

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Letícia Barbosa Jorososki

Graduanda em Engenharia Agrônômica

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS
AUTÓCTONES EM SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-
AÇÚCAR E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL DE
BIODEGRADAÇÃO DE TEBUTHIURON**

Dracena

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Letícia Barbosa Jorososki

Graduanda em Engenharia Agrônômica

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS
AUTÓCTONES EM SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-
AÇÚCAR E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL DE
BIODEGRADAÇÃO DE TEBUTHIURON

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Campus
de Dracena como parte das exigências
para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes
Co-orientador: Ms. Bruno Rafael de Almeida Moreira

Dracena
2023

J82b

Jorososki, Letícia Barbosa

Bioprospecção de microrganismos autóctones em solo cultivado com cana-de-açúcar e avaliação de seu potencial de biodegradação de tebuthiuron / Letícia Barbosa Jorososki. -- Dracena, 2023

54 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena

Orientador: Paulo Renato Matos Lopes

Coorientador: Bruno Rafael de Almeida Moreira

1. Impacto Ambiental. 2. Biorremediação. 3. Colorimetria. 4. Teoria Bayesiana de decisão estatística. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Bioprospecção de microrganismos autóctones em solo cultivado com cana-de-açúcar e avaliação de seu potencial de biodegradação de tebuthiuron

Modalidade: Atividades de pesquisa

Autora: Letícia Barbosa Jorososki

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes

Número de Créditos: 12

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 19/06/2023



Paulo Renato Matos
Lopes

Diego Cunha Zied

Leandro Tropaldi

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Letícia Barbosa Jorososki, nascida em 06 de dezembro de 2000, na cidade de São Paulo/SP. Ingressou em 2018 na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAT/Unesp) – Campus de Dracena, no curso de graduação em Engenharia Agrônômica. Iniciou participação ativa no Grupo de Ação em Impactos ambientais (GAIA) no mesmo ano, conjuntamente ao desenvolvimento de pesquisas na área de microbiologia agrícola, com ênfase em biorremediação, além de projetos de educação ambiental. Foi bolsista PIBIC/CNPq em 2020-2021 com trabalho intitulado “Avaliação da microbiota em solos fitorremediados com espécies de interesse agrônômico com tebuthiuron e vinhaça”. Posteriormente, foi contemplada com bolsa FAPESP de iniciação científica em 2021 com o projeto “Bioprospeção de microrganismos autóctones e diversidade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar e avaliação do seu potencial de biodegradação de tebuthiuron”. Realizou estágios não-obrigatórios nas áreas de Agroecologia (2018) e Agricultura Biodinâmica (2022) no Rancho Y-Îara Agroecologia (Panorama-SP) e na Associação Brasileira de Agricultura Biodinâmica (Botucatu-SP), respectivamente. De julho/2022 a dezembro/2022 foi intercambista pelo programa “Asociación de Universidades Grupo Montevideo” na Universidad Nacional de Asunción (Paraguai), onde realizou disciplinas no curso de graduação em “Ingeniería em Ecología Humana”. Recebeu menção honrosa pelo 2º melhor trabalho apresentado na 1ª fase do “XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp – CIC 2021”, sendo classificada para a 2ª fase do evento. Além disso, durante o período de graduação, realizou diversas vivências voluntárias e de extensão universitária, participou como ouvinte e apresentadora em eventos científicos e cursos na área, e publicou trabalhos em anais de eventos como primeira autora e como colaboradora.

DEDICATÓRIA

À alegria que é viver rodeada de amor.
À minha mãe, que me deu a vida e me
proporcionou educação, afeto e
dedicação, raízes fortes que sustentam
hoje frutos doces e carnosos, prontos para
findarem o ciclo de mais uma estação
evolutiva.
Ao Universo.

AGRADECIMENTOS

Para o florescer deste trabalho foram responsáveis inúmeras pessoas e iniciativas, que me possibilitaram ascender, degrau a degrau, o privilégio da conclusão do curso em Engenharia Agrônômica em uma das melhores universidades públicas do estado de São Paulo.

Agradeço principalmente à minha mãe Magda, que, com muita dedicação, força e amor incondicional, pôde me proporcionar educação, apoio emocional e financeiro durante toda a vida, motivo primordial da conclusão deste trabalho. Sem você minha vida seria muito mais tortuosa e eu não seria a pessoa que sou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes, que me incentivou a sempre continuar e alcançar o possível e o impossível, sempre com muito acolhimento, cuidado e educação. Me sinto inspirada e grata por estes cinco anos de dedicação ao ensino e atenção ao processo de aprendizagem que pôde me proporcionar.

Ao meu co-orientador Bruno Rafael de Almeida Moreira, que com ideias inspiradoras, pôde contribuir com excelência na qualidade científica deste trabalho.

Ao meu pai Rogério e à sua mulher Rosilene, cujo subsídio financeiro me ajudou durante à graduação.

À Coordenadoria de Permanência Estudantil (COPE-Unesp), que possibilitou minha continuação e permanência durante os primeiros anos de graduação e que constitui papel fundamental para diversos alunos em vulnerabilidade socioeconômica que alcançam o ensino superior público no Brasil.

Ao meu coletivo de irmãs e parceiros coloridos e holísticos, que me ensinam diariamente que a construção e plantio de um mundo sano, alegre, político e palhaço é possível. Naélia, Isabela, Mohamed, Luciana, Melissa, Vinícius, Bruna e Victor, sem vocês meus sonhos não seriam possíveis de serem sonhados.

À minha amiga Danielle, que com risadas que preenchem a alma e com amor, sempre foi e segue companheira e trampolim na vida, nas aulas e nos trabalhos. Sou muito grata pela construção dessa amizade tão bonita.

Ao meu companheiro de alma Albecy, que com carinho, compreensão e resiliência me ensina diariamente sobre paciência e sinergia.

À república Ohana, que me ensinou maturidade aos 17 anos de idade, e cujas experiências me enriqueceram o olhar para o mundo.

Ao Grupo de Ação em Impactos Ambientais – GAIA e seus participantes, que me apoiaram durante todas as iniciações científicas, projetos de extensão e eventos organizados. Luziane, Victor, Vinícius Andreotti, Laura e Munick, agradeço ao apoio, ideias, parcerias e toda ajuda que me ofertaram.

À FCAT/Unesp, docentes, técnicos administrativos, técnicos de laboratório e técnicos de campo, que, com muito trabalho, oferecem estrutura e conhecimento para processos de transformação social e profissional.

Ao Grupo de Aquicultura da Unesp (GAUD), ao professor Leonardo Takahashi e à doutoranda Gabriela por me auxiliarem a partir do empréstimo e capacitação na utilização do espectrofotômetro para as análises deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento à pesquisa científica nacional e pelo financiamento do projeto de iniciação científica (Processo 2021/06952-0).

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Unesp, que através do programa de bolsas de Iniciação Científica nas Ações Afirmativas realizou o fomento do primeiro projeto que executei (2019-2020).

“It is time to learn from the mistakes of monocultures of the mind and the essentializing violence of reductionist thought. It is time to turn to diversity for healing”. (Vandana Shiva, 2003)

“É tempo de aprender com o equívoco das monoculturas da mente e com a essencial violência do pensamento reducionista. É tempo de recorrer à diversidade em busca da cura”.

RESUMO

O Brasil é líder mundial em produção de cana-de-açúcar. Tal posição é, parcialmente, garantida pelo modo de produção intensivo que conta com ampla utilização de agrotóxicos. Dentre estes, o tebuthiuron é um dos herbicidas mais utilizados em lavouras brasileiras, a fim do controle da comunidade infestante de plantas espontâneas. Entretanto, sua molécula apresenta alto potencial de impacto ambiental devido à longa persistência no solo e toxicidade. Neste contexto se faz necessário o estudo de metodologias eficientes para a redução destes compostos no ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo foi bioprospectar microrganismos autóctones de solo cultivado com cana-de-açúcar contendo histórico de aplicação de tebuthiuron e de avaliar sua eficiência na biodegradação desta molécula. Para tanto, foi realizado o monitoramento do metabolismo microbiano através de ensaios colorimétricos qualitativos (ensaios fotográficos) e quantitativos (espectrofotometria). O delineamento experimental utilizado para ambas análises foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2x5, totalizando 10 tratamentos, ligados à presença ou ausência do herbicida associadas a quatro inoculações de microrganismos isolados. Os resultados foram analisados através da escala de diluições do DCPIP para o ensaio colorimétrico quantitativo e pelos testes de Welch e Games-Howell, para o ensaio colorimétrico qualitativo. Ao analisar visualmente o primeiro ensaio proposto não foi possível verificar a descoloração dos meios em nenhum tratamento proposto, fazendo-se necessária a melhor investigação das amostras por espectrofotometria. Pelos testes estatísticos, entretanto, houve, pelo menos, um isolado que se diferiu dos demais, quanto ao potencial de degradação de herbicida. Por escala Bayesiana, houve moderada a forte evidência de que tal condição experimental – que envolvia microrganismos bioprospectados de cana-soca – degradou tebuthiuron, o que reduziu a capacidade de absorção de meio analítico que o continha. Os resultados de pesquisa são consistentes e condutivos ao desenvolvimento de estratégias microbiotecnológicas para descontaminação de solo e proteção ambiental em ambientes agrícolas de produção, como canaviais. Entretanto, pela incipiência e desconhecido de composição de inóculo, há necessidade de caracterização, para confirmação de agentes de biodegradação de tebuthiuron.

Palavras-chave: Impacto ambiental. Biorremediação. Colorimetria. Teoria bayesiana de decisão estatística.

ABSTRACT

Brazil's dominance in global sugarcane production hinges on intensive agricultural practices reliant on pesticide utilization. However, the extensive use of herbicides, notably tebuthiuron, presents significant environmental concerns owing to its enduring persistence in the soil and inherent toxicity. To address this challenge, we designed a study to bioprospect autochthonous microorganisms inhabiting tebuthiuron-treated sugarcane soil and assess their efficacy in metabolizing this compound. Qualitative colorimetric assays (photographic assays) and quantitative assays (spectrophotometry) were employed to monitor microbial metabolic activity. A completely randomized 2x5 factorial scheme was arranged, encompassing 10 treatments representing herbicide presence/absence and four inoculations of isolated microorganisms. Visual analysis of the colorimetric assays did not reveal any discernible discoloration, necessitating further scrutiny through spectrophotometry. Nevertheless, statistical analysis identified at least one isolate exhibiting distinct herbicide degradation potential, supported by moderate to strong Bayesian evidence. Our findings yield robust and compelling evidence for the development of microbiotechnological strategies aimed at soil remediation and environmental protection in agricultural landscapes, particularly within sugarcane cultivation. Comprehensive characterization of the microbial inoculum is imperative to validate the tebuthiuron biodegradation agents, thereby paving the way for sustainable agricultural practices and environmental conservation.

Keywords: Bayesian Decision Theory. Bioremediation. Colorimetry. Environmental Impact.

RESUMEN

La dominancia de Brasil en la producción mundial de caña de azúcar se basa en prácticas agrícolas intensivas que dependen en gran medida del uso de pesticidas. Sin embargo, el amplio uso de herbicidas, especialmente el tebuthiuron, plantea importantes preocupaciones ambientales debido a su persistencia duradera en el suelo y su toxicidad inherente. Para abordar este desafío, diseñamos un estudio para prospectar microorganismos autóctonos que habitan en suelos de caña de azúcar tratados con tebuthiuron y evaluar su eficacia en la metabolización de este compuesto. Se utilizaron ensayos colorimétricos cualitativos (ensayos fotográficos) y ensayos cuantitativos (espectrofotometría) para monitorear la actividad metabólica de los microorganismos. Se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado de 2x5, que comprendía 10 tratamientos que representaban la presencia o ausencia del herbicida y cuatro inoculaciones de microorganismos aislados. El análisis visual de los ensayos colorimétricos no reveló ninguna decoloración discernible, lo que requirió una mayor investigación mediante espectrofotometría. Por lo tanto, el análisis estadístico identificó al menos un microorganismo aislado que mostraba un potencial distintivo para degradar el herbicida, respaldado por evidencia bayesiana moderada a fuerte. Nuestros hallazgos brindan evidencia sólida y convincente para el desarrollo de estrategias microbiotecnológicas destinadas a la remediación del suelo y la protección del medio ambiente en paisajes agrícolas, especialmente en el cultivo de caña de azúcar. Es imperativo realizar una caracterización exhaustiva del inóculo microbiano para validar los agentes de biodegradación del tebuthiuron, allanando el camino para la implementación de prácticas agrícolas sostenibles y la conservación del medio ambiente.

