

Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*

Toxicity of herbicides used in the sugarcane crop to diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*

Sergio de Oliveira Procópio^{1*}; Marcelo Ferreira Fernandes¹;
Daniele Araújo Teles²; José Guedes Sena Filho³;
Alberto Cargnelutti Filho⁴; Marcelo Araújo Resende⁵; Leandro Vargas⁶

Resumo

Objetivou-se nesse trabalho identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento, o desenvolvimento, ou que não causem prejuízos à capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. Dezoito herbicidas (paraquat, ametryne, tebuthiuron, amicarbazone, diuron, metribuzin, [hexazinone + diuron], [hexazinone + clomazone], clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, [trifloxysulfuron sodium + ametryne], glyphosate, MSMA e 2,4-D) foram testados em suas respectivas doses comerciais quanto ao impacto sobre os parâmetros de crescimento da bactéria em meio líquido DIGs. Os parâmetros analisados foram a duração da fase lag, tempo de geração e densidade celular máxima, calculados a partir de dados de densidade ótica obtidos, em intervalos regulares, durante a incubação de culturas por 33 h, a 32°C. Também foi avaliado o impacto dos herbicidas na atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* cultivada em meio semi-sólido JNFb livre de N. Os efeitos dos herbicidas sobre os parâmetros de crescimento e sobre a atividade de redução do acetileno (ARA) foram comparados ao tratamento controle pelo teste de Dunnett, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen inibiram o crescimento de *H. seropedicae* *in vitro*. Os herbicidas ametryne, oxyfluorfen e glyphosate ocasionaram pequena redução na duração da fase lag da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*. Os herbicidas oxyfluorfen, ametryne e imazapyr acarretaram aumento no tempo de geração de *H. seropedicae*. O herbicida glyphosate promoveu redução drástica na fixação biológica de nitrogênio *in vitro* de *H. seropedicae*. Os demais herbicidas avaliados não afetaram os parâmetros de crescimento ou mesmos a FBN de *H. seropedicae*. **Palavras-chave:** *Saccharum* spp., fixação biológica de nitrogênio, pesticidas

Abstract

The objective of this work was to identify herbicides used in the sugarcane crop that affects neither the growth, the development, of nor the process of biological nitrogen fixation (BNF) by the diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. Eighteen herbicides (paraquat, ametryne, tebuthiuron,

¹ Pesquisadores da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. E-mail: sergio.procopio@embrapa.br; marcelo.fernandes@embrapa.br

² Discente do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE. E-mail: daniaraujo_bio@hotmail.com

³ Analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. E-mail: jose-guedes.sena@embrapa.br

⁴ Prof., Deptº de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. E-mail: alberto.cargnelutti.filho@gmail.com

⁵ Discente do Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE. E-mail: araujoresende@hotmail.com

⁶ Pesquisador da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. E-mail: leandro.vargas@embrapa.br

* Autor para correspondência

amicarbazone, diuron, metribuzin, [hexazinone + diuron], [hexazinone + clomazone], clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, [trifloxysulfuron sodium + ametryne], glyphosate, MSMA e 2,4-D) were tested in their respective commercial doses regarding their impact on the growth of the bacteria in liquid medium DIGs. For this, we determined the duration of lag phase, generation time and maximum cell density of *H. seropedicae*, calculated from optical density data obtained at regular intervals during the incubation of cultures for 33 h at 32°C. We also evaluated the impact of herbicides on nitrogenase activity of *H. seropedicae* grown in semi-solid N-free JNFb medium. The effects of herbicides on the growth variables and the ARA were compared with the untreated control by Dunnett test. A completely randomized design was used. The herbicides paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate and oxyfluorfen inhibited the growth of *H. seropedicae* in vitro. Ametryne, oxyfluorfen and glyphosate caused a small reduction in the duration of the lag phase of diazotrophic bacteria *H. seropedicae*. Oxyfluorfen, ametryne and imazapyr resulted in increased the generation time by *H. seropedicae*. Glyphosate promoted drastic reduction in biological nitrogen fixation in vitro by *H. seropedicae*. The other tested herbicides did not affect the growth or the same BNF by *H. seropedicae*.

