMIL NO  
DESENVOLVIMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS  
BACTÉRIAS *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97**

## RESUMO

O uso de Bactérias Promotoras de Crescimentos em Plantas (BPCP) vem sendo estudado quanto a remediação ambiental, visto que muitos dos solos agrícolas estão contaminados pelo resíduo dos pesticidas. Dentre tais bactérias, estão os gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, que possuem a capacidade de crescer em variados ambientes, possuindo habilidade de conservar o meio ambiente, através de sua atividade em biodegradar compostos poluentes. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de tolerância e degradação das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, quanto aos inseticidas cipermetrina e metomil utilizados no controle da *Spodoptera frugiperda*; avaliar a taxa respirométrica do solo quando influenciada com o inseticida cipermetrina e as linhagens bacterianas; avaliar a influência da cipermetrina sobre a produção do ácido indol acético pelas BPCP e avaliar a influência da inoculação bacteriana, cultivada com cipermetrina, em sementes de milho. Para o teste de tolerância aos inseticidas cipermetrina e metomil pelas bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, foi utilizado o meio mínimo mineral líquido modificado acrescido de glicose, onde cada tratamento recebeu 25-50-100 e 200 mg L<sup>-1</sup> de cada inseticida, além do tratamento controle, isento de inseticida. Para o teste de degradação dos inseticidas cipermetrina e metomil pelas bactérias avaliadas, seguiu-se a mesma metodologia, diferindo apenas da ausência da glicose nos tratamentos. Para o teste da influência do inóculo bacteriano e das diferentes concentrações de cipermetrina (0-25-50-100-200 mg L<sup>-1</sup>) no solo, o experimento foi conduzido em microcosmos instalados em casa de vegetação, sendo posteriormente coletados 100g do solo e transferidos para potes afim de avaliar a taxa respiratória do solo, em laboratório. Também foi avaliado a produção do ácido indol acético (AIA) pelas BPCP, através da influência do inseticida cipermetrina na concentração de campo. E por fim, as bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, foram cultivadas em meio na presença e na ausência do cipermetrina (100 mg L<sup>-1</sup>) afim de serem utilizados na avaliação de germinação e desenvolvimento do milho, sendo inculadas em sementes. As duas bactérias avaliadas conseguiram expressar crescimento na presença das concentrações dos inseticidas, demonstrando sua tolerância quanto ao mesmo. A *Burkholderia* sp. UAGC867 degradou o metomil em todas as concentrações, e mostrou degradação em 25 mg L<sup>-1</sup>, do inseticida cipermetrina, pelo método avaliado. Já a *Pseudomonas* sp. UAGC97 exibiu degradação apenas na concentração 25 mg L<sup>-1</sup> do inseticida metomil. Houve oscilações de dióxido de carbono capturado entre os tratamentos avaliados, no entanto, não foi observado desagrupamento entre os tratamentos através da análise de componentes principais. A síntese do AIA produzido pelas BPCP, não foi inibido pelo inseticida cipermetrina, contudo, houve destaque da produção de AIA pela *Pseudomonas* sp. UAGC97 no sétimo dia de avaliação. Não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados no índice de velocidade de germinação e na percentagem de germinação, contudo, nas avaliações de promoção de crescimento vegetal observou que o cultivo da *Burkholderia* sp. UAGC867 na presença de 100 mg L<sup>-1</sup> cipermetrina estimulou o crescimento da parte aérea das plântulas de milho, além de apresentar resultados significativos na massa fresca e seca da parte aérea. As

bactérias avaliadas exibem características de promoção de crescimento vegetal, apresentando potencial para exploração mais minuciosa da sua interação com a planta.

**Palavras-chave:** pesticidas, *Zea mays*, lagarta do cartucho, sementes, interação bactéria-planta.

## ABSTRACT

Bacteria Plant Growth Promoting (BPGP) has been studied as environmental remediation, as many agricultural soils are contaminated by residue of pesticides. Among these bacteria are *Burkholderia* and *Pseudomonas*, which have the ability to grow in different environments, having the ability to conserve the environment through their activity to biodegrade polluting compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential of tolerance and degradation of bacteria *Burkholderia* sp. UAGC867 and *Pseudomonas* sp. UAGC97, in relation to the cypermethrin and methomyl insecticides, used to control *Spodoptera frugiperda*; the respirometric rate ground when influenced with the cypermethrin insecticide and bacterial strains; the effect of cypermethrin on the indole acetic acid production by BPGP and the influence of bacterial inoculation with cypermethrin in corn seeds. For the tolerance test in relation to cypermethrin and methomyl insecticide, the strains UAGC867 and UAGC97 were cultivated in mineral liquid medium plus glucose and each treatment received 25-50-100 and 200 mg L<sup>-1</sup> of each insecticide. The treatment control was free insecticide. The degradation test of insecticides by bacteria followed the same methodology, differing only in the absence of glucose treatments. The influence of bacterial inoculum and concentrations different of cypermethrin (0-25-50-100-200 mg L<sup>-1</sup>) in the soil, the experiment was conducted in microcosms installed in a greenhouse, and later collected 100 g ground and transferred to pots in order to evaluate the respiration rate of the soil in the laboratory. It was also evaluated the production of indole acetic acid (IAA) by BPGP, through the influence of cypermethrin insecticide in the field concentration. Finally, the strains *Burkholderia* sp. UAGC867 and *Pseudomonas* sp. UAGC97 were cultured in the presence and absence of cypermethrin (100 mg L<sup>-1</sup>) to evaluate the germination and growth of corn seed. The two bacteria evaluated were able to express growth in the presence of pesticides concentrations, demonstrating their tolerance for the same. *Burkholderia* sp. UAGC867 was able to degrade all methomyl concentrations, and 25 mg L<sup>-1</sup> of the insecticide cypermethrin. *Pseudomonas* sp. UAGC97 exhibited degradation only in 25 mg L<sup>-1</sup> methomyl insecticide. There carbon dioxide captured oscillations throughout the experiment, however, was not observed between treatments unclustering by principal component analysis. The IAA synthesis by BPGP was not inhibited by the insecticide cypermethrin, however, there was prominent production by *Pseudomonas* sp. UAGC97 on the seventh day of evaluation. There was no statistical difference between treatments evaluated in the germination speed index and the germination percentage. The assessments of plant growth promotion revealed that the cultivation of *Burkholderia* sp. UAGC867 in the presence of 100 mg L<sup>-1</sup> cypermethrin stimulated the growth of shoots of corn seedlings, in addition to presenting significant results in fresh and shoot dry. The evaluated bacteria exhibit promoting

characteristics of plant growth, with potential for more exploration of their interaction with the plant.

**Key words:** pesticides, *Zea mays*, armyworm, seeds, interaction plant-bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção total prevista para safra nacional da cultura do milho 2014/2015, segundo a CONAB (2015), foi de 84,3 milhões de toneladas, sendo considerada a maior safra da história. O aumento se deu devido as condições climáticas favoráveis, as características edafoclimáticas que o país detém e pela tecnologia aplicada na produção da cultura, como os insumos agrícolas e tecnologia de plantio, destacada principalmente na segunda safra.

Dentre os insumos agrícolas utilizados na produção do milho, 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). A classificação dos inseticidas geralmente está relacionada com o modo de ação que estes afetam o organismo. Os inseticidas químicos disponibilizados no comércio do município de Garanhuns (PE) utilizados no combate do *Spodoptera frugiperda*, praga chave do milho, pelos agricultores da região, tem como ingredientes ativos cipermetrina e o metomil (MAPA, 2003).

O cipermetrina faz parte do grupo químico piretróide, que atua na transmissão axônica modulando os canais de sódio, ou seja, durante a transmissão do impulso nervoso ocorre a abertura desses canais, que são fechados após da despolarização da célula nervosa. Porém, em contato com esse grupo químico, ocorrerá ligações do mesmo em alguns sítios desse canal, que o manterá aberto, provocando uma hiperexcitabilidade, devido ao período prolongado do influxo de sódio após um potencial de ação, seguido do óbito. O metomil faz parte do grupo químico metilcarbamato de oxima, que atua na transmissão sináptica inibindo a enzima acetilcolinesterase, ou seja, não permite a catalisação do neurotransmissor acetilcolina através de sua enzima, provocando assim a passagem continua dos impulsos nervosos, levando o inseto à fadiga e, conseqüentemente, a morte (GALLO et al., 2002).

Embora os inseticidas possuam registros para serem empregados na cultura do milho, ambos possuem classificação ambiental de classe II, tendo como definição produto muito perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2003).

Detectar meios que promovam degradação 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). A tecnologia microbiana para remover pesticidas agrícolas é considerada a menos perigosa, visto que se encontra enquadrado nos quesitos sugeridos pelo triângulo da sustentabilidade, sendo economicamente viável, socialmente justa e ecologicamente correta (YOU; LIU, 2004). O processo de degradação biológica envolve a utilização de micro-organismos eficazes que são capazes em degradar o complexo do pesticida em produtos inorgânicos químicos simples, pelo processo enzimático (VERMA et al., 2014; WOOD, 2008). Entre muitos gêneros bacterianos descritos na literatura, quanto a degradarem pesticidas e metais pesados, estão inclusos os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* (OKOH et al., 2001; RAMU; SEETHARAMAN, 2013), que apresentam potencial de biorremediação de solos contaminados.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) desempenham importantes funções na interação bactéria/planta, entre tantos mencionados em inúmeros trabalhos, está a capacidade de biodegradar pesticidas agrícolas (JOUTEY et al., 2013) e a produção do ácido indol acético (AIA) (FARIAS et al., 2012; LEITE et al., 2014), que dependendo da concentração produzida, pode promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas, além de controlar a divisão celular de alguns tecidos da planta (CENTELLAS et al., 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004; MARCHIORO, 2005; IUNI, 2009). A síntese do AIA pode acontecer por diversas rotas bioquímicas, contudo, a via dependente de triptofano é a principal utilizada pelas bactérias, sendo comprovado pelo aumento da produção desse fitohormônio quando o mesmo é empregado (LEITE, 2012).

