

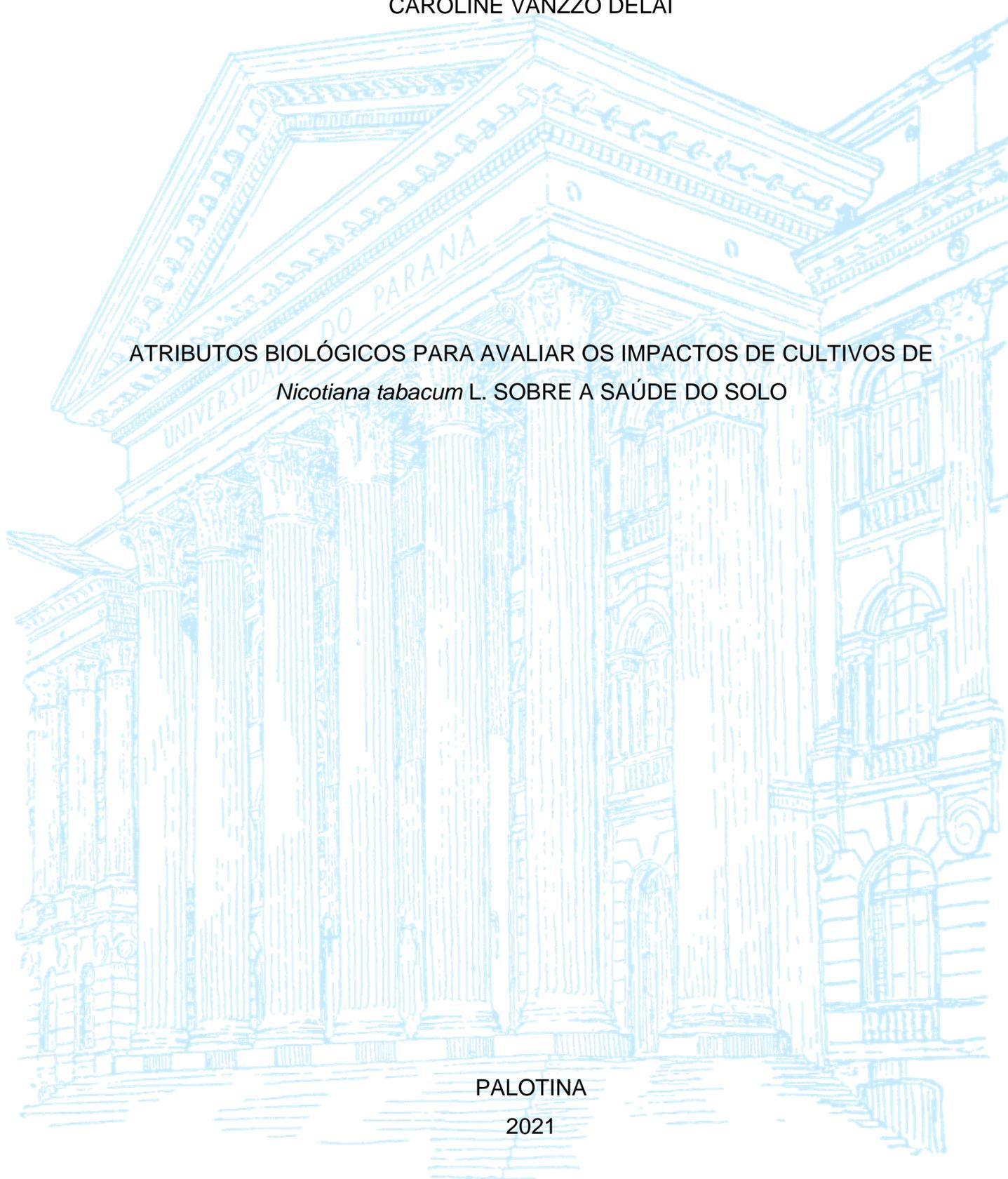
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE VANZZO DELAI

ATRIBUTOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR OS IMPACTOS DE CULTIVOS DE
Nicotiana tabacum L. SOBRE A SAÚDE DO SOLO

PALOTINA

2021



CAROLINE VANZZO DELAI

ATRIBUTOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR OS IMPACTOS DE CULTIVOS DE
Nicotiana tabacum L. SOBRE A SAÚDE DO SOLO

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Grange.

PALOTINA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINE VANZZO DELAI

ATRIBUTOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR OS IMPACTOS DE CULTIVOS DE *Nicotiana tabacum* L. SOBRE A SAÚDE DO SOLO

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.



Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros.

Orientador – Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina



Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini

Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, Setor
Palotina



Msc. Caroline Rosa Silva

Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá

Palotina, 22 de dezembro de 2021.

*Aos meu pais, minhas irmãs e meu
namorado, que são meu suporte e fonte de
amor, sempre me incentivando e fazendo
o possível e o impossível por mim <3*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por ter colocado tantas pessoas incríveis para compartilharem momentos comigo.

Aos meus pais, Nestor e Jaqueline, não tenho palavras para expressar toda a gratidão que sinto. Obrigada por TUDO! Pelo amor, incentivo, suporte e confiança. Por sempre quererem dar o melhor para mim e para as meninas, por estarem dispostos a me ajudar ou me darem conselhos quando eu preciso, por acreditarem em mim e me apoiarem nas minhas escolhas... vocês são incríveis, eu admiro e amo muuuuuito vocês dois!

Às minhas irmãs, Juli, Nati e Isa, obrigada por todo o apoio e suporte diário. Obrigada pela amizade, pelos momentos de risada e de descontração, pelas conversas, por todas nossas trocas, por estarem comigo em momentos de desespero e me ajudarem sempre que preciso, enfim, obrigada por tanto, amo vocês infinitamente.

Ao João, meu namorado e parceiro da vida! Você é meu equilíbrio. Obrigada por ser você. Obrigada por sempre estar presente e disposto a me ajudar, por me apoiar e acreditar em mim mais do que eu mesma, por toda compreensão e paciência... por tudo! Cada momento com você é único e especial e me sinto extremamente sortuda em poder dividir minha vida com você.

Aos meus orientadores, prof. Marco e prof^a Luciana! Parece que já agradei vocês dezenas de vezes, mas mesmo assim não é o suficiente. Não poderia ter tido orientadores melhores, vocês são sensacionais. Obrigada por toda atenção, ajuda, suporte e incentivo. Obrigada por acreditarem em mim. Aprendi e aprendo muito com vocês e me sinto privilegiada por ter tido a oportunidade de ser orientada pelos dois.

À prof^a Adriana e à Caroline, pela participação na banca e por todas as colocações e sugestões enriquecedoras. Admiro vocês duas!

Às minhas amigas Amanda, Heloisa, Izabela e Juliana. Obrigada pelas conversas, pela compreensão em momentos de ausência, por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida, por me apoiarem e acreditarem em mim, por vibrarem com as minhas conquistas junto comigo, por segurarem minha mão quando precisei, por nossos momentos de risadas e bobagens, e por tantas outras coisas. Vocês são especiais e eu amo muuuuuito cada uma!

À Tauana, o presente que ganhei na universidade! Obrigada por todo companheirismo, por toda troca, ajuda, suporte, confidências, risadas, gordices... obrigada por tanto, amo você!

À todas as amizades que fiz na UFPR! Vocês foram essenciais e com certeza deixaram o caminho mais leve e tranquilo. Sev e Lanah, obrigada pela parceria de sempre, sem vocês a experiência da academia não seria a mesma! <3

À UFPR, pelas oportunidades que me foram proporcionadas.

À todo corpo docente do curso de Ciências Biológicas, Setor Palotina. Tenho orgulho em poder dizer que tive professores maravilhosos e inspiradores e que eu os admiro muito! Vocês são exemplo.

Ao FIXTEC, por todo acolhimento e parceria, especialmente ao Matteus, por toda colaboração.

E, por fim, a todos que contribuíram de uma forma ou de outra para que eu chegasse até aqui. Obrigada :)

RESUMO

A *Nicotiana tabacum* L. é uma angiosperma popularmente conhecida como fumo ou tabaco. Esta planta é mundialmente conhecida por sintetizar a nicotina e sua principal utilização é na indústria do fumo. Embora o Brasil seja destaque na fumicultura, esta atividade é responsável por causar diversos impactos ambientais e sociais. O objetivo do presente trabalho foi obter e avaliar bioindicadores de solos sob cultivo de *Nicotiana tabacum* L., com o intuito de apontar os impactos causados no sistema biológico da rizosfera pelos diferentes manejos do solo realizados, a saber: M1 – tempo de cultivo de três anos, realizando rotação com soja e milho, com dois anos de descanso e sem adubação orgânica; M2 – tempo de cultivo de seis anos, realizando rotação com soja, milho e aveia, com três anos de descanso e com adubação orgânica anual; M3 – tempo de cultivo de 10 anos, realizando rotação com soja, sem descanso e sem adubação orgânica; M4 – tempo de cultivo de 12 anos, realizando rotação com soja, sem descanso e com adubação orgânica anual; e M5 - tempo de cultivo de quarenta anos, realizando rotação com soja, sem descanso, com cobertura verde entressafra e com adubação orgânica anual. Foram realizadas as análises dos atributos biológicos do metabolismo do solo, sendo elas: carbono da biomassa microbiana (C-BMS), respiração basal do solo (RBS), quociente de carbono orgânico (qCO₂), quociente microbiano (qMIC) e unidade formadora de colônia (UFC). Além disso, as rizobactérias foram submetidas à classificação pelo método de Gram, caracterização morfológica e molecular, através da análise da região intergênica (ITS) e análise de restrição da região 16S do RNA ribossomal, pelas enzimas *BsuRI* e *Mbol*, para estudos de análise polifásica. Para analisar a diversidade das áreas, calculou-se o índice de diversidade de *Shannon-Weaver*. Pelo presente trabalho, foi possível apontar que o tempo de exploração do solo com o cultivo do tabaco reduz a diversidade logo nos primeiros anos. O M5, apesar da exploração a cerca de 40 anos, apresenta seu valor de diversidade próximo a do M4, sob 12 anos de cultivo, principalmente, devido a presença da cobertura verde que ele realiza na entressafra, não deixando o solo desnudo e acumulando mais biomassa a ser incorporada durante o preparo do solo para o próximo plantio. Porém, através da análise polifásica, concluiu-se que os manejos ainda não estão selecionando as bactérias pelo tempo de exploração. Os valores de C-BMS, alcançados pelos manejos M2, M4 e M5, refletem os ganhos biológicos que o sistema recebeu através dos manejos de cobertura verde, rotação e ou adubação orgânica. O baixo qCO₂ destes manejos aponta para o acúmulo do bom carbono advindo dos resíduos orgânicos, das raízes e das palhadas, o que se reflete de forma contrária em relação aos manejos M1 e M3, não só pelos valores C-BMS, mas de qCO₂, qMIC% e UFC. Os impactos do preparo de solo para o plantio do tabaco, somados a uma exploração intensiva, observados pelos valores obtidos para os M1 e M3, apontam que nestas áreas, a adoção de práticas mais sustentáveis é necessária para que a saúde do solo não seja mais prejudicada.

Palavras-chave: ARDRA. Biodiversidade. ITS. Manejo de solo. Rizobactéria. Tabaco.

ABSTRACT

The *Nicotiana tabacum* L. is an angiosperm popularly known as smoke or tobacco. This plant is known worldwide for synthesizing nicotine and its main function is in the tobacco industry. Although Brazil is notorious in tobacco farming, this activity is responsible for several social and environmental impacts. The goal of the present monograph is to obtain and evaluate bioindicators of soils in which *Nicotiana tabacum* L. was cultivated, pointing the impacts caused in the biological system of the rhizosphere by the different forms of soil management namely: M1 - cultivated in 3 years, rotating with soy and corn, with two years of rest and without organic fertilizing; M2 - cultivated in six years, rotating with soy, corn and oat, with three years of rest and annual organic fertilizing; M3 - cultivated in 10 years, rotating with soy, without rest or annual organic fertilizing; M4 - cultivated in 12 years, rotating with soy, without rest and with annual organic fertilizing and M5 - cultivated in 40 years, rotating with soy, without rest, with a green cover in the off season and with annual organic fertilizing. The biological attributes of the soil metabolism were analyzed, being them: microbial biomass carbon (C-MBS), basal soil respiration (BSR), organic carbon quotient (qCO₂), microbial quotient (qMIC) and colony forming unity (CFU). Other than that, the rhizobacteria were submitted to classification under the Gram method, morphological and molecular characterization, through analysis of the intergenic region (ITS) and analysis of the restriction of the 16S region of the ribosomal RNA, by the *Bsu*RI and *Mbo*I enzymes, for studies of the polyphasic analysis. To analyze the diverse areas, the index of diversity of *Shannon-Weaver* was calculated. Through this monograph, it was possible to point out that the time of exploration of the soil with tobacco cultivation reduces its diversity in the first years. The M5, although the exploration went through 40 years, presents its diversity close to the M4, under 12 years of cultivation, mainly due to the presence of green cover in the off season, not leaving the soil bare and accumulating more biomass to be incorporated during the preparation of the soil for the next planting. However, through the polyphasic analysis, it was possible to concluded that the managements still are not selecting the bacteria through time of exploration. The C-BMS values, reached by the M2, M4 and M5 managements, reflect the biological gains that the system has received through the management with green cover, rotation and or organic fertilizing. The low qCO₂ of these management points to the accumulation of the good carbon arising from the organic residue, the roots and straws, which reflects on contrary on the M1 and M3 managements, not only by the C-MBS values, but the qCO₂, qMIC% and UFC. The impacts of the preparation of the soil for the tobacco planting, added to an intensive exploration, observing the values obtained to the M1 and M3, point that in these areas, the adoption of more sustainable techniques is necessary for not harming the soil health.

Keywords: ARDRA. Biodiversity. ITS. Soil management. Rhizobacteria. Tobacco.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Nicotiana tabacum</i> L.	15
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA <i>Nicotiana tabacum</i> L. NO BRASIL	16
FIGURA 3 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA REGIÃO INTERGÊNCIA (ITS) 16S-23S DO rRNA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotina tabacum</i> L.	33
FIGURA 4 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA ARDRA-PCR DA REGIÃO 16S DO rRNA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotina tabacum</i> L. CONSIDERANDO <i>BsuRI</i> COMO ENZIMA DE RESTRIÇÃO.....	35
FIGURA 5 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA ARDRA-PCR DA REGIÃO 16S DO rRNA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotina tabacum</i> L. CONSIDERANDO <i>Mbol</i> COMO ENZIMA DE RESTRIÇÃO.....	36
FIGURA 6 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA CARACTERIZAÇÃO MOROFLÓGICA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotina tabacum</i> L.	37
FIGURA 7 – DENDOGRAMA DA ANÁLISE POLIFÁSICA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotina tabacum</i> L. ...	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ÁREAS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotiana tabacum</i> L. ...	25
TABELA 2 – ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ANÁLISES CONJUNTAS DOS ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DOS SOLOS SOB CULTIVO DE <i>Nicotiana tabacum</i> L.	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo geral	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	<i>NICOTIANA TABACUM</i> L. E A FUMICULTURA	15
2.2	OS AGROTÓXICOS NO SISTEMA SOLO-PLANTA.....	17
2.3	OS AGROTÓXICOS E A PRESSÃO SELETIVA.....	19
2.4	BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO.....	20
2.5	BIOLOGIA MOLECULAR EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	A COLEÇÃO DE CULTURA	24
3.2	ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO METABOLISMO DO SOLO.....	26
3.3	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	26
3.4	COLORAÇÃO DE GRAM	27
3.5	TIPAGEM MORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS.....	27
3.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	27
3.6.1	Extração de DNA.....	27
3.6.2	Reação em Cadeia da Polimerase do Gene do RNA Ribossomal 16S	28
3.6.3	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ADRA-PCR)	29
3.6.4	Reação em Cadeia das Polimerase da região ITS	29
3.7.	ANÁLISES CONJUNTAS	30
3.8.	ÍNDICES DE DIVERSIDADE	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A *Nicotiana tabacum* L., popularmente conhecida como fumo ou tabaco, é uma angiosperma difundida mundialmente, caracterizada por sintetizar a nicotina, um alcaloide encontrado, essencialmente, nas folhas da planta (ROSEMBERG, 2004; CHEN *et al.*, 2012; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2021). A principal utilização da *Nicotiana tabacum* L. é na indústria do fumo (MADURO, 2005).