Key words: *Saccharum* spp., biological nitrogen fixation, pesticides

Introdução

Atualmente, a produção e a utilização de combustíveis menos poluentes são vistas como prioridades para as principais potências mundiais, até mesmo pelas que se encontravam resistentes ao reconhecimento da gravidade da situação ambiental. O risco de falta de energia é cada vez mais real devido ao preocupante esgotamento dos recursos hídricos e ao declínio das reservas energéticas armazenadas nos subsolos. Também é fato que a demanda na produção de alimentos continua em ascensão devido ao contínuo aumento populacional, principalmente nos países de menor renda per capita. Diante desse cenário alarmante, o cultivo da cana-de-açúcar pode auxiliar para a contenção do quadro exposto. Primeiramente, por ter como um dos principais produtos de sua industrialização o álcool, combustível que emite menor quantidade de monóxido de carbono à atmosfera, em comparação aos obtidos de petróleo (BERMANN, 2008), além de ter caráter renovável. Segundo, que a partir da queima do bagaço, um subproduto rico em fibras naturais, é possível a geração de energia elétrica, de tal magnitude que a agroindústria pode ter a capacidade de não apenas suprir sua total demanda, mas também comercializar o excedente, abastecendo regiões adjacentes. E finalmente, a produção do açúcar, alimento energético e fundamental na dieta da humanidade.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e é visto mundialmente como o grande expoente na tecnologia de produção de agroenergia, devendo aumentar muito suas exportações nesse setor nos próximos anos (MELLO et al., 2006). Para isso, uma série de novas unidades industriais estão sendo construídas em várias regiões do País, aumentando muito a área cultivada com cana-de-açúcar. Todavia, aumento na produtividade, redução de custos e sustentabilidade da produção é o grande desafio da pesquisa nacional.

A adubação nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar é uma operação necessária, já que a produtividade desta cultura responde à elevação dos teores de N do solo, principalmente, na cana-soca. Sabe-se, entretanto que o emprego de fontes minerais de N é uma operação extremamente onerosa (SUMAN et al., 2008). O principal fertilizante mineral utilizado na cultura da cana-de-açúcar, a ureia, apresenta problema de volatilidade, necessitando ser incorporada para a diminuição de perdas (PRAMMANEE; SAFFIGNA; WOOD, 1989; DENMEAD et al., 1990; CANTARELLA et al., 1999). No entanto, com o advento da colheita sem queima, designada de cultivo de cana-crua, a densa camada de palha que pode ficar sobre a superfície do solo dificulta muito a operação de incorporação da uréia, e pode reduzir drasticamente a eficiência dessa adubação.

Sabe-se que esta cultura é capaz de se associar com uma diversidade de bactérias diazotróficas e obter contribuições efetivas do processo de redução do nitrogênio atmosférico (BODDEY et al., 2001). Uma das espécies de bactérias diazotróficas que vêm sendo estudadas com resultados extremamente promissores é a *Herbaspirillum seropedicae*. Essa bactéria endofítica é encontrada em grandes populações nos tecidos da cana-de-açúcar, sendo capaz de fixar N atmosférico em locais com altas concentrações de sacarose e pH variando de 5,3 a 8,0 (BALDANI et al., 1986; BODDEY et al., 1995; OLIVARES et al., 1996). A otimização e a aplicação prática desse processo natural está sendo estudada em algumas instituições nacionais de pesquisa, com resultados já bastante promissores. Algumas espécies de bactérias já foram identificadas e isoladas de áreas de produção de cana-de-açúcar no Brasil, e a tecnologia de inoculação desses micro-organismos nos toletes de cana-de-açúcar já se encontra em fase adiantada.