Palabras clave: Biorremediación. Colorimetría. Impacto Ambiental. Teoría de Decisiones Bayesiana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo esquemático da dinâmica dos herbicidas no sistema solo-planta- água-atmosfera.....	23
Figura 2 - Área de coleta de solo com histórico de aplicação de tebuthiuron cultivado com cana-de-açúcar sob diferentes talhões.....	27
Figura 3 - Meios de cultura e respectivos reagentes.....	29
Figura 4 - Esquema experimental e fotos da bioprospecção de comunidades microbianas biorremediadoras.....	30
Figura 5 - Diluições de 2,6-diclorofenol-indofenol em função da avaliação fotográfica do ensaio colorimétrico qualitativo.....	33
Figura 6 - Representação dos componentes necessários para a espectrofotometria.....	34
Figura 7 - Placas de Petri com crescimento de comunidades microbianas após o cultivo de bioprospecção.....	37
Figura 8 - Resultado da avaliação de biodegradação de tebuthiuron a partir do ensaio colorimétrico através de registros fotográficos.....	38
Figura 9 – Biodegradação de tebuthiuron por isolados microbianos a partir do ensaio colorimétrico por espectrofotometria sob diferentes abordagens estatísticas.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição do manejo de aplicação do herbicida tebuthiuron nos talhões selecionados, em função dos ciclos sucessivos da cana-de-açúcar.....	28
Tabela 2 - Delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x4, para o ensaio colorimétrico qualitativo.....	32
Tabela 3 - Quantificação microbiana pelo plaqueamento de amostras coletadas	36
Tabela 4 - Valores de absorbância obtidos a partir de espectrofotometria dos ensaios colorimétricos quantitativos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BF	Fator Bayes
BH	Bushnell-Haas (meio de cultura)
C. DCPIP	Controle DCPIP
C. TBT	Controle TBT
DCPIP	Indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol
DCPIP _{ox}	DCPIP oxidado
DCPIP _{red}	DCPIP reduzido
FSII	Fotossistema II
GAIA	Grupo de Ação em Impactos Ambientais
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
NB	<i>Nutrient Broth</i> / Caldo Nutriente
PC	<i>Plant Cane</i> / Cana-Planta (talhão selecionado com menor percentual de matéria orgânica)
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
RC	<i>Ratoon Cane</i> / Cana-Soca (talhão selecionado com maior percentual de matéria orgânica)
TBT	Tebuthiuron
TBT-	Ausência de tebuthiuron
TBT+	Presença de tebuthiuron
u.a.	Unidade de absorbância
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	Geral	19
2.2.	Específicos.....	19
3.	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1.	Cana-de-açúcar	20
3.2.	Dinâmica e impacto de herbicidas no meio ambiente	21
3.3.	Tebuthiuron	23
3.4.	Biorremediação de agrotóxicos em solo	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1.	Coleta do solo	27
4.2.	Herbicida tebuthiuron	28
4.3.	Meios de cultura.....	28
4.4.	Isolamento de comunidades microbianas	29
4.5.	Crescimento e padronização dos inóculos bioprospectados.....	30
4.6.	Avaliação da atividade microbiana por colorimetria	31
4.6.1.	Ensaio colorimétrico qualitativo – registro fotográfico	32
4.6.2.	Ensaio colorimétrico quantitativo – espectrofotometria.....	33
4.7.	Análise de resultados	34
4.7.1.	Modelagem matemática.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1.	Contagem de unidades formadoras de colônias	36
5.2.	Ensaio colorimétrico qualitativo – registro fotográfico	37
5.3.	Ensaio colorimétrico quantitativo – espectrofotometria	39
6.	CONCLUSÃO.....	43
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44

8.	REFERÊNCIAS	45
9.	APÊNDICE	51

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a dinâmica política e estrutura latifundiária fomentam a produtividade de *commodities*, para suprir demandas mercadológicas internas e externas. Neste contexto, a cana-de-açúcar se destaca como monocultura relevante ao cenário sucroenergético nacional, tornando-se alvo de intensos investimentos tecnológicos ao aprimoramento de produtividade de colmos e o seu teor de açúcar. Embora represente um grande destaque econômico nacional e internacionalmente, a intensa produção de cana-de-açúcar pode gerar impactos ambientais à fauna e à flora devido, principalmente, ao modo de exploração do solo e seu manejo inadequado.

Pelo manejo convencional, plantas infestantes em lavouras canavieiras representam ameaças à produtividade e são amplamente controladas por herbicidas, principalmente caracterizados por ação em pré-emergência e extenso residual, como o tebuthiuron. A molécula de tebuthiuron apresenta elevada meia-vida, alta toxicidade a organismos não-alvo e grande potencial lixiviação pelo perfil de solo. Tais características geram alertas de impactos ambientais em curto, médio e longo prazos a componentes e organismos de ecossistemas naturais.

Neste sentido, pesquisadores buscam desenvolver estratégias de redução de danos ambientais por vias biológicas eficientes, de baixo custo e menor risco ambiental. Dentre estas ferramentas, destaca-se a biorremediação, técnica que viabiliza a utilização do metabolismo microbiano em associação ou não com plantas em processo de decomposição, ou transformação, de contaminantes orgânicos em compostos menos nocivos.

Portanto, a bioprospecção de microrganismos autóctones, adaptados a ambientes com histórico de aplicação do herbicida, apresenta-se como técnica adequada e relevante ao estudo da biodegradação de tebuthiuron, e potencialmente, favorece processos ecológicos naturais e fomenta sustentabilidade intrínseca à evolução ambiental, social e econômica da agricultura moderna.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Bioprospectar microrganismos autóctones de solo e avaliar sua eficiência na biodegradação de tebuthiuron.

2.2. Específicos

- Isolar comunidades microbianas com potencial de biodegradação de tebuthiuron a partir de solos agrícolas cultivados com cana-de-açúcar de diferentes manejos com histórico de aplicação do herbicida;
- Avaliar o metabolismo dos isolados microbianos na biodegradação da molécula de tebuthiuron por ensaio colorimétrico; e
- Propor uma nova abordagem matemática para interpretação de resultados de ensaios colorimétricos aplicados à biodegradação de agrotóxicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea pertencente à família botânica Poaceae (NOCELLI *et al.*, 2017). Uma característica morfológica marcante da cultura é a capacidade de armazenamento de sacarose em tecidos parenquimáticos de colmo, pois, é planta de metabolismo C4, o que a confere elevada capacidade de conversão de energia solar em fitomassa (ALMEIDA, 2020; TEJERA *et al.*, 2007). Devido às condições climáticas do território brasileiro, a planta de cana-de-açúcar é capaz de demonstrar seu potencial produtivo, sendo assim tão estimada para a exploração industrial (TEJERA *et al.*, 2007).

Sob perspectiva comercial, produtiva e de processamento de cana-de-açúcar, há oportunidades de geração de açúcar e bioetanol ao desenvolvimento sustentável global (AMORIM *et al.*, 2018; UNICA, 2023). O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, tornando alvo de intenso investimento tecnológico. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra 2023/2024 ocupa 1,5% mais espaço do território nacional se em comparação com a safra anterior. Além disso, seus índices produtivos também se encontram em ascensão, apresentando produção de 637 milhões de toneladas em 8.410 mil hectares e contando com rendimento médio de colmos de 75.751 kg ha⁻¹(CONAB, 2023).

Naturalmente, a cultura se comporta como perene; entretanto, em lavouras comerciais extensivas, desenvolve-se como semi-perene, devido a colheitas ao longo de cultivo, que, usualmente, compõe-se de cinco safras consecutivas com posterior reforma de área. O primeiro ciclo é conhecido como “cana-planta”, caracterizado por colmos produzidos antes de colheita inicial. A partir do primeiro corte, torna-se “cana-soca”, distinguida pela produção de colmos de rebrota (SILVA; SILVA, 2012).

Por mais que sucessivos cortes em lavoura representem decréscimos graduais na produção e qualidade de colmos, tal sistema de colheita mecanizada garante restos culturais, como folhas secas e verdes, em cobertura de solo, o que, eventualmente, contribuem à melhora de características físicas, químicas e biológicas, pela deposição da matéria orgânica (AQUINO *et al.*, 2017). Sob

aspecto biológico, microrganismos heterotróficos de solo se beneficiam de matéria orgânica como fonte de carbono e nutrientes para multiplicação. Neste sentido, a diversidade e densidade da população microbiana em solos é alterada em função do manejo e manutenção da palhada de cobertura, que variam de acordo com o sistema, ou seja: cana-planta ou cana-soca (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Apesar desse intenso crescimento das áreas cultivadas ser extremamente benéfico para o cenário econômico, deve ser ressaltado o potencial de impactos negativos de cunho ambiental, social e até mesmo econômico, refletindo danos futuros (RODRIGUES, 2010). Dentre os impactos que são refletidos no meio ambiente, têm-se o controle químico de plantas espontâneas, que por sua vez são responsáveis por causarem efeitos diretos na cultura, como a competição e alelopatia, ou então efeitos indiretos, como aumento no custo de produção e depreciação da qualidade do produto (EMBRAPA, 2021).

Neste sentido, o controle químico é uma alternativa utilizada em lavouras canavieiras por apresentar resultados efetivos e em curto prazo. Porém, sua aplicação a longo prazo, massiva e, em alguns casos, indiscriminada, pode acarretar em contaminações ambientais (RODRIGUES, 2010).

3.2. Dinâmica e impacto de herbicidas no meio ambiente

Em sistemas de cultivo intensivo, plantas daninhas são resultado da modificação do ambiente, normalmente, gerada por ações antrópicas com a introdução de culturas. A fim de corrigir deficiências ou excessos minerais, compactações e outros fatores, a natureza dispõe de plantas nativas capazes de retornar o sistema ao equilíbrio (PRIMAVESI, 2017).

Entretanto, do ponto vista produtivo, em que o equilíbrio, muitas vezes, não é considerado, tais plantas se tornam problema à cultura de interesse econômico, pois, competem por água, luz e nutrientes, além de liberarem compostos químicos alelopáticos (VICTORIA; CHRISTOFFOLETI, 2004). Estas interferências podem representar até 85% de perda em produtividade; portanto, seu manejo e controle são indispensáveis à redução de custos e garantia do vigor de plantas comercialmente interessantes (SILVA *et al.*, 2018).

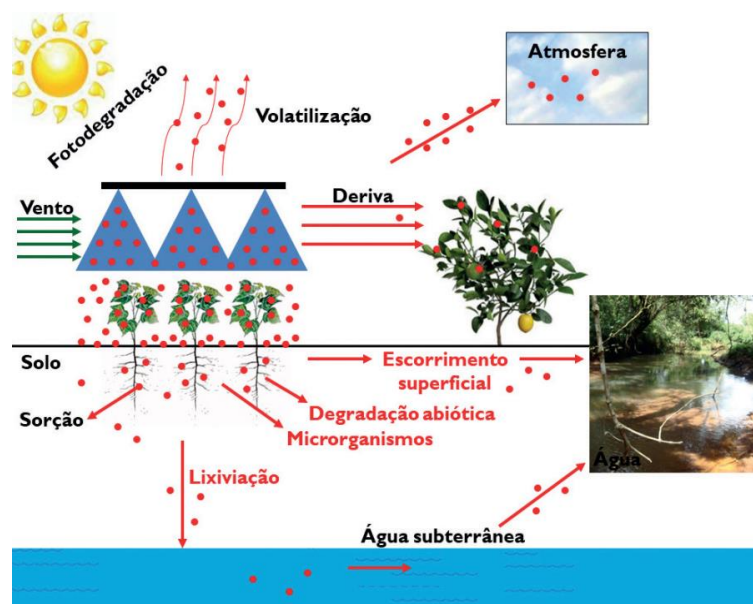
Neste contexto, a utilização de herbicidas como controle químico de plantas espontâneas é, amplamente, difundida no Brasil, sendo estes

responsáveis pela maior porcentagem de agrotóxicos utilizados na agricultura (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Por serem acessíveis e devido à intensificação da agricultura em prol de maiores índices produtivos, com o decorrer dos séculos a acumulação destes compostos no ambiente tem se tornado realidade, cada vez mais, latente, gerando grandes impactos ambientais, como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, ou até mesmo no próprio solo (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2008; SILVA JUNIOR *et al.*, 2018).