Trabalhos expressam os benefícios da interação entre essas BPCP com a cultura do milho, como é o caso de estudo realizado por SANTOS (2015) que trabalhou com a *Burkholderia cepacia* e com a *Pseudomonas putida* na

germinação das sementes de milho, e obteve resultados vantajosos quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG) e a fitomassa total de sementes de milho.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de tolerância e degradação das linhagens bacterianas UAGC97 e UAGC867, dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, respectivamente, quanto aos inseticidas cipermetrina e metomil utilizados no controle da *S. frugiperda*; avaliar a taxa respirométrica do solo quando influenciada com o inseticida cipermetrina e as linhagens bacterianas; avaliar a influência da cipermetrina sobre a produção do ácido indol acético pelas BPCP e avaliar a influência da inoculação bacteriana, cultivada com cipermetrina, em plântulas de milho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Linhagens bacterianas**

Foram utilizadas duas linhagens bacterianas endofítica de raiz e do rizoplano, *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, respectivamente, isoladas da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (LIMA, 2012; SILVA, 2011). As bactérias são mantidas em meio TSA (*Tryptcase Soy Agar*) e sob refrigeração de 4°C, no Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE). Essas linhagens foram previamente avaliadas como fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato inorgânico e produtoras de ácido indol acético (FARIAS, 2015; LIMA, 2012; SILVA, 2011).

### **2.2 Inseticidas**

Foram avaliados dois inseticidas comerciais utilizados no controle da *Spodoptera frugiperda* em milho, o Cipermetrina Nortox® 250 EC, que tem como ingrediente ativo a Cipermetrina (250 g i.a. L<sup>-1</sup>) e o Lannate BR®, que tem o Metomil como ingrediente ativo (215 g i.a. L<sup>-1</sup>), dos fabricantes Nortox e DuPont, respectivamente.

### **2.3 Tolerância bacteriana a diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil**

As bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, foram inoculadas a partir de colônias isoladas em meio TSA (*Tryptcase Soy Agar*) 10% líquido, sendo mantidas sob agitação constante (125 rpm), durante 24-48 horas. Após, retirou-se 2 mL do inoculo para a verificação da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (600 nm), sendo transferidos 10 µL do inoculo bacteriano para tubos contendo 25 mL de Meio Mínimo Mineral (MMM) líquido modificado: 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,25 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mg NaCl; 100 mg

MgSO<sub>4</sub>; 1 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O por litro, com pH 7,3 (MENDOZA et al., 2011), acrescido de glicose (10 g.L<sup>-1</sup>) como fonte inicial de carbono seguido dos seguintes tratamentos: 0 mg L<sup>-1</sup> – 25 mg L<sup>-1</sup> – 50 mg L<sup>-1</sup> – 100 mg L<sup>-1</sup> (equivalente a concentração em campo) e 200 mg L<sup>-1</sup> de cada inseticida – Cipermetrina e Metomil. Em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação constante (125 rpm), à 28°C. Durante 9 dias, a DO foi verificada, em intervalos de 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **2.4 Potencial de degradação bacteriana dos inseticidas cipermetrina e metomil**

As duas linhagens bacterianas, *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, foram inoculadas a partir de colônias isoladas em MMM líquido modificado (MENDOZA et al., 2011), acrescido com glicose (10 g L<sup>-1</sup>), e foram mantidas sob agitação constante (125 rpm), durante 24-72 horas. Em seguida, foram retirados 2 mL do inóculo para a verificação da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (600 nm), e transferidos 10 µL do inóculo bacteriano para tubos contendo 25 mL de MMM líquido modificado tendo como única fonte de carbono cada inseticida, cipermetrina e metomil, ambos nas seguintes concentrações: 0 mg L<sup>-1</sup> – 25 mg L<sup>-1</sup> – 50 mg L<sup>-1</sup> – 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, foram incubadas sob agitação constante (125 rpm), à 28°C. Durante 9 dias, a DO foi verificada, em intervalos de 24 horas. O teste foi realizado em triplicata.

#### **2.5 Formação de microcosmos e análise respirométrica para avaliação da interação inseticida cipermetrina X inoculantes bacterianos**

Inicialmente, realizou-se a coleta do solo (Figura 1A), sitiado na sementeira do município de Garanhuns (PE), localizado especificamente na comunidade da Várzea. As análises químicas e físicas, foram feitas no Laboratório de Fertilidade do Solo, do Instituto Agrônomo de Pernambuco, sendo expostas na Tabela 1.

O solo foi distribuído em vasos com capacidade de 5 Kg, e inoculado com as duas linhagens bacterianas e diferentes concentrações do inseticida cipermetrina, como está listado na Tabela 2. Os inóculos bacterianos foram preparados a partir de colônias puras de bactérias, incubadas em meio de cultura TSA 10% líquido, sob agitação constante (125 rpm), durante 24 h, à 28°C. Após o crescimento bacteriano, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCL; 1,44 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), de forma a atingir densidade óptica de 0,095, esta realizada em espectrofotômetro (630nm), segundo Lima (2012).

**Tabela 1.** Características químicas e físicas do solo utilizado no experimento.

pH	P	K	Ca	Mg	Na	Al	H	S	CTC	V	m	Areia	Silte	Argila
H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>	----- cmolc dm <sup>-3</sup> -----				-----			----- % -----					
5,8	86	0,61	4,75	4,75	0,05	0	2,14	6,4	8,6	75	0	69,48	16,52	14

**Tabela 2.** Tratamentos da inoculação bacteriana com diferentes concentrações do inseticida cipermetrina na formação do microcosmos.

TRATAMENTO	LINHAGEM BACTERIANA	CONCENTRAÇÃO DO INSETICIDA CIPERMETRINA (mg.L <sup>-1</sup> )
1	Controle*	0
2	Controle*	25
3	Controle*	50
4	Controle*	100
5	Controle*	200
6	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	0
7	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	25
8	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	50
9	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	100
10	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	200
11	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	0
12	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	25
13	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	50
14	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	100
15	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	200

\*Controle = ausência de linhagem bacteriana

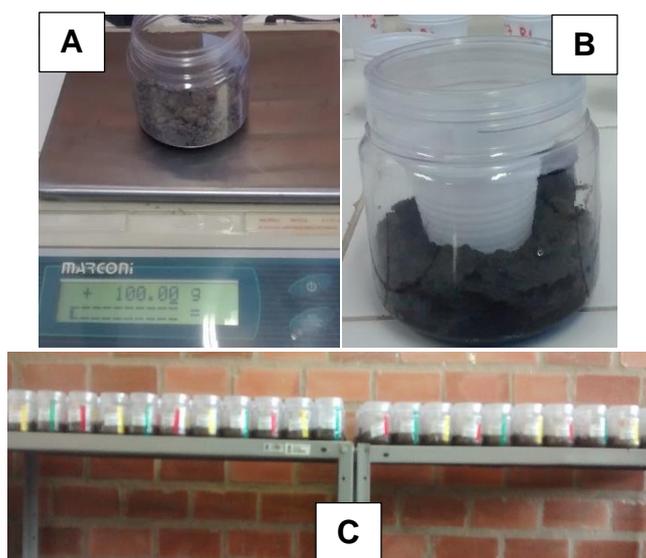
Os tratamentos foram mantidos em casa de vegetação por 7 dias, sendo conduzido em triplicata e em delineamento inteiramente casualizado (Figura 1B). Após a montagem dos microcosmos, foram coletadas três amostras de cada tratamento, de acordo com o tempo da inoculação bacteriana, sendo estes: 24 horas antes da inoculação; 24 horas depois da inoculação; 7 dias depois da inoculação. Após cada coleta, o material foi submetido a secagem ao ar, durante 72 horas (Figura 1C), sendo posteriormente determinada sua capacidade de campo e utilizado nas análises respirométricas.



**Figura 1.** Manipulação do solo utilizado no experimento: **A** – coleta de solo; **B** – disposição do experimento em casa de vegetação; **C** – secagem ao ar do solo.

A respirometria do solo foi realizada por meio da quantificação do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), liberado pelos micro-organismos presentes no solo. Na quantificação da respiração de cada tratamento dos microcosmos, utilizou-se 100 gramas de solo seco, umedecido com água destilada a 70% da capacidade de campo, sendo então distribuídos em potes hermeticamente fechados (Figura 2A). Dentro de cada pote foi adicionado um copo descartável com capacidade de 50 ml, contendo 10 ml de  $\text{NaOH}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) (Figura 2B). O pote permaneceu fechado durante 7 dias até sua primeira leitura. A testemunha utilizada foi o pote ausente de qualquer solo contendo apenas o hidróxido de sódio para captação do  $\text{CO}_2$  do ambiente.

Em cada leitura realizada, o NaOH de cada pote foi transferido para Erlenmeyers e adicionados 5 ml de BaCl<sub>2</sub> (1 mol L<sup>-1</sup>), e 3 gotas de fenolftaleína. A titulação das amostras foi realizada com HCl (0,5 mol L<sup>-1</sup>) a fim de neutralizar o meio e quantificar o volume de CO<sub>2</sub>. A liberação do dióxido de carbono, em mg C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> do solo, foi calculada por meio da fórmula:  $\text{mg C-CO}_2.\text{g}^{-1} = (\text{B}-\text{V}).\text{M.E}$  (STOTZKY, 1965), onde o B indica o volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da prova em branco; o V indica o volume necessário para titular o excedente de NaOH da amostra; o M indica a molaridade do HCl utilizado e o E indica o número atômico do carbono. O experimento foi conduzido em triplicata com disposição aleatória (Figura 2C).



**Figura 2.** Montagem do experimento de respirometria: **A** – pesagem do solo nos potes; **B** – solo umedecido em potes hermeticamente fechado contendo NaOH; **C** – disposição dos potes em laboratório.

## 2.6 Influência do inseticida cipermetrina sobre a produção *in vitro* do ácido indol acético (AIA) bacteriano

Para avaliar a influência do inseticida cipermetrina na produção de AIA pelas bactérias *Burkholderia* sp. (UAGC867) e *Pseudomonas* sp. (UAGC97), as linhagens bacterianas foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em meio

TSA líquido acrescido de L-triptofano (5 mM), em duas diferentes concentrações de cipermetrina (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identificação dos tratamentos da inoculação bacteriana em diferentes concentrações do inseticida cipermetrina no meio TSA líquido, para avaliação da produção de AIA.