A presença de plantas daninhas em lavouras de cana-de-açúcar pode causar perdas na produtividade de colmos e de açúcar, decréscimo da longevidade do canavial, dificuldade e aumento no custo da colheita, queda na qualidade industrial da matéria prima, servir de abrigo para pragas e doenças da cana-de-açúcar e causar depreciação no valor da terra. Dentre os métodos de controle das plantas daninhas sobressai no Brasil o controle químico, devido, principalmente, ao rendimento operacional e ao custo por área, comparado aos demais métodos. Todavia, a aplicação de herbicidas, dependendo do princípio ativo ou da formulação, da dose utilizada, dos micro-organismos presentes e da sensibilidade destes aos diversos produtos, das condições climáticas e do tipo de solo, pode trazer consequências indesejáveis para a microbiota do solo (ROYUELA et al., 1998). Kuklinsky-Sobral et al. (2005) afirmam que o herbicida glyphosate pode induzir a mudanças na comunidade bacteriana endofítica de algumas plantas. Além disso, o glyphosate pode inibir a síntese de proteínas resultantes da via do

chiquimato em bactérias e fungos (BENTLEY, 1990; FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997), e um dos surfactantes, o polyoxyethylene tallow amine, presente na formulação do produto comercial utilizado, foi tóxico a algumas espécies de bactérias e protozoários (TSUI; CHU, 2003). O metabólito 2-Ethyl-6-methylaniline resultante da degradação do herbicida metolachlor foi, aproximadamente, seis vezes mais tóxico a bactéria *Vibrio fischeri* do que o próprio princípio ativo (OSANO et al., 2002). Andaló et al. (2004) constataram que os herbicidas oxyfluorfen, diuron, 2,4-D, simazine + ametryne e acetochlor foram altamente tóxicos ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, enquanto que o glyphosate foi considerado moderadamente tóxico a esse micro-organismo.

Decorrente desse cenário o objetivo do trabalho foi identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento, ou que não causem prejuízos a capacidade de FBN da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.

Material e Métodos

Preparo do inóculo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju-SE. A estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) utilizada neste estudo foi obtida da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

As células foram ativadas em 10 mL de meio líquido DIGs, cuja formulação, em g L⁻¹ de água destilada, é a seguinte: glicose, 2,0; ácido málico, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; e ácido glutâmico, 1,5, pH 6,0. A cultura foi incubada a 25°C por 24 h, quando a densidade ótica (DO_{450nm}) atingiu aproximadamente 0,7. Este mesmo procedimento de ativação das bactérias foi utilizado para a preparação do inóculo em todos os ensaios descritos abaixo.

Efeito de doses comerciais de herbicidas sobre o crescimento de H. seropedicae

Dezoito herbicidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil foram avaliados (Tabela 1) no delineamento inteiramente casualizado quanto ao impacto sobre o crescimento e a fixação biológica de nitrogênio de *Herbaspirillum seropedicae* em condições de laboratório. Soluções estoques dos

herbicidas foram preparadas com água destilada e filtrada através de membranas Millipore com poros de 0,22 µm. As concentrações dos herbicidas nas soluções estoques foram determinadas de modo que a adição de 200 µL destas ao volume final de meio de cultura utilizado nos diferentes ensaios resultasse nas concentrações previamente estabelecidas para cada tratamento.

Tabela 1. Lista de herbicidas avaliados no presente estudo.

Nome comum	Marca comercial	Dose (g ha ⁻¹)	Grupo químico	Modo de ação
paraquat	Gramoxone 200®	600	Bipiridílios	Inibição do fotossistema I
ametryne	Gesapax®	4.000	Triazinas	Inibição do fotossistema II
tebuthiuron	Spike 500®	1.200	Derivados da ureia	Inibição do fotossistema II
amicarbazone	Dinamic®	1.400	Triazolinonas	Inibição do fotossistema II
diuron	Herburon 500 BR®	3.200	Derivados da ureia	Inibição do fotossistema II
metribuzin	Sencor 480®	1.920	Triazinonas	Inibição do fotossistema II + Inibição do fotossistema II
hexazinone + diuron	Velpar K WG®	396 + 1.404	Triazinonas + Derivados da ureia	Inibição do fotossistema II + Inibição da biossíntese de carotenóides (local de ação desconhecido)
hexazinone + clomazone	Discover 500 WP®	250 + 1.000	Triazinonas + Isoxazolidinonas	Inibição da biossíntese de carotenóides (local de ação desconhecido)
clomazone	Gamit®	1.100	Isoxazolidinonas	Inibição da 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase (4-HPPD)
isoxaflutole	Provence 750 WG®	262,5	Isoxazole	Inibição da protoporphyrinogen oxidase (PPO)
sulfentrazone	Boral 500 SC®	800	Triazolinonas	Inibição da protoporphyrinogen oxidase (PPO)
oxyfluorfen	Goal BR®	1.200	Difenileteres	Inibição da acetolactate synthase (ALS)
imazapic	Plateau®	245	Imidazolinonas	Inibição da acetolactate synthase (ALS)
imazapyr	Contain®	500	Imidazolinonas	Inibição da acetolactate synthase (ALS) + Inibição do fotossistema II