O Brasil é destaque na fumicultura, sendo o maior exportador de folhas de tabaco e o segundo maior produtor do mundo, ficando atrás apenas da China (TCI, 2018; AFUBRA, 2021; INCA, 2020). Na safra de 2020/2021, por exemplo, foram produzidos 628.489 toneladas de folhas de tabaco, gerando um faturamento de mais de seis bilhões de reais (AFUBRA, 2021). Contudo, embora a fumicultura seja a fonte de renda de mais de 137 mil famílias brasileiras e empregue, direta e indiretamente, mais de dois milhões de pessoas, esta cultura utiliza expressivamente agrotóxicos durante todo o ciclo produtivo (INCA, 2021b, 2021c).

A exposição permanente aos agentes químicos, manuseados constantemente durante cerca de 10 meses (duração aproximada do ciclo produtivo), tem prejudicado não só a saúde dos fumicultores e suas famílias, mas também a saúde do solo e do meio ambiente no entorno (SCHOENHALS; FOLLADOR; SILVA, 2009; TROIAN, 2014; ASCARI; SHEID; KESSLER, 2012; AFUBRA, 2021; INCA, 2021b, 2021c).

A pressão exercida pela aplicação constante dos agrotóxicos, seleciona indivíduos com fenótipos vantajosos capazes de se adaptarem à condição específica a que são expostos, enquanto outros estão propensos a serem extintos ou terem suas frequências diminuídas (FONSECA JÚNIOR, 2014). Isto tem levado a alterações estruturais, funcionais e genética das comunidades microbianas e de seus serviços ecossistêmicos (SOUZA *et al.*, 2012; BRÖRING, 2017). Neste cenário, bactérias capazes de tolerar, resistir e/ou degradar estes agentes no solo podem ser selecionadas (MATTOS, 2015; MORETTO, 2015; SILVA, 2021).

Se o estreitamento da curva da biodiversidade é uma desvantagem sobre os microbiomas edáficos, por outro lado, solos sob o cultivo de fumo, podem ser considerados habitats estratégicos de extrema importância para a bioprospecção de microrganismos capazes de biodegradar agrotóxicos, mitigando assim os seus impactos nos sistemas produtivos e naturais. Isto se deve, em parte, ao fato destes

microrganismos estarem sendo constantemente expostos às condições hostis, condicionando seus genomas a uma adaptabilidade ecológica que resulta em readaptações estruturais e metabólicas (MENDES, 2015; LIMA *et al.*, 2017).

Todavia, a eliminação das espécies não adaptáveis e, conseqüentemente, a diminuição da biodiversidade de microrganismos do solo, pode ser um fator influente na resiliência e no bom funcionamento, seja de sistemas naturais ou agroecossistemas, já que diferentes serviços são prestados pelos distintos gêneros nestas distintas condições (ZILLI *et al.*, 2003; BRÖRING, 2017). Cada microbioma possui sua comunidade natural, complexa e diversa, enquanto alguns necessitam de muitas espécies para funcionar em toda a sua capacidade, como é o caso da maioria dos solos sob condições tropicais, outros são extremamente eficientes, mesmo sendo composto por um número pequeno espécies funcionais (COLARES, 2010; KÖBERL *et al.*, 2020). Ainda assim, a abundância de espécies é uma característica intrínseca da maioria dos solos agrícolas do Brasil, fortalecendo o fato de que o país abriga a maior biodiversidade do planeta (BRASIL, 2021).

Além do uso intenso dos agrotóxicos e de todos seus impactos ambientais, o tabaco é geralmente cultivado como monocultura, outro fator capaz de modificar o meio, tendo em vista, que esta prática empobrece significativamente o solo, já que o cultivo intensivo de apenas uma cultura, pode esgotar os nutrientes de forma muito severa, retirando rapidamente a matéria orgânica e estressando a comunidade rizosférica (REIS, 2017; WHO, 2017; STEIN; COSCOLIN, 2019).

Especialmente quando em monocultura, a fumicultura requer o uso demasiado de fertilizantes inorgânicos, além de causar erosão, desagregação, desbalanceamento, perda de matéria orgânica e desertificação a longo prazo (REIS, 2017; WHO, 2017; STEIN; COSCOLIN, 2019). Outros fatores como a falta de palhada e o revolvimento pesado do solo também contribuem para deterioração das áreas de produção (SIMONI, 2017). Levando todos esses fatores em conta, é essencial 1) conhecer a situação em que os agroecossistemas ou sistemas naturais se encontram, especialmente no que diz respeito ao solo da área de produção; e 2) a partir disso, adotar práticas de manejo sustentáveis a fim de evitar ou mitigar os vários impactos que a fumicultura é capaz de provocar.

Os atributos biológicos do solo são amplamente utilizados como indicadores da qualidade dele, tendo em vista que a comunidade de microrganismos edáficos é grande, diversa e responsável por diversas atividades, além de estarem localizados

na camada mais superficial do solo, respondendo de forma mais rápida às mudanças no ambiente (PORTÔ *et al.*, 2009; SIMONI, 2017; PINTO, 2019).

Indicadores biológicos como o carbono da biomassa microbiana ou biomassa microbiana (C-BMS), respiração basal do solo (RBS), quociente metabólico (qCO_2), quociente microbiano (qMIC) e unidade formadora de colônia (UFC) são comumente utilizados nos estudos de análise de qualidade do solo e avaliação do seu nível de degradação (CARDOSO *et al.*, 2009; PORTÔ *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2012; VASCONCELOS, 2015; PINTO, 2019).

Além disso, no contexto de estudos de diversidade, a biologia molecular atua como uma ferramenta fundamental. Técnicas como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e suas variações com marcadores para regiões repetitivas e conservadas (BOX-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR), como os genes ribossomais, vêm sendo amplamente utilizados em estudo de filogenia microbiana (REIS JUNIOR, 2002; MENEZES *et al.*, 2010; HUNGRIA; SILVA, 2011; KOCK, 2014; OLIVEIRA, 2015).

Marcadores filogenéticos para analisar as regiões ITS (*Intergenic Transcribe Space*) e a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) revolucionaram a caracterização de organismos, que anteriormente era realizada somente com base nas características fenotípicas, características estas que não são estáveis e podem ser alteradas dependendo do ambiente (REIS JUNIOR, 2002; MENEZES *et al.*, 2010; HUNGRIA; SILVA, 2011; KOCK, 2014; OLIVEIRA, 2015).

Posto isto e tendo em vista: 1) O histórico da necessidade e do uso intenso de agrotóxicos para algumas culturas; 2) A necessidade de avaliar a resiliência biológica de sistemas produtivos ao uso de agrotóxicos e às diferentes formas de manejo do solo; e 3) A necessidade de prevenir impactos ambientais futuros, é fundamental que pesquisas associadas à avaliação da qualidade do solo e à comparação entre diferentes formas de manejo sejam realizadas, a fim de apresentar os diferentes impactos (e seus níveis) causados, na maioria dos casos, pelos métodos de cultivo tradicionais, e servirem como base em tomadas de decisões e buscas por soluções sustentáveis que satisfaçam as dimensões econômica, ambiental e social.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Obter e avaliar bioindicadores de solos sob cultivo de *Nicotiana tabacum* L., a fim de expor os impactos causados na comunidade rizosférica pelos diferentes manejos do solo realizados.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade, realizar a caracterização morfológica e classificar 21 estirpes da coleção de cultura de bactérias coletadas de solos sob cultivo de *Nicotiana tabacum* L. pelo método de Gram;
- Obter fragmentos da região 16S rDNA para estudos de agrupamento genético por ARDRA-PCR;
- Obter fragmentos da região ITS para estudos de diversidade por agrupamento genético;
- Obter índice de diversidade de *Shannon-Weaver* a partir da tipagem morfológica das 278 colônias caracterizadas por Simoni (2017);
- Realizar a análise dos valores de C-BMS, RBS, qCO₂, qMIC e UFC previamente gerados a partir destes mesmos manejos de *Nicotiana tabacum* L.;
- Interpretar o índice de *Shannon-Weaver* e os atributos biológicos do metabolismo do solo em relação ao tempo de cultivo e ao tipo de manejo da cultura do tabaco;
- Revelar se a implantação de técnicas conservacionistas mitiga ou não os impactos do cultivo do fumo sobre a biologia do solo agrícola;
- Apontar quais manejos foram mais impactantes para o sistema biológico do solo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Nicotiana tabacum* L. E A FUMICULTURA

Nicotiana tabacum L., comumente conhecida como fumo ou tabaco, é uma angiosperma pertencente à família Solanaceae e originária da América do Sul (CHEN *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2021). Acredita-se que a planta era cultivada pelos indígenas por todo o continente americano, sendo considerada sagrada e mística, e com a chegada de Colombo à América, o tabaco foi disperso também por toda a Europa (ROSEMBERG, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2021).

A planta do tabaco ficou muito conhecida por possuir a nicotina ($\text{CH}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$), uma substância estimulante, caracterizada por ser um alcaloide extremamente tóxico, sintetizado nas raízes e levado para as folhas, onde permanece armazenado nos vacúolos (ROSEMBERG, 2004; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). Quando secas, as folhas são utilizadas para, principalmente, fumar, mastigar ou aspirar (FIGUEIREDO, 2008).

A *Nicotiana tabacum* L. caracteriza-se por ser uma planta herbácea à subarbustiva, anual ou bianual, com caule principal ereto, capaz de atingir até dois metros de altura, com poucos ramos, dispor de folhas grandes, largas e numerosas, entre 18 e 26, e possuir inflorescência do tipo panícula, com flores coloridas, variando entre o rosa, branco e amarelo (FIGURA 1) (CHEN *et al.*, 2012; LANDAU *et al.*, 2020; VIGNOLI-SILVA; STEHMANN, 2020).

FIGURA 1 – *Nicotiana tabacum* L.



Fonte: UTAD (2021).

No Brasil, há ocorrências confirmadas de *Nicotiana tabacum* L. nos estados do Amazonas, Pará, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Distrito Federal, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (VIGNOLI-SILVA; STEHMANN, 2020) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA *Nicotiana tabacum* L. NO BRASIL



FONTE: VIGNOLI-SILVA; STEHMANN (2020).

Atualmente, a produção brasileira de folhas de fumo é a segunda maior do mundo, e, desde 1993, o país caracteriza-se por ser o maior exportador deste produto, sendo o Sul, a região que se destaca, e o Rio Grande do Sul, o maior produtor nacional (TCI, 2018; INCA, 2020; AFUBRA, 2021;). Contudo, apesar de ser o sustento de milhares de famílias brasileiras e empregar, direta e indiretamente, mais de dois milhões de pessoas, o cultivo do tabaco envolve diversos riscos, tanto na dimensão ambiental, quanto na dimensão social (AFUBRA, 2021; INCA, 2021b, 2021c).

O desenvolvimento de intoxicações agudas e crônicas, o desenvolvimento de cânceres, danos neurológicos e infertilidade são algumas das possíveis consequências para a saúde do fumicultor (e sua família) causadas pelo uso intenso de agrotóxicos nessa cultura (RIQUINHO; HENNINGTON, 2014; WHO, 2017; INCA, 2021c).

Já no ecossistema, o excesso de agrotóxicos e o acúmulo destes nos compartimentos ambientais, promove, entre outros, a contaminação dos lençóis freáticos e do solo e a perda da biodiversidade (SCHOENHALS; FOLLADOR; SILVA, 2009; ASCARI; SHEID; KESSLER, 2012). Para agravar, o produtor da cultura do tabaco, normalmente trabalha o solo por três safras consecutivas, o que leva o sistema a um grande desgaste biológico e físico, culminando em erosão e compactação do solo (SÁ; SANTOS JÚNIOR, 2005; STEFANOSKI *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2018; STEIN; COSCOLIN, 2019).

Esta condição permanente desencadeia uma cascata de mortes de espécies e de perdas de genes, podendo estar entre estes, aqueles envolvidos nos processos de biorremediação natural dos biomas (BAPTISTA; BUSS; EGLER, 2003; MAHMOOD *et al.*, 2016; ALI *et al.*, 2021).

2.2 OS AGROTÓXICOS NO SISTEMA SOLO-PLANTA

Com o aumento constante da população, se fez, e se faz, necessária a busca por tecnologias que objetivam maior produtividade e menor perda, causada por problemas sanitários, dos produtos cultivados (MANCUSO; NEGRISOLI; PERIM, 2011; SANTOS; POLINARSKI, 2012). Estima-se que em 2050 a população mundial será de quase 10 bilhões de pessoas e para suprir as necessidades alimentícias de toda a população, a produção de alimentos terá que aumentar em 60% (FAO, 2016; UN, 2019).

Sendo assim, os agrotóxicos começaram a ser utilizados na agricultura com o intuito de solucionar a problemática da perda de alimentos na produção em larga escala (SANTOS; POLINARSKI, 2012). De acordo com Peres, Moreira e Dubois (2003), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura definiu agrotóxicos como i) substâncias ou misturas de substâncias, capazes de prevenir, destruir ou controlar pragas que causam danos ou prejudicam qualquer etapa do processo de produção, processamento, armazenamento, transporte e distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados; ou ii) substâncias ou misturas de substâncias que atuam no controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que atacam animais de criação.

Conforme o modo de ação, as classes de agrotóxicos mais comumente conhecidas e utilizadas no setor agrícola são: inseticidas, utilizados no controle de

insetos-praga, fungicidas e bactericidas, empregados no controle de doenças microbianas, e herbicidas, aplicados devido a problemas promovidos pela presença de plantas daninhas, sendo esta última a classe de agrotóxicos mais utilizada no mundo (BLASIOLI; BRASCHI; GESSA, 2011; ROSSET *et al.*, 2014; FONSECA; ARAUJO, 2015).

No histórico do uso dos agrotóxicos, foi após a Segunda Guerra Mundial, com a descoberta do poder biocida de organofosforados e organoclorados utilizados até o momento com propósitos militares, que os agrotóxicos passaram a ser vistos como uma possibilidade no setor agrícola (FARIA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SANTOS; POLINARSKI, 2012). Com a Revolução Verde, na década de 50, o uso dos agroquímicos difundiu-se e tornou-se tecnologia fundamental na agricultura moderna, enquanto que no Brasil, foi durante a ditadura militar que a Revolução Verde foi implantada e a utilização dos agrotóxicos passou a ser incentivada (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Atualmente, a agricultura é um dos pilares da economia brasileira e o Brasil, desde 2008, caracteriza-se como o país que mais consome agrotóxicos no mundo (REIS, 2017; INCA, 2021a). Contudo, apesar de serem amplamente utilizados, o uso irresponsável dos agrotóxicos, como a aplicação de doses inadequadas, aplicações em intervalos errôneos, utilização imprudente de herbicidas com alta persistência no solo e descarte incorreto das embalagens, acarretam diversas e graves externalidades negativas (BRITO; GOMIDE; CÂMARA, 2008; MANCUSO; NEGRISOLI; PERIM, 2011; MORAES, 2019).

A seleção de plantas daninhas, patógenos e insetos resistentes, capazes de se reproduzirem transmitindo estes genes, levam ao agravamento das enfermidades agrícolas e também ao aumento do custo da produção, em consequência dos alimentos para o consumidor (OLIVEIRA; BRIGHETTI, 2018; GARRIDO; BOTTOM, 2021). Ainda, como consequências ambientais do descuido na utilização de agroquímicos, podem-se citar também a perda da biodiversidade, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, efeito residual no solo (*carryover*) e a toxicidade à organismos não alvos, como peixes, anfíbios, insetos e algas (SANTOS *et al.*, 2005; VARGAS; ROMAN, 2006; RIBAS; MATSUMURA, 2009; CORRÊA; CAMPOS; MONQUERO, 2014; ALVES *et al.*, 2016; BELCHIOR *et al.*, 2017; HAMIA, 2017; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; PERUZZOLO, 2018).