TRATAMENTO	BACTÉRIA	CONCENTRAÇÃO DE CIPERMETRINA (mg.L <sup>-1</sup> )
1	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	0
2	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867)	100
3	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	0
4	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97)	100

O experimento foi conduzido em triplicada, mantido em mesa agitadora (120 rpm) à 28°C. A cada 24 h, num período de 7 dias, alíquotas de 2 mL de cada tratamento, foram centrifugadas (12000 g). Ao sobrenadante foi acrescentado o reagente de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M em 35% de ácido perclórico) (CROZIER et al., 1988), na proporção de 3:1, permanecendo em repouso, na ausência da luz, durante 30 minutos. A quantificação da produção do ácido indol acético foi realizada em espectrofotômetro (530 nm), e as concentrações da produção foram inferidas por meio da fórmula  $y = 692,93x + 0,6421$ , obtida a partir de uma curva padrão com diferentes concentrações do AIA (SIGMA-ALDRICH®) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ : 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350).

## 2.7 Influência da inoculação bacteriana, cultivada em meio com cipermetrina, sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho

A germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de milho, *in vitro*, foram avaliadas quanto a possível influência de promoção de crescimento vegetal das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97,

submetidas a seis tratamentos (Tabela 4), sob delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições de 20 sementes por tratamento.

**Tabela 4.** Tratamentos utilizados na avaliação da germinação e desenvolvimento de plântulas de milho, da variedade São José.

Tratamento	Definição
1	Controle total - meio ausente de bactéria e ausente do cipermetrina
2	Controle bactéria - meio ausente de bactéria e acrescido com cipermetrina à 100 mg L <sup>-1</sup>
3	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97) cultivada em meio ausente do cipermetrina
4	<i>Pseudomonas</i> sp. (UAGC97) cultivada em meio acrescido de cipermetrina à 100 mg L <sup>-1</sup>
5	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867) cultivada em meio ausente do cipermetrina
6	<i>Burkholderia</i> sp. (UAGC867) cultivada em meio acrescido de cipermetrina à 100 mg L <sup>-1</sup>

Inicialmente, as sementes foram desinfestadas superficialmente com solução de NaOCl 1% por 5 min, seguida de lavagem em água destilada. Para a obtenção do inóculo, colônias puras de bactérias foram incubadas em meio de cultura TSA 10% líquido na ausência presença do cipermetrina (100 mg L<sup>-1</sup>), sob agitação constante de 125 rpm, durante 24 h, numa temperatura de 28°C. Após o crescimento bacteriano, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCL; 1,44 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), de forma a atingir densidade óptica de 0,095, esta realizada em espectrofotômetro a 630nm (LIMA, 2012). As sementes permaneceram imersas nessa solução, por 30 minutos sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, realizou-se a semeadura em substrato de papel tipo *Germitest*, umedecido com 2,5 vezes o seu peso, com água destilada na forma de rolo e depois mantida em câmara de germinação (BOD), por um período de 7 dias, com uma temperatura

de  $25 \pm 5$  °C, sob fotoperíodo de 12 h. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente após a semeadura, computando-se o número de sementes germinadas (consideradas germinadas aquelas com emissão da radícula) de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O Índice de Velocidade de Emergência (IVE) foi determinado com a contagem diária do número de sementes germinadas como proposto por Maguire (1962), para cultura do milho.

Ao término do período experimental (aos 7 dias após a semeadura), foram realizadas as avaliações da promoção do crescimento vegetal, através das seguintes variáveis: comprimento da parte aérea e comprimento da raiz, realizados com auxílio de régua. Além dos pesos da fitomassa fresca e fitomassa seca das plântulas, estas analisadas em balança de precisão, e a secagem do material vegetal realizada em estufa a 60°C, até alcançar a massa constante, segundo metodologia proposta por Oliveira et al., (2012).

## **2.8 Análise estatística**

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) para os testes avaliados. E realizada a análise de componente principal através do programa PAST versão 2.17c (HAMMER et al., 2001) para a avaliação da respirometria.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Tolerância bacteriana a diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil

Ambas as bactérias, *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, apresentaram tolerância aos inseticidas cipermetrina e metomil, uma vez que foram capazes de se desenvolver nas diferentes concentrações avaliadas, tanto quanto no meio de cultura sem a presença dos inseticidas (Tabela 5). Aislabe 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 desses pesticidas pelas bactérias avaliadas no presente trabalho, já que havia como fonte alternativa a glicose a ser usado pelas linhagens bacterianas.

Com a exceção do 2º e do 7º dia de avaliação, a linhagem UAGC97, apresentou variações estatísticas quanto a tolerância ao inseticida cipermetrina. Ao 3º e 8º dia de avaliação, a *Pseudomonas* sp. apresentou diminuição de tolerância a cipermetrina conforme o aumento da concentração do inseticida, expressando tolerância máxima até 50 mg L<sup>-1</sup>, resultado semelhante ao encontrado pela *P. aeruginosa* L2-1, que conseguiu tolerar a uma concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> do pentaclorofenol, no período de 2 dias de cultivo (KASEMODEL et al., 2014).

Até o sétimo dia de avaliação não se observou diferença estatística do crescimento da linhagem UAGC97 frente as diferentes concentrações do metomil, dados semelhantes foram encontrados em estudos realizados por Kasemodel et al. (2014), onde observaram que a presença de pesticidas organoclorados não influenciou significativamente o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* L2-1, os autores sugerem que o gênero pode apresentar mecanismos de proteção contra os efeitos tóxicos dos organoclorados, podendo estar relacionados à sua degradação. Existe a possibilidade da *Pseudomonas* sp. quando associada com outras bactérias,

apresente tolerância a concentrações mais altas de cipermetrina (DUBEY; FULEKAR, 2012).

As concentrações de cipermetrina avaliadas, não promoveram diferença significativa ao longo dos 9 dias de avaliação, na linhagem UAGC867. Contudo, percebe-se que houve maior crescimento bacteriano na presença do inseticida, quando comparado ao controle. No oitavo dia, houve destaque na tolerância da *Burkholderia* sp. UAGC867 a concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> do inseticida metomil, podendo-se 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).

**Tabela 5.** Densidade óptica (600 nm) das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97 em meio de cultura MMM acrescido de glicose sob os tratamentos de diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil, durante 9 dias.

<i>Burkholderia</i> sp. UAGC867							<i>Pseudomonas</i> sp. UAGC97					
TEMPO (DIA)												
CIPERMETRINA	1º	2º	3º	7º	8º	9º	1º	2º	3º	7º	8º	9º
0 mg.L <sup>-1</sup>	0,128 <b>a1</b>	0,127 <b>a1</b>	0,11633 <b>a1</b>	0,10067 <b>a1</b>	0,08633 <b>a1</b>	0,054667 <b>a1</b>	0,181 <b>a1</b>	0,187 <b>a1</b>	0,178 <b>a1</b>	0,17467 <b>a1</b>	0,15833 <b>a1</b>	0,11133 <b>a1</b>
25 mg.L <sup>-1</sup>	0,144 <b>a1</b>	0,15 <b>a1</b>	0,162 <b>a1</b>	0,151 <b>a1</b>	0,13033 <b>a1</b>	0,084 <b>a1</b>	0,144 <b>a2</b>	0,15967 <b>a1</b>	0,16767 <b>a1</b>	0,15833 <b>a1</b>	0,14533 <b>a1</b>	0,06733 <b>a2</b>
50 mg.L <sup>-1</sup>	0,130667 <b>a1</b>	0,15533 <b>a1</b>	0,158 <b>a1</b>	0,15533 <b>a1</b>	0,09767 <b>a1</b>	0,102667 <b>a1</b>	0,158 <b>a1</b>	0,15667 <b>a1</b>	0,15267 <b>a1</b>	0,15267 <b>a1</b>	0,0933 <b>a2</b>	0,105 <b>a1</b>
100 mg.L <sup>-1</sup>	0,136333 <b>a1</b>	0,151 <b>a1</b>	0,14633 <b>a1</b>	0,148 <b>a1</b>	0,12967 <b>a1</b>	0,088667 <b>a1</b>	0,13433 <b>a2</b>	0,14367 <b>a1</b>	0,13467 <b>a2</b>	0,13633 <b>a1</b>	0,12033 <b>a2</b>	0,034 <b>a2</b>
200 mg.L <sup>-1</sup>	0,038667 <b>a2</b>	0,119 <b>a1</b>	0,126667 <b>a1</b>	0,12833 <b>a1</b>	0,11267 <b>a1</b>	0,101 <b>a1</b>	0,114 <b>a2</b>	0,12 <b>a1</b>	0,11933 <b>a2</b>	0,11967 <b>a1</b>	0,10067 <b>a2</b>	0,09067 <b>a1</b>
METOMIL	1º	2º	3º	7º	8º	9º	1º	2º	3º	7º	8º	9º
0 mg.L <sup>-1</sup>	0,141 <b>a1</b>	0,11567 <b>a1</b>	0,107 <b>a1</b>	0,08833 <b>a1</b>	0,09133 <b>a2</b>	0,03 <b>a2</b>	0,164 <b>a1</b>	0,18433 <b>a1</b>	0,17467 <b>a1</b>	0,18433 <b>a1</b>	0,18467 <b>a1</b>	0,10167 <b>a2</b>
25 mg.L <sup>-1</sup>	0,150333 <b>a1</b>	0,13233 <b>a1</b>	0,113 <b>a1</b>	0,10333 <b>a1</b>	0,102 <b>a2</b>	0,108333 <b>a1</b>	0,15433 <b>a1</b>	0,18867 <b>a1</b>	0,20467 <b>a1</b>	0,198 <b>a1</b>	0,193333 <b>a1</b>	0,18967 <b>a1</b>
50 mg.L <sup>-1</sup>	0,164667 <b>a1</b>	0,14733 <b>a1</b>	0,126333 <b>a1</b>	0,116 <b>a1</b>	0,11967 <b>a2</b>	0,121667 <b>a1</b>	0,14233 <b>a1</b>	0,181 <b>a1</b>	0,20567 <b>a1</b>	0,207 <b>a1</b>	0,204667 <b>a1</b>	0,17833 <b>a1</b>
100 mg.L <sup>-1</sup>	0,158 <b>a1</b>	0,14233 <b>a1</b>	0,12 <b>a1</b>	0,108 <b>a1</b>	0,15267 <b>a1</b>	0,107 <b>a1</b>	0,141 <b>a1</b>	0,182 <b>a1</b>	0,19767 <b>a1</b>	0,21767 <b>a1</b>	0,210667 <b>a1</b>	0,17667 <b>a1</b>
200 mg.L <sup>-1</sup>	0,156333 <b>a1</b>	0,16133 <b>a1</b>	0,149667 <b>a1</b>	0,13433 <b>a1</b>	0,04733 <b>a3</b>	0,099667 <b>a1</b>	0,14333 <b>a1</b>	0,18767 <b>a1</b>	0,20833 <b>a1</b>	0,22553 <b>a1</b>	0,138 <b>a2</b>	0,20933 <b>a1</b>

Letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade.