continua

continuação

trifloxysulfuron sodium + ametryne	Krismat®	37 + 1.463	Sulfonilureas + Triazinas	Inibição da divisão celular
glyphosate	Roundup®	1.800	Derivados da Glicina	Inibição da EPSP synthase
MSMA	MSMA Sanachem 720 SL®	2.880	Organoarsenicais	Desconhecido
2,4-D	Aminol 806®	1.005	Derivados do ácido ariloxialcanóico	Mimetizador de auxinas

Fonte: Elaboração dos autores.

O efeito de doses comerciais de herbicidas sobre os parâmetros de crescimento de *H. seropedicae* foi avaliado pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DIGs misturados com os herbicidas e incubados por 33 h. Detalhes deste procedimento são descritos a seguir.

Um volume de 200 µL das soluções herbicidas filtradas foi adicionado a Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido DIGs, de modo a atingir as concentrações comerciais recomendadas para cada produto (Tabela 1). Frascos controle receberam 200 µL de água destilada filtrada através de membrana Millipore. Os frascos foram inoculados com 40 µL de uma cultura de *H. seropedicae* ativa ($DO_{450nm} = 0,6$). Após inoculação, os frascos foram rapidamente agitados e o conteúdo dos mesmos vertido em placas de petri estéreis. Aliquotas de 200 µL destas misturas foram transferidas para microplacas de 96 poços utilizando-se uma micropipeta de oito canais, de modo que cada coluna da placa (8 poços) recebesse um tratamento herbicida diferente. Uma das colunas de poços foi preenchida com meio DIGs estéril para verificar a possível ocorrência de contaminação da microplaca durante as leituras de DO ao longo do período dos ensaios. As placas foram incubadas a 32°C, no escuro, e as leituras de DO realizadas em intervalos regulares em um leitor de microplacas,

ajustado no comprimento de ondas de 450 nm. Com os resultados das leituras foram traçadas curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação, para os diferentes tratamentos.

O comprimento da fase lag foi estimado como o tempo no qual o ln (DO) da fase lag equivaleu à média do ln (DO) das três primeiras leituras de DO, quando as células encontravam-se indubitavelmente em fase lag. Matematicamente, o comprimento da fase lag (t_{lag}) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$t_{lag} = \frac{[(\ln DO_{lag}) - a]}{b}$$

onde $\ln DO_{lag}$ corresponde ao ln da média das três primeiras leituras de DO, e “a” e “b” ao intercepto e à inclinação da equação ajustada para o ln de DO na fase log em função do tempo de incubação. Os valores de g e t_{lag} foram estimados para cada uma das oito repetições separadamente.

O tempo de geração de *H. seropedicae* exposta aos diferentes herbicidas foi calculado após transformação dos dados de DO em ln(DO). Para estes cálculos um mínimo de cinco leituras de DO, tomadas do meio da fase log, foram consideradas.

As médias de cada tratamento herbicida foram comparadas à do tratamento controle (sem herbicida) pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Efeito de doses comerciais de herbicidas sobre a atividade de nitrogenase de H. seropedicae