2.3 OS AGROTÓXICOS E A PRESSÃO SELETIVA

Após a aplicação, quando no solo, o agroquímico está sujeito à processos físicos, químicos e biológicos, e seu comportamento depende das características específicas da molécula e das particularidades do ambiente, principalmente da condição funcional do microbioma envolvido (MANCUSO; NEGRISOLI; PERIM, 2011; ANDRIGHETTI *et al.*, 2014; SOUTO *et al.*, 2013; LISBÔA *et al.*, 2021).

A exposição contínua à agroquímicos pode ser um fator indutor de pressão seletiva em comunidades microbianas, selecionando bactérias capazes de resistir, tolerar e/ou degradar agrotóxicos presentes no solo e atuando como agente modificador da estrutura funcional e genética das comunidades (SOUZA *et al.*, 2012; FONSECA JÚNIOR, 2014; BRÖRING, 2017; SILVA, 2021).

É importante destacar a diferença entre os organismos tolerantes e os resistentes à agrotóxicos, visto que os organismos tolerantes, geralmente são aqueles que ficam presentes no solo após doses sub-letais e passageiras dos agrotóxicos, entretanto, estes não possuem genes relacionados à exposição pela qual passaram não repassando, ainda, a característica para as próximas gerações (GARRIDO; BOTTOM, 2021). Já os organismos resistentes são aqueles que sobrevivem ao uso contínuo dos agrotóxicos e são capazes de transmitir o gene resistente para suas próximas gerações (GARRIDO; BOTTOM, 2021).

Ainda, os organismos degradadores de agrotóxicos, são aqueles capazes de realizar a biodegradação do agroquímico, ou através do seu próprio crescimento, utilizando o xenobiótico como fonte de carbono e energia, ou através do cometabolismo, recurso em que o organismo utiliza um substrato como fonte de energia para metabolizar, parcialmente na maioria das vezes, o contaminante (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010; JOUTEY *et al.*, 2013; RANGEL; NOWACKI, 2014).

Vale destacar que os microrganismos edáficos são extremamente importantes para a saúde do solo e caracterizam-se por serem fator de interação na formação dele (MATTOS, 2015). As bactérias representam os microrganismos edáficos mais abundante e, assim como as outras comunidades de microrganismos presentes no solo, estão sujeitas às variações que ocorrem no meio (MATTOS, 2015). Sabe-se que indivíduos procariontes, como bactérias e cianobactérias, revelam um aparato genômico que possibilita maior plasticidade fenotípica frente as diferentes alterações

dos biomas, proporcionando uma melhor adaptação à essas variações (LEITE, 2011; SOUZA, 2020).

Um bom exemplo da adaptabilidade de bactérias são as sequências de DNA conhecidas como transposons ou “genes saltadores” (BROWN, 2002; WATSON *et al.*, 2015). Estes fragmentos transponíveis conseguem se movimentar aleatoriamente de um local para o outro no genoma, podendo causar, por exemplo, a perda da função de genes, alterar o padrão de expressão genético ou gerar uma nova mutação, fazendo também com que a organização das comunidades bacterianas se altere com o tempo (BROWN, 2002; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Outro elemento fundamental para a evolução das bactérias, principalmente frente a condições inconstantes e nocivas, é a transferência horizontal de genes, que possibilita a troca de material genético entre indivíduos diferentes, processo extremamente vantajoso e com capacidade de distribuir rapidamente na comunidade bacteriana os genes favoráveis e necessários para a sobrevivência dos organismos (MOREIRA *et al.*, 2013).

Entretanto, o desaparecimento das espécies que não suportam as condições desfavoráveis à que são expostas, pode ser um cenário perigoso, visto que com seleção de espécies resilientes, que geralmente, possuem funções redundantes, embora fundamentais, a diversidade e a abundância de microrganismos são diretamente afetadas, interferindo de maneira significativa na saúde do ecossistema (ZILLI *et al.*, 2003; BRÖRING, 2017; PINTO, 2019; SILVA, 2021).

2.4 BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO

O solo é um sistema dinâmico e complexo, caracterizado por ser o habitat de diversas espécies (MENDES *et al.*, 2009). Além disso, a sua preservação é essencial para a sobrevivência do ser humano (MENDES *et al.*, 2009)

Para a avaliação da qualidade de solo e análise de seu nível de degradação, são utilizados os atributos biológicos do solo, que atuam como bioindicadores desses corpos naturais, devido à sensibilidade em responder a alterações ambientais, podendo-se citar, como exemplo, análise da fauna edáfica, avaliação do desenvolvimento das plantas e raízes, e as análises de biomassa, atividade e diversidade dos microrganismos (MENDES *et al.*, 2009).

Atributos como o carbono da biomassa microbiana ou biomassa microbiana (C-BMS), a respiração basal do solo (RBS), o quociente metabólico (qCO_2), o quociente microbiano ($qMIC$), unidade formadora de colônia (UFC) e atividade enzimática são amplamente utilizados como bioindicadores (CARDOSO *et al.*, 2009; PORTÔ *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2012; VASCONCELOS, 2015; PINTO, 2019).

O C-BMS é o componente vivo da matéria orgânica e abrange as bactérias, os fungos, as actinobactérias, as algas e a microfauna, sendo a seção principal do ciclo do carbono (DIONÍSIO; PIMENTEL; SIGNOR, 2016). Este atributo é fortemente influenciado pelo manejo do solo, tendo em vista que a variabilidade no meio pode influenciar a densidade, a diversidade e a atividade microbiana (DIONÍSIO; PIMENTEL; SIGNOR, 2016).

A RBS caracteriza-se como todas as atividades metabólicas nas quais CO_2 é produzido, sendo que as bactérias e os fungos são os principais responsáveis pela liberação de CO_2 , principalmente por conta da degradação da matéria orgânica realizada por esses microrganismos (SILVA; AZEVEDO; DE-POLLI, 2007). Esse indicador está estreitamente relacionado com as condições abióticas do solo e, a partir da razão dele com o C-BMS, é possível a determinação do qCO_2 , um indicador da eficiência da utilização do substrato pela comunidade de microrganismos edáficos, com grande sensibilidade a perturbações sobre o C-BMS (SILVA; AZEVEDO; DE-POLLI, 2007).

O $qMIC$ está relacionado diretamente com a qualidade da matéria orgânica do solo, definido como a relação entre C-BMS e Carbono Orgânico Total (COT) (REIS JUNIOR; MENDES, 2007). Já a UFC é o dado que permite avaliar a densidade populacional microbiana do solo, além de identificar grupos de microrganismos edáficos específicos e avaliar a interação entre eles (LIMA *et al.*, 2014).

A UFC caracteriza-se como uma técnica simples e direta, porém de grande utilidade quando o número de amostras é alto e são necessários resultados em um curto período de tempo (VIEIRA; NAHAS, 2000). Além disso, essa técnica ainda é bastante utilizada, como, por exemplo, no trabalho de Leal *et al.* (2021), em que os autores analisaram o efeito dos sistemas de manejo e do uso do solo na população de microrganismos do solo, utilizando, como uma das metodologias, a UFC.

Outra técnica muito utilizada, que apesar de também ser simples, pode auxiliar em estudos de qualidade de solo, é a Coloração de Gram. Demichelli (2016), por exemplo, demonstrou que em meios contendo glifosato, bactérias Gram-negativas

são predominantes. Já Shultz (2010), demonstrou que em um solo contaminado com hidrocarbonetos, todas as bactérias isoladas em seu estudo, que totalizavam oito, eram Gram-negativas. Estudos como esses podem indicar que em solos contaminados, há o predomínio de Gram-negativas, e isso pode ser por conta da presença da dupla bicamada lipídica que estes organismos têm (PADILHA *et al.*, 2017).

Ainda, Mendes (2016) destaca que o solo possui memória relacionada ao seu manejo. A autora demonstra, através de um estudo de longa duração, que a atividade enzimática é uma das vias de formação da memória do solo, podendo atuar como impressões digitais que nos fornecem informações dos sistemas de manejo que os solos foram submetidos. A atividade enzimática é considerada hoje um dos melhores bioindicadores.

Portanto, a utilização dos bioindicadores de qualidade do solo, são essenciais na avaliação da sustentabilidade em sistemas de produção, expondo a real situação da área de cultivo e direcionando às práticas que devem ou não ser adotadas.

2.5 BIOLOGIA MOLECULAR EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE

Nos últimos anos, com o advento da biologia molecular e com o avanço da genética molecular, os métodos para a caracterização de indivíduos e populações progrediram (BUENO-SILVA, 2012). A caracterização se faz extremamente importante na identificação de organismos e pode ser realizada com bases nas características fenotípicas, que podem ser alteradas conforme o meio onde o indivíduo está inserido, ou genotípicas, que não se alteram com relação ao ambiente onde o organismo se encontra (HUNGRIA; SILVA, 2011).

Na caracterização genotípica/molecular, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma tecnologia indispensável na maioria dos estudos (REIS JÚNIOR *et al.*, 2002). Essa técnica é uma reação enzimática *in vitro* que se baseia na amplificação exponencial de uma região específica do DNA (ácido dioxirribonucleico) ou *cDNA* (DNA complementar), gerando uma quantidade significativa desta para posteriores análises (FONSECA JÚNIOR, 2014; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Na maioria das vezes, em estudos taxonômicos e filogenéticos, utilizam-se marcadores moleculares para regiões conservadas e que possibilitam a identificação

dos organismos analisados (SHERER, 2016). O gene 16S rRNA (RNA ribossomal) é frequentemente utilizado nessas pesquisas, tendo em vista que se caracteriza como uma frequência altamente conservada e que permite classificar bactérias ao nível de gênero e até espécie (HUNGRIA; SILVA, 2011; SHERER, 2016). Variações da PCR como a BOX-PCR, REP-PCR e ERIC-PCR, utilizam *primers* que se ligam a regiões repetitivas e conservadas do genoma de bactérias, possibilitando também a diferenciação de isolados (REIS JÚNIOR *et al.*, 2002).

A Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) é bastante utilizada em estudos de caracterização gênica. Esta técnica consiste na amplificação da região do gene 16S rRNA e posterior digestão com enzimas de restrição, revelando polimorfismos, tanto nos fragmentos estudados, quanto no nível de conservação dos sítios reconhecidos (NAVROSKI, 2015). Outra técnica também utilizada é a análise da região ITS nas bactérias (*Intergenic Transcribe Space*), localizada entre os genes 16S-23S, que apresenta alto grau de variabilidade e também pode ser utilizada na identificação de polimorfismos, tanto no tamanho, quanto na sequência de bases (MUNHOZ, 2009).

Apesar da caracterização genotípica/molecular ser fundamental, esta não exclui a importância da caracterização fenotípica. Sendo assim, a associação dos dois tipos de caracterização torna os resultados obtidos mais ricos, possibilitando que as soluções biotecnológicas encontradas para problemas da atualidade sejam mais precisas e acuradas (KOCK, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 A COLEÇÃO DE CULTURA

A coleta das rizobactérias foi realizada, durante o trabalho de Simoni (2017), a partir de solos (profundidade aproximada de 10 cm a 15 cm) de cinco áreas sob distintos manejo de cultivo da *Nicotiana tabacum* L. (M1, M2, M3, M4 e M5) (TABELA 1) do município de Itaipulândia, Paraná, Brasil, seguindo os padrões apresentados por Cardoso, Fernandes e Fernandes (2009) e Arruda, Pereira e Moreira (2014).

Para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), 10 g de solo de cada amostra foram pesados e dispostos em Erlenmeyers juntamente com 90 mL de solução salina esterilizada a 0,85%. As amostras foram submetidas à agitação com pérolas de vidro a 200 r.p.m por 20 minutos e foram posteriormente decantadas por 30 minutos. Após, realizou-se uma diluição seriada até as concentrações de trabalho 10^{-3} e 10^{-4} e as diferentes concentrações de cada amostra foram inoculadas em quadruplicata em meio DIGS (item 3.3) pelo método *spread plate*. Então, foram obtidas 278 colônias, tendo como critério de escolha, as características da colônia e do manejo.

A caracterização morfológica das colônias foi realizada de acordo com Hofling e Gonçalves (2011) e os agrupamentos foram estabelecidos a partir do programa *BioNumerics* (*Applied Mathematics*, Versão 7.6), aplicando o método de Ward, com valores de atributos e utilizando o coeficiente cofenético para validação dos agrupamentos. Deste estudo prévio foram obtidos 22 agrupamentos distintos e foram selecionadas 40 estirpes representantes para compor a coleção para futuros estudos de bioprospecção. Os isolados foram armazenados na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, utilizado pelo FIXTEC, na Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ÁREAS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotiana tabacum* L.

Tratamento	Tempo de cultivo (anos)	Tamanho da área (hectare)	Média de produção (mil/pés/ano)	Técnicas de manejo utilizadas	Agrotóxicos utilizados
M1	3	30	120	1) Rotação com soja e milho; 2) Descanso de dois anos para retorno do fumo na mesma área; 3) Sem adubação orgânica.	Inseticida
M2	6	30	50	1) Rotação com soja, milho e aveia; 2) Descanso de três anos para retorno do fumo na mesma área; 3) Adubação orgânica anual.	Inseticida
M3	10	60	50	1) Rotação com soja; 2) Sem descanso; 3) Sem adubação orgânica.	Fungicida, Herbicida e Inseticida
M4	12	16	100	1) Rotação com soja; 2) Sem descanso; 3) Adubação orgânica anual.	Inseticida
M5	40	8	110	1) Rotação com soja; 2) Sem descanso, mas com cobertura verde na entressafra; 3) Adubação orgânica anual.	Fungicida e Herbicida

FONTE: Adaptado de SIMONI (2017).

3.2 ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO METABOLISMO DO SOLO

O valor do Carbono da Biomassa Microbiana (C-BMS) foi obtido pelo processo de fumigação-extração conforme proposto por Vance *et al.* (1987) e Tate *et al.* (1988), apresentado por Silva, Azevedo e De-Polli (2007). A respiração basal do solo (RBS), foi estabelecida pelo método proposto por Jenkinson e Powlson (1976), apresentado por Silva, Azevedo e De-Polli (2007). O quociente de carbono orgânico (qCO_2) foi determinado pela razão entre a RBS e o C-BMS: $qCO_2 = RBS / (C-BMS \times 10^{-3})$. Já o quociente microbiano ($qMIC$) foi estabelecido pela razão entre C-BMS e carbono orgânico total (COT), estabelecido pelo método de Walkley-Black (1934), apresentado por EMBRAPA (1997) e baseado na oxidação da matéria orgânica com dicromato de potássio em meio sulfúrico. Estes protocolos foram realizados durante as atividades de Simoni (2017), entretanto as análises das médias destes dados só foram realizadas neste trabalho, com a retomada da prospecção desta coleção.

3.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para a avaliação da viabilidade e obtenção de colônias puras para a realização da caracterização morfológica e coloração de Gram, as estirpes foram inoculadas em meio DIGS sólido (2 g/L glicose; 2 g/L ácido málico; 1,5 g/L peptona bacteriológica; 2 g/L extrato de levedura; 0,5 g/L fosfato de potássio bibásico; 0,5 g/L sulfato de magnésio heptahidratado; 1,5 g/L ácido glutâmico; 17 g/L ágar, pH=6,5) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Após, os microrganismos foram incubados por 72 horas, em estufa incubadora BOD à 27°C.

Para realizar a extração de DNA, as colônias puras, anteriormente inoculadas em meio sólido DIGS, foram inoculadas em meio DIGS líquido por 72 horas, em câmara incubadora com agitação orbital (*Shaker*) à 27°C e à agitação de 125 rotações por minuto (r.p.m.).

Considerando a viabilidade, das 40 estirpes armazenadas, 21 foram selecionadas como representantes por este trabalho para serem reavaliadas pela tipagem morfológica e submetidas à coloração de Gram e ao estudo de diversidade genética.

3.4 COLORAÇÃO DE GRAM

As bactérias foram crescidas em meio de cultura DIGS sólido, nas condições descritas no item 3.3. Para estabelecer as classes bacterianas da coleção, os isolados foram submetidos à Técnica de Coloração Gram, segundo à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (2018).