No sentido da interação solo, planta, água e atmosfera, a dinâmica dos herbicidas aplicada ao ambiente exemplifica que estes produtos possuem diversos outros destinos e transformações. Dependendo de características inerentes à molécula, podem ser arrastados pelo vento para outras áreas e permanecerem adsorvidos nos coloides do solo, escorrerem superficialmente, ou lixivarem ao lençol freático. Assim, podem contaminar leitos d'água, ou até mesmo, de um ponto de vista ambientalmente favorável, serem foto ou biodegradados, como exemplificado na Figura 1 (CORREIA, 2018).

Além disso, tais contaminações são afetadas, diretamente, por características físicas e químicas do solo, uma vez que, em contato com as moléculas dos herbicidas, desencadeiam interações que definem sorção, dessorção e meia-vida das mesmas. Logo, é importante conhecer tais características, pois herbicidas que possuem alta dessorção, elevada meia-vida e baixa sorção no solo têm maiores potenciais de gerar contaminação (GUO *et al.*, 1993; KODESOVA *et al.*, 2011; CADKOVA *et al.*, 2013; GARCIA-JARAMILLO *et al.*, 2014).

Figura 1 – Resumo esquemático da dinâmica dos herbicidas no sistema solo-planta-água-atmosfera.



Fonte: Correia (2018).

3.3. Tebuthiuron

Dentre os herbicidas mais empregados na cultura da cana-de-açúcar, destaca-se o tebuthiuron (1-(5-tert-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilureia). Pertencente ao grupo das ureias substituídas, este herbicida seletivo e sistêmico atua em pré-emergência para plantas espontâneas de importância à cultura, como *Commelina benghalensis*, *Cenchrus echinatus* e *Euphorbia heterophylla* (AGROFIT, 2023).

Tal molécula atua como inibidora do fotossistema II (FSII), bloqueando diretamente o transporte de elétrons entre as quinonas A e B. Neste processo, devido à elevada instabilidade energética no centro de reação do FSII, ocorre a peroxidação lipídica que após uma série de processos celulares acarreta no extravasamento do conteúdo citoplasmático e, consequente, morte da planta por estresse oxidativo (OLIVEIRA, 2011).

Sendo assim, a ação ocorrerá na semente pelo aumento da formação de radicais livres, gerando oxidação da membrana plasmática e interferindo no início do ciclo de vida da plântula (BREITENBACH *et al.*, 2001). Por via de regra, a atuação do tebuthiuron ocorre em plantas dicotiledôneas, embora gramíneas possam apresentar injúrias sob aplicação de altas doses do produto (WANG *et al.*, 2019).

Sob o ponto de vista da persistência do tebuthiuron no perfil do solo, esta varia de acordo com a sua umidade e temperatura; porém, mesmo em condições desfavoráveis, pode permanecer no ambiente por 12 a 14 meses (CHANG; STRITZKE, 1977; BLANCO; OLIVEIRA, 1987). Além disso, por se tratar de um produto de alta persistência no meio ambiente, a bioacumulação da molécula em organismos vivos é uma possibilidade (GUIMARÃES, 1987).

Outra característica intrínseca à molécula deste herbicida é sua mobilidade e capacidade de transporte no perfil do solo. Isso ocorre, pois, sua estrutura apresenta alta solubilidade em água e baixo teor de K_{ow} , demonstrando baixa lipofilicidade e consequente dificuldade em ser adsorvido no perfil do solo, favorecendo assim, a lixiviação deste composto (PIRES *et al.*, 2005).

Portanto, pela sua elevada meia vida no solo (> 1 ano), alta toxicidade à organismos não-alvo, mobilidade em tipos de solo e uso indiscriminado, consideráveis impactos ambientais, sociais, econômicos e agronômicos podem ser gerados, uma vez que é classificado como produto perigoso ao meio ambiente (Periculosidade ambiental II – muito perigoso) (IBAMA, 2022). O acúmulo deste agrotóxico em leitos d'água e em organismos aquáticos é realidade, resultando em perdas de biodiversidade e potencialmente apresentando risco à biota de consumidores finais, como é o caso de seres humanos (MACHADO, 2016).

A dinâmica de comunidades que usufruem diretamente e cotidianamente dos recursos hídricos contaminados, como por exemplo, populações ribeirinhas e indígenas, é afetada. Devido à proximidade cotidiana às águas contaminadas, estas pessoas já não podem mais aproveitar da riqueza em diversidade de espécies aquáticas, nadar em águas sanas e aproveitarem igualmente de paisagens que antes compunham seu dia-a-dia, bem como a população em geral vem perdendo o contato humano-natureza devido à impactos ambientais (HESPANHOL, 2006).

Sob perspectivas agronômica e econômica, a permanência dessa molécula no solo por longos períodos, pode representar prejuízo ao manejo do agroecossistema ao limitar a rotação da cana-de-açúcar com potenciais culturas sensíveis à molécula em questão (FARIA, 2013).

3.4. Biorremediação de agrotóxicos em solo

Sabendo que as consequências das ações antrópicas em agroecossistemas têm se agravado ao longo das décadas, recursos humanos e tecnológicos são necessários na busca por estratégias de como remediar ambientes que foram impactados por essas atividades. Neste sentido, a biorremediação surge como uma alternativa viável e ecologicamente adequada no tratamento de áreas contaminadas (MALLMANN *et al.*, 2019).

Segundo Fasanella e Cardoso (2016), a biorremediação é o conjunto de técnicas ecológicas e de baixo custo baseadas em processos biológicos que visam a descontaminação ou remediação de sistemas, utilizando microrganismos como transformadores e mineralizadores de contaminantes orgânicos em moléculas menos agressivas ao ecossistema.

A biodegradação microbiana é uma dessas diversas técnicas que visam remediar ambientes contaminados. Trata-se de um processo eficiente, uma vez que, os microrganismos, em constante sinergia, realizam manutenção da vida na Terra por meio da ciclagem de moléculas da biosfera. Dentro deste contexto, eles podem ser bioestimulados na área contaminada pela adição de nutrientes, de forma que o desenvolvimento da comunidade microbiana existente no sistema seja favorecido. Outro processo favorável é a bioaumentação por meio da introdução de microrganismos autóctones (isolados a partir de amostras do ambiente), alóctones (organismos *ex situ*) ou então, organismos geneticamente modificados do meio para que haja o metabolismo específico do poluente em questão (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Assim, o conhecimento dos microrganismos já existentes em ambientes com histórico de presença da molécula em análise é fundamental, uma vez que, estes seres estão adaptados ao meio impactado, tornando-os capazes de tolerar alta concentração e até de degradar o composto poluente pelo consumo de carbono (MUYZER *et al.*, 1993). Entretanto, a ação microbiana pode gerar compostos intermediários pela degradação das moléculas orgânicas poluentes iniciais, o que potencializa os prejuízos ambientais em virtude do aumento do potencial ecotoxicológico da área contaminada (FASANELLA; CARDOSO, 2016; ROCHA *et al.*; 2018).

Em estudo recente do GAIA – FCAT/Unesp, Ferreira *et al.* (2021) demonstraram, por meio de ensaios ecotoxicológicos, que o tebuthiuron

apresentou efeitos prejudiciais à espécie não-alvo *Lactuca sativa*. Entretanto, quanto mais efetiva é a biodegradação dessa molécula e a sua redução do meio, menores são as chances de gerar danos ao desenvolvimento de outros organismos no solo.

Dessa forma, novas ferramentas biotecnológicas pelo isolamento microbiano podem incrementar estratégias de biorremediação de solo contaminado a partir do herbicida tebuthiuron. Sendo assim, é de grande importância o estudo de ferramentas matemáticas e estatísticas melhores adaptadas aos diferentes fenômenos de crescimentos biológicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

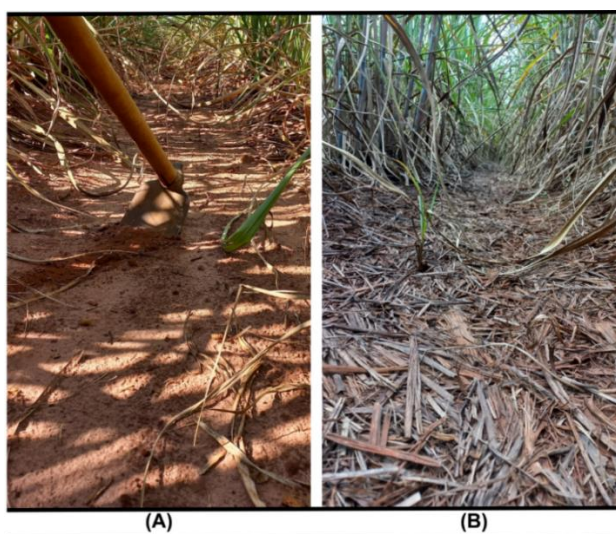
O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAT/Unesp, campus de Dracena, durante o primeiro semestre do ano de 2023.

4.1. Coleta do solo

Amostras de solo foram coletadas dia 31 de março de 2023, em área de cultivo convencional de cana-de-açúcar, com histórico de aplicação do herbicida tebuthiuron, em Junqueirópolis/SP. A coleta foi realizada com o auxílio de pá, a 15 cm de profundidade, pela designação de dois pontos aleatórios dentro do espaço de 100 m² em dois talhões. Para a coleta, foi realizada a lavagem da pá com água deionizada e, posteriormente, a limpeza da mesma com álcool 70%, para evitar possíveis contaminações microbianas. Posteriormente, as amostras foram transportadas ao laboratório para secagem e peneiramento em malha de 2,0 mm, estando assim prontas para a realização das análises, sem necessidade de acondicionamento.

O primeiro talhão (PC) foi caracterizado pela menor deposição de matéria orgânica em superfície do solo, devido ao ciclo cana-planta instalado na área (Figura 2A); enquanto o segundo talhão (RC), caracterizado por cana-soca em primeiro corte, demonstrou maior aporte de matéria orgânica sobre a superfície do solo, oriunda da deposição de restos culturais (Figura 2B).

Figura 2 – Área de coleta de solo cultivado com cana-de-açúcar sob diferentes talhões: (A) cana-planta e (B) cana-soca.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2. Herbicida tebuthiuron

O histórico de aplicação de tebuthiuron nas áreas escolhidas está descrito na Tabela 1 de acordo com as datas de plantio da cultura e da última aplicação do herbicida, além do produto comercial e da dose aplicada.

O produto comercial, Combine® 500SC (Dow AgroSciences Industrial Ltda) foi adquirido para as análises experimentais. Assim, foram preparadas soluções a 10% e 0,1% correspondente a 100 e 1 mg L⁻¹ do ingrediente ativo tebuthiuron (TBT), respectivamente.

Tabela 1 – Descrição do manejo de aplicação do herbicida tebuthiuron nos talhões selecionados, em função dos ciclos sucessivos da cana-de-açúcar.

Talhão	Data de plantio	Última aplicação	Produto comercial	Dose (L.ha ⁻¹)
Plant Cane (PC)	01/04/2022	12/04/2022	Spike (ADAPAR)	1,6
Ratoon Cane (RC)	02/09/2022	07/11/2022	Butiron (ADAMA)	1,7

*Plant Cane (PC) = cana-planta; Ratoon Cane (RC) = cana-soca

Fonte: Elaborada pela autora.