Os herbicidas foram testados no delineamento inteiramente casualizado quanto ao impacto na atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* quando esta foi cultivada em meio semi-sólido JNFb livre de N (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Alíquotas de 20 µL de uma cultura de *H. seropedicae* crescida sob agitação por 24 h em meio DIGs líquido (DO = 0,7) foram utilizadas para inocular frascos de 50 mL contendo 25 mL do meio semi-sólido com as diferentes concentrações de herbicidas a serem testadas. Os herbicidas foram adicionados ao meio semi-sólido utilizando-se 200 µL de soluções estoques de herbicidas esterilizadas por filtração. Estas soluções foram preparadas de modo que a adição de 200 µL destas a 25 ml de meio semi-sólido resultasse nas concentrações finais dos produtos determinada para cada tratamento (Tabela 1). Nos frascos utilizados como controle, adicionaram-se 200 µL de água destilada esterilizada por filtração em membrana Millipore com poros de 0,22 µm de diâmetro. Quatro frascos foram preparados para cada tratamento. Os frascos foram fechados com tampão de algodão e incubados por 24 h, a 32°C no escuro. Após este período uma película bem desenvolvida foi observada na subsuperfície de todos os frascos controle. Cada frasco foi então fechado com um septo de borracha, sendo 10% da atmosfera dos mesmos (2,5 mL) substituída por acetileno de alta pureza através de uma seringa hipodérmica (HAAHTELA et al., 1981).

A produção de etileno foi determinada após 12 h de incubação a 32°C, no escuro. Tubos sem acetileno foram também incluídos para a quantificação do etileno endógeno. Em seguida, para a determinação de etileno, 100 µL de amostra gasosa da atmosfera dos frascos foi injetado em um cromatógrafo a gás (Perkin-Elmer, Clarus 500) com um detector de ionização de chamas (FID) e uma coluna capilar com fase estacionária GS-CarbonPLOT (Agilent J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA). As temperaturas de operação da coluna, do injetor e do detector foram

100°C, 150°C e 180°C, respectivamente. Nitrogênio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1,8 mL min⁻¹. A atividade da nitrogenase foi calculada em nmoles de etileno produzido por frasco por hora. Os efeitos dos herbicidas sobre a atividade de redução do acetileno (ARA) foram comparados ao tratamento controle pelo teste de Dunnett (p < 0,05). As eventuais porcentagens de inibição causadas pelos herbicidas foram calculadas.

Intensidade de inibição da atividade de nitrogenase por diferentes doses do herbicida glyphosate

O herbicida glyphosate, cuja dose comercial apresentou efeito significativo sobre a atividade de nitrogenase de *H. seropedicae*, foi posteriormente avaliado para determinação da concentração requerida para inibir 50% da atividade nitrogenase (CI_{50at}).

Os procedimentos utilizados para esse ensaio foram os mesmos descritos para o ensaio anterior, exceto que cinco doses deste herbicida foram testadas (0, 90, 270, 540 e 1.080 g ha⁻¹) no delineamento inteiramente casualizado.

Utilizou-se análise de regressão para avaliar a resposta da atividade da nitrogenase ao incremento das doses do herbicida glyphosate.