### 3.2 Potencial de degradação bacteriana dos inseticidas cipermetrina e metomil

O gênero *Burkholderia* tem se mostrado muito versátil em desempenhar funções que auxiliem tanto na agricultura como no meio ambiente, seja em promover o crescimento em plantas (COMPANT et al., 2005; PEREIRA et al., 2012) fixando o nitrogênio atmosférico (SANTOS et al., 2012), solubilizando o fosfato (SONG et al., 2008) ou em agir na biodegradação de ambientes poluídos (MENDOZA et al., 2011). Ao nono dia de cultivo, pelo método utilizado, houve degradação do inseticida metomil em todas as concentrações avaliadas, pela bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867. Contudo, em relação a cipermetrina, esse perfil de comportamento foi observado apenas na concentração de 25 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 6).

Entre os diferentes gêneros bacterianos biodegradadores de pesticidas, o gênero *Pseudomonas* geralmente detém a capacidade em metabolizar uma ampla quantidade de compostos orgânicos (MALIK et al., 2008). A linhagem UAGC97, representante desse gênero, não apresentou indícios em utilizar o inseticida cipermetrina como fonte de carbono em nenhuma das concentrações avaliadas. Esses resultados se mostram antagonistas com estudos que relatam que ao passo que aumenta a concentração do cipermetrina há um decréscimo de crescimento pelo gênero *Pseudomonas* e um efeito negativo na sua taxa de degradação (JILANI; ALTAF KHAN, 2006; MURUGESAN et al., 2010). No entanto, referente ao inseticida metomil, observou-se que a linhagem UAGC97 apresentou uma provável degradação do inseticida na menor concentração avaliada, 25 mg.L<sup>-1</sup>.

Nos estudos realizados por MENDOZA et al. (2011), com três gêneros diferentes de bactérias, dentre elas a *Pseudomonas* e a *Burkholderia*, os mesmos observaram que o gênero *Burkholderia* se mostrou menos adaptável a crescer durante o processo de degradação das concentrações 50 mg.L<sup>-1</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup> de cipermetrina, em 10 dias de incubação. Quanto ao presente trabalho não houve diferença estatísticas entre ambos gêneros nas concentrações trabalhadas, exceto na concentração 25 mg.L<sup>-1</sup> de cipermetrina, onde

estatisticamente a linhagem UAGC867 de *Burkholderia* sp. se sobressaiu em relação a *Pseudomonas* sp. UAGC97, apresentando crescimento (densidade óptica) de 0,034 e 0,024, respectivamente, em 600 nm (Tabela 6).

Os gêneros bacterianos *Burkholderia* e *Pseudomonas* são bastante mencionados quanto a capacidade de degradar vários compostos químicos (GUPTA et al., 2015; DWIVEDI et al., 2010; MALGHANI et al., 2009; REVATHY et al., 2015). Nesse contexto, a bactéria *Burkholderia* sp. UAGC867, exibiu melhor biodegradação em relação a bactéria *Pseudomonas* sp. UAGC97 quanto aos inseticidas avaliados, expressando maior desempenho na degradação do inseticida metomil, tal linhagem é promissora para avaliações futuras.

**Tabela 6.** Densidade ótica (600nm) das bactérias *Burkholderia sp.* UAGC867 e *Pseudomonas sp.* UAGC97 em meio de cultura MMM ausente de glicose, sob os tratamentos de diferentes concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil, durante 9 dias.

<i>Burkholderia sp.</i> UAGC867						<i>Pseudomonas sp.</i> UAGC97				
CIPERMETRINA						CIPERMETRINA				
dia	0 mg.L <sup>-1</sup>	25 mg.L <sup>-1</sup>	50 mg.L <sup>-1</sup>	100 mg.L <sup>-1</sup>	200 mg.L <sup>-1</sup>	0 mg.L <sup>-1</sup>	25 mg.L <sup>-1</sup>	50 mg.L <sup>-1</sup>	100 mg.L <sup>-1</sup>	200 mg.L <sup>-1</sup>
1º	0,128 <b>a1</b>	0,017667 <b>a2</b>	0,004333 <b>a1</b>	0,037333 <b>a1</b>	0,018333 <b>a1</b>	0,181 <b>a1</b>	0,022333 <b>a1</b>	0,007333 <b>a1</b>	0,041667 <b>a1</b>	0,020667 <b>a1</b>
2º	0,127 <b>a1</b>	0,022333 <b>a2</b>	0,00867 <b>a1</b>	0,042333 <b>a1</b>	0,03 <b>a1</b>	0,187 <b>a1</b>	0,027333 <b>a1</b>	0,011667 <b>a1</b>	0,041 <b>a1</b>	0,022 <b>a1</b>
3º	0,116333 <b>a1</b>	0,013333 <b>a2</b>	0,009 <b>a1</b>	0,024667 <b>a1</b>	0,02 <b>a1</b>	0,178 <b>a1</b>	0,018333 <b>a1</b>	0,008667 <b>a1</b>	0,037 <b>a1</b>	0,017 <b>a1</b>
7º	0,100667 <b>a1</b>	0,019667 <b>a2</b>	0,01 <b>a1</b>	0,017 <b>a1</b>	0,024333 <b>a1</b>	0,174667 <b>a1</b>	0,027 <b>a1</b>	0,009 <b>a1</b>	0,019667 <b>a1</b>	0,022333 <b>a1</b>
8º	0,086333 <b>a2</b>	0,024667 <b>a2</b>	0,008667 <b>a1</b>	0,004667 <b>a1</b>	0,040667 <b>a1</b>	0,158333 <b>a1</b>	0,038333 <b>a1</b>	0,006667 <b>a1</b>	0,011 <b>a1</b>	0,038 <b>a1</b>
9º	0,054667 <b>a2</b>	0,034333 <b>a1</b>	0,003333 <b>a1</b>	0,015667 <b>a1</b>	0,045667 <b>a1</b>	0,111333 <b>a2</b>	0,024 <b>a1</b>	0,038333 <b>a1</b>	0,021 <b>a1</b>	0,019667 <b>a1</b>
dia	METOMIL					METOMIL				
1º	0,141 <b>a1</b>	0,003 <b>a2</b>	0,005 <b>a2</b>	0,004 <b>a2</b>	0,004333 <b>a2</b>	0,164 <b>a1</b>	0,004333 <b>a2</b>	0,004 <b>a1</b>	0,004667 <b>a1</b>	0,007667 <b>a1</b>
2º	0,115667 <b>a1</b>	0,002 <b>a2</b>	0,000333 <b>a2</b>	0,000667 <b>a2</b>	0,001333 <b>a2</b>	0,184333 <b>a1</b>	0,005667 <b>a2</b>	0,001667 <b>a1</b>	0,005333 <b>a1</b>	0,002667 <b>a1</b>
3º	0,107 <b>a1</b>	0,001333 <b>a2</b>	0,001333 <b>a2</b>	0,001667 <b>a2</b>	0,001333 <b>a2</b>	0,174667 <b>a1</b>	0,008667 <b>a2</b>	0,004333 <b>a1</b>	0,005 <b>a1</b>	0,004 <b>a1</b>
7º	0,088333 <b>a1</b>	0,001 <b>a2</b>	0,003667 <b>a2</b>	0,000667 <b>a2</b>	0,002 <b>a2</b>	0,184333 <b>a1</b>	0,013 <b>a2</b>	0,006 <b>a1</b>	0,010667 <b>a1</b>	0,008 <b>a1</b>
8º	0,091333 <b>a1</b>	0,003333 <b>a2</b>	0,025 <b>a2</b>	0,006 <b>a2</b>	0,002667 <b>a2</b>	0,0184667 <b>a1</b>	0,026 <b>a2</b>	0,013 <b>a1</b>	0,011667 <b>a1</b>	0,010333 <b>a1</b>
9º	0,03 <b>a2</b>	0,072333 <b>a1</b>	0,054667 <b>a1</b>	0,057667 <b>a1</b>	0,075 <b>a1</b>	0,101667 <b>a2</b>	0,082 <b>a1</b>	0,049 <b>a1</b>	0,028333 <b>a1</b>	0,041 <b>a1</b>
<b>CV% = 57,83</b>										

Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade.

### **3.3 Análise respirométrica para avaliação da interação inseticida cipermetrina X inoculantes bacterianos em ambiente de microcosmos**

A produção acumulada de CO<sub>2</sub> no período de 21 dias do solo inoculado com linhagens bacterianas UAGC97 e UAGC867, e contaminado com o cipermetrina, bem como não contaminado, pode ser observado na Figura 3.