3.5 TIPAGEM MORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS

As bactérias foram crescidas em meio de cultura DIGS sólido, nas condições descritas no item 3.3. Para a caracterização morfológica das colônias bacterianas utilizou-se o protocolo estabelecido por Hofling e Gonçalves (2011), sendo considerados os seguintes aspectos: tamanho (menor que um milímetro; entre um e dois milímetros; maior que dois milímetros), coloração (homogênea; heterogênea), cor (branco; creme; alaranjado; amarelo), forma (puntiforme; circular; filamentos; irregular; rizoide; fuso), borda (lisa; ondulada; lobada; dentado; filamentosa; anelada) e elevação (chata; levantada; convexa; pulvinada; protuberante).

3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.6.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados e incubados em 5 mL de meio DIGS líquido, nas condições descritas no item 3.3. Posteriormente, foram submetidos à extração de DNA total, seguindo o protocolo de Minas *et al.* (2011) modificado.

Sendo assim, 2000 µL de cada suspensão foram coletados e centrifugados à 5000 r.p.m, por 10 minutos à 4° C. Após, o sobrenadante foi descartado e os tubos secos com papel toalha. Repetiu-se novamente a centrifugação e o descarte do sobrenadante nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, foram adicionados 1000 µL de tampão de lise (40 mL/L CTAB 5%; 20 mL/L Tris-HCl 1M; 4 mL/L EDTA 0,5M; 28 mL/L NaCl 5M) e as amostras foram homogeneizadas em agitador vortex e incubadas em banho-maria por 60 minutos à 65°C. Logo após, adicionou-se 1000 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 8000 r.p.m, por 15 minutos à 4°C. Com a formação de duas fases, o

sobrenadante foi retirado e pipetado em um novo microtubo e o restante foi descartado. Mais uma vez, adicionou-se 1000 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 8000 r.p.m, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente retirado e pipetado em um novo microtubo e o restante foi descartado. Então, foram adicionados 1000 μ L de isopropanol:acetato de amônio (7,5M) (9:1) gelado e as amostras foram mantidas em freezer.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000 r.p.m, por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado. Após, o *pellet* foi lavado com álcool 70% gelado e a amostra foi centrifugada a 12000 r.p.m, por 15 minutos à 4°C. Repetiu-se a lavagem com álcool 70%, sendo a última centrifugação a 12000 r.p.m, por 10 minutos à 4°C. O precipitado foi ressuscitado em 50 μ L de tampão TE (10 mL/L Tris-HCl 1M e 2 mL/L EDTA 0,5M; pH = 8) e as amostras foram armazenadas em freezer. A quantificação do DNA extraído foi realizada através de espectrofotometria utilizando o aparelho *NanoDrop® 2000 Thermo Scientific*.

3.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase do Gene do RNA Ribossomal 16S

Para a reação de amplificação (PCR - Reação em Cadeia da Polimerase) do gene do RNA ribossomal 16s foram utilizados os *primers* fD1 (5'-CCGAATTCGTGCGACAACA-3') e rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAA-3') (WEISSBURG *et al.*, 1991).

O mix foi composto por: 0,15 mM de cada dNTP, 0,8 pmol do *primer* fD1; 0,8 pmol do *primer* rD1, 1x Tampão *EasyTaq®*, 5 U de *EasyTaq®* DNA Polimerase e 50 ng do DNA extraído. O volume foi completado com água ultra pura para uma reação de 50 μ L.

A PCR consistiu em uma desnaturação inicial de dois minutos a 95°C; 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por quinze segundos e 93°C por 45 segundos, anelamento a 42°C por quarenta e cinco segundos e extensão a 72°C por dois minutos; e um ciclo final de extensão por 10 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese, a uma voltagem de 70 Volts (V), corrente de 100 amperes (mA) e força de 93 Watts (W) por duas horas, em um gel de agarose 1,5% diluído em tampão TBE 1x (TBE 10x = 108g/L Tris; 55g/L ácido bórico; 9,3g/L EDTA; pH = 8). Nos poços, aplicou-se 10 μ L da mistura de 10 μ L do produto da PCR com 2 μ L do tampão de amostra 10x (Invitrogen by *Thermo Fisher*

Scientific). Nos poços das extremidades aplicou-se 10 µL da mistura de 2 µL do padrão de peso molecular de 1Kb (*Boca Scientific*), com 8 µL de água ultra pura e 2 µL do tampão de amostra 10x (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*). Após, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados utilizando o fotodocumentador com transluminador L-PIX EX (Loccus).

3.6.3 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ADRA-PCR)

Os produtos de amplificação, por PCR, do gene rRNA 16S foram clivados, separadamente, pelas endonucleases *BsuRI* (GG[^]CC) e *Mbol* ([^]GATC) através da técnica de ARDRA-PCR para o estudo de agrupamento genético. Todas as enzimas pertenciam à marca *Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*.

O mix constituiu-se de 6 µL de água ultra pura, 2 µL de tampão de clivagem (vermelho Anza 10x), 10 µL do produto da PCR e 1 µL da enzima. Após, as amostras foram incubadas em banho-maria por 15 minutos à 37°C.

Os fragmentos foram submetidos à eletroforese, a uma voltagem de 70 Volts (V), corrente de 100 amperes (mA) e força de 93 Watts (W) por duas horas, em um gel de agarose 1,5% diluído em tampão TBE 1x (TBE 10x = 108g/L Tris; 55g/L ácido bórico; 9,3g/L EDTA; pH = 8). Nos poços, aplicou-se 10 µL da mistura de 10 µL do produto da PCR com 2 µL do tampão de amostra 10x (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*). Nos poços das extremidades aplicou-se 10 µL da mistura de 2 µL do padrão de peso molecular de 1Kb (*Boca Scientific*), com 8 µL de água ultra pura e 2 µL do tampão de amostra 10x (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*).

Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados utilizando o fotodocumentador com transluminador L-PIX EX (Loccus). A análise de agrupamento foi realizada no programa *BioNumerics* (*Applied Mathematics*, Versão 7.6), aplicando o método de Ward, com similaridade de cosseno e utilizando o coeficiente cofenético para validação dos agrupamentos.

3.6.4 Reação em Cadeia das Polimerase da região ITS

Para a reação de amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) foram utilizados os *primers* L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') e G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') (CLEMENTINO *et al.*, 2001).

O mix foi composto por: 0,15 mM de cada dNTP, 0,8 pmol do *primer* L1; 0,8 pmol do *primer* G1, 1x Tampão *EasyTaq*®, 5 U de *EasyTaq*® DNA Polimerase e 50 ng do DNA extraído. O volume foi completado com água ultra pura para uma reação de 50 µL.

A PCR consistiu em uma desnaturação inicial de dois minutos a 94°C; 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento a 50°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto; e um ciclo final de extensão por 10 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese, a uma voltagem de 70 Volts (V), corrente de 100 amperes (mA) e força de 93 Watts (W) por duas horas, em um gel de agarose 1,5% diluído em tampão TBE 1x (TBE 10x = 108g/L Tris; 55g/L ácido bórico; 9,3g/L EDTA; pH = 8). Nos poços, aplicou-se 10 µL da mistura de 10 µL do produto da PCR com 2 µL do tampão de amostra 10x (Invitrogen by *Thermo Fisher Scientific*). Nos poços das extremidades aplicou-se 10 µL da mistura de 2 µL do padrão de peso molecular de 1Kb (*Boca Scientific*), com 8 µL de água ultra pura e 2 µL do tampão de amostra 10x (Invitrogen by *Thermo Fisher Scientific*).

Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados utilizando o fotodocumentador com transluminador L-PIX EX (Loccus). A análise de agrupamento foi realizada no programa *BioNumerics* (*Applied Mathematics*, Versão 7.6), aplicando o método de Ward, com similaridade de cosseno e utilizando o coeficiente cofenético para validação dos agrupamentos.

3.7. ANÁLISES CONJUNTAS

As análises de agrupamentos pelo método hierárquico a partir da região intergênica (ITS), da ARDRA da região do rRNA 16S, considerando as enzimas de restrição, a *BsuRI* e a *Mbol*, e da tipagem morfológica, realizadas, separadamente e por análise polifásica, no programa *BioNumerics* (*Applied Mathematics*, Versão 7.6), aplicando o método de Ward, com valores de atributos e utilizando o coeficiente cofenético para validação dos agrupamentos.

Os atributos metabólicos do solo (C-BMS, RB, qCO₂, qMIC e UFC) foram avaliados pela obtenção das médias a partir de três repetições realizadas para cada atributo e por amostra composta advinda do solo de cada área produtora escolhida.

3.8. ÍNDICES DE DIVERSIDADE

A partir dos dados de tipagem morfológica das 278 colônias caracterizadas por Simoni (2017), foram estimados a taxa S e os índices de *Shannon-Weaver* e de Dominância pelo *software PAST 3*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de diversidade pelos métodos de agrupamento, objetivam decompor um grupo original de observações em diversos subgrupos, assegurando que a homogeneidade dentro dos subgrupos e a heterogeneidade entre os subgrupos sejam alcançadas (BERTAN *et al.*, 2006). O presente trabalho submeteu 21 isolados a estudos de agrupamentos por métodos hierárquicos, a partir da 1) região intergênica (ITS) 16S-23S do rRNA; 2) ARDRA da região do rRNA 16S, utilizando as enzimas de restrição *BsuRI* e *Mbol*; e 3) tipagem morfológica, sendo avaliados separadamente e por análise polifásica.

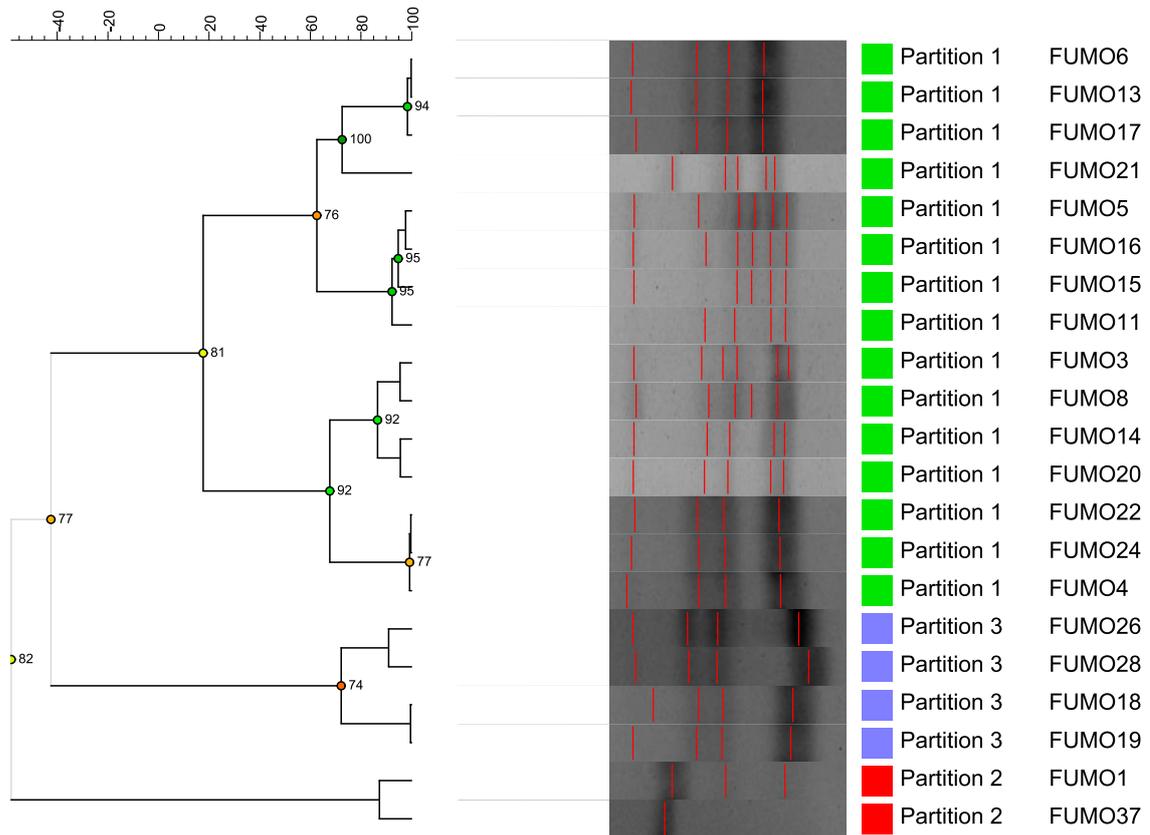
Dentre as ferramentas estatísticas para estudos de agrupamentos, as técnicas hierárquicas são as mais comumente utilizadas (RODRIGUES, 2009). É possível dividir as técnicas hierárquicas em dois grandes grupos: técnicas aglomerativas, em que cada objeto corresponde a um grupo, e, de acordo com a similaridade, os grupos vão sendo unidos, originando novos grupos, até que todos os objetos façam parte de um grande grupo, ou técnicas divisivas, onde um grande grupo vai sendo dividido até que cada subgrupo seja formado por apenas um objeto (LEAL, 2004). As técnicas hierárquicas aglomerativas são as mais utilizadas e as classificações hierárquicas resultantes podem ser representadas por um dendrograma, um modelo de diagrama bidimensional em forma de árvore (LEAL, 2004; HAIR *et al.*, 2009; RODRIGUES, 2009).

Um fator de extrema importância nos estudos de agrupamentos, é a definição de uma medida de distância ou semelhança, que irá atuar como determinante no esquema de aglomeração, definindo o quanto as observações são mais ou menos similares (FÁVERO; BELFIORE, 2015). Existem diversas medidas de similaridade, entretanto as mais utilizadas são: o coeficiente de correlação de *Pearson* e a medida de distância euclidiana (VALENTIN, 1995; SMOLSKI, 2019).

Avaliando, unicamente, o dendrograma estabelecido a partir da região intergênica (ITS) 16S-23S do rRNA (FIGURA 3), é possível observar, pelas partições, a formação de três agrupamentos, o maior deles contendo 15 isolados, seguidos de um com quatro e de outro com dois representantes, respectivamente representados na Figura 3 pelas cores verde, azul e vermelho. No entanto, considerando um coeficiente de similaridade acima de 80%, se observa na Figura 4, a formação de seis subgrupos, uma amostra individualizada (isolado 21), apresentando um perfil

morfológico único, e um grupo com os isolados um e trinta e sete, agrupados devido à baixa qualidade dos perfis polimórficos.

FIGURA 3 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA REGIÃO INTERGÊNCIA (ITS) 16S-23S DO rRNA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotina tabacum* L.



FONTE: O autor (2021).

De acordo com Valentin (2000), é possível avaliar o quanto um dendrograma é divergente da realidade através do coeficiente de correlação cofenético, validando assim o método de agrupamento. Ainda de acordo com os autores, o coeficiente varia entre 0 e 1, e de acordo com Crispim, Fernandes e Albuquerque (2019), um valor igual ou maior 0,7 é considerado na literatura como um bom ajuste do método de agrupamento escolhido. Porém, em estudos com microrganismos, como é o caso da rizobactérias de ambiente agrícola, é necessário ajustar os parâmetros da distância euclidiana, a fim de obter maior número de subgrupos que possam revelar, ao nível de genes, a biodiversidade ali presente, e como quanto maior o valor do coeficiente cofenético, menor é a distorção do dendrograma, neste trabalho considerou-se que o

valor de coeficiente cofenético que demonstrasse o bom ajuste do método de agrupamento fosse igual ou maior que 0,8 (MOREIRA *et al.*, 2016).

Em estudo de diversidade e filogenia microbiana, o uso de agrupamentos por regiões intergênicas tem se mostrado eficiente durante os programas de caracterização e seleção de microrganismos. Silva *et al.* (2017), mostraram que por meio da análise da região ITS, foi possível comprovar a diversidade genética existente entre bactérias isoladas do sorgo e que estas foram classificadas em oito grupos, com semelhança de 60%. Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) provaram, através da análise por agrupamento da região ITS, a alta variabilidade genética existente entre espécies de rizóbios nativas de tabuleiros costeiros.