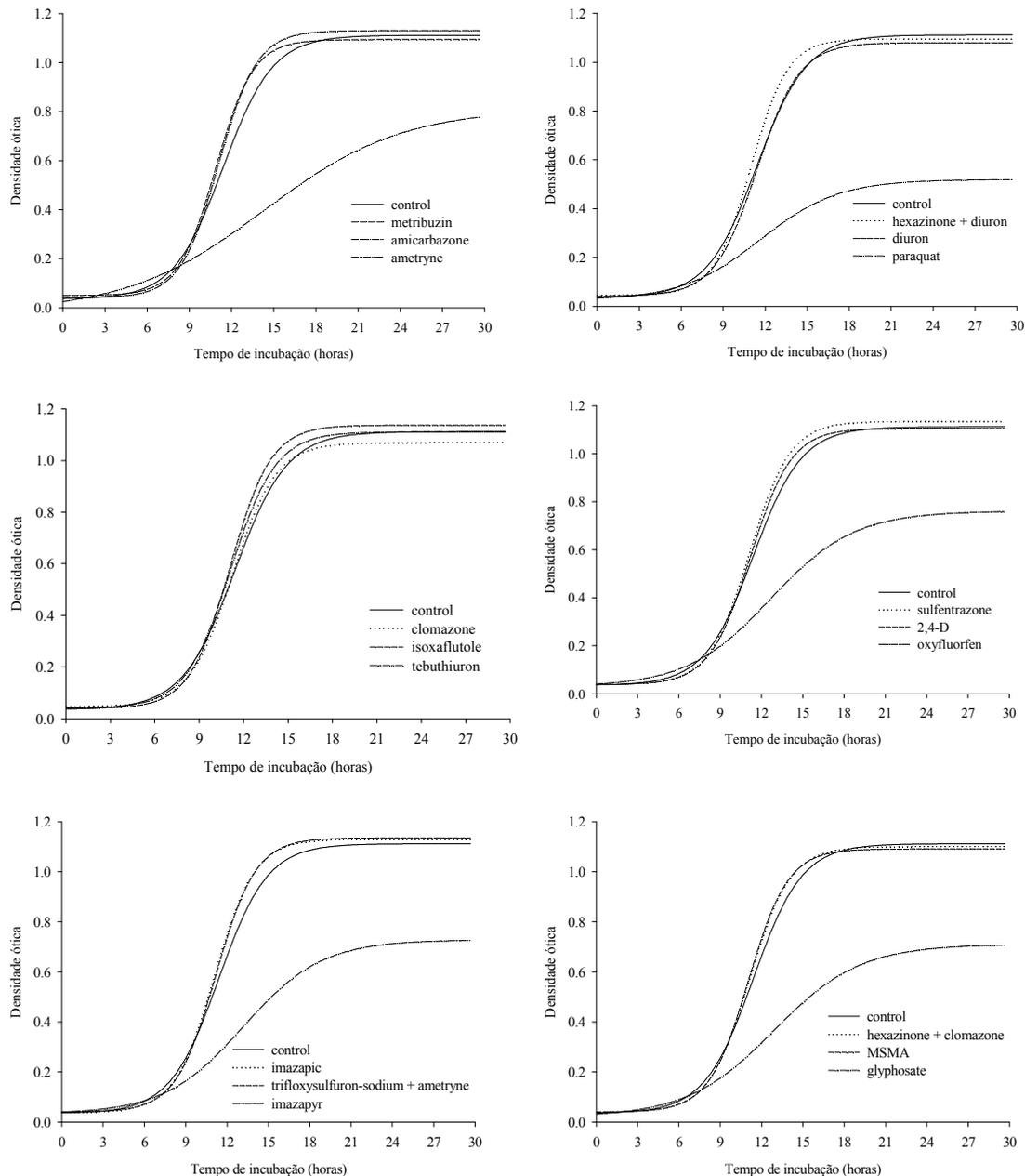
Resultados e Discussão

A curva de crescimento, baseada no aumento da densidade ótica, da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* sob o efeito de todos os tratamentos avaliados é visualizada na Figura 1, sendo as equações, que representam os modelos sigmoidal de regressão, apresentadas na Tabela 2. Observa-se que as curvas de crescimento da bactéria em meio de cultura contendo os herbicidas amicarbazone, tebuthiuron, diuron, metribuzin, [hexazinone + diuron], [hexazinone + clomazone], clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, imazapic, [trifloxysulfuron sodium + ametryne], MSMA

e 2,4-D nas suas respectivas doses comerciais ficaram muito próximas à curva confeccionada quando a bactéria cresceu em meio isento de herbicidas. Gallori et al. (1991) constataram que

os herbicidas 2,4-D, alachlor, atrazine, butylate, EPTC e glyphosate não afetaram o crescimento de *Azospirillum brasilense*, mesmo quando aplicados em doses elevadas.

Figura 1. Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.



Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 2. Equações de regressões expressando o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