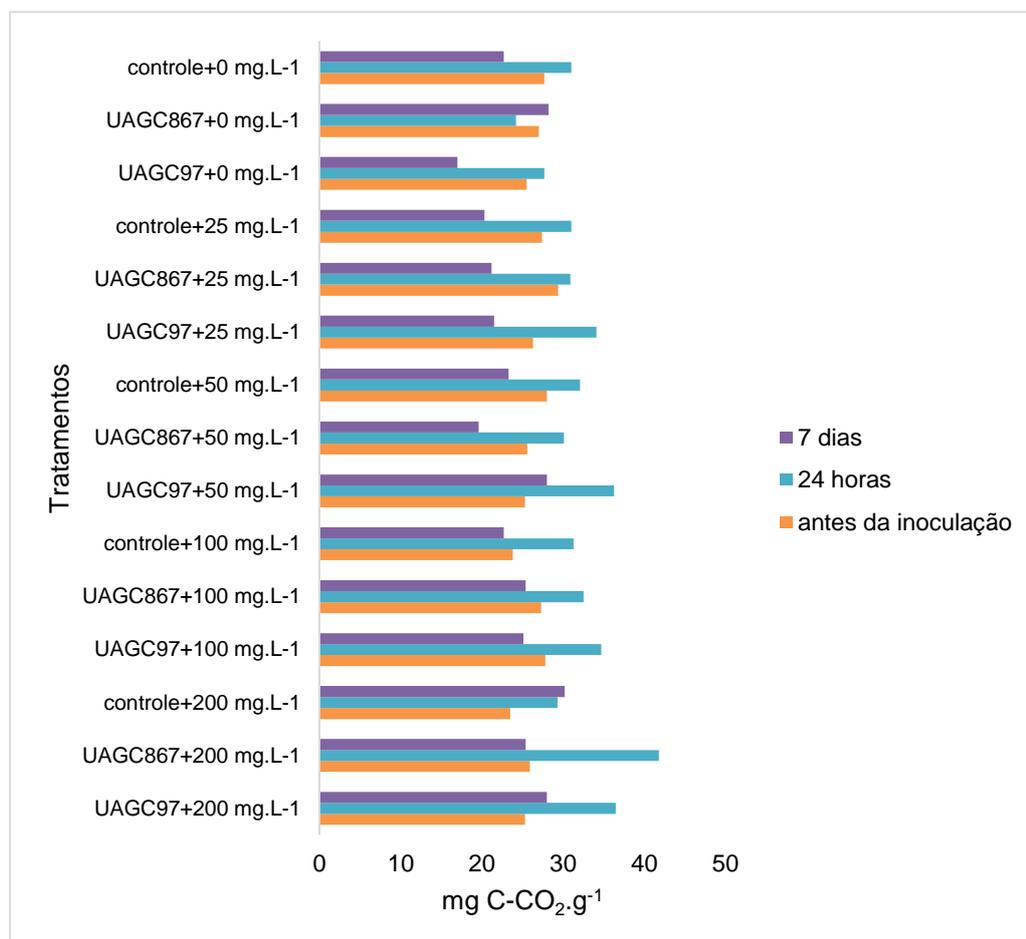
No microcosmos, 93,33% dos tratamentos apresentaram um aumento inicial da taxa de dióxido de carbono, 24 horas depois da aplicação da montagem do mesmo, na segunda coleta, seguido por um decréscimo na terceira coleta (7 dias), incluindo o controle. A correção da umidade do solo, pela adição da água destilada, pode ter ocasionado a solubilização dos compostos orgânicos do solo, deixando-os mais disponíveis a microbiota nativa. Contudo, a quantidade de carbono disponibilizado nesse processo foi insuficiente para manter a população, ocasionando assim um declínio da taxa respiratória (COLLA, 2012; MERCADO, 2013).

A introdução da linhagem UAGC867 no solo ocasionou uma diminuição de 10,37% da taxa de CO<sub>2</sub> acumulado, podendo-se inferir que houve um desequilíbrio da microbiota existente, ocasionado pela competição entre a bactéria introduzida e os micro-organismos nativos, apresentando assim uma queda inicial na taxa respiratória. No entanto, houve um aumento de 28,2 mg C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> (com 21 dia de acumulo) na coleta dos 7 dias após a sua inoculação.

A aplicação da cipermetrina na concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>, proporcionou benefícios no aumento de mg C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>, demonstrando que possivelmente os micro-organismos nativos se beneficiaram dessa fonte de carbono em concentração elevada, ou de acordo com Lopes et al. (2011) , a alta concentração de metais no solo ocasionou uma maior abundância de espécies bacterianas resistentes, visto que em solos não contaminados ocorre uma dominância de bactérias não resistentes.

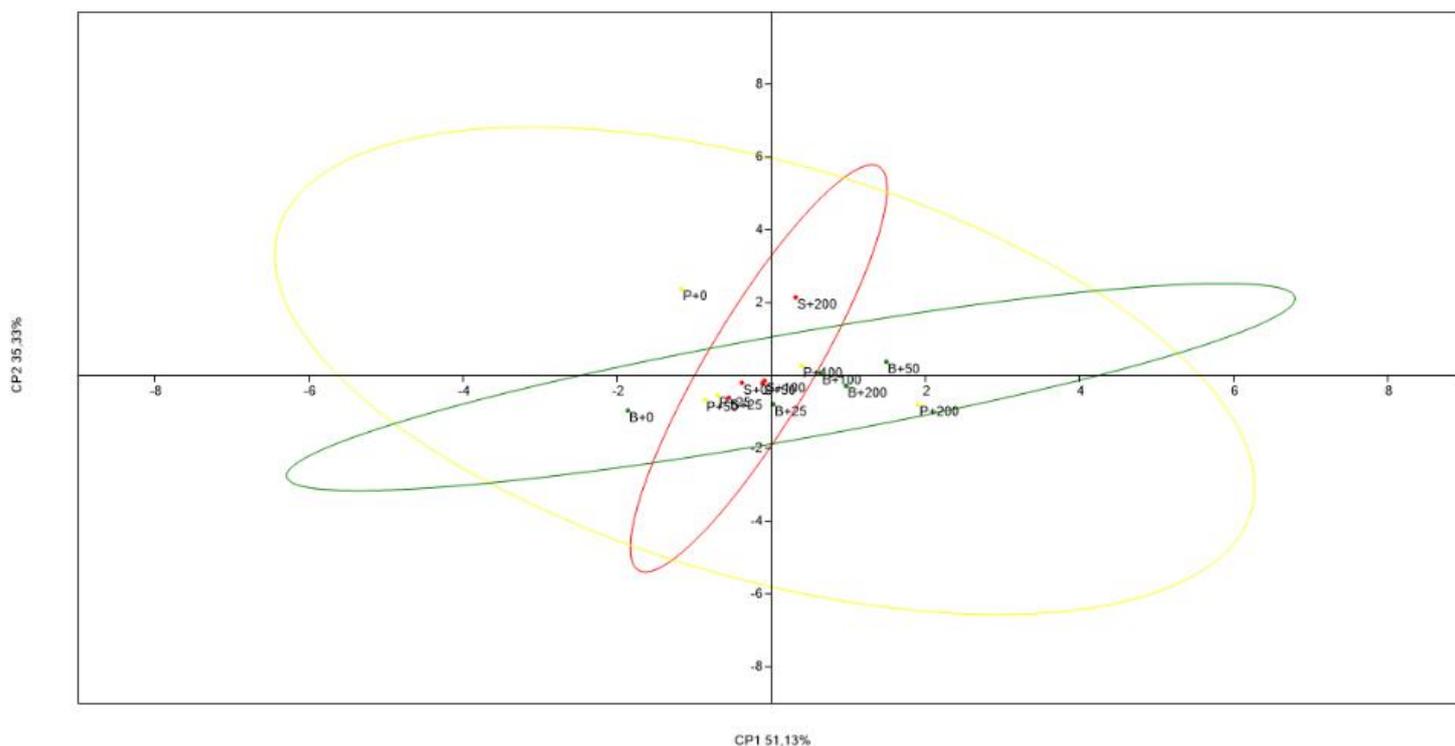
As oscilações de dióxido de carbono capturado entre os tratamentos são ocasionadas, entre tantos outros fatores, pela interação da característica físico/química do solo, junto a sua umidade com a capacidade dos micro-

organismos presentes neste solo em degradar a molécula do pesticida (SOUZA et al., 1999).



**Figura 3.** Produções de C-CO<sub>2</sub> de três coletas de solo (antes da inoculação, 24 horas depois da inoculação e 7 dias depois da inoculação) acumuladas aos 21 dias de avaliação, do solo inoculado com as linhagens bacterianas UAGC97 e UAGC867, e diferentes concentrações do inseticida cipermetrina: 0, 25, 50, 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup>.

A meia vida do cipermetrina no solo, segundo CHAPMAN et al. (1981), é entre 2 à 4 semanas, no contexto do presente trabalho, o solo arenoso pôde ter sido motivo de uma baixa persistência do inseticida no solo (SOUSA, 2010), visto que na análise de componentes principais, não foi observado desagrupamento pelos tratamentos avaliados (Figura 4).



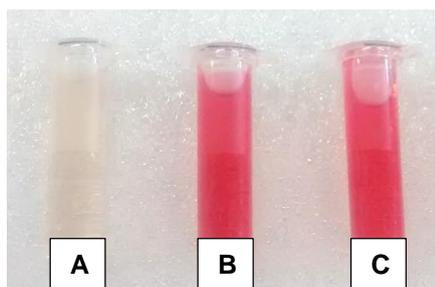
**Figura 4.** Análise de componentes principais das variáveis: bactérias (B=*Burkholderia* sp. UAGC867; P=*Pseudomonas* sp. UAGC97 e S=ausente de inoculo) e concentrações de cipermetrina (0 mg.L<sup>-1</sup>; 25 mg.L<sup>-1</sup>; 50mg.L<sup>-1</sup>; 100 mg.L<sup>-1</sup>; 200 mg.L<sup>-1</sup>), inoculadas em solo sob ambiente de microcosmos.

A aglomeração entre os tratamentos juntamente com o tratamento controle, que não apresentava aplicação de cipermetrina, mostra um indicativo que tais concentrações do pesticida não apresentaram influência sobre liberação de CO<sub>2</sub>.