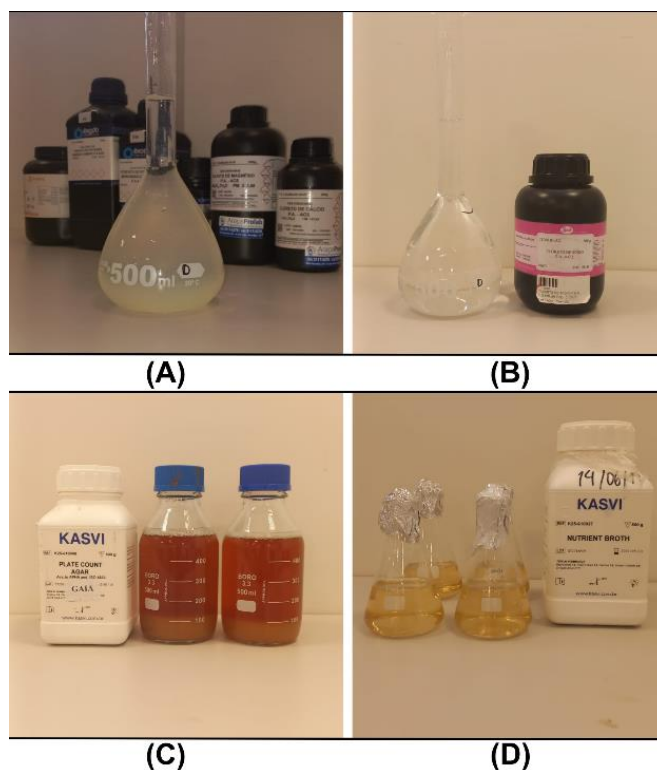
4.3. Meios de cultura

Foram preparados quatro meios de cultura: Bushnell-Haas (BH), NaCl 0,9% m/v, *Plate Count Agar* – Ágar de Contagem em Placas (PCA) e *Nutrient Broth* – Caldo Nutriente (NB), demonstrados na Figura 3A, B, C e D, respectivamente. Após o seu preparo, estes foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos para a sua esterilização previamente ao uso.

O BH foi utilizado como meio mineral mínimo e seguiu o protocolo de preparo utilizando os seguintes compostos, em g.L⁻¹: NH₄NO₃ 1; K₂HPO₄ 1; KH₂PO₄ 1; FeCl₃ 0,5; MgSO₄ 0,2; CaCl₂ 0,02 (HANSON *et al.*, 1993). O meio salino de NaCl foi preparado de acordo com a relação m/v descrita, enquanto os meios de cultura PCA e NB seguiram as instruções dos fabricantes.

Posteriormente, foram adicionados 10 mL da solução de 100 mg L⁻¹ de tebuthiuron para cada 90 mL do meio BH para o isolamento de comunidades microbianas, e 1,2 mL da solução de 1 mg L⁻¹ do herbicida para cada 6,5 mL do meio BH utilizado nos ensaios colorimétricos.

Figura 3 - Meios de cultura e respectivos reagentes: (A) Bushnell-Hass, (B) NaCl, (C) *Plate Count Agar* e (D) *Nutrient Broth*.



Fonte: Elaborada pela autora.

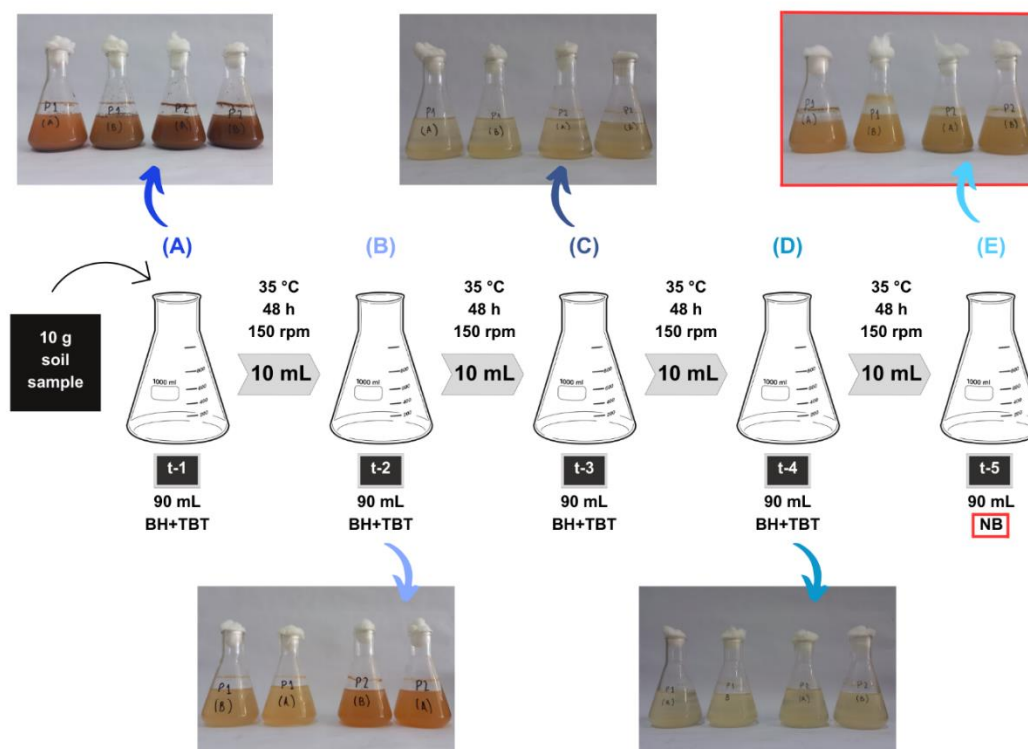
4.4. Isolamento de comunidades microbianas

O isolamento das comunidades com potencial de biodegradar moléculas de tebuthiuron a partir de solo cultivado com cana-de-açúcar foi realizado segundo Rani *et al.* (2008) e Zhang *et al.* (2014), com adaptações.

Inicialmente, realizou-se a preparação de frascos Erlenmeyer contendo 90 mL de BH+TBT, com adição de 10 g das amostras de solo. Os frascos passaram por um agitador rotativo a 150 rpm por 48 h a 35 °C (Figura 4A – t1). Posteriormente, 10 mL de cada meio contendo os respectivos crescimentos microbianos foram transferidos para novos Erlenmeyer de 125 mL contendo 90 mL de BH+TBT, onde foi realizada uma segunda incubação em agitador orbital a 150 rpm por 48 h a 35 °C (Figura 4B – t2). Este procedimento de incubação foi realizado mais duas vezes, totalizando quatro incubações (Figura 4C – t3 e 4D – t4). Finalmente, a verificação do crescimento microbiano a partir dos isolados de cada amostra de solo foi realizada a partir do cultivo de alíquotas do processo de bioprospecção em meio NB a 35 °C por 48 h a 150 rpm (Figura 4E – t5). A turbidez do meio indicou o crescimento de microrganismos

selecionados a partir do BH+TBT, contando apenas com a molécula do herbicida como fonte de carbono.

Figura 4 - Esquema experimental e fotos da bioprospecção de comunidades microbianas biorremediadoras: (A) primeira incubação em BH+TBT, (B) segunda incubação em BH+TBT, (C) terceira incubação em BH+TBT, (D) quarta incubação em BH+TBT e (E) quinta incubação em NB.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.5. Crescimento e padronização dos inóculos bioprospectados

A partir das comunidades bioprospectadas pelo procedimento apresentado na Figura 4, foi necessária a padronização dos inóculos isolados em NB para posterior verificação do crescimento microbiano em placas de Petri e análise colorimétrica.

Portanto, a padronização foi feita através da diluição seriada dos respectivos inóculos em solução salina estéril (NaCl 0,9 % m v^{-1}) com base no estabelecimento em espectrofotômetro da alíquota a 0,500 u.a., no comprimento de onda 600 nm. O cultivo dos microrganismos em PCA foi realizado a partir da

técnica de *Pour Plate* a fim de incentivar o crescimento microbiano em toda a extensão do meio.

Por fim, as placas foram incubadas em quadruplicatas a 35 °C por 48 h. Os resultados do processo de padronização da bioprospecção foram expressos pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC), na diluição 10^{-5} .

4.6. Avaliação da atividade microbiana por colorimetria

O método utilizado para avaliar a atividade microbiana dos microrganismos isolados das amostras de solo foi baseado em ensaios colorimétricos com o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) a partir de Hanson *et al.* (1993) e Bidoia *et al.* (2010).

Os resultados foram avaliados a partir do tempo mínimo necessário para a total descoloração do indicador ao longo do tempo de incubação, uma vez que, quando reduzido, o composto DCPIP se torna incolor (DCPIP_{red}), diferentemente da coloração azul quando está oxidado (DCPIP_{ox}). Considerando a padronização das alíquotas previamente, a avaliação ocorreu em duas formas: (1) qualitativa, em tubos de ensaio com registro fotográfico e (2) quantitativa, em placa de micropoços, tipo ELISA, com o uso de espectrofotômetro UV-Vis.

Para ambas análises, foram preparados dois testes controles: negativo (C. DCPIP), a partir de BH, DCPIP e água deionizada, sem a presença do isolado microbiano; e positivo (C. TBT) com BH, DCPIP e TBT, seguindo a ausência de isolados. Neste sentido, C. DCPIP representou a base de comparação de resultados para tratamentos sem o herbicida e C. TBT seguiu mesma lógica para tratamentos contendo tebuthiuron.

O delineamento experimental utilizado para as análises qualitativa e quantitativa da atividade microbiana foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 5: (i) presença ou ausência do herbicida tebuthiuron; e (ii) à adição das comunidades isoladas na bioprospecção - PC.1, PC.2, RC.1 e RC.2. Portanto, foram preparados dez tratamentos em quadruplicatas, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x4, para o ensaio colorimétrico qualitativo.

	Tratamentos	TBT	Isolado
1	Controle DCPIP	-	-
2	PC.1 T-	-	PC.1
3	PC.2 T-	-	PC.2
4	RC.1 T-	-	RC.1
5	RC.2 T-	-	RC.2
6	Controle TBT	+	-
7	PC.1 T+	+	PC.1
8	PC.2 T+	+	PC.2
9	RC.1 T+	+	RC.1
10	RC.2 T+	+	RC.2

* PC = cana-planta; RC = cana-soca; TBT = tebuthiuron

Fonte: Elaborada pela autora

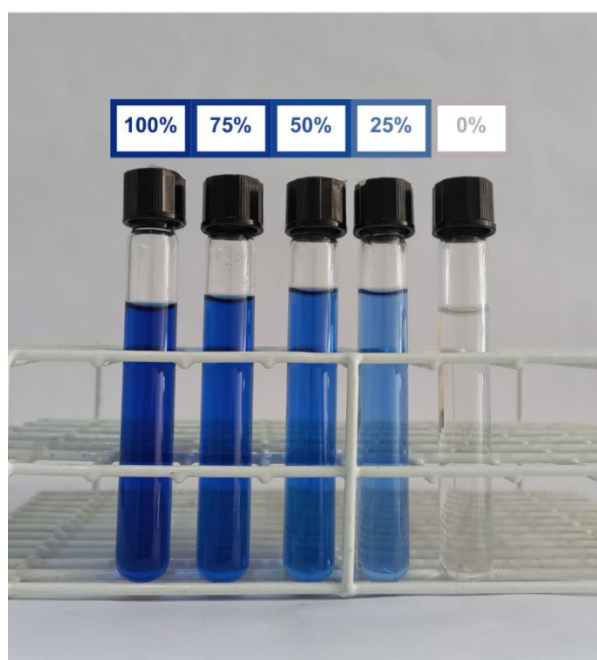
4.6.1. Ensaio colorimétrico qualitativo – registro fotográfico

As medidas qualitativas de descoloração do DCPIP contendo tebuthiuron como substrato e as comunidades microbianas biopropectadas foram realizadas em tubos de ensaio de 10 mL contendo 4 mL de BH; 1 mL da solução de DCPIP 1 g L^{-1} ; 0,8 mL de inóculo microbiano à $4,27 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ e 1,2 mL de TBT na concentração 1 g L^{-1} . Os tratamentos sem herbicida tiveram a adição de 1,2 mL de água deionizada ao invés da solução de tebuthiuron.