Tratamento herbicida	$\hat{Y}=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$	R ²
testemunha	$\hat{Y}=0,0358+1,0756/(1+\exp(-(x-11,4073)/ 1,7722))$	0,99
metribuzin	$\hat{Y}=0,0495+1,0444/(1+\exp(-(x-10,8956)/ 1,3277))$	0,99
amicarbazone	$\hat{Y}=0,0405+1,0902/(1+\exp(-(x-11,0822)/ 1,3657))$	0,99
ametryne	$\hat{Y}=-0,0175+0,8307/(1+\exp(-(x-14,3215)/ 4,9173))$	0,99
hexazinone + diuron	$\hat{Y}=0,0454+1,0502/(1+\exp(-(x-10,9671)/ 1,3162))$	0,99
diuron	$\hat{Y}=0,0412+1,0387/(1+\exp(-(x-11,4244)/ 1,5255))$	0,99
paraquat	$\hat{Y}=0,0249+0,4945/(1+\exp(-(x-11,6323)/ 2,7978))$	0,99
clomazone	$\hat{Y}=0,0474+1,0217/(1+\exp(-(x-11,2484)/ 1,4667))$	0,99
isoxaflutole	$\hat{Y}=0,0396+1,0969/(1+\exp(-(x-11,0967)/ 1,3828))$	0,99
tebuthiuron	$\hat{Y}=0,0408+1,0702/(1+\exp(-(x-11,1157)/ 1,5352))$	0,99
s-metolachlor	$\hat{Y}=0,0214+0,9315/(1+\exp(-(x-12,6171)/ 2,5876))$	0,99
sulfentrazone	$\hat{Y}=0,0384+1,0960/(1+\exp(-(x-11,1193)/ 1,4789))$	0,99
2,4-D	$\hat{Y}=0,0382+1,0666/(1+\exp(-(x-11,2129)/ 1,4909))$	0,99
oxyfluorfen	$\hat{Y}=0,0294+0,7317/(1+\exp(-(x-12,6557)/ 3,0406))$	0,99
imazapic	$\hat{Y}=0,0373+1,0920/(1+\exp(-(x-11,0640)/ 1,4564))$	0,99
trifloxysulfuron-sodium + ametryne	$\hat{Y}=0,0412+1,0937/(1+\exp(-(x-11,1985)/ 1,4493))$	0,99
imazapyr	$\hat{Y}=0,0334+0,6945/(1+\exp(-(x-13,1628)/ 2,8610))$	0,99
hexazinone + clomazone	$\hat{Y}=0,0406+1,0599/(1+\exp(-(x-11,1156)/ 1,4807))$	0,99
MSMA	$\hat{Y}=0,0406+1,0503/(1+\exp(-(x-11,0573)/ 1,4398))$	0,99
glyphosate	$\hat{Y}=0,0217+0,6882/(1+\exp(-(x-12,8957)/ 3,1325))$	0,99

Fonte: Elaboração dos autores.

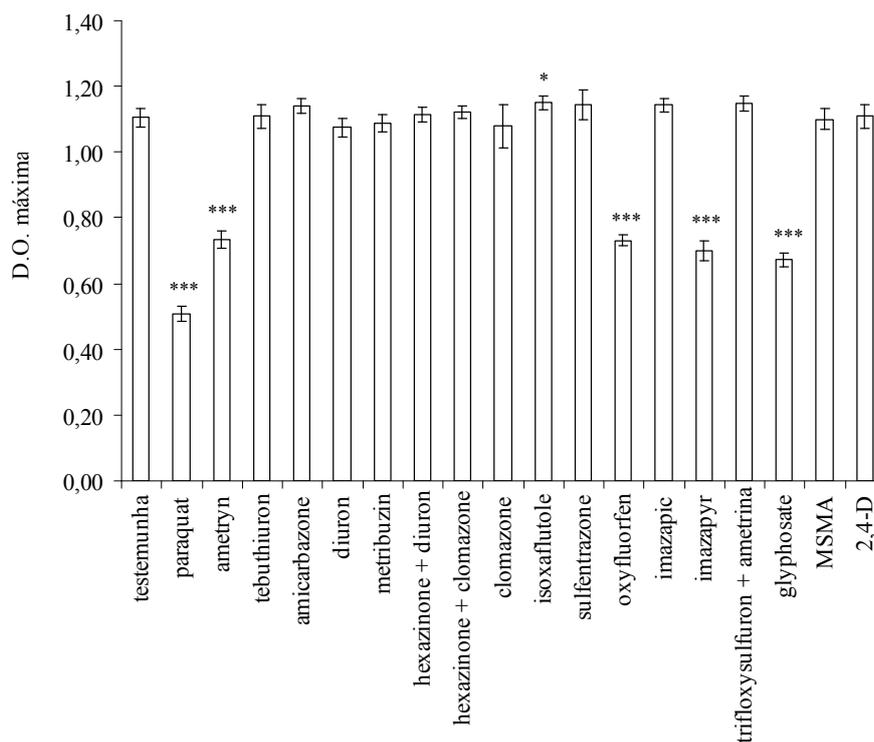
Os tratamentos contendo os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen inibiram significativamente o crescimento de *H. seropedicae* (Figura 1 e Tabela 2). Santos et al. (2006), avaliando a toxicidade de diversos herbicidas a duas estirpes de *Rhizobium tropici*, observaram que o paraquat foi o produto que promoveu maior inibição do crescimento das estirpes.