### 3.4 Influência do inseticida cipermetrina sobre a produção *in vitro* do ácido indol acético (AIA) bacteriano

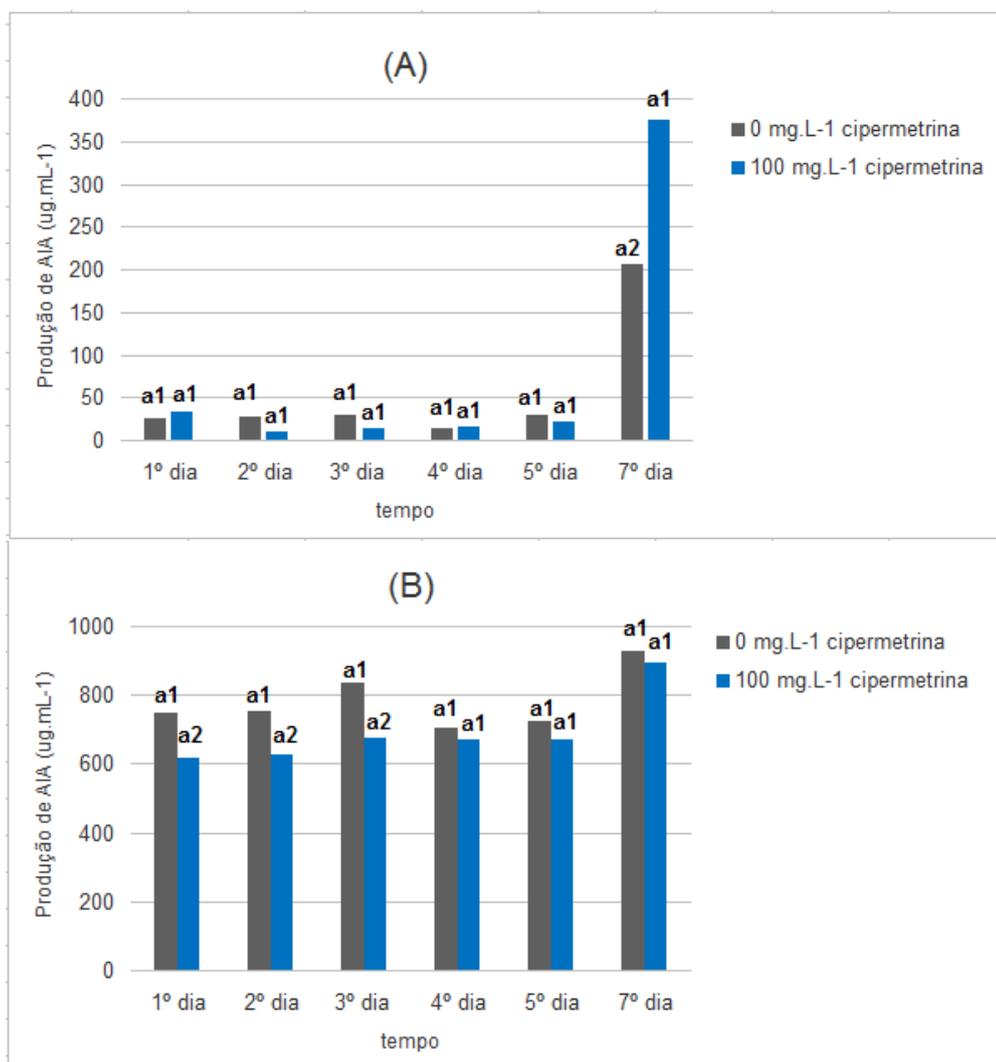
A influência do inseticida cipermetrina sobre a produção do ácido indol acético, pelas linhagens *Pseudomonas* sp. UAGC97 e *Burkholderia* sp. UAGC867, foi avaliada por método colorimétrico (Figura 5), e quantificada. Esse fitohormônio, o AIA, seja quando é produzido pelas próprias plantas, seja quando

produzido por micro-organismos, pode estimular a germinação das sementes e controlar os processos de crescimento vegetativos, além de iniciar o processo de enraizamento, entre outros, revelando a importância do mesmo para o desenvolvimento vegetal (AHEMAD; KIBRET, 2014).



**Figura 5.** Indicativo da síntese de ácido indol acético por bactérias, em meio de cultivo sem e com o inseticida cipermetrina. Coloração rósea indica produção de AIA: **A** – controle; **B** – produção na ausência do inseticida; **C** – produção na presença do inseticida.

A concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de cipermetrina foi escolhida por ser equivalente a concentração de aplicação em campo para o cultivo de milho (NORTOX, 2013). Além disso, foi considerado o tempo de cultivo bacteriano, uma vez que já foi observado que a produção de AIA por bactérias, inclusive do gênero *Burkholderia*, apresentam variação na quantidade de AIA produzido em função do tempo (NAVEED et al., 2014; TALLAPRAGADA et al., 2015). Diante disso, no presente trabalho, a linhagem de *Pseudomonas* não apresentou influência na produção de AIA, *in vitro*, pelo inseticida cipermetrina, durante os primeiros 5 dias de cultivo. No entanto, ao sétimo dia, a produção de AIA pela *Pseudomonas* sp. UAGC97 se destacou no meio de cultivo com a cipermetrina, chegando a uma produção de  $375,631 \text{ ug.mL}^{-1}$ , ou seja, nesse caso, ao longo do tempo de cultivo o inseticida estimulou a produção de AIA (Figura 6A).



**Figura 6.** Produção do ácido indol acético (AIA) pelas bactérias: *Pseudomonas* sp. UAGC97 **(A)** e *Burkholderia* sp. UAGC867 **(B)** nas concentrações 0 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de cipermetrina, em função do tempo de cultivo. Colunas, em cada tempo de cultivo, com letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A produção do ácido indol acético produzido pela *Burkholderia* sp. UAGC867, foi menor na presença do inseticida cipermetrina até o terceiro dia de avaliação, dados semelhantes foram observados por Ahemad e Khan (2012), que perceberam a diminuição da produção de AIA conforme o aumento da concentração do inseticida. No entanto, do 4º ao 7º dia de avaliação, não se percebeu diferença estatística da produção de AIA pela *Burkholderia* sp.

UAGC867 na presença do pesticida em relação ao meio ausente do mesmo (Figura 6B).

A bactéria *Burkholderia* sp. UAGC867 apresentou produções excelentes de AIA ao longo da avaliação, chegando a produção máxima de 926,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no meio ausente do pesticida e 893,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio acrescido de cipermetrina, ambos na presença do precursor triptofano, que tem como função modular os níveis de biossíntese de AIA, e aumentar sua produção pela maioria das bactérias em meio de cultura (AHMED et al., 2014).

A quantidade do ácido indol acético produzido pelas bactérias tem influência de vários fatores, estando inclusos a localização dos genes responsáveis pela biossíntese e a limitação do carbono (SPAEPEN et al., 2007). Segundo a classificação feita por Montañez et al. (2012), da produção do AIA pelas bactérias, a *Pseudomonas* sp. UAGC97 teve produção baixa até o quinto dia de avaliação (com produção de até 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), chegando no final da avaliação com alta produção do ácido indol acético (superior a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já a *Burkholderia* sp. UAGC867 manteve ao longo do tempo com alta produção do fitohormônio, dados semelhantes ao de Santos (2015), que ao testar linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp., observou uma síntese máxima na produção do ácido indol acético de 226,71  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , na presença de L-triptofano.

### **3.5 Influência da inoculação bacteriana, cultivada em meio com cipermetrina, sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho**

O cultivo das bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, em meio acrescido de cipermetrina na concentração de campo (100  $\text{mg L}^{-1}$ ), teve como objetivo a simulação da atividade das bactérias na promoção do crescimento na fase inicial das sementes de milho, com a presença dos resquícios do pesticida no solo.

A capacidade das bactérias em sintetizarem o AIA, pode promover efeitos benéficos no aumento da germinação e na emergência (ARAÚJO et al., 2012;

MIA et al., 2012). O vigor das sementes avaliadas proporcionaram além de altos valores de IVE, uma uniformidade no percentual de germinação entre os tratamentos (OLIVEIRA et al., 2009), não apresentando assim, diferença significativa para as variáveis analisadas, ou seja, as bactérias avaliadas não apresentaram influência nesse processo, nem o inseticida acrescido ao meio de cultura bacteriano interferiu de maneira significativa o percentual de germinação e o índice de velocidade de emergência (IVE) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de milho, sob diferentes tratamentos.

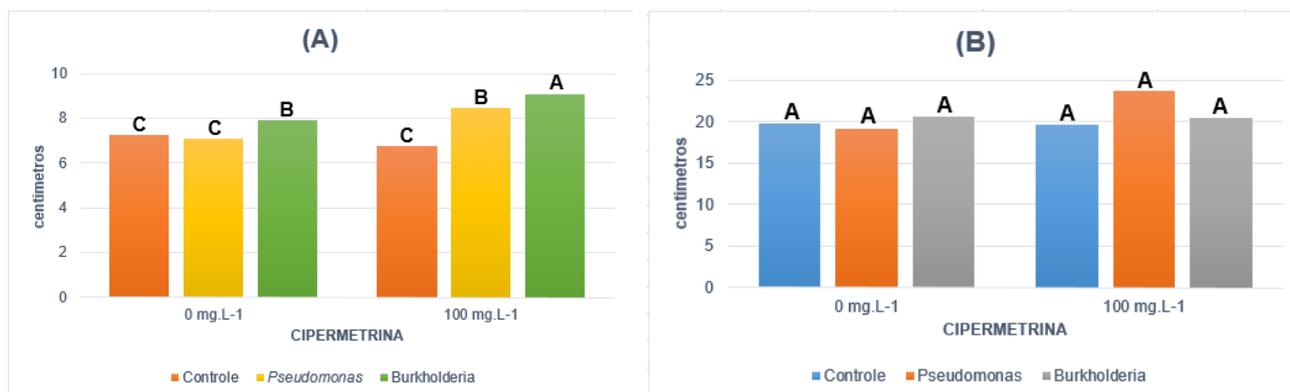
Tratamento	% de germinação	IVE
Controle total	98,33 <b>a1</b>	4,917 <b>a1</b>
Controle da bactéria	100,00 <b>a1</b>	5,000 <b>a1</b>
UAGC97 ausente do cipermetrina	100,00 <b>a1</b>	5,000 <b>a1</b>
UAGC97 com 100 mg L <sup>-1</sup> do cipermetrina	95,00 <b>a1</b>	4,750 <b>a1</b>
UAGC867 ausente do cipermetrina	98,33 <b>a1</b>	4,917 <b>a1</b>
UAGC867 com 100 mg L <sup>-1</sup> do cipermetrina	100,00 <b>a1</b>	5,000 <b>a1</b>
<b>CV%</b>	<b>2,88</b>	<b>2,88</b>

Letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Considerando o desenvolvimento das plântulas de milho, a presença da cipermetrina (100 mg L<sup>-1</sup>) no meio de cultura bacteriano, estimulou o desenvolvimento da parte aérea quando inoculadas com o gênero *Burkholderia* sp. UAGC867, chegando a medir 9,07 cm de comprimento, enquanto que na ausência do inseticida, a mesma bactéria proporcionou um comprimento de 7,94 cm de parte aérea (Figura 7A).