Vinticino, Batista e Lacerda (2018) avaliaram a diversidade de cepas de leveduras encontradas em frutas orgânicas com potencial para fermentação cervejeira através da análise da ITS, e constataram o crescimento dos gêneros *Hanseniaspora* e *Pichi* em morangos orgânicos. Além disso, os autores relataram que os gêneros encontrados apresentam o potencial biotecnológico alvo do estudo. Ainda, Costa (2021) estudou isolados fúngicos coletados em áreas suscetíveis à desertificação, no Ceará, com o intuito de selecionar fungos com potencial para atuarem como inoculantes na recuperação do solo dessas áreas degradadas. A autora destacou que através do sequenciamento da região ITS, foram identificados 22 fungos em seis gêneros, sendo os gêneros mais abundantes *Aspergillus* e *Penicillium*. Além disso, os indivíduos do gênero *Aspergillus* foram os que se apresentaram mais promissores na aplicação-alvo estudada.

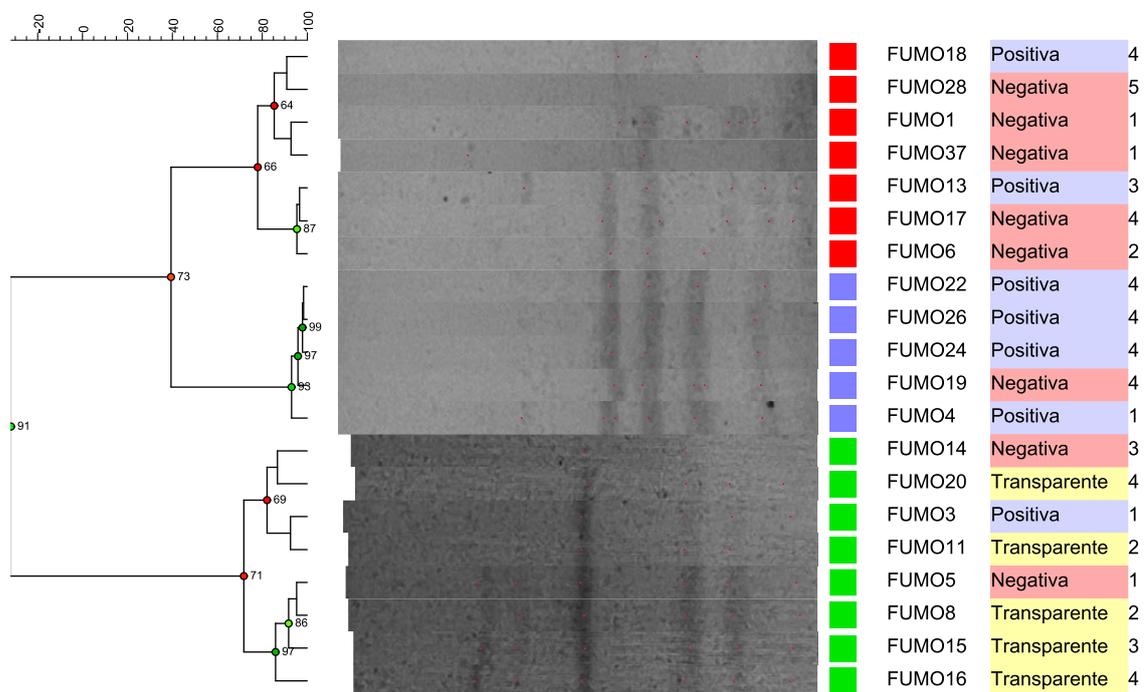
No presente trabalho, três agrupamentos foram obtidos utilizando técnica de ARDRA-PCR a partir da enzima *BsuRI*: um com oito isolados agrupados a 71% pelo coeficiente de correlação cofenético, seguido por um grupo com cinco isolados numa rama de 99% (FIGURA 4).

A biologia agrícola tende a apresentar menor diversidade quando sua biota é comparada com as de solos sob sistemas nativos (NAVROSKI *et al.*, 2015; HASS *et al.*, 2019). Nestas comunidades, prevalecem, ao longo do tempo, os chamados indivíduos resilientes. Resiliência, na biologia do solo, é a palavra utilizada para descrever a habilidade que comunidades de organismos possuem de retornarem ao seu estado original, tanto do ponto de vista taxonômico, quanto do funcional, após um impacto ambiental (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Estes habitantes da rizosfera vão assumindo os serviços ecossistêmicos na tentativa de manter o equilíbrio metabólico

do solo e para isso, as bactérias alçam, quando necessário, de processos como a transferência horizontal de genes, uma especialidade promovida pela presença dos plasmídeos (MOREIRA *et al.*, 2013; PINTO, 2019; SILVA, 2021).

O terceiro grupo obtido pelo agrupamento com a enzima *BsuRI* é composto por sete estirpes agrupadas a 66% com poucos ou fracos perfis de bandas observados na Figura 4 pela imagem da corrida de eletroforese.

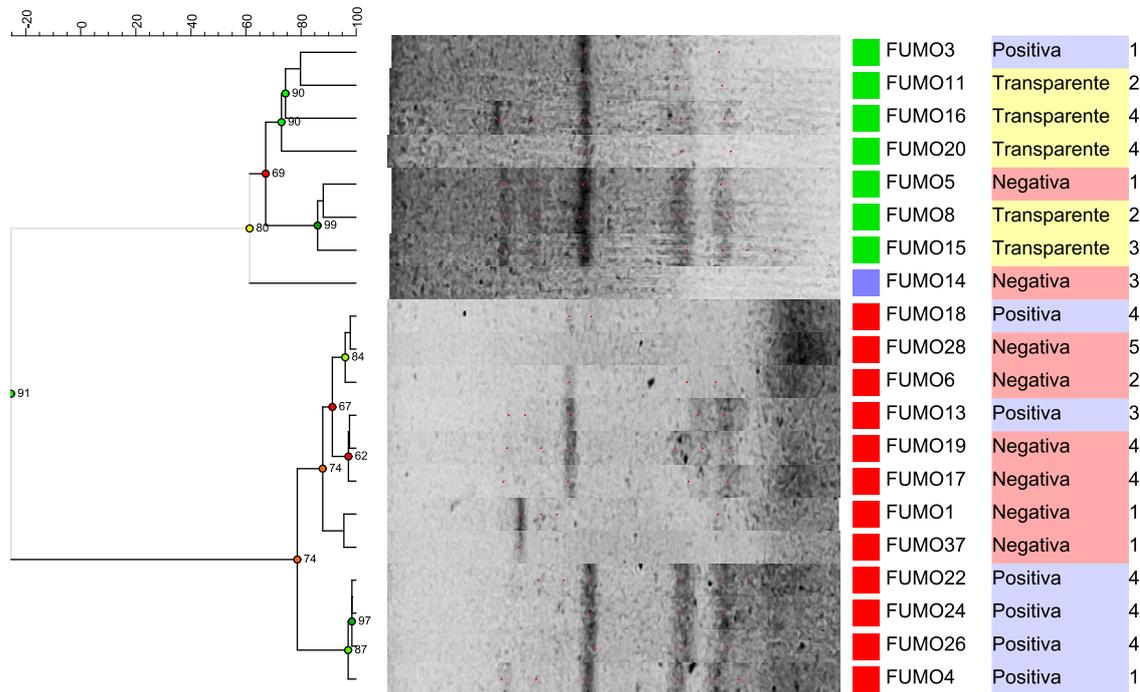
FIGURA 4 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA ARDRA-PCR DA REGIÃO 16S DO rRNA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotina tabacum* L. CONSIDERANDO *BsuRI* COMO ENZIMA DE RESTRIÇÃO



FONTE: O autor (2021).

Com a enzima *Mbol*, foi possível gerar dois grupos, um composto por sete isolados e outro com 14 isolados agrupados pela partição a 74% (FIGURA 5). Ambas as enzimas reconhecem sítios de restrição de ordem comum, composto por quatro bases. Portanto, a probabilidade de se conseguir gerar pelo menos de quatro a oito perfis polimórficos pela técnica de eletroforese sob um genoma total de bactérias é comumente alcançada (BROWN, 2002; REIS JUNIOR *et al.*, 2002; REIS JUNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2004).

FIGURA 5 – DENDROGRAMA CRIADO A PARTIR DA ARDRA-PCR DA REGIÃO 16S DO rRNA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotina tabacum* L. CONSIDERANDO *Mbo*I COMO ENZIMA DE RESTRIÇÃO



FONTE: O autor (2021).

Enzimas de restrição, também conhecidas como endonucleases de restrição, são enzimas que clivam o DNA em sítios de restrição específicos, previamente conhecidos (MOREIRA, 2014). Existem três tipos de endonucleases de restrição: I, II e III (BROWN, 2002). Não há controle exato sobre os locais de corte das endonucleases do tipo I e III, o que resulta em fragmentos sem precisão, porém, as endonucleases do tipo II não possuem essa desvantagem, clivando sempre no mesmo local, ou muito próximo dele (BROWN, 2002).

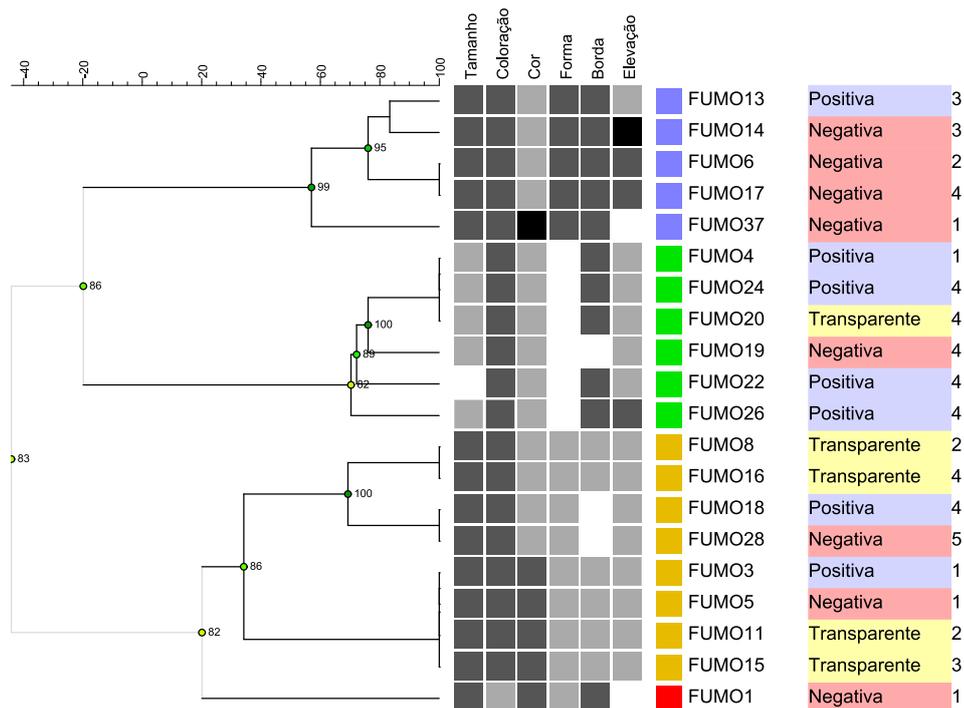
Posto isto, a baixa qualidade do produto da digestão neste trabalho pode ser advinda de diversos fatores, como: a qualidade da água ultra pura utilizada, contaminantes advindos da extração do DNA, digestão incompleta devido à metilação do DNA e proximidade do local de reconhecimento com o final do fragmento de DNA (TFS, 2021).

Ainda assim, segundo Reis Junior *et al.* (2002) e Reis Junior, Teixeira e Reis (2004), a técnica de ARDRA-PCR é muito utilizada em estudos de biodiversidade e filogenia. Khosravi e Dolatabad (2020), por exemplo, realizaram, por meio da ARDRA, utilizando a enzima *Hpa*II, a identificação e caracterização molecular de *Azotobacter*

chrococccum e *Azhotobacter salinestrís*, espécies sem diferenças morfológicas e fisiológicas significativas. Ainda, Beev *et al.* (2021), conseguiram identificar espécies de *Lactobacillus* presentes no leite de Búfala, por meio da ARDRA utilizando *EcoRI* e *HaeIII*, sendo que a espécie dominando foi *Lactobacillus casei*.

O dendrograma obtido a partir da tipagem morfológica, realizado utilizando o método de Ward, com valores de atributos e o coeficiente cofenético para validação (FIGURA 6), conseguiu apresentar três grupos organismos por altos valores cofenéticos. No primeiro grupo se identifica cinco isolados agrupados a 99%, o segundo grupo é composto por 6 isolados a 62%, mas com uma boa tendência de agrupamento, representado pela cor verde. O terceiro agrupamento é representando por oito bactérias a 86% de similaridade.

FIGURA 6 – DENDOGRAMA CRIADO A PARTIR DA CARACTERIZAÇÃO MOROFLÓGICA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotina tabacum* L.



FONTE: O autor (2021).

Segundo Moreira (2009) e Ceretta e Aita (2008), é comum encontrar maior diversidade morfológica entre bactérias de ambientes abertos, como o solo, porque elas são ecologicamente bastante versáteis no aproveitamento e transformação de nutrientes. Portanto, em cultivos *in vitro*, estas podem responder às diferenças dos compostos expressando distintas características morfológicas. Porém, ainda sim

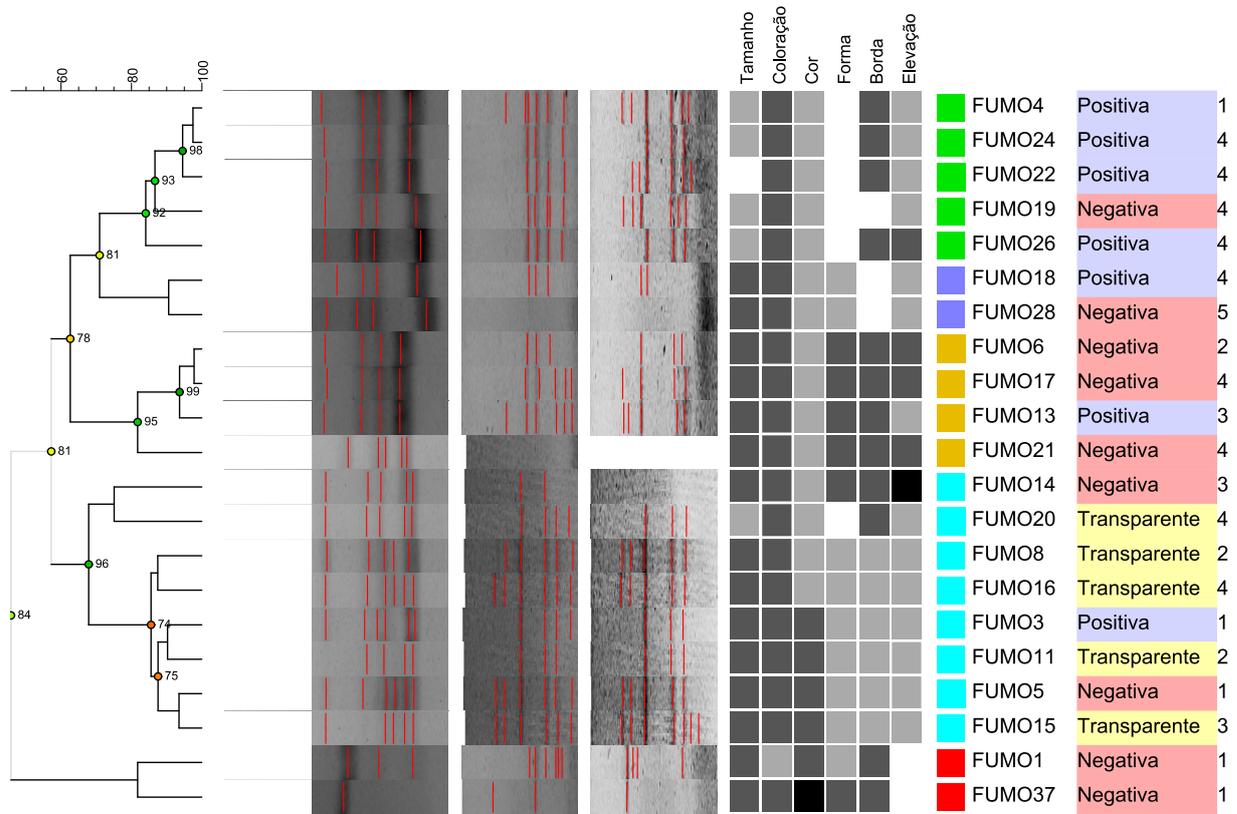
segundo Kock (2014), a tipagem morfológica ainda se caracteriza como um método importante para a avaliação de diversidade e seleção de microrganismos.