O ensaio foi realizado em quadruplicatas com a incubação dos tubos a 35°C sob rotação em agitador orbital à 150 rpm e a observação da descoloração do meio feita a partir do registro fotográfico dos tubos a cada 2 h durante o período diurno (08h00-18h00) e a cada 6 h no período noturno (19h00-07h00) durante 7 dias. Do oitavo ao vigésimo primeiro dia, a periodicidade das análises passou a ser de 24 h (08h00).

Como forma de padronizar as leituras, foi proposta uma escala de diluições do composto DCPIP, para melhor identificação de nuances de colorações e identificação do processo de descoloração (Figura 5). Sendo assim, as escalas de diluições da solução do indicador DCPIP a 1 g L^{-1} : (A) 100%, (B) 75%, (C) 50%, (D) 25% e (E) 0%.

Figura 5 – Diluições de 2,6-diclorofenol-indofenol em função da avaliação fotográfica no ensaio colorimétrico qualitativo.



Fonte: Elaborada pela autora.

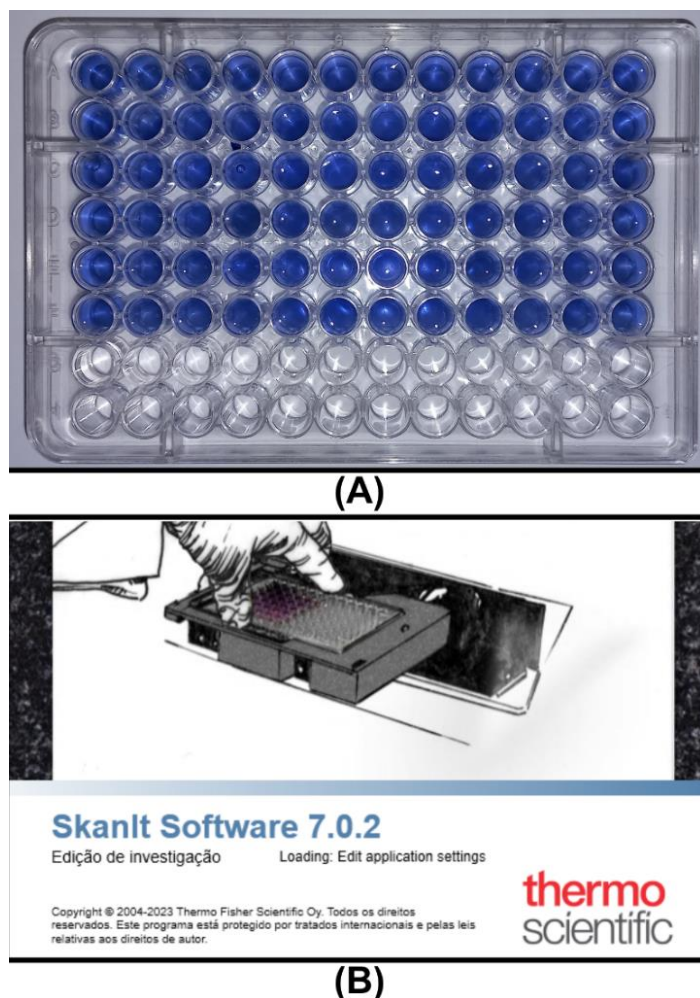
4.6.2. Ensaio colorimétrico quantitativo – espectrofotometria

Para o ensaio quantitativo, foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific® Multiskan Go, a partir de controle eletrônico pelo software SkanIt® RE 7.0.2 (Figura 6).

As proporções da composição dos tratamentos propostos seguiram semelhantemente ao ensaio qualitativo em tubos de ensaio (Tabela 2). Neste sentido, houve a preparação do ensaio quantitativo em placa de micropoços, tipo ELISA, contendo 300 µL de substâncias em cada poço (Tabela 4). Assim, foram adicionados 190 µL de BH, 10 µL da solução de DCPIP 1 g L⁻¹, e 36 µL de inóculo microbiano a 4,27 x10⁵ UFC.mL⁻¹ para os tratamentos isolados e 18 µL para os tratamentos em consórcio microbiano, além de 54 µL de TBT a 1 g.L⁻¹ para tratamentos com a presença do herbicida.

Esta análise foi realizada em quadruplicatas com a incubação da placa de micropoços a 35 °C sob agitação média (proposta pelo software) antes das leituras, que por sua vez foram efetuadas a cada 5 minutos durante 4 h. Após este período, as análises continuaram em 14 h de incubação a cada 30 min durante mais duas horas (16 h total).

Figura 6 – Representação dos componentes necessários para a espectrofotometria: (A) placa de micropoços tipo ELISA contendo seus respectivos tratamentos; (B) inicializador do Software SkanIt® RE 7.0.2.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.7. Análise de resultados

Para os dados da contagem de UFC foi realizada a análise de variância através do teste de Tukey a 5,0% de probabilidade para a comparação de médias. Ao avaliar o ensaio colorimétrico qualitativo foi considerada a escala de diluições do DCPIP proposta pela autora. Por se tratar de uma análise visual e empírica, não houveram análises estatísticas.

4.7.1. Modelagem matemática

Pela expectativa de curvas colorimétricas sigmoidais, com base em Gogoi, Saikia e Mahanta (2022), pensou-se inicialmente em modelá-las por

Gompertz para estimativa de parâmetros cinéticos. Entretanto, devido à não ocorrência de tal padrão, houve readequação de abordagem.

Assim, foram aplicados os testes de Welch e Games-Howell ao conjunto de dados de ensaio espectrométrico para análise de variância não homogênea, pois não houve a mesma quantidade de informação entre condições, e comparação de médias.

Adicionalmente, empregou-se escala Bayesiana para determinar grau de evidência de hipótese nula ou alternativa, ou seja, há pelo menos um grupo de microrganismos bioprospectados que se diferencia dos demais e, por isso, permite significativa biodegradação de herbicida.

É importante destacar que esta análise estatística foi realizada em ambiente computacional e gráfico de *software* R, que calculou o logaritmo natural da razão de resposta entre curvas de condição experimental (bioprospectados + TBT) e controle (TBT) para padronização de medidas de posição e dispersão. Neste sentido, foram desconsiderados os tratamentos sem o herbicida na apresentação de resultados em texto principal, pois o objetivo era demonstrar potencial de degradação por microrganismos autóctones em relação à presença do tebuthiuron. Todavia, é possível acessar todos os dados pelo Apêndice.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem de unidades formadoras de colônias

A quantificação microbiana pelo plaqueamento de amostras coletadas gerou média de $4,27 \times 10^6$ UFC por grama de solo. Os resultados para os pontos PC.1, PC.2, RC.1 e RC.2 demonstraram valores próximos, sendo respectivamente: 4,42; 4,41; 4,39; e $3,85 \times 10^6$ UFC g⁻¹ solo. Além disso, a análise de variância, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, não identificou diferença significativa entre eles, como é possível aferir com a Tabela 3.

Tabela 3 – Quantificação microbiana pelo plaqueamento de amostras coletadas.

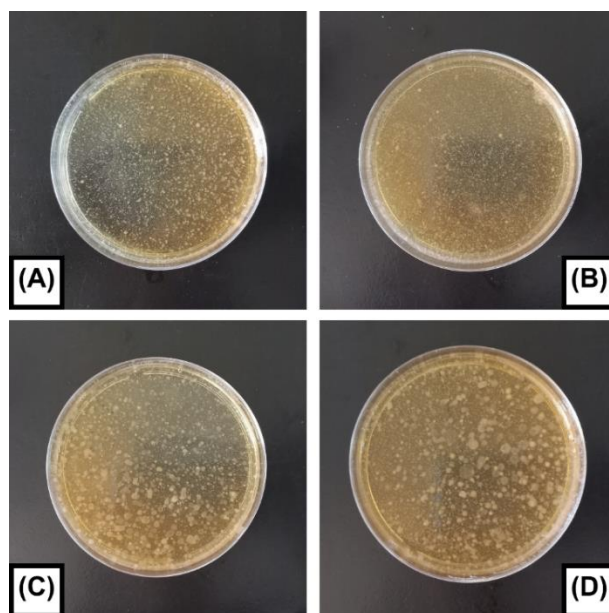
Tratamentos	Médias (UFC/g de solo)	
PC.1	$4,42 \times 10^6$	A
PC.2	$4,41 \times 10^6$	A
RC.1	$4,39 \times 10^6$	A
RC.2	$3,85 \times 10^6$	A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que houve crescimento microbiano em todos os tratamentos propostos, como ilustrado na Figura 7, indicando a viabilidade das amostras coletadas, bem como o efetivo crescimento de colônias bacterianas, selecionadas em função da utilização de PCA. Considerando o resultado obtido pelo plaqueamento e verificação da viabilidade microbiana das amostras, foram prosseguidas as análises colorimétricas.

Figura 7 – Placas de Petri com crescimento de comunidades microbianas após o cultivo de bioprospecção: (A) PC.1, (B) PC.2, (C) RC.1, (D) RC.2.

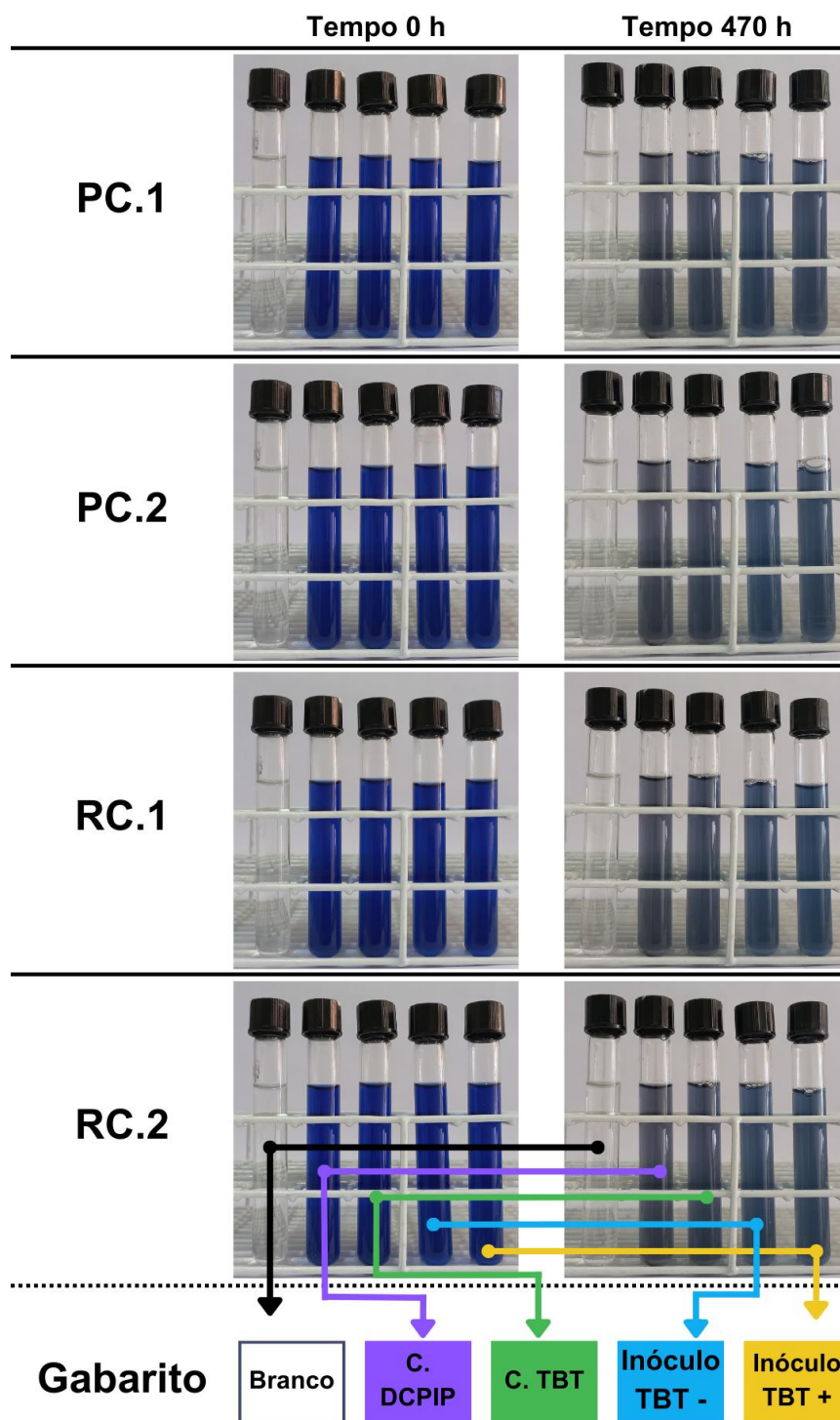


Fonte: Elaborada pela autora.