Embora a produção do ácido indol acético produzido pelas bactérias tenha sido alto na presença da cipermetrina, chegando a 893,183 ug mL<sup>-1</sup> pela *Burkholderia* sp. UAGC867 e 375,631 ug mL<sup>-1</sup> pela *Pseudomonas* sp. UAGC97

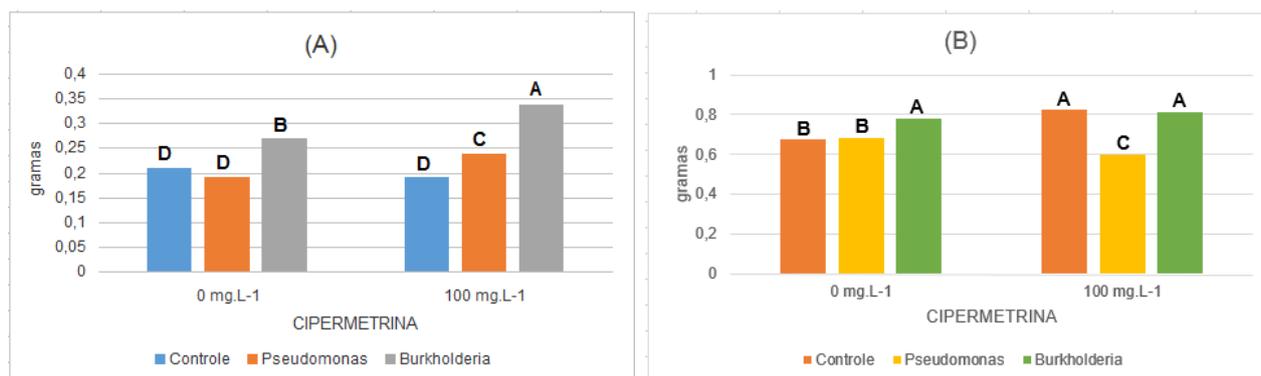
(Figura 5), não foi observado um favorecimento desses inoculantes ao desenvolvimento radicular do milho, podendo-se inferir que a alta produção do fitohormônio possa ter inibido o desenvolvimento das plântulas de milho (LEITE et al., 2014). Em contrapartida, houve desenvolvimento radicular promovido pelas linhagens bacterianas em todos os tratamentos realizados (Figura 7B).



**Figura 7.** Comprimento da parte aérea (A) e comprimento da raiz (B) de plântulas de milho inoculadas com as bactérias *Pseudomonas* sp. UAGC97 e *Burkholderia* sp. UAGC867, cultivadas com e sem o inseticida cipermetrina.

A linhagem de UAGC867 do gênero *Burkholderia* sp. apresentou influência mais significativa quando cultivada em meio com 100 mg.L<sup>-1</sup> de cipermetrina. Além disso, essa bactéria também favoreceu aumento de massa fresca de raiz, mas nesse caso, apenas quando cultivada sem o inseticida (Figura 8B). A linhagem de *Pseudomonas* sp. UAGC97 não apresentou influência significativa em relação ao ganho de massa fresca vegetal (Figura 8).

O aumento da produção vegetal pode ser alcançado pelo uso de BPCP (SILVA, 2014). Contudo, o nicho em que essas bactérias são isoladas pode ser um dos fatores de influência para o desenvolvimento de uma parte específica da planta, visto que houve um aumento de massa fresca da parte aérea das plântulas nos tratamentos avaliados, independente do inseticida, pela *Burkholderia* sp. UAGC867 que é endofítica de raiz, (Figura 8A), sendo também observado por Conceição et al. (2008) em plantas de milho.



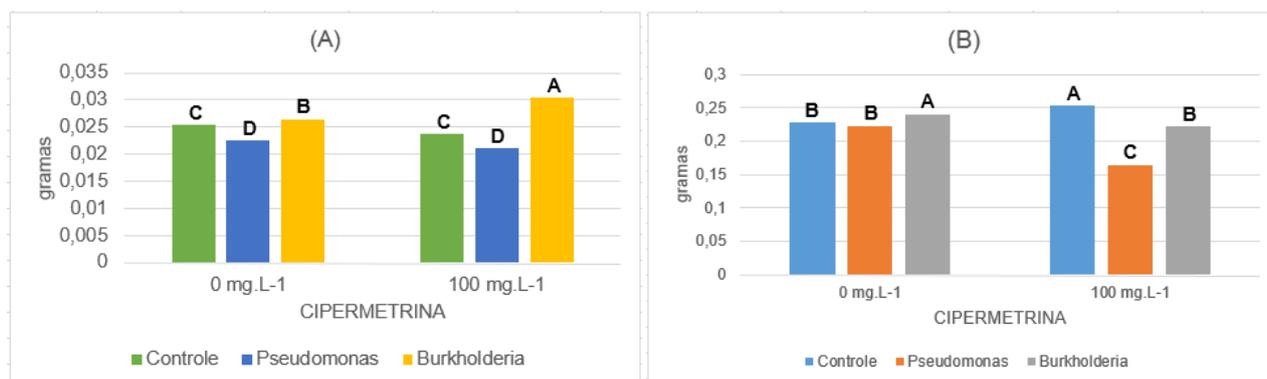
**Figura 8.** Massa fresca da parte aérea (A) e massa fresca da raiz (B) se plântulas de milho inoculadas com *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, cultivadas com e sem inseticida cipermetrina.

Em relação a fitomassa seca, a linhagem UAGC867 de *Burkholderia* sp. apresentou o mesmo comportamento descrito no item anterior, ou seja, essa linhagem influenciou positivamente o desenvolvimento da parte aérea vegetal, em ambos os tratamentos. Mas, mais uma vez, apresentou melhor resultado quando cultivada com o inseticida cipermetrina, apresentando um aumento de 20,30% em massa quando comparada com o controle geral. Observa-se também que a presença do cipermetrina contribui com um aumento de produção da fitomassa seca da parte aérea produzido pela UAGC867 de 15,33% quando contrastado com seu cultivo ausente do inseticida (Figura 9A).

A bactéria *Burkholderia* sp. UAGC867 quando cultivada em meio ausente ao inseticida, promoveu 0,267 g de fitomassa seca total, peso superior ao achado por de FARIAS (2015) com a bactéria *Stenotrophomonas* sp. UAGC982 (0,035g), e inferior ao de SANTOS (2015) pela linhagem UAGF55 (7,788g), trabalhos realizados com a mesma metodologia e mesma variedade de semente de milho do presente estudo.

A inoculação da linhagem UAGC867, no meio ausente ao pesticida, não apresentou diferenças estatísticas entre o controle acrescido com 100 mg.L<sup>-1</sup>, se destacando dos demais tratamentos, chegando a um peso de 0,031g. Foi observado que quando cultivados em meio ausente do cipermetrina, as espécies

*Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. promoveram um ganho de massa seca do sistema radicular de 36,59% e 7,81%, respectivamente, quando comparado com seus cultivos em meio acrescido do inseticida (Figura 9B).



**Figura 9.** Massa seca da parte aérea (A) e massa seca da raiz (B) de plântulas de milho inoculadas com *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97, cultivadas com e sem inseticida cipermetrina.

Embora o gênero bacteriano *Pseudomonas* tenha se mostrado em vários trabalhos como promotoras de crescimento de plantas (ALIZADEH et al., 2013; BABALOLA, 2010; CHAVES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012; PEDRINHO, 2009), no presente trabalho o gênero representado pela linhagem UAGC97 não apresentou potencial de promoção.

#### 4. CONCLUSÕES

- As bactérias *Burkholderia* sp. UAGC867 e *Pseudomonas* sp. UAGC97 conseguiram tolerar todas as concentrações dos inseticidas cipermetrina e metomil;
- Houve degradação do inseticida metomil em todas as concentrações pela *Burkholderia* sp. UAGC867, além da degradação do inseticida cipermetrina na concentração mínima de 25 mg L<sup>-1</sup> pelas bactérias *Pseudomonas* sp. UAGC97 e *Burkholderia* sp. UAGC867;
- A taxa respirométrica do solo expressou oscilações quanto ao dióxido de carbono capturado nos tratamentos avaliados;
- O inseticida cipermetrina não inibiu a síntese do ácido indol acético pelas bactérias promotoras de crescimento de plantas avaliadas, mostrando destaque para a bactéria *Pseudomonas* sp. UAGC97;
- Não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados no índice de velocidade de germinação e na percentagem de germinação, contudo, o cultivo da bactéria *Burkholderia* sp. UAGC867 na presença de 100 mg L<sup>-1</sup> cipermetrina estimulou o crescimento da parte aérea das plântulas de milho, além de apresentar resultados significativos na massa fresca e seca da parte aérea;
- As bactérias avaliadas exibem características de promoção de crescimento vegetal, apresentando potencial para exploração mais minuciosa da sua interação com a planta.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT: **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. 2003. Acessado em 20 de nov. 2015. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit>>.