Na tentativa de buscar estirpes que possam ser representativas da coleção e dos agrupamentos até então obtidos para dar continuidade aos estudos de prospecção, o presente trabalho, realizou uma análise polifásica considerando os agrupamentos morfológicos e genéticos. Análise polifásica é a combinação de diferentes metodologias de identificação, como a morfológica, bioquímica, fisiológica e molecular, sendo amplamente utilizada na identificação de microrganismos, principalmente entre espécies estritamente relacionadas (MACIEL, 2013).

O dendrograma da Figura 7, considerando a distância euclidiana a 80%, revela três grupos: o primeiro agrupado a 92% composto por cinco isolados e, agrupado a este a 81% se soma mais duas estirpes, representados na partição pela cor azul; o segundo grupo contém três bactérias agrupadas a 99%; e o terceiro grupo contém seis isolados juntos a 74% e associado a este, as bactérias 5 e 15 se incluem com 96% de similaridade. Pelo critério de 80% as bactérias 14, 20 e 21 foram consideradas indivíduos.

Pela Figura 7, o número de agrupamentos se manteve e as amostras individualizadas não permaneceram as mesmas, mesmo considerando o agrupamento das diferentes regiões genômicas e os caracteres morfológicos ao mesmo tempo para estabelecer as ramas e a distância euclidiana. O que se percebe é uma repetição no número dos agrupamentos e do perfil das ramas dentro dos subgrupos. No entanto, este padrão ainda não se estabelece a partir das estirpes, o que pode levar a seguinte consideração: em solos sob cultivo intensivo de agrotóxicos, a pressão seletiva já acontece nos primeiros anos de exploração (BELCHIOR *et al.*, 2014; RIBEIRO, 2019).

FIGURA 7 – DENDOGRAMA DA ANÁLISE POLIFÁSICA DE RIZOBACTÉRIAS COLETADAS EM SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotina tabacum* L.



FONTE: O autor (2021).

Os agrupamentos mostram que os manejos ainda não estão selecionando as bactérias pelo tempo de exploração. Esta possibilidade se apresenta não só pela tipagem morfológica e genética, mas também pelos resultados do teste de Gram. Dos 21 isolados representantes da coleção dos solos sob cultivo de tabaco, sete foram classificados como sendo Gram-positivas, nove como Gram-negativas e cinco apresentaram-se transparentes, distribuídos entre os diferentes grupos nas distintas análises, inclusive na polifásica.

Porém, ao se considerar os índices de *Shannon-Weaver* gerados a partir dos grupos formados considerando-se a diversidade morfológica das 278 estirpes, é possível observar que os manejos M1, M2 e M3, foram os que apresentaram os maiores índices de diversidade, e estes também são aqueles de menor tempo de exploração sendo, respectivamente, de 3, 6 e 10 anos sob cultivo do tabaco (TABELA 2). Os manejos M4 e M5, sob 12 e 40 anos, foram os que apresentaram os menores valores para este índice.

Ressalta-se que o índice de diversidade de *Shannon-Weaver*, considera espécies raras e abundantes da mesma forma, além de pressupor que todas as espécies estão representadas e que estas estão distribuídas aleatoriamente na população (SEMENSATTO JÚNIOR, 2003). Além disso, o índice oferece uma aproximação do nível de incerteza na previsão de a qual espécie o indivíduo retirado aleatoriamente da população pertenceria, levando em consideração riqueza e uniformidade (SCOLFORO *et al.*, 2008). Quanto maior o índice de *Shannon-Weaver*, maior é a diversidade encontrada no ambiente (SCOLFORO *et al.*, 2008).

TABELA 2 – ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ANÁLISES CONJUNTAS DOS ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DOS SOLOS SOB CULTIVO DE *Nicotiana tabacum* L.

Tratamento	Taxa S	Dominância	Índice de Shannon-Weaver	C-BMS	RBS	qCO ₂	qMIC (%)	UFC (10 ⁻³)
M1	18	0,1352	2,446	99,19	0,13	0,0013	7,922524	12000
M2	15	0,176	2,188	178,85	0,16	0,0008	12,22488	93000
M3	13	0,180	2,100	66,53	0,26	0,0039	5,032526	23000
M4	8	0,1828	1,849	227,77	0,06	0,0002	17,69775	39000
M5	9	0,1734	1,937	269,34	0,15	0,0005	23,7304	13000

FONTE: O autor (2021).

Semensatto Júnior (2003) afirma que os índices de diversidade são ferramentas importantes em pesquisas que abrangem caracterização ambiental e monitoramento de ambientes, tendo em vista que expressam, por meio de valores numéricos, a complexidade do ambiente e até o nível de estresse em que ele se encontra. O autor ainda coloca que muitas vezes o valor dos índices de diversidade são reflexos da qualidade do ambiente.

Carneiro *et al.* (2012), comprovaram em sua pesquisa que o índice de *Shannon-Weaver* caracteriza-se como sensível na indicação de alterações na diversidade de fungos micorrízicos arbusculares de áreas degradadas. Outro trabalho como o de Silva, Everton e Melo (2016), utilizou, entre outros, o índice de *Shannon-Weaver* na avaliação da qualidade da água do Rio Oricuri, no Pará, e através dele foi

possível constatar que o rio apresenta indícios de impacto ambiental por ações antrópicas.

Além dos trabalhos citados, Santos e Barros (2021) realizaram um levantamento entomológico de uma área de Caatinga para avaliar a qualidade ambiental do fragmento. Os autores, por meio do índice de *Shannon-Weaver*, que foi baixo, concluíram que a área se encontra em um alto grau de degradação.

Sendo assim, pelo presente trabalho, é possível apontar que o tempo de exploração do solo com o cultivo do tabaco reduz a diversidade em aproximadamente 20% quando comparado o M1, sob três anos de plantio, com M4 e M5, sob 12 e 40 anos de plantio. O M5, apesar da exploração a cerca de 40 anos, apresenta seu valor de diversidade próximo a do M4, sob 12 anos de cultivo, principalmente, devido à presença da cobertura verde que ele realiza na entressafra, não deixando o solo desnudo e acumulando mais biomassa a ser incorporada durante o preparo do solo para o próximo plantio (CARVALHO *et al.*, 2018).

A necessidade de proteger a vida dos solos agrícolas vem tomando importância emergencial diante das adversidades edafoclimáticas. A tendência nas regiões mais produtoras do Brasil são chuvas espaçadas, torrenciais e localizadas que precisam ser armazenadas no solo para que as plantas cultivadas possam ser atendidas na sua necessidade pluviométrica por mais tempo durante os seus diferentes ciclos de crescimento (OLIVEIRA, 2019; DINIZ *et al.*, 2021).

Souza, Borges e Souza (2011) afirmam que o manejo de cobertura vegetal e a adubação verde colabora fundamentalmente no auxílio do armazenamento de água nos solos. A presença destas plantas também possibilita mitigar os impactos das gotas das chuvas, principalmente em terrenos de grande declive, evitando a erosão e carreando água filtrada pelas suas raízes, seguindo limpas para os córregos e rios próximos às propriedades (ESPÍNDOLA; GUERRA; ALMEIDA, 1997).

Considerando ainda os índices de *Shannon-Weaver* gerados pelo estudo de diversidade pela região ITS em relação aos outros atributos biológicos avaliados, vale ressaltar que os manejos M1 e M3 foram os que apresentaram os valores mais baixos de C-BMS, de qMIC e de UFC, confirmando que nestes não há o manejo de nenhuma cobertura ou adubação verde, nem tão pouco a aplicação de resíduo orgânico.

Além do manejo de cobertura, a aplicação de resíduos orgânicos tem sido uma alternativa na recuperação da saúde de solos cultivados. No trabalho de Machado *et al.* (2014), os autores observaram que o resíduo orgânico (macrófitas

aquáticas) afetou, de maneira positiva, a fertilidade do solo e a comunidade de microrganismos edáficos. Melo Neto e Araújo (2016) realizaram um estudo utilizando quatro resíduos orgânicos na recuperação de solos degradados: dejetos de suíno, lodo de esgoto, esterco bovino e cama de frango, e concluíram que todos proporcionaram resultados positivos na fertilidade do solo, porém para diferentes nutrientes.

Os valores mais altos de qCO_2 confirmam o estado exploratório dos M1 e M3. Normalmente o qCO_2 alto sob baixa condição de C-BMS, é sinal de que aquele sistema biológico está se desgastando para manter a respiração que apresenta, isto é, em situações de estresse, a qCO_2 , geralmente, se apresenta com valores mais altos, indicando maior consumo de energia, pois o carbono a ser mineralizado é advindo de adubos minerais e agroquímicos (CUNHA *et al.*, 2011).

Quando se observa os agrotóxicos utilizados nestas propriedades (TABELA 1), o M3 é o que aplica todos os tipos de agentes (fungicidas, herbicidas e inseticidas). Ainda, o M1 aplica somente o inseticida no fumo, mas faz todas as aplicações padrões da soja e do milho com pouco período de descanso. Ainda sim, pelo pouco tempo de uso, o solo tem se mantido produtivo.

Considerando os valores de produtividade, é possível observar que o M1 (120 mil/pés/ano), o mais recente, ainda possui nutrientes armazenados para salvaguardar a produção de grão. O M2 e M3, apresentaram os piores valores de produtividade (50 mil/pés/ano), valor este, esperado para o M3 devido à condução altamente exploratória, porém para o M2, este valor de produtividade só pode ser advindo da falta de boas práticas de manejo, de um solo com histórico de contaminação ou ainda de baixa fertilidade. A produtividade do M5 (110 mil/pés/ano) se apresenta a contento quando comparado com a média de produtividade da época de avaliação (90 mil/pés/ano).

Vale ainda ressaltar que, um dos grandes impactos do cultivo do fumo é o preparo do solo para o plantio. No entanto, os dados coletados pelas indústrias de tabaco na assistência aos produtores mostram que a aplicação de práticas de cultivo que primam pela conservação do solo tem aumentado de maneira significativa. Atualmente, 76% das lavouras de tabaco são cultivadas usando as técnicas de plantio direto ou cultivo mínimo (SINDITABACO, 2020).

Estudos mostraram que no ano de 2007, 83% dos fumicultores ainda utilizavam técnicas tradicionais, utilizando a aeração do solo na preparação do solo das lavouras, enquanto apenas 17% já utilizavam de técnicas conservacionistas

(SINDITABACO, 2020). Entretanto, em 2011 e 2014 a porcentagem de fumicultores que recorreram a técnicas conservacionistas ultrapassou a porcentagem do fumicultores que utilizavam técnicas tradicionais. A utilização de técnicas como o plantio direto e cultivo mínimo aumentou em mais de 25% dos cultivos, enquanto que a porcentagem de fumicultores que utilizam de técnicas convencionais diminuiu em mais da metade (SINDITABACO, 2020).

É importante lembrar que o cultivo mínimo se caracteriza como o método em que o produtor diminui ao máximo o uso de maquinários, objetivando menor revolvimento e compactação do solo, e aplica cobertura no solo, a fim de proteger parcialmente a superfície, enquanto que o plantio direto na palha, visa evitar o revolvimento do solo, fazendo com que a palhada dos cultivos de cobertura sobre a sua superfície seja preservada (SINDITABACO, 2015).

Portanto, vale ressaltar que se estes manejos não agregarem mais técnicas conservacionistas no histórico das suas conduções, os índices de diversidade alcançados poderão cair para os níveis de exploração de longo prazo.

5 CONCLUSÃO

O índice de diversidade de *Shannon-Weaver* mostrou que, comparando os valores da área M1, com apenas três anos de cultivo, com os da área M4 e M5, que possuem, respectivamente, 12 e 40 anos de cultivo, a diversidade diminuiu em mais de 20%. Porém, através da análise polifásica, concluiu-se que os manejos ainda não estão selecionando as bactérias pelo tempo de exploração.

Os valores de C-BMS, alcançados pelos manejos M2, M4 e M5, refletem os ganhos biológicos que o sistema recebeu através dos manejos de cobertura verde, rotação e/ou adubação orgânica. O baixo qCO_2 destes manejos aponta para o acúmulo do bom carbono advindo dos resíduos orgânicos, das raízes e das palhadas. Isto se reflete de forma contrária em relação aos manejos M1 e M3, não só pelos valores C-BMS, mas de qCO_2 , $qMIC\%$ e UFC.

Os impactos do preparo de solo para o plantio do tabaco, somados a uma exploração intensiva, observados pelos valores obtidos para os M1 e M3, apontam que devem, urgentemente, buscar adotar mais práticas sustentáveis, de modo a não prejudicarem a saúde destes solos cultivados.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. *et al.* Environmental and Health Effects of Pesticides Residues. In: INAMUDDIN; AHAMED, M. I.; LICHTFOUSE, E. **Sustainable Agriculture Reviews** **48**, [s. l.], Springer International Publishing, 2021, p. 311–336. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-54719-6_8. Acesso em: 10 dez. 2021.
- ALVES, O. R *et al.* BIOTECNOLOGIAS DE REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM AGROQUÍMICOS. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 3, n. 5, p. 27-50, ago. 2016. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/Agrarian%20Academy/2016a/biotecnologias.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.
- ANDRIGHETTI, M. S. *et al.* Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [online], v. 38, n. 5, p. 1643-1653, out. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcs/a/twqss8fRfgDWVvSBXjKwfVM/?lang=pt#ModalArticles>. Acesso em: 15 out. 2021.
- ARRUDA, M. R.; MOREIRA, A.; PEREIRA, J. C. R. **Amostragem e Cuidados na Coleta de Solo para Fins de Fertilidade** – Documento nº115. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, 2014. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Amazonia_Ocidental_Coleta_para_Fertilidade_do_Solo.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.
- ASCARI, R. A.; SCHEID, M.; KESSLER, M. FUMICULTURA E A UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS: riscos e proteção da saúde. **Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 12, n. 23, p. 41-50, jul./dez. 2012. Disponível em: <https://www.revistas.unijui.edu.br/index.php/contextoesaude/article/view/1840>. Acesso em: 15 out. 2021.
- ASSOCIAÇÃO DOS FUMICULTORES DO BRASIL (AFUBRA). **Fumicultura no Brasil**. 2021. Disponível em: <https://afubra.com.br/fumicultura-brasil.html>. Acesso em: 15 out. 2021.
- BAPTISTA, D. F.; BUSS, D. F.; EGLER, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 157-175. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.
- BEEV, G. *et al.* ARDRA Analysis on Biodiversity of Lactobacilli Isolated from Bulgarian Raw Buffalo Milk. **Acta Microbiologica Bulgarica**, Bulgária, v. 37, n. 1, p. 22-26, 2021. Disponível em: <https://actamicrobio.bg/archive/issue-1-2021/amb-1-2021-article-3.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BELCHIOR, D. C. *et al.* Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 135-151, jan./abr. 2014. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164063/1/Impactos-de-agrotoxicos-sobre-o-meio-ambiente.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BERTAN, I. *et al.* COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE AGRUPAMENTO NA REPRESENTAÇÃO DA DISTÂNCIA MORFOLÓGICA ENTRE GENÓTIPOS DE TRIGO. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 279-286, jul./set., 2006. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/viewFile/4554/3465>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BLASIOLI, S.; BRASCHI, I.; GESSA, C. E. The Fate of Herbicides in Soil. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**. [online], IntechOpen, 2011, p. 175-194. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/12586>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BRITO, N. M. *et al.* RISCO DE CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS POR PESTICIDAS APLICADOS EM PLANTAÇÕES DE EUCALIPTOS E COQUEIROS: ANÁLISE PRELIMINAR. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, p. 93-104, jan./dez. 2001. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/3138>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BRITO, P. F.; GOMIDE, M.; CÂMARA, V. M. Agrotóxicos e saúde: realidade e desafios para mudança de práticas na agricultura. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 2017-225, set. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/physis/a/3nrWG7SKSZNzxDB8bThscvb/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 8 dez. 2021.