5.2. Ensaio colorimétrico qualitativo – registro fotográfico

Estão apresentados na Figura 8 os registros fotográficos realizados no ensaio colorimétrico qualitativo para a avaliação da biodegradação de tebuthiuron em função do tempo de descoloração do DCPIP em dois tempos distintos (t_0 – inicial e t_{470} – final), para todos os tratamentos (PC.1, PC.2, RC.1, RC.2).

Figura 8 – Resultado da avaliação de biodegradação de tebuthiuron a partir do ensaio colorimétrico através de registros fotográficos



Legenda: Branco = apenas água; C. DCPIP = controle sem tebuthiuron; C. TBT = controle com tebuthiuron; Inóculo TBT - = tratamentos com inóculo microbiano na ausência de tebuthiuron; Inóculo TBT + = tratamentos com inóculo microbiano na presença de tebuthiuron; PC.1 = linhagem 1 isolada em área com manejo cana-planta; PC.2 = linhagem 2 isolada em área com manejo cana-planta; RC.1 = linhagem 1 isolada em área com manejo cana-soca; RC.2 = linhagem 2 isolada em área com manejo cana-soca.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar que não houve descoloração de nenhum dos meios durante o tempo de análise, devido a contínua coloração azul que perdurou ao longo do tempo. Entretanto, todos os tratamentos em presença e ausência de tebuthiuron apresentaram despigmentação da coloração azul, característica observada após 326 h que se manteve até o tempo final da análise (470 h).

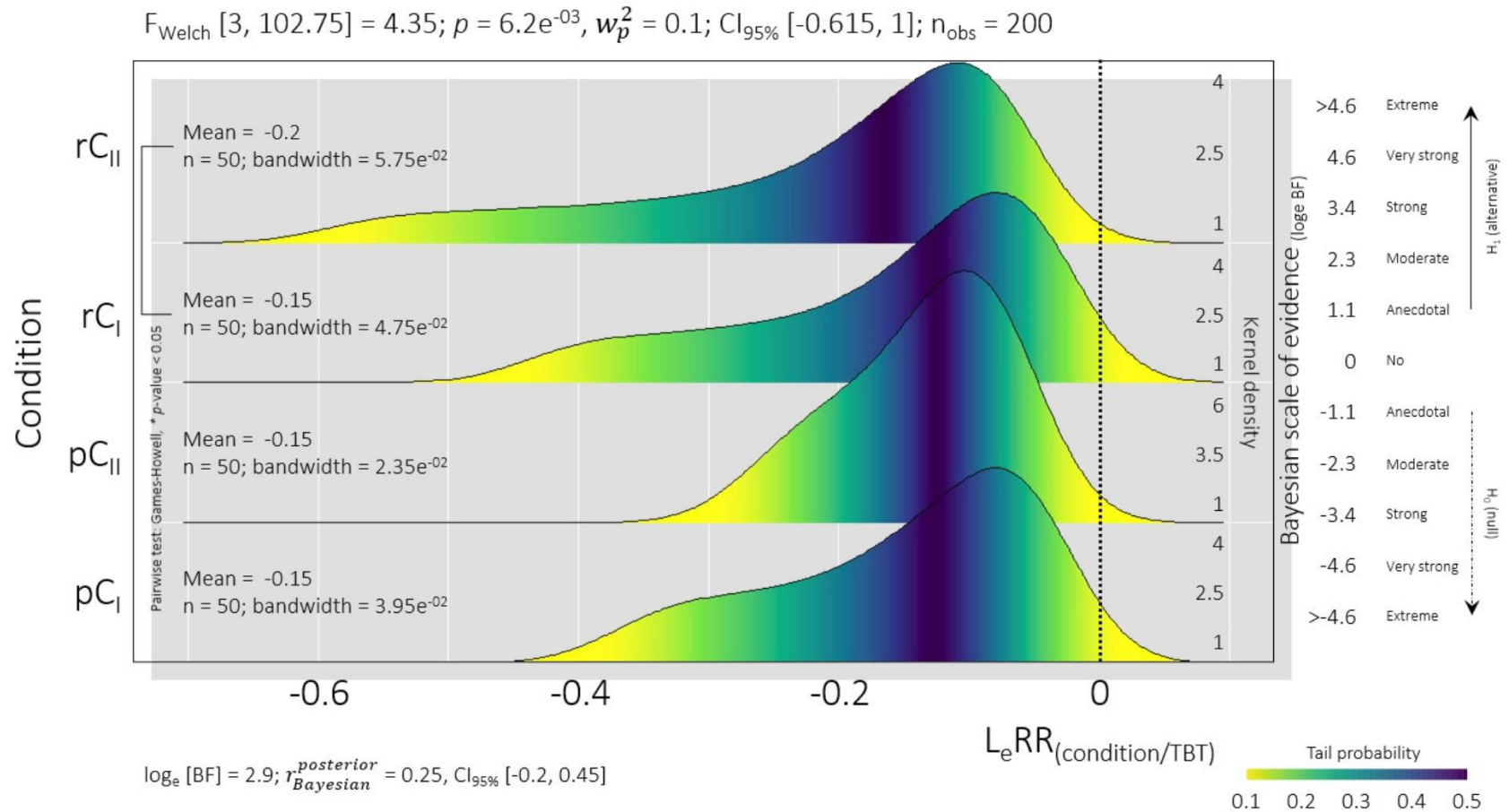
Não há indícios de que a despigmentação da coloração azul para cinza azulado seja a ocorrência da redução do DCPIP em função da respiração microbiana, uma vez que o tubo referência (C.DCPIP, Figura 8) acompanhou o padrão de cor dos demais tratamentos durante o tempo de análise. Desta forma, pode ter havido alguma alteração nos meios em função do indicador redox.

Portanto, a avaliação deste resultado revelou a importância de ser realizado uma análise quantitativa por espectrofotometria para elucidar possíveis alterações nos meios, não visíveis a olho nu, fomentando assim a melhor compreensão do processo de biodegradação da molécula de tebuthiuron existente nas amostras.

5.3. Ensaio colorimétrico quantitativo – espectrofotometria

Os dados médios da relação entre os tratamentos com o herbicida tebuthiuron estão apresentados na Figura 9. O comportamento negativo das curvas de densidade representa a descoloração do DCPIP nos ensaios com a presença de microrganismos bioprospectados nas diferentes amostras de solo, o que comprova a biodegradação de tebuthiuron. Proporcionalmente, quanto mais negativo o valor de média, maior é a atividade microbiana.

Figura 9 – Curva de densidade de biodegradação de tebuthiuron por isolados microbianos, a partir do ensaio colorimétrico por espectrofotometria sob diferentes abordagens estatísticas



Legenda: pCI = linhagem 1 isolada em área com manejo cana-planta; pCII = linhagem 2 isolada em área com manejo cana-planta; rCI = linhagem 1 isolada em área com manejo cana-soca; rCII = linhagem 2 isolada em área com manejo cana-soca.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela densidade de Kernel, é possível observar distintas distribuições dos dados espectrofotométricos e, conseqüentemente, origens dos isolados microbianos. Para PC.1 e PC.2, os valores se concentraram próximos a região central e demonstraram maior densidade. Em contrapartida, RC.1 e RC.2. assumiram caldas longas por apresentarem valores mais dispersos. Neste sentido, é possível observar comportamento semelhante entre as curvas com inóculos de mesmo manejo do solo, pois tendem a possuir comunidades microbianas similares. Sendo assim, é provável que a distribuição mais dispersa em RC.1 e RC.2. pode ser devido a um maior teor de matéria orgânica no solo pelo sistema cana-soca que possivelmente promoveu um incremento na diversidade microbiana dessas áreas.

A presença de uma fonte de carbono prontamente disponível favorece a diversidade da comunidade microbiana no solo, o que evidencia a importância de conservação dessa diversidade como promotora de funções ecossistêmicas (MARON *et al.*, 2018). Logo, a manutenção da palhada no manejo cana-soca (RC) pode ter auxiliado no melhor resultado dos isolados microbianos nestas áreas. Além disso, os microrganismos são afetados pelo ambiente e pelo manejo antrópico, uma vez que as condições básicas necessárias para sua sobrevivência são oxigênio, água e matéria orgânica (DIONÍSIO; KUSDRA; KUSDRA, 2007).

Pelo teste de Welch, RC.2 distinguiu significativamente das demais condições, destacando-se pelo maior metabolismo nos meios com tebutiuron. A maior média encontrada para este isolado (Figura 9) pode inferir em comunidades com grande potencial no tratamento de solos agrícolas com este herbicida. Neste sentido, confirma-se que microrganismos autóctones são ferramentas biotecnológicas muito úteis para a remediação de ecossistemas contaminados com esta molécula (LIMA *et al.*, 2022).

Utilizada como ferramenta de contraste de credibilidade, a análise Bayesiana confirma ao estudo, a hipótese de que há diferença significativa entre as curvas analisadas. A partir do intervalo de confiança a 95%, é possível comprovar de moderada a forte evidência a disparidade da curva RC.2 em relação às demais. A afirmação de evidência da escala Bayesiana é comprovada a partir do $\log_e [BF] = 2.9$.

O manejo do solo é um fator primordial na efetividade enquanto a biorremediação de agrotóxicos, sendo metabolismo microbiano uma ferramenta financeiramente acessível e de fácil execução (LOPES *et al.*, 2022). Além da ação microbiana isolada, a interação com as plantas em agrossistemas é fundamental, uma vez que a maior atividade de degradação de moléculas contaminantes ocorre na rizosfera (WANG *et al.*, 2021). Portanto, a bioprospecção destes organismos em solos agrícolas é importante para aumentar a eficiência deste tratamento, assim como demonstrado na Figura 9. Neste sentido, Lima *et al.* (2022) concluíram que o consórcio entre microrganismos provenientes de sistemas de produção (convencional e plantio direto) favoreceu a biodegradação do tebutiuron.

Quanto à bioaumentação microbiana, Lopes *et al.* (2022) atestaram que a grande maioria dos trabalhos relacionados à biorremediação de ambientes contaminados com agrotóxicos estão baseados na seleção bacteriana, assim como este estudo. Entretanto, investigações relacionadas ao consórcio entre plantas ou rotação de culturas e também à bioprospecção de fungos possibilitam novas alternativas cientificamente interessantes.

Portanto, a presente investigação apresenta resultados iniciais, mas relevantes para potencializar o uso de espécies microbianas com capacidade de biodegradar agrotóxicos, oferecendo assim contribuições científicas sociais, econômicas e ambientais aplicadas às ciências agrárias.

6. CONCLUSÃO

Foi possível isolar comunidades microbianas viáveis com potencial de biodegradação de tebuthiuron a partir de solos cultivados com cana-de-açúcar pelos manejos cana-planta e cana-soca;

Os microrganismos autóctones bioprospectados em sistema cana-soca possibilitaram maior biodegradação de molécula de tebuthiuron em relação aos isolados de solo com o manejo cana-planta; e

A análise estatística proposta demonstrou-se como uma ferramenta abrangente e concisa para interpretação mais detalhada dos resultados de biodegradação microbiana por espectrofotometria que pode ser empregada em novos estudos com outras moléculas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fim de explorar a potencialidade do método de isolamento realizado, é válida a aplicação da metodologia em outros tipos de manejo, como é o exemplo de sistemas agroflorestais que favorecem a diversificação de espécies e estratos vegetais dentro do agroecossistema.