AHMED, E. A.; HASSAN, E. A.; EL TOBGY, K. M. K.; RAMADAN, E. M. **Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control**. Annals of agricultural science, v. 59, n. 2, 273-280 p. 2014.

AHEMAD, M. e KHAN, M.S. **Effects of Pesticides on Plant Growth Promoting Traits of Mesorhizobium Strain Mrc4**. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 11, n. 1, 63-71 p. 2012.

AHEMAD, M. e KIBRET, M. **Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective**. Journal of King Saud University – Science. V.26. 20 p. 2014.

AISLABIE, J.M.; LLOYD-JONES, G. **A review of bacterial degradation of pesticides**. Australian Journal of Soil Research. v.33, 925-942 p. 1995.

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.

ARAÚJO, F.F.; GUABERTO, L.M.; SILVA, I.F. **Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha***. Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, 521-527 p. 2012.

- BABALOLA, O. O. **Beneficial bacteria of agricultural importance.** Biotechnology Letters, v. 32, n. 11. 1559-1570 p. 2010.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa/ACS. 399p. Brasília, 2009.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G.R.L.; MULLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. **Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento in vitro da macieira.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. v. 34. n.2. 181 – 186 p. 1999.
- CHAPMAN, R.A., TU, C.M., HARRIS, C.S. e COLE, C. **Persistence of five pyrethroid insecticides in sterile and natural mineral and organic soil.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 26: 513-519 p. New York, 1981.
- CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. **Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho.** Semina: Ciências Agrárias, v.34, n.1, 57-72 p. 2013.
- COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano.** Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 138 p. 2012.
- COMPANT, S., REITER, B., SESSITSCH, A., NOWAK, J., CLEMENT, C., AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied Environmental Microbiology**, n.71, p.1685-1693, 2005.

- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária**. Vol. 13, 130 p. Brasília. 2015.
- CONCEIÇÃO, P.M.; DUARTE VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; MARQUES JÚNIOR, R.B.; OLIVARES, F.L. **Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.43, 545-548 p. 2008.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. **Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense***. Applied and Environmental Microbiology. v.54, 2833-2837 p. 1988.
- DWIVEDI, S.; SINGH, B.R.; AL-KHEDHAIRY, A.A. e MUSARRAT, J. **Biodegradation of isoproturon using a novel *Pseudomonas aeruginosa* strain JS-11as a multi-functional bioinoculant of environmental significance**. Journal of Hazardous Materials, 938–944 p. 2010.
- DUBEY, K.K.; FULEKAR, M.H. **Investigation of potential rhizospheric isolate for cypermethrin degradation**. 3 Biotech. 33–43 p. 2012.
- FARIAS, A.R.B. **Inoculação de sementes de feijão e milho com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 76 p. 2015.
- FARIAS, A.R.B.; LIMA, D.R.M.; LIRA-CADETE, L.; RAMOS, A.P.S.; SILVA, M.C.B.; FREIRE, F.J. e KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar**. Pesquisa Agropecuária Pernambucana. V.17, n. único. 101-104 p. Recife. 2012.

- FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.4. UFLA - 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.
- GUPTA, M.; MATHUR, S.; SHARMA, T.K.; RANA, M.; GAIROLA, A.; NAVANI, N.K.; PATHANIA, R. **A study on metabolic prowess of Pseudomonas sp. RPT 52 to degrade imidacloprid, endosulfan and coragen**. Journal of Hazardous Materials. 250–258 p. 2015.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. & RIAN, P. D. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version 2.17c. 2001.
- INUI, R. N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal. 90p. 2009.
- JILANI, S.; ALTAF KHAN, M. **Biodegradation of Cypermethrin by pseudomonas in a batch activated sludge process**. International Journal of Environmental Science and Technology, volume 3, n. 4. 371-380 p. 2006.
- JING-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.

- 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.
- KASEMODEL, M.C.; PORTO, A.L.M. e NITSCHKE, M. **Biodegradação bacteriana de compostos organoclorados.** Química Nova. vol. 37, No. 8. 1351-1356 p. 2014.
- LEITE, M. C. B. S. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana-de-açúcar em solos da zona da mata de Pernambuco.** Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 91 p. 2012.
- LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. **Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.18, 73–79 p. 2014.
- LIMA, D. R. M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 110 p. 2012.
- LOPES, A.; REMÉDIOS, C.; DEUS, C.; BARROS, S. **Identificação da presença de bactérias resistentes a metais em solos não contaminados por poluição industrial.** CAPTAR ciência e ambiente para todos, volume 3, n.2, 95-103 p. 2011.

- MAGUIRE, J.D. **Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor.** Crop Science, v.2, 176-177 p. 1962.
- MALGHANI, S.; CHATTERJEE, N.; YU, H.X. e LUO, Z. **Isolation and identification of profenofos degrading bacteria.** Brazilian Journal of Microbiology, 893-900 p. 2009.
- MALIK, D.; SINGH, M.; BHATIA, P. **Biodegradation of Cypermethrin by a Pseudomonas Strain Cyp19 and its use in Bioremediation of contaminated soil.** Journal of Microbiology, volume 6, n. 2. 6 p. 2008.
- MAPA – MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2003. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2015.
- MARCHIORO, T.E.L. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio.** Tese de Doutorado, Pós Graduação em Microbiologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 74p. 2005.
- MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas.** Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo. 167-183 p.1997.
- MENDOZA, JOSÉ C.; PEREA, YAZMIN S.; SALVADOR, JAIME A.; MORALES, JANETTE A. e PÉREZ, GABRIELA. **Biodegradación Bacteriana de Plaguicidas Permetrina Y Cipermetrina en Cultivo Lote.** Avances en Ciencias e Ingeniería, vol. 2, n.3. 45-55 p. Puebla, México. 2011.

- MERCADO, L.W. **Biorremediação de solo contaminado com a mistura B10 em concentração de intervenção.** Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 144 p. 2013.
- MIA, M.A.B.; SHAMSUDDIN, Z.H.; MAHMOOD, M. **Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice.** African Journal Biotechnol, v.16, 37-58 p. 2012.
- MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. **Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro.** Applied Soil Ecology, n. 54, 21-28 p. 2012.
- MURUGESAN, A.G.; JEYASANTHI, T.; MAHESWARI, S. **Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil.** African Journal of Microbiology Research, volume 4, n.1. 10-13 p. 2010.
- NAVEED, M.N.; QURESHI, M.A.; ZAHIR, Z.A.; HUSSAIN, M.B.; SESSITSCH, A. e MITTER, B. **L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN.** Annals of Microbiology, 9 p. 2014.
- OKOH, A.; AJISEBUTU, S.; BABALOLA, G.; TREJO-HERNANDEZ, M.R. **Potential of *Burkholderia cepacia* RQ1 in the biodegradation of heavy crude oil.** International Journal of Microbiology. 83-87 p. 2001.

- OLIVEIRA, A.C.S.; MARTINS, G.N.; SILVA, R.F.; VIEIRA, H.D. **Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas.** Revista Científica Internacional, v.4, 21 p. 2009.
- OLIVEIRA, M. A.; ZUCARELLI, C.; SPOLAOR, L. T.; DOMINGUES, A. R.; FERREIRA, A. S. **Composição química dos grãos de milho em resposta à adubação mineral e inoculação com rizobactérias.** Revista Ceres. v.59, n.5, 709-715 p. 2012.
- PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.).** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 87 p. 2009.
- 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-SOBRA, 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.
- RAMU, S.; SEETHARAMAN, B. **Biodegradation of acephate and methamidophos by a soil bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain Is-6.** Journal of Environmental Science and Health. 23-34 p. 2013.
- REVATHY, T.; JAYASRI, M.A. e SUTHINDHIRAN, K. **Biodegradation of PAHs by *Burkholderia* sp. VITRSB1 Isolated from Marine Sediments.** Scientifica - Hindawi Publishing Corporation, volume 2015, 9 p. 2015.
- 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.

- SANTOS, I.B. **Bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar: Diversidade Genética e Promoção de Crescimento Vegetal.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 133 p. 2015.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.T.C.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade.** Bioscience Journal, Uberlândia. v. 28, 142-149 p. 2012.
- SILVA, F.G. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de *Atriplex nummularia* L. e sua inoculação em mudas.** Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 90 p. 2014.
- SILVA, M. O. **Bactérias associadas a cana-de-açúcar: Isolamento e potencial promoção do crescimento vegetal.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. Tese de Doutorado. 69 p. 2011.
- SONG, OK-RYUL; LEE, SEUNG-JIN; LEE, YONG-SEOK; LEE, SANG-CHEOL; KIM, KEUN-KI e CHOI, YONG-LARK. **Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia DA23 isolated from cultivated soil.** Brazilian Journal of Microbiology, vol.39, no.1, 151-156 p. 2008.
- SOUSA, A.P.A. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei*.** Dissertação de Mestrado. Instituto Biológico. 57 p. São Paulo, 2010.
- SOUZA, A.P.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A.; CARDOSO, A.A. e RUIZ, H.A. **Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr.** Planta Daninha, v. 17, n. 3, 387-398 p. 1999.

- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. **Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling**. FEMS Microbiology Reviews. v.31, 425-448 p. 2007.
- STOTZKY, G. MICROBIAL RESPIRATION. In: BLACK, C.A. (ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, v.2, cap.113, 1551-1572 p. 1965.
- TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan. Porto Alegre. 454-460 p. 2004.
- TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R. e SESHAGIRI, S. **Isolation and optimization of IAA producing *Burkholderia seminalis* and its effect on seedlings of tomato**. Songklanakarin Journal of Science and Technology, v. 37, n. 5, 553-559 p. 2015.
- VERMA, J.P.; JAISWAL, D.K. e SAGAR, R. **Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art**. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 38 p. 2014.
- WOOD, T.K. **Molecular approaches in bioremediation**. Current Opinion in Biotechnology, v. 19, 572–578 p. 2008.
- YOU, M. e LIU, X. **Biodegradation and bioremediation of pesticide pollution**. Chinese Journal of Ecology, v. 23, 73–77 p. 2004.