BRÖRING, J. M. **DIVERSIDADE FUNCIONAL-ESTRUTURAL DE ORGANISMOS DO SOLO E A PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS DE ECOSSISTEMA EM CENÁRIOS EXTREMOS DE REGIME HÍDRICO**. 2017. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2017. Disponível em: https://www.udesc.br/arquivos/cav/id_cpmenu/1477/Tese_Janaina_M__Br_ring__15694156994297_1477.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.

BROWN, T. A. **Genomes**. 2 ed. Oxford: Wiley-Liss, 2002.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia**, [online], v. 34, n. 83, p. 157-163, jul./dez. 2012. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/estudosdebiologia/article/view/22914/22015>. Acesso em: 15 out. 2021.

CARDOSO, E. L. *et al.* Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em pastagem cultivada e nativa no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 631-637, jun. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/WfgswvqgXkBq538ZKGFhszB/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CARDOSO, E. L.; FERNANDES, A. H. B. M.; FERNANDES, F. A. **Análise de Solos: Finalidade e Procedimentos de Amostragem – Comunicado Técnico nº 79**. Corumbá: EMBRAPA, 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/807342/1/COT79.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CARDOSO; E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. Disponível em: <http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/view/109/92/461>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CARNEIRO, R. F. V. *et al.* Fungos micorrízicos arbusculares como indicadores da recuperação de áreas degradadas no Nordeste do Brasil. **Revista Ciências Agronômicas**, Ceará, v. 43, n. 4, p. 648-657, out./dez. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/BLYHs7t4n57hPm4pBvkyw/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CARVALHO, A. M. *et al.* **Plantas de cobertura do solo recomendadas para a entressafra de milho em Sistema Plantio Direto no cerrado – Comunicado Técnico 181**. Brasília: EMBRAPA, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/184756/1/CT-181.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CERETTA, C. A.; AITA, C. **Manejo e Conservação do Solo**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA: 2008. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/16180/Curso_Agric-Famil-Sustent_Manejo-Conservacao-Solo.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 10 dez. 2021.

CHEN, Y. *et al.* Phenolic compounds from *Nicotiana tabacum* and their biological activities. **Journal of Asian Natural Products Research**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 450-456, maio 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22428563/>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CLAESSEN, M. E. C. (Ed.). **Manual de métodos de análise de solo**. 2 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/330804>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CLEMENTINO, M. M. *et al.* PCR Analyses of tRNA Intergenic Spacer, 16S-23S Internal Transcribed Spacer, and Randomly Amplified Polymorphic DNA Reveal Inter- and Intraspecific Relationships of *Enterobacter cloacae* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 3865-3870, nov. 2001. Disponível em:

https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/11284/2/J_Clin_Microbiol_39_3865-3870.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

COLARES, G. B. **DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS À RIZOSFERA DE *Rhizophora mangle* DO MANGUELA DO RIO PACOTI, ZONA LESTE DA COSTA CEARENSE**. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Instituto Ciências do Mar, Fortaleza, 2010. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1926/1/2010_dis_gbcolares.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

CORRÊA, M. C.; CAMPOS, M. B. S.; MONQUERO, P. A.. **IMPACTO DE HERBICIDAS UTILIZADOS EM CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE COTESIA FLAVIPES. Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 24, p. 53-60, jan./dez. 2014. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/39029/23776>. Acesso em: 10 dez. 2021.

COSTA, V. A. S. **Fungos da caatinga e seu potencial na promoção da fertilidade do solo de áreas em processo de desertificação**. 2021. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Fortaleza, 2021. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/59481>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CRISPIM, D. L.; FERNANDES, L. L.; ALBUQUERQUE, R. L. O. L. Aplicação de técnica estatística multivariada em indicadores de sustentabilidade nos municípios do Marajó-PA. **Revista Principia**: Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB, João Pessoa, v. 1, n. 46, p. 145-154, ago. 2019. Disponível em: <https://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/viewFile/3203/1124>. Acesso em: 15 out. 2021.

CUNHA, E. Q. *et al.* **SISTEMAS DE PREPARO DO SOLO E CULTURAS DE COBERTURA NA PRODUÇÃO ORGÂNICA DE FEIJÃO E MILHO. II - ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO. Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [online], v. 35, p. 603-611, abr. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcs/a/QvtpPNM4Wb4ZrdBZDG8Mkhk/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

DEMICHELLI, F. N. **ISOLAMENTO, SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO (N-(FOSFONOMETIL)GLICINA) POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SOLO DE LAVOURA, EM LARANJEIRAS DO SUL, PR**. 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, 2016. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/189/1/DEMICHELLI.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

DINIZ, J. A. O. *et al.* **Crise hídrica no Brasil: O USO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS COMO REFORÇO NO ABASTECIMENTO PÚBLICO**. Rio de Janeiro: Serviço Geológico do Brasil – CPRM: 2011. Disponível em:

https://rigeo.cprm.gov.br/bitstream/doc/22291/3/rel_2021_estiagem_agua_%20subterranea%20%282%29.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D. Biomassa Microbiana do Solo (BMS) também conhecida como carbono da Biomassa Microbiana - C-BMS: sua Importância; Indicador de qualidade de solo e protocolo. In: DIONÍSIO, J. A. *et al.* **Guia Prático de Biologia do Solo**. Curitiba: SBCS/NEPAR, 2016, p. 78-83. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142766/1/Diana-11.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não - leguminosas** Brasília: Embrapa-SPI, 1995.

FARIA, M. V. C. Avaliação de ambientes e produtos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). **É veneno ou é remédio?**: agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 137-156. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P. **Análise de dados**: técnicas multivariadas exploratórias com SPSS e STATA. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 911-920, ago. 2003. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPISO/21906/1/v38n8a03.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

FIGUEIREDO, A. **PROGRAMA DE DIVERSIFICAÇÃO DE LAVOURAS DE TABACO NAS ENCOSTAS DA SERRA GERAL, ATIVIDADES E PONTUALIDADES**. 2008. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenheiro Agrônomo) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/119364/260544.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 dez. 2021.

FONSECA JÚNIOR, A. A. **Guia Rápido de Bioinformática**. 7 ed. [online]: Bizantium. 2014.

FONSECA, E. M. S.; ARAÚJO, R. C. **Fitossanidade**: princípios básicos e métodos de controle de doenças e pragas. São Paulo: Érica, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **Food and Agriculture**: key to achieving the 2030 agenda for sustainable development. Key to achieving the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i5499e/i5499e.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2021.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM PARA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA**. 2018. Disponível em: https://amazonia.fiocruz.br/doc/gq/ilmd_scol_pop_001.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.

GARRIDO, L. R.; BOTTON, M. **Recomendações técnicas para evitar resistência de patógenos, insetos e ácaros-pragas a fungicidas e inseticidas na cultura da videira**: conceitos, fatores envolvidos e práticas gerais para o manejo. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222984/1/ComTec-220-Online-2021.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

GUIMARÃES, T. B. *et al.* **CONDIÇÕES DE TRABALHO E SAÚDE NA FUMICULTURA BRASILEIRA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA. Trabalho En(Cena)**, Palmas, v. 6, n. 1, p. 1-26, fev. 2021. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/encena/article/view/10589/18559>. Acesso em: 15 out. 2021.

HAIR JÚNIOR, J. F. *et al.* **Análise multivariada de dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HAMIA, Y. A. A. **Contaminação de águas subterrâneas por herbicidas no departamento de Lot-et-Garonne, França**. 2017. 20f. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/174492/TCC%20-%20YASMIN%20AHMAD%20ABOU%20HAMIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 out. 2021.

HASS, L. M. *et al.* Estudo de diversidade de rizobactérias na qualidade biológica de diferentes manejos do solo. In: Reunião Paranaense de Ciências do Solo, 6, 2019. Ponta Grossa: **Anais [...]**. [online]: 2019. p. 1-4. Disponível em: http://rpcs2019.com.br/trabalhos_aprovados/arquivos/03292019_220309_5c9ecb514b84f.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

HOFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. **Microscopia de luz em microbiologia**: Morfologia bacteria e fúngica. ArtMed, 2011.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de Curadores de Germoplasma – Microorganismos**: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

INSTITUO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Agrotóxicos**. 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: 15 out. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Fumicultura e meio ambiente**. 2021b. Disponível em: Fumicultura e meio ambiente - Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco. Acesso em: 15 out. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Fumicultura e saúde**. 2021c. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/fumicultura-e-saude>. Acesso em: 15 out. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Produção de fumo e derivados**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/producao-fumo-e-derivados>. Acesso em: 15 out. 2021.

JARDIM BOTÂNICO DA UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO (UTAD). **Nicotiana tabacum L.** 2021. Disponível em: https://jb.utad.pt/especie/Nicotiana_tabacum. Acesso em: 10 dez. 2021.

JOUTEY, N. T. *et al.* Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. In: CHAMY, R. (Ed.). **Biodegradation: life of science**. [online]: IntechOpen, 2013. p. 289-320. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/45093>. Acesso em: 15 out. 2021.

KHOSRAVI, H.; DOLATABAD, H. K. Identification and molecular characterization of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter salinestris* using ARDRA, REP, ERIC, and BOX. **Molecular Biology Reports**, [online], v. 47, n. 1, p. 307-316, jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31659690/>. Acesso em: 10 dez. 2021.

KÖBERL, M. *et al.* Unraveling the Complexity of Soil Microbiomes in a Large-Scale Study Subjected to Different Agricultural Management in Styria. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 1052, p. 1-11, maio 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01052/full>. Acesso em: 10 dez. 2021.

KOCK, K. **DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE BACILLUS spp. OBTIDAS DE SOLOS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO E NATURAL**. 2014. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina, 2014. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37738>. Acesso em: 15 out. 2021.

LANDAU, E. C. *et al.* **DINÂMICA DA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA E DA PAISAGEM NATURAL NO BRASIL NAS ÚLTIMAS DÉCADAS**. Brasília: EMBRAPA, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1122551/dinamica-da-producao-agropecuaria-e-da-paisagem-natural-no-brasil-nas-ultimas-decadas-sistemas-agricolas-paisagem-natural-e-analise-integrada-do-espaco-rural>. Acesso em: 10 dez. 2020.

LEAL, M. L. A. *et al.* Efeito dos sistemas de manejo e do uso do solo na população de microrganismos do solo. **Research, Society and Development**, [online], v. 10, n. 9, p. 1-11, jul. 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/17966>. Acesso em: 10 dez. 2021.

LEAL, P. B. **Estudo e aplicações do método de agrupamento baseado no modelo**. 2004. 68f. Dissertação (Mestrado em Estatística) – Universidade Federal de

Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Estatística, Recife, 2004. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/6612/1/arquivo7262_1.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

LEITE, J. **Caracterização de Bactérias Nativas de Solos do Semiárido Brasileiro Isoladas de Nódulos de Feijão-caupi**. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciencia do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, 2011. Disponível em: [http://www.ia.ufrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/290_\(ME-2011\)_Jakson_Leite.pdf](http://www.ia.ufrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/290_(ME-2011)_Jakson_Leite.pdf). Acesso em: 10 dez. 2021.

LIMA, J. V. L. *et al.* POPULAÇÕES MICROBIANAS CULTIVÁVEIS DO SOLO E SERRAPILHEIRA DE UMA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. **Enciclopédia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2300-2316, jul. 2014. Disponível em: <http://conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/populacoes.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

LIMA, N. R. W. *et al.* Plasticidade Fenotípica. **Ciência Elementar**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 1-7, jun. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Neuza-Wille-Lima/publication/318648149_Plasticidade_Fenotipica/links/59749f4a0f7e9b4016a06e4a/Plasticidade-Fenotipica.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.

LISBÔA, H. *et al.* **Plantas Daninhas**. Porto Alegre: Sagah. 2021.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Revista Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, abr./jun. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/bGBYZvVVKMrV4yzqfwwKtP/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2020.

MACHADO, K. S. *et al.* Resíduos orgânicos e fósforo como condicionantes de solo degradado e efeitos sobre o crescimento inicial de *Dipteryx alata* Vog. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 541-552, jul./set. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cflo/a/DShTZrSrWWvJRtX9SdpTRwf/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MACIEL, M. H. C. **Abordagem polifásica para identificação de linhagens de ASPERGILLUS Seção NIGRI preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de POLIGALACTURONASES**. 2013. 149f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Pernambuco, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/12809/1/TESE%20MARÍLIA%20MACIEL.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MADURO, R. M. **Equilíbrio líquido-líquido em sistemas nicotina + água + extratante**. 2005. 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2005. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/267422>. Acesso em: 17 out. 2021.

MAHMOOD, I. *et al.* Effects of pesticides on environment. In: HAKEEM, K.; AKHTAR, M.; ABDULLAH, S. **Plant, Soil and Microbes: Implications in Crop Science**, [s. l.], Springer International Publishing, 2016, p. 253–269. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-27455-3_13#citeas. Acesso em: 10 dez. 2021.

MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo (“*Carryover*”). **Revista Brasileira de Herbicidas**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 151-164, mai./ago. 2011. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/Agrarian%20Academy/2016a/biotecnologias.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

MATTOS, M. L. T. Microbiologia do Solo. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. (Org.). **Recurso Solo: Propriedades e Usos**. São Carlos: Editora Cubo, 2015. p. 250-272. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1034181/1/MariaLauraRecursoSoloPropriedadeseUsos.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

MELO NETO, J. C.; ARAÚJO, W. E. L. **APROVEITAMENTO DE DIFERENTES RESÍDUOS ORGÂNICOS NA RECUPERAÇÃO DE SOLOS DEGRADADOS**. 2016. 18f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Ambiental) – Universidade de Rio Verde, Rio Verde, 2016. Disponível em: <https://www.unirv.edu.br/conteudos/fckfiles/files/APROVEITAMENTO%20DE%20DIFERENTES%20RESÍDUOS%20ORGÂNICOS%20NA%20RECUPERAÇÃO%20DE%20SOLOS%20DEGRADADOS.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MENDES, I. C. *et al.* **Bioindicadores para avaliação da qualidade do solos tropicais: utopia ou realidade?**. Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2010/31300/1/doc-246.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

MENDES, I. C. O solo é a memória do manejo. In: FERTBIO 2016, 2016. Goiânia: **Anais [...]**. [online]: 2016. p. 1. Disponível em: <https://sbcs.org.br/fertbio2016/anais/palestrantes/leda%20de%20Carvalho%20Mendes.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MENDES, R. B. **Plasticidade Ecológica e Comportamental em Ambiente Hostil: o Manguezal como Último Refúgio de *Cebus xanthostenos* Wied-Neuwied 1820**. 2015. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2015. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/11688?locale=pt_BR. Acesso em: 17 out. 2021.

MENEZES, J. P. *et al.* VARIABILIDADE GENÉTICA NA REGIÃO ITS DO rDNA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. (BIOCONTROLADOR) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, jan./fev. 2010. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cagro/a/HjR9qvpt4zCnxFnmbQNGGcg/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 out. 2021.

MINAS, K. *et al.* Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. **FEMS Microbiology Letters**, [online], v. 325, n. 2, p. 162-169, dez. 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/325/2/162/566576>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MORAES, R. F. **AGROTÓXICOS NO BRASIL: PADRÕES DE USO, POLÍTICA DA REGULAÇÃO E PREVENÇÃO DA CAPTURA REGULATÓRIA**. Rio de Janeiro: IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (Brasília), 2019. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

MOREIRA, C. Enzimas de restrição. **Revista de Ciência Elementar**, [online], v. 2, n. 2, p. 1-2, jun. 2014. Disponível em: https://www.fc.up.pt/pessoas/jfgomes/pdf/vol_2_num_2_60_art_enzimaRestricao.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

MOREIRA, F. M. S. Diversidade de microrganismos são fundamentais ao agroecossistema. **Visão Agrícola**, USP/ESALQ, v. 9, p. 63-66, 2009. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA9-Microbiologia03.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Ufla, 2006. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/departamentos/Iso/arquivos_aula/LSO_400%20Livro%20-%20Microbiologia%20e%20bioquimica%20do%20solo.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.