Além disso, é possível o estudo da bioprospecção de microrganismos autóctones de ambientes cultivados com outras *commodities*, bem como a avaliação da biodegradação de demais agrotóxicos, sendo estes formulados isoladamente ou em consórcio, considerando sua periculosidade e dinâmica ambiental.

Vislumbrando o aprimoramento desta pesquisa, sugere-se aumentar a concentração de tebuthiuron utilizada no ensaio qualitativo, no sentido de adequar a resposta visual da biodegradação, uma vez que tratamentos propostos igualmente, entretanto em menor escala obtiveram efetividade na avaliação da biodegradação por espectrofotometria.

Vale destacar a readequação da análise de comparação entre diferentes modelagens matemáticas aplicadas ao ensaio colorimétrico por espectrofotometria na avaliação da biodegradação de agrotóxicos, proposta inicial que devido ao comportamento dos resultados (curvas não sigmóides), não foi possível ser realizada. Entretanto, pode-se ressaltar a efetividade das análises estatísticas subsequentes, nunca antes propostas em conjunto como ferramenta de interpretação de dados para análises de biodegradação.

Por fim, é válido detalhar a comunidade microbiana isolada em RC.2 e identificar molecularmente as espécies componentes, possibilitando desta forma o estudo isolado e consorciado dos fatores, visando a possível validação de patentes perante à formulação de novos produtos biotecnológicos.

8. REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. 2023. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 02 abr. 2023.
- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-787, 2016.
- ALMEIDA, R. L. **Capacidade fotossintética em cana-de-açúcar é limitada por fatores fotoquímicos, difusivos e bioquímicos**. 2020. 48 f. Dissertação de Mestrado (Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico, Campinas-SP, 2020.
- AMARAL-ZETTLER, L. A.; McCLIMENT, E. A.; DUCKLOW, H. W.; HUSE, S. M. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. **PLOS ONE**, v. 4, n. 12, e6372, 2009.
- AMORIM, F. R.; PATINO, M. T. O.; MARCOMINI, G. R. Sustentabilidade da produção de cana-de-açúcar em usinas no estado de São Paulo. **Revista em agronegócio e meio ambiente**, v. 11, n. 4, p. 1133-1145, 2018.
- AQUINO, G. S.; MEDINA, C. C.; COSTA, D.C.; SHAHAB, M.; SANTIAGO, A.D. Sugarcane straw management and its impact on production and development os ratoons. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 58 – 64, 2017.
- BIDOIA, E.D.; MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M. **Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study**. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Málaga-Espanha: Formatex Research Center, v. 2, p. 1277-1288, 2010.
- BLANCO, J. G.; OLIVEIRA, D. A. Persistência de herbicidas em Latossolo Vermelho-Amarelo em cultura de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 681-687, 1987.
- BREITENBACH, J.; ZHU, C.; SANDMANN, G. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5270-5272, 2001.
- CADKOVA, E.; KOMAREK, M.; KALISZOVA, R.; VANEK, A.; BALAKOVA, M. Tebuconazole sorption in contrasting soil types. **Soil and Sediment Contamination**, v. 22, p. 404-414, 2013.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global

patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 108 (suppl. 1), p. 4516-4522, 2011.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p. Disponível em: https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf. Acesso em: 02 abr. 2023.

CHANG, S.S; STRITZKE, J.F. Sorption, movement, and dissipation of tebuthiuron in soils. **Weed Science Society of America**. Cambridge University Press. v. 25, n. 2, p. 184-187, 1977.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**, [s. l.], v. 3, p. 9-34, 2008.

CORREIA, N. M. **Comportamento dos herbicidas no ambiente**. Documentos 160, Embrapa Hortaliças, 30 p. Brasília – DF, 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. v. 11 – Safra 2023/24 - n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, 56 f. 2023.

DE CÁCERES, M.; LEGENDRE, P. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology**, v. 90, n. 12, p. 3566-3574, 2009.

DEUS, R. M.; BAKONYI, S. M. C. O impacto da agricultura sobre o meio ambiente. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, v. 7, n. 7, p. 1306-1315, 2012.

DIONÍSIO, J. A.; KUSDRA, J. F.; KUSDRA, E. S. S. Biologia do solo. In: **O solo no meio ambiente**: abordagem para professores do ensino fundamental e médio e alunos do ensino médio. Universidade Federal do Paraná, 2007. Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Cap. 6, p. 65-76.

EMBRAPA. **Plantas Daninhas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-plantas-daninhas/sobre-o-tema>. Acesso em: 18 abr. 2023.

FASANELLA, C. C.; CARDOSO, E. J. B. N. Biorremediação. In: **Microbiologia do solo**. 2.ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. Cap. 13. p. 197-210.

FARIA, A. T. **Sorção, dessorção, meia vida e lixiviação do tebuthiuron em latossolos brasileiros**. 2013. 60 f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2013.

FERREIRA, L. C.; MOREIRA, B. R. A.; MONRAGNOLLI, R. N.; PRADO, E. P.; VIANA, R. S.; TOMAZ, R. S.; CRUZ, J. M.; BIDOIA, E. D.; FRIAS, Y. A.;

LOPES, P. R. M. Green manure species for phytoremediation of soil with tebuthiuron and vinasse. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, article 613642, 2021.

GARCIA-JARAMILLO, M.; COX, L.; CORNEJO, J.; HERMOSIN, M. Effect of soil organic amendments on the behavior of bentazone and tricyclazole. **Science of Total Environment**, v. 466-467, p. 906-913, 2013.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GOGOI, U. N.; SAIKIA, P.; MAHANTA, D. J. A review of the growth models in biological sciences, AIP Conference Proceedings 2451, 020070. 2022.

GUIMARÃES, G. L. Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente. **Série Técnica IPEP**, Piracicaba, v.4, n.12, p. 159 – 180, 1987.
GUO, L.; BICKI, T.; FELSOT, A.; HINESLY, T. Sorption and movement of alachlor in soil modified by carbon-rich wastes. **Journal of Environmental Quality**, v. 22, n. 1, p. 186-194, 1993.

HANSON, K, G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v.7, p. 745-748, 1993.

HESPANHOL, I. Recarga artificial de aquíferos. **Revista da Fundação de Apoio à Tecnologia** – FAT, São Paulo, v.33, n.1, p.25-29, 2006

IBAMA. Perfis Ambientais de Agrotóxicos. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/perfis-ambientais#lista-perfis>. Acesso em: 15 abr. 2023

KODESOVA, R.; KOCAREK, M.; KODES, V.; DRABEK, O.; KOZAK, J.; HEJTMANKOVA, K. Pesticide adsorption in relation to soil properties and soil type distribution in regional scale. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 540-550, 2011.

LEGENDRE, P., LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier Science BV. 1998.

LIMA, E. W. D. **Metabolismo microbiano de isolados de solos cultivados com cana-de-açúcar na presença de tebuthiuron**. 2020. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidades: Sistema de Produção, 2020.

LIU, H. **Comparing Welch ANOVA, a Kruskal-Wallis test, and traditional ANOVA in case of heterogeneity of variance**. 2015. 46 f. Dissertação (Mestrado e Ciências) – Faculty of Virginia, Commonwealth University, Richmond, 2015.

LOPES, P. R. M.; CRUZ, V. H.; MENEZES, A. B.; GADANHOTO, B. P.; MOREIRA, B. R. A.; MENDES, C. R.; MAZZEO, D. E. C.; DILARRI, G.; MONTAGNOLLI, R. N. Microbial bioremediation of pesticides in agricultural soils: an integrative review on natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 21, p. 851-876, 2022.

LUPATINI, M.; KORTHALS, G. W.; DE HOLLANDER, M.; JANSSENS, T. K.; KURAMAE, E. E. Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2064-2077, 2017.

MACHADO, C. S. **Quantificação do risco à saúde humana pela exposição a poluentes químicos e potencial carcinogênico às comunidades adjacentes ao Rio Pardo, Brasil**. 2016. 175 p. Tese (Doutorado em Enfermagem e Saúde Pública) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto – SP, 2016.

MALLMAN, V.; ARAGÃO, L. W. R.; FERNANDES, S. S. L.; FERNANDES, T. C. L.; ARAGÃO, R. F. R.; SILVA, R. C. L. As vantagens da biorremediação na qualidade ambiental. **Ensaio e Ciência**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MARON, P. A.; SARR, A.; KAISERMANN, A.; LÉVÊQUE, J.; MATHIEU, O.; GUIGUE, J.; KARIMI, B.; BERNARD, L.; DEQUIEDT, S.; TERRAT, S.; CHABBI, A.; RANJARD, L. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *American Society for Microbiology Journal* – **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 9, 2018.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

NOCELLI, R. C. F.; ZAMBON, V.; SILVA, O. G. M.; MORINI, M. S. C. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil: contribuições e importância econômica. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru: Canal 6, 2017. 275 p.

OLIVEIRA JR, R. S. Mecanismo de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. F. (ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 141-192. Disponível em: <http://omnipax.com.br/livros/2011/BMPD/BMPD-livro.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2023.

PIRES, F. R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A.; CECON, P.R.; PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com tebutiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, Viçosa – MG, v. 23, n. 4, p. 711-717, 2005.

PRIMAVESI, A. M. **Algumas plantas indicadoras: como reconhecer os problemas de um solo**. 1ª ed., São Paulo: Expressão Popular, 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing website**, Vienna, 2020.

RANI, M. S.; LAKSHMI, K. V.; DEVI, P. S.; MADHURI, R. J.; ARUNA, S.; JYOTHI, K.; NARASIMHA, G.; VENKATESWARLU, K. Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacterium from agricultural soil and its growth response. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 26-31, 2008.

RICHARD J. Y., VOGEL T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.

ROCHA, R. S.; BEATI, A. A. G. F.; VALIM, R. B.; STETER, J. R.; BERTAZZOLI, R.; LANZA, M. R. V. Avaliação dos subprodutos de degradação do herbicida ametrina obtidos via processos oxidativos avançados. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 12, n. 1, p. 52-67, 2018.

RODRIGUES, L. D. **A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação**. 2010. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Especialização em Análise Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, 2010.

SILVA, G. S.; SILVA, A. F. M.; GIRALDELI, A. L.; GHIRARDELLO, G. A.; VICTORIA FILHO, R.; TOLEDO, R. E. B. Manejo de plantas daninhas no sistema de mudas pré brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n.1, p. 86-94, 2018.

SILVA, J. P. N.; SILVA, M. R. N. **Noções da cultura da cana-de-açúcar**. Rede e-Tec Brasil. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás e Universidade Federal de Santa Maria, Inhumas – GO, 105 p., 2012.

SILVA JUNIOR, A. C.; GONÇALVES, C. G.; QUEIROZ, J. R. G.; MARTINS, D. Evaluation of leaching potential of tebuthiuron using bioindicator plants. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-9, e0692015, 2018.

SHIVA, Vandana. **Monocultures of the mind**: Perspectives on Biodiversity and Biotechnology. 1. Ed. New York, United States of America: Thrid World Network, 1993.

TEJERA, N. A.; RODÉS, R.; ORTEGA, E.; CAMPOS, R.; LLUCH, C. Comparative analysis of physiological characteristics and yield components in sugarcane cultivars. **Field Crops Research**, v. 102, p. 64-72, 2007.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo. **Setor Sucroenergético**. 2023. Disponível em: <https://unica.com.br>. Acesso em: 14 abr. 2023.

VICTORIA FILHO, R.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de plantas daninhas e produtividade da cana. **Visão Agrícola**, v. 1, n. 1, p. 32-37, 2004.

WANG, J.; AWAYA, J.; ZHU, Y.; MOTOOKA, P. S.; NELSON, D. A.; LI, Q. X. Tests of Hexazinone and Tebuthiuron for Control of Exotic Plants in Kauai, Hawaii. **Forests**, v. 10, n.7, p. 576, 2019.

WANG, X.; HOU, J.; LIU, W.; BAO, J. Plant-microbial remediation of chlorpyrifos contaminated soil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 10, p. 925-931, 2021

ZHANG, M. Y.; TENG, Y.; ZHU, Y. WANG, J.; LUO, Y. M.; CHRISTIE, P.; LI, Z. G.; UDEIGWE, T. K. Isolation and characterization of chlorothalonil-degrading bacterial strain H4 and its potential for remediation of contaminated soil. **Pedosphere**, v. 24, n. 6, p. 799-807, 2014.

9. APÊNDICE

Tabela 4 – Valores de absorvância obtidos a partir de espectrofotometria dos ensaios colorimétricos quantitativos

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	0	5	10	15	20	25	30	35
C. DCPIP	0,8201	0,8278	0,8316	0,8337	0,8358	0,8345	0,8340	0,8326
PC.1 (T-)	0,8409	0,8488	0,8472	0,8447	0,8421	0,8389	0,8367	0,8333
PC.2 (T-)	0,8642	0,8575	0,8568	0,8553	0,8533	0,8502	0,8477	0,8450
RC.1 (T-)	0,9184	0,8845	0,8781	0,8722	0,8665	0,8622	0,8602	0,8607
RC.2 (T-)	0,8804	0,8702	0,8750	0,8745	0,8646	0,8609	0,8593	0,8574
C. TBT	0,9087	0,9128	0,9134	0,9156	0,9159	0,9150	0,9132	0,9120
PC.1 (T+)	0,7816	0,8595	0,8700	0,8737	0,8751	0,8733	0,8728	0,8699
PC.2 (T+)	0,7934	0,8493	0,8500	0,8535	0,8557	0,8535	0,8497	0,8468
RC.1 (T+)	0,7924	0,8730	0,8861	0,8808	0,8812	0,8806	0,8771	0,8719
RC.2 (T+)	0,7729	0,8366	0,8484	0,8511	0,8519	0,8495	0,8511	0,8465
BRANCO	0,0444	0,0439	0,0442	0,0441	0,0442	0,0440	0,0441	0,0444

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	40	45	50	55	60	65	70	75
C. DCPIP	0,8312	0,8296	0,8280	0,8266	0,8249	0,8233	0,8215	0,8203
PC.1 (T-)	0,8301	0,8279	0,8233	0,8200	0,8165	0,8131	0,8096	0,8063
PC.2 (T-)	0,8415	0,8380	0,8354	0,8317	0,8280	0,8246	0,8210	0,8179
RC.1 (T-)	0,8563	0,8511	0,8474	0,8416	0,8368	0,8322	0,8275	0,8231
RC.2 (T-)	0,8516	0,8459	0,8407	0,8362	0,8313	0,8269	0,8223	0,8177
C. TBT	0,9107	0,9093	0,9082	0,9072	0,9059	0,9049	0,9034	0,9025
PC.1 (T+)	0,8684	0,8652	0,8606	0,8567	0,8520	0,8476	0,8431	0,8389
PC.2 (T+)	0,8450	0,8426	0,8401	0,8375	0,8345	0,8317	0,8287	0,8258
RC.1 (T+)	0,8655	0,8609	0,8570	0,8535	0,8494	0,8462	0,8418	0,8382
RC.2 (T+)	0,8442	0,8405	0,8347	0,8295	0,8244	0,8201	0,8156	0,8115
BRANCO	0,0443	0,0441	0,0441	0,0444	0,0442	0,0442	0,0441	0,0441

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	80	85	90	95	100	105	110	115
C. DCPIP	0,8186	0,8169	0,8153	0,8138	0,8125	0,8109	0,8094	0,8080
PC.1 (T-)	0,8027	0,7993	0,7957	0,7923	0,7895	0,7853	0,7819	0,7787
PC.2 (T-)	0,8141	0,8107	0,8072	0,8037	0,8002	0,7964	0,7928	0,7890
RC.1 (T-)	0,8185	0,8135	0,8083	0,8046	0,7985	0,7930	0,7880	0,7823
RC.2 (T-)	0,8130	0,8084	0,8035	0,7985	0,7933	0,7877	0,7825	0,7764
C. TBT	0,9013	0,9002	0,8990	0,8980	0,8968	0,8958	0,8945	0,8936
PC.1 (T+)	0,8346	0,8302	0,8256	0,8213	0,8163	0,8117	0,8067	0,8015
PC.2 (T+)	0,8229	0,8200	0,8170	0,8140	0,8108	0,8075	0,8041	0,8006
RC.1 (T+)	0,8344	0,8301	0,8257	0,8215	0,8170	0,8120	0,8072	0,8024
RC.2 (T+)	0,8067	0,8025	0,7972	0,7923	0,7878	0,7819	0,7766	0,7712
BRANCO	0,0440	0,0441	0,0441	0,0450	0,0448	0,0447	0,0446	0,0445

Tabela 4 (continuação) – Valores de absorbância obtidos a partir de espectrofotometria dos ensaios colorimétricos quantitativos

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	120	126	131	136	141	146	151	156
C. DCPIP	0,8065	0,7978	0,7993	0,7993	0,7986	0,7981	0,7971	0,7962
PC.1 (T-)	0,7744	0,7638	0,7638	0,7617	0,7592	0,7561	0,7526	0,7490
PC.2 (T-)	0,7856	0,7761	0,7747	0,7727	0,7700	0,7668	0,7632	0,7596
RC.1 (T-)	0,7774	0,7650	0,7627	0,7590	0,7547	0,7482	0,7415	0,7361
RC.2 (T-)	0,7702	0,7585	0,7547	0,7514	0,7466	0,7408	0,7338	0,7266
C. TBT	0,8923	0,8828	0,8840	0,8841	0,8841	0,8840	0,8832	0,8823
PC.1 (T+)	0,7958	0,7817	0,7793	0,7751	0,7702	0,7647	0,7587	0,7521
PC.2 (T+)	0,7968	0,7851	0,7847	0,7817	0,7787	0,7755	0,7711	0,7665
RC.1 (T+)	0,7966	0,7814	0,7791	0,7752	0,7704	0,7640	0,7571	0,7497
RC.2 (T+)	0,7648	0,7498	0,7465	0,7425	0,7372	0,7311	0,7243	0,7162
BRANCO	0,0446	0,0449	0,0445	0,0447	0,0446	0,0444	0,0438	0,0435

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	161	166	171	176	181	186	191	196
C. DCPIP	0,7950	0,7947	0,7943	0,7936	0,7930	0,7913	0,7903	0,7887
PC.1 (T-)	0,7454	0,7419	0,7381	0,7340	0,7300	0,7256	0,7214	0,7169
PC.2 (T-)	0,7559	0,7524	0,7488	0,7449	0,7410	0,7370	0,7332	0,7291
RC.1 (T-)	0,7283	0,7225	0,7158	0,7088	0,6999	0,6930	0,6856	0,6774
RC.2 (T-)	0,7188	0,7106	0,7018	0,6926	0,6821	0,6723	0,6618	0,6502
C. TBT	0,8816	0,8810	0,8802	0,8796	0,8786	0,8774	0,8766	0,8754
PC.1 (T+)	0,7452	0,7382	0,7308	0,7231	0,7149	0,7070	0,6987	0,6898
PC.2 (T+)	0,7619	0,7572	0,7524	0,7471	0,7416	0,7361	0,7306	0,7248
RC.1 (T+)	0,7419	0,7344	0,7256	0,7170	0,7071	0,6975	0,6874	0,6769
RC.2 (T+)	0,7079	0,6995	0,6896	0,6794	0,6683	0,6567	0,6448	0,6322
BRANCO	0,0434	0,0436	0,0435	0,0436	0,0435	0,0434	0,0435	0,0434

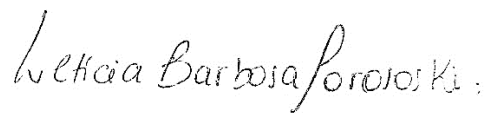
Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	201	206	211	216	221	226	231	236
C. DCPIP	0,7872	0,7861	0,7849	0,7838	0,7829	0,7818	0,7805	0,7797
PC.1 (T-)	0,7124	0,7081	0,7037	0,6991	0,6944	0,6898	0,6851	0,6804
PC.2 (T-)	0,7250	0,7213	0,7172	0,7131	0,7089	0,7049	0,7006	0,6962
RC.1 (T-)	0,6689	0,6610	0,6530	0,6461	0,6362	0,6280	0,6193	0,6118
RC.2 (T-)	0,6381	0,6265	0,6151	0,6021	0,5887	0,5755	0,5618	0,5477
C. TBT	0,8743	0,8735	0,8725	0,8715	0,8705	0,8698	0,8687	0,8677
PC.1 (T+)	0,6810	0,6723	0,6636	0,6544	0,6453	0,6366	0,6274	0,6187
PC.2 (T+)	0,7189	0,7134	0,7076	0,7017	0,6958	0,6902	0,6842	0,6785
RC.1 (T+)	0,6659	0,6553	0,6442	0,6330	0,6211	0,6099	0,5979	0,5866
RC.2 (T+)	0,6189	0,6056	0,5917	0,5774	0,5627	0,5480	0,5326	0,5170
BRANCO	0,0433	0,0436	0,0436	0,0437	0,0436	0,0436	0,0436	0,0436

Tabela 4 (continuação) – Valores de absorbância obtidos a partir de espectrofotometria dos ensaios colorimétricos quantitativos

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	241	246	1106	1111	1116	1121	1126	1131
C. DCPIP	0,7783	0,7769	0,7274	0,7312	0,7350	0,7372	0,7383	0,7386
PC.1 (T-)	0,6757	0,6708	0,4491	0,4548	0,4604	0,4662	0,4714	0,4765
PC.2 (T-)	0,6918	0,6873	0,4762	0,4805	0,4871	0,4935	0,4997	0,5058
RC.1 (T-)	0,6021	0,5929	0,3944	0,3996	0,4033	0,4063	0,4080	0,4092
RC.2 (T-)	0,5333	0,5186	0,4990	0,4971	0,5048	0,5130	0,5205	0,5262
C. TBT	0,8667	0,8656	0,7562	0,7569	0,7582	0,7589	0,7584	0,7572
PC.1 (T+)	0,6099	0,6010	0,4445	0,4549	0,4660	0,4780	0,4888	0,4997
PC.2 (T+)	0,6727	0,6668	0,3639	0,3632	0,3706	0,3789	0,3883	0,3989
RC.1 (T+)	0,5747	0,5627	0,4341	0,4296	0,4355	0,4379	0,4390	0,4392
RC.2 (T+)	0,5014	0,4857	0,4522	0,4583	0,4665	0,4751	0,4822	0,4878
BRANCO	0,0436	0,0434	0,0443	0,0440	0,0441	0,0442	0,0444	0,0445

Tratamentos	Tempo de leitura em minutos							
	1166	1171	1176	1181	1186	1191	1196	1221
C. DCPIP	0,7242	0,7269	0,7301	0,7314	0,7323	0,7320	0,7318	0,7159
PC.1 (T-)	0,4899	0,5006	0,5046	0,5070	0,5089	0,5098	0,5106	0,5071
PC.2 (T-)	0,5196	0,5296	0,5347	0,5384	0,5421	0,5449	0,5477	0,5442
RC.1 (T-)	0,4236	0,4229	0,4217	0,4184	0,4141	0,4088	0,4035	0,4061
RC.2 (T-)	0,5425	0,5496	0,5538	0,5574	0,5607	0,5624	0,5645	0,5601
C. TBT	0,7357	0,7366	0,7374	0,7369	0,7359	0,7338	0,7315	0,7097
PC.1 (T+)	0,5331	0,5429	0,5497	0,5562	0,5628	0,5682	0,5741	0,5760
PC.2 (T+)	0,4435	0,4586	0,4678	0,4767	0,4860	0,4948	0,5036	0,5148
RC.1 (T+)	0,4523	0,4460	0,4449	0,4421	0,4370	0,4321	0,4260	0,4324
RC.2 (T+)	0,5049	0,5101	0,5141	0,5185	0,5225	0,5255	0,5288	0,5276
BRANCO	0,0441	0,0441	0,0441	0,0442	0,0443	0,0441	0,0443	0,0444

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS
AUTÓCTONES EM SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-
AÇÚCAR E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE
BIODEGRADAÇÃO DE TEBUTHIURON**



Letícia Barbosa Jorososki

Engenheira Agrônoma



Paulo Renato Matos Lopes

Orientador

Dracena-SP
Julho de 2023.