MOREIRA, N. M. *et al.* OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA DA Salmonella sp. FRENTE À UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS. **Enciclopédia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1131-1153, jul. 2013. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/agrarias/os%20mecanismos%20de.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

MOREIRA, P. S. P. *et al.* Análise de agrupamento aplicado ao ciclo diário das variáveis meteorológicas nos biomas do estado de mato grosso. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 5, n. 1, p. 80-94, 2016. Disponível em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/14466>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MORETTO, J. A. S. **Investigação da influência de diferente herbicidas sobre a microbiota do solo**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: <https://docplayer.com.br/125488386-Universidade-de-sao-paulo-investigacao-da-influencia-de-diferentes-herbicidas-sobre-a-microbiota-do-solo.html>. Acesso em: 17 out. 2021.

MUNHOZ, C. F. **Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em marcadores rep-PCR e AFLP e construção de primers específicos para diagnose**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-18052009-153241/publico/Carla_Munhoz.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

NAVROSKI, D. Diversidade Morfológica de Rizobactérias Obtidas de Solos Sob Distintos Manejos de Cultivo da Região Oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [online], v. 4, p. 117-128, jun. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/307680145_Diversidade_Morfologica_de_Rizobacterias_Obtidas_de_Solos_SoB_Distintos_Manejos_de_Cultivo_da_Regiao_Oeste_do_Parana. Acesso em: 12 dez. 2021.

OLIVEIRA, F. S. **Análise em larga escala das regiões intergênicas ITS, ITS1 e ITS2 para o filo Basidiomycota (Fungi)**. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <http://www.pgbioinfo.icb.ufmg.br/defesas/102M.PDF>. Acesso em: 15 out. 2021.

OLIVEIRA, I. C. **CRISE HÍDRICA ATUAL E AGRICULTURA NO BRASIL**. UNIFASC, 2016. Disponível em: <https://unifasc.edu.br/wp-content/uploads/2019/07/Isabel-CRISE-HÍDRICA-ATUAL-E-AGRICULTURA-NO-BRASIL.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2021.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. **Controle de Plantas Daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia**. Brasília; EMBRAPA, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1103281/control-de-plantas-daninhas-metodos-fisico-mecanico-cultural-biologico-e-alelopatia>. Acesso em: 10 dez. 2021.

OLIVEIRA, M. L. F. *et al.* Sistema de Notificação de intoxicações: desafios e dilemas. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 303-315. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

PADILHA, T. M. *et al.* Isolamento de linhagens bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos BTEX proveniente do setor petroquímico. **Scientia Plena**, [online], v. 13, n. 9, p. 1-10, set. 2017. Disponível em: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/3795>. Acesso em: 16 dez. 2021.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxico, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 21-41. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021.

PERUZZOLO, M. C. **EFEITOS DOS HERBICIDAS PARAQUAT E DIQUAT EM ABELHAS *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (HYMENOPTERA: APIDAE)**. 2018. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, 2018. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/60690/TCC-MARINA-PERUZZOLO-PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 dez. 2021.

PINTO, L. P. **BIOINDICADORES DE SOLO CULTIVADO COM PINHÃO-MANSO SUBMETIDO A APLICAÇÕES DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUÍNOS (ARS)**. 2019. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2019. Disponível em: http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/4179/5/LuanaP_Pinto2019.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

PINTO, L. P. *et al.* ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOLOS SOB DISTINTOS MANEJOS DE CULTIVO DE *Nicotiana tabacum* L. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIA DA PUCPRS, 3, 2018, Toledo. **Anais [...]**. [online]: 2018. p. 1-3. Disponível em: <https://www.cicapucpr.com.br/trabalhos/detalhe/19>. Acesso em: 10 dez. 2021.

PÔRTO, M. L. *et al.* Indicadores biológicos de qualidade do solo em diferentes sistemas de uso no brejo paraibano. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1011-1017, jul./ago. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/v6QfvDB7ZdtC9yZ8R66Xvth/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

RAMOS, M. L. G. *et al.* Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solo de Cerrado. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 58-68, jan./fev. 2012. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54855/1/bj.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

RANGEL, C. C. B.; NOWACKI, M. B. A. **Química ambiental: conceitos, processos e estudo dos impactos ao Meio Ambiente**. São Paulo: Érica, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2014.

REIS JUNIOR, F. B. *et al.* **Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/559150/1/doc51.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021

REIS JUNIOR, F. B., REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum* amazonense isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online]. v. 41, n. 3, p. 431-438, mar. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/hrbLDTfBXTky3b4PTfm9nYp/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C. **Biomassa Microbiana do Solo**. Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/572256/1/doc205.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *brachiaria***. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/569406>. Acesso em: 10 dez. 2021.

REIS, A. C. **Manejo de Solo e Plantas**. Porto Alegre: SAGAH, 2017.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p.1 49-158, jul./dez. 2009. Disponível em: <http://www.revista.liberato.com.br/index.php/revista/article/view/142/132>. Acesso em: 10 dez. 2021.

RIBEIRO, A. V. **CO-SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO À PESTICIDAS EM BACTÉRIAS AMBIENTAIS**. 2019. 70f. Monografia (Bacharel em Ciências Ambientais) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2019. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/45402/1/2019_tcc_avribeiro.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

RIQUINHO, D. L.; HENNINGTON, E. A. Cultivo do tabaco no sul do Brasil: doença da folha verde e outros agravos à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 12, p. 4797-4808, dez. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/fjCKC4MyCZydpK7Sx4cvhcS/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 10 dez. 2021.

RODRIGUES, F. S. **Métodos de agrupamento na análise de dados de expressão gênica**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Estatística) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, São Carlos, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/4537/2596.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, Acesso em: 10 dez. 2021.

RODRIGUES, N. R. *et al.* Biodegradação do diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 393-400, jun. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pd/a/qmbvd7TY75vT8mRzqcTrLFB/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

ROSEMBERG, J. **Nicotina**: droga universal. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCA). 2004. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/nicotina-droga-universal.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

ROSSET, J. S. *et al.* Agricultura convencional versus sistemas agroecológicos: modelos, impactos, avaliação da qualidade e perspectivas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 13, n. 2, p. 80-94, abr./jun. 2014. Disponível em:

<https://saber.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/7351/7390>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SÁ, M. A. C.; SANTOS JÚNIOR, J. D. G. **Compactação do solo**: consequências para o Crescimento Vegetal. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2009/27465/1/doc_136.pdf. Acesso em: 15 out. 2021

SANTOS, J. B. *et al.* Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 4, p. 683-691, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pd/a/LBWshjCR7HfbL94WwHrkJwK/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SANTOS, J. P.; POLINARSKI, C. A. Ação local efeito global: quem são os agrotóxicos? In: PARANÁ. Secretaria de Estado da Educação. Superintendência de Educação. **O professor PDE e os desafios da escola pública paranaense**, 2012. Curitiba: SEED/PR, 2012. V.1. (Cadernos PDE). Disponível em: http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/cadernospde/pdebusca/producoes_pde/2012/2012_unioeste_cien_artigo_juliana_piana.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

SCHERER, A. J. **PROSPECÇÃO DE Pseudomonas spp. E Bacillus COM POTENCIAL PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS**. 2016. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina, 2016.

SCHOENHALS, M.; FOLLADOR, F. A. C.; SILVA, C. Análises dos impactos da fumicultura sobre o meio ambiente, a saúde dos fumicultores e iniciativas de gestão ambiental na indústria do tabaco. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 16-37, maio/ago. 2009. Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:fbNle_ZtNGIJ:ferramentas.unipinhal.edu.br/engenhariaambiental/include/getdoc.php%3Fid%3D597%26article%3D205%26mode%3Dpdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso em: 18 out. 2021.

SCHULTZ, F. M. **AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL**. 2010. 137f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49353/000836221.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 dez. 2021

SCOLFORO, J. DIVERSIDADE, EQUABILIDADE E SIMILARIDADE NO DOMÍNIO DA CAATINGA. (2008). In: MELLO, J. M.; SCOLFORO, J. R.; CARVALHO, L. M. T.

Inventário Florestal de Minas Gerais: Floresta Estacional Decidual-Florística, Estrutura, Similaridade, Distribuição Diamétrica e de Altura, Volumetria, Tendências de Crescimento e Manejo Florestal. Minas Gerais: UFLA, 2008, p. 118-133.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/290344015_DIVERSIDADE_EQUABILIDADE_E_SIMILARIDADE_NO_DOMINIO_DA_CAATINGA. Acesso em: 10 dez. 2021.

SEMENSATTO JÚNIOR, D. L. Aplicação de índices de diversidade em estudos envolvendo associações entre foraminíferos e tecamebas recentes: uma breve discussão. In: Congresso sobre Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras dos Países de Expressão Portuguesa e Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 2 e 9, 2003. Rio de Janeiro, **Anais [...]**. [online]: 2003. p. 1-5.

Disponível em: http://abequa.org.br/trabalhos/micropaleontologia_14.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

SILVA, C. R. **Sistemas de respostas antioxidantes ao estresse gerado por Heat em linhagem bacteriana de solo agrícola independente de pressão seletiva prévia por esse herbicida.** 2021. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva, Ponta Grossa, 2021. Disponível em:

<https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/3474/1/Caroline%20Rosa%20Silva.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação da Respiração Basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂)** – Comunicado Técnico nº 99. Seropédica; EMBRAPA, 2007. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/34390/1/cot099.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SILVA, K. W. S.; EVERTON, N. S.; MELO, M. A. D. Aplicação dos índices biológicos Biological Monitoring Working Party e Average Score per Taxon para avaliar a qualidade de água do rio Ouricuri no Município de Capanema, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 7, n. 3, p. 13-22, set. 2016. Disponível em:

http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000300013. Acesso em: 10 dez. 2021.

SILVA, L. B. *et al.* CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S-23S rRNA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SORGO. In: Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, 4, 2017. Goiás: **Anais [...]**. [online]: 2018. p. 1-10.

Disponível em: <https://www.anais.ueg.br/index.php/cepe/article/view/10118>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SIMONI, M. F. **Atributos biológicos de solos sob distintos manejos de cultivo de *Nicotiana tabacum* L.** 2017. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenheiro Agrônomo) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina, 2017.

Disponível em:

<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/62282/TCC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SINDITABACO. **APELO MUNDIAL – Potencial agrícola depende do cuidado com o solo**. 2015. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/apelo-mundial-potencial-agricola-depende-cuidado-com-o-solo/>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SINDITABACO. **Plantio direto e cultivo mínimo são aplicados em 76% das lavouras de tabaco**. 2020. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/item/plantio-direto-e-cultivo-minimo-sao-aplicados-em-76-das-lavouras-de-tabaco/>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SMOLSKI, F. M. S. Análise de Clusters. In: BATTISTI, I. D. E.; SMOLSKI, F. M. S. **Software R: curso avançado**. Extensão Universidade Federal da Fronteira Sul, 2019. Disponível em: <https://smolski.github.io/livroavancado/index.html>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SOUTO, K. M. *et al.* Biodegradação dos herbicidas imazetapir e imazapique em solo rizosférico de seis espécies vegetais. **Ciência Rural**, [online], v. 43, n. 10, p. 1790-1796, out. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/jW6tPvVx5yPpfgmJq3YffFk/?lang=pt#>. Acesso em: 18 out. 2021.

SOUZA, B. C. E. **Caracterização genômica de bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias de ordem Nostocales**. 2020. 70f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2020. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-04062020-104047/publico/Bruno_Costa_Evangelista_de_Souza_versao_revisada.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

SOUZA, L. M. *et al.* Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 269-276, fev. 2012, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200016>. Acesso em: 15 out. 2021.

SOUZA, L. S.; BORGES, A. L.; SOUZA, L. D. Influência da Adubação Verde em Aspectos Físicos, Químicos e Biológicos do Solo. In: TOFANELLI, M. B. D.; SILVA, T. O. (Ed.). **Manejo ecológico e conservação dos solos e da água no Estado de Sergipe**. São Cristovão: Editora UFS, 2011. p. 115-142. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/902738?locale=es>. Acesso em: 12 dez. 2021.

SPÍNDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. **ADUBAÇÃO VERDE: ESTRATÉGIA PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL**. Seropédica: EMBRAPA/CNPAB, 1997. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/27233/1/doc042.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2021.

STEFANOSKI, D. C. *et al.* Uso e manejo do solo e seus impactos sobre a qualidade física. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.17, n.12, p.1301-1309, dez. 2013. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/Kqq4dHBX4yfnxwWFTpqBVzb/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

STEIN, R. T.; COSCOLIN, R. B. S. **Agricultura climaticamente inteligente e sustentabilidade**. Porto Alegre: SAGAH, 2019.

TCI (Tendências Consultoria Integrada). **Relevância do Setor de Tabaco no Brasil**. São Paulo, 2018. Disponível em: http://www.sinditabaco.com.br/site/wp-content/uploads/2018/10/Estudo-Tendências_Relevância-do-setor-de-tabaco-no-Brasil.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC (TFS). **7 Common Issues with Restriction Digestion Reactions and How to Avoid Them**. 2021. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/7-common-issues-with-restriction-digestion-reactions-and-how-to-avoid-them.html>. Acesso em: 10 dez. 2021.

TROIAN, A. **Percepções e projetos de jovens rurais produtores de tabaco de Arroio do Tigre/RS**. 2014. 291 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento Rural, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/96702/000918662.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 nov. 2021.

UNITED NATIONS (UN). **World Population Prospects 2019: Highlights**. 2019. Disponível em: https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf. Acesso em: 16 nov. 2021.

VALENTIN, J. L. Agrupamento e Ordenação. In: PERES-NETO, P. R.; VALENTIN, J. L.; FERNANDEZ, F. A. S. (Ed.). **Tópicos em Tratamentos de Dados Biológicos**. Série Oecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro, 1995. Disponível em: <http://www.avesmarinhas.com.br/3.1%20-%20Agrupamento%20e%20ordenação.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica**: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Interciência, Rio de Janeiro, 2000.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Manejo e controle de plantas daninhas na cultura de soja**. Passo Fundo, EMBRAPA Trigo, 2006. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

VASCONCELLOS, M. C. **Avaliação dos indicadores químicos e biológicos de qualidade do solo de Cerrado degradado após o cultivo de leguminosas**. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ecologia e Produção Sustentável, Goiânia, 2015. Disponível em: <http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/bitstream/tede/2545/1/MARIA%20CECILIA%20ALVES%20DE%20VASCONCELOS.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 539-545, jul./set. 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/tSZxyXp7MVR9mY65Nq7zfGz/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

VIGNOLI-SILVA, M.; STEHMANN, J. R. *Nicotiana tabacum* L. in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB88067>>. Acesso em: 09 dez. 2021

VINTICINO, M. K.; BATISTA, J. S.; LACERDA, G. ISOLAMENTO, SELEÇÃO E DIVERSIDADE DE CEPAS DE LEVEDURAS A PARTIR DE FRUTAS ORGÂNICAS PARA UTILIZAÇÃO EM FERMENTAÇÃO CERVEJEIRA. In: Encontro Anual de Iniciação Científica e Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, 27 e 4, 2018. Ponta Grossa: **Anais [...]**. [online]: 2018. p. 1-4. Disponível em: https://siseve.apps.uepg.br/storage/eaic2018/10_Mariana_Kelly_Vinticinco-153661067282747.pdf. Acesso em: 10 dez. 2021.

WATSON, J. D. *et al.* **Biologia molecular do gene**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 173, n. 2, p. 697-703, jan. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1987160/>. Acesso em: 10 dez. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tobacco and its environmental impact: an overview**. Geneva: 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255574/9789241512497-eng.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). **Biologia molecular básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZILLI, J. É. *et al.* DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO SOLO. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Diversidade_microbianaID-eUVKetj4E4.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.