Embora a avaliação de crescimento tenha sido realizada por 33 h de incubação, o crescimento final máximo de *H. seropedicae*, medido pela densidade ótica máxima (DO máxima) a 450 nm, foi atingido entre 15 e 20 h, para todos os tratamentos. Este crescimento foi reduzido por apenas cinco dos 18 herbicidas testados na dose comercial: paraquat, ametryne, oxyfluorfen, imazapyr e glyphosate (Figura 2), os mesmos que já haviam alterado a curva de crescimento dessa diazotrófica. Três mecanismos potencialmente associados a esses decréscimos na DO máxima foram antevistos: (i) aumento da duração da fase lag, (ii) aumento do tempo de

geração e (iii) redução da eficiência de utilização de C e energia do meio de cultura para o crescimento bacteriano. Destes mecanismos, os dois primeiros foram testados pela estimativa do tempo de duração da fase lag e do tempo de geração. Madhaiyan et al. (2006) observaram que o herbicida 2,4-D reduziu em 50% o crescimento de *G. diazotrophicus*, quando foi adicionado ao meio na concentração de 22 mg L⁻¹. Nemes-Kósa e Cserháti (1995) não detectaram nenhum efeito tóxico do herbicida diuron sobre a espécie *Azotobacter chroococcum*.

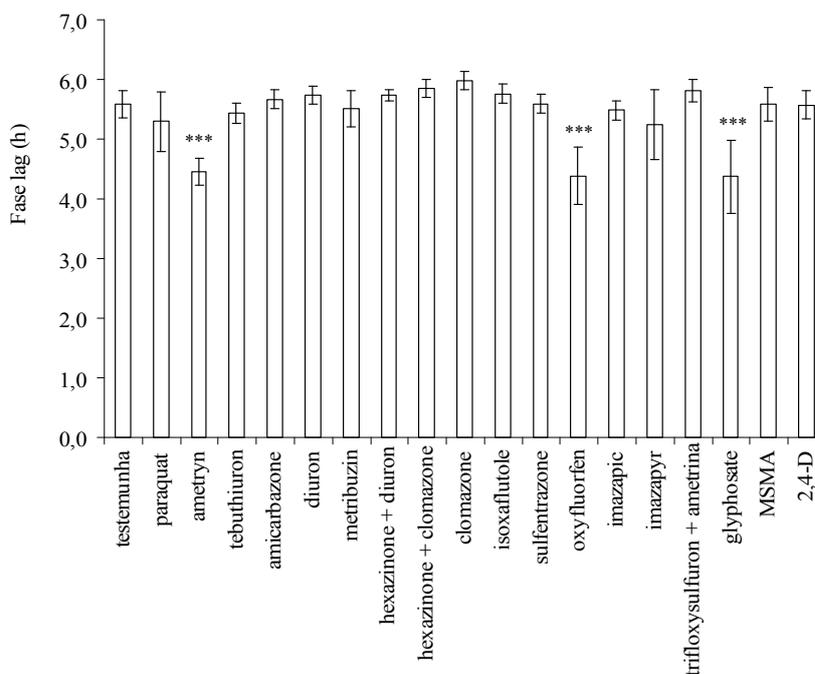
Ao contrário do esperado, três dos cinco herbicidas que impactaram negativamente o crescimento final máximo de *H. seropedicae* (ametryne, oxyfluorfen e glyphosate) apresentaram uma redução de cerca de 1 h na fase lag, comparativamente ao controle sem herbicida (Figura 3). É importante ressaltar que a fase lag representa um período inicial de adaptação da bactéria ao meio antes do início da sua fase de crescimento.

Figura 2. Crescimento máximo da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. *Significativo a 5% pelo teste de Dunnett. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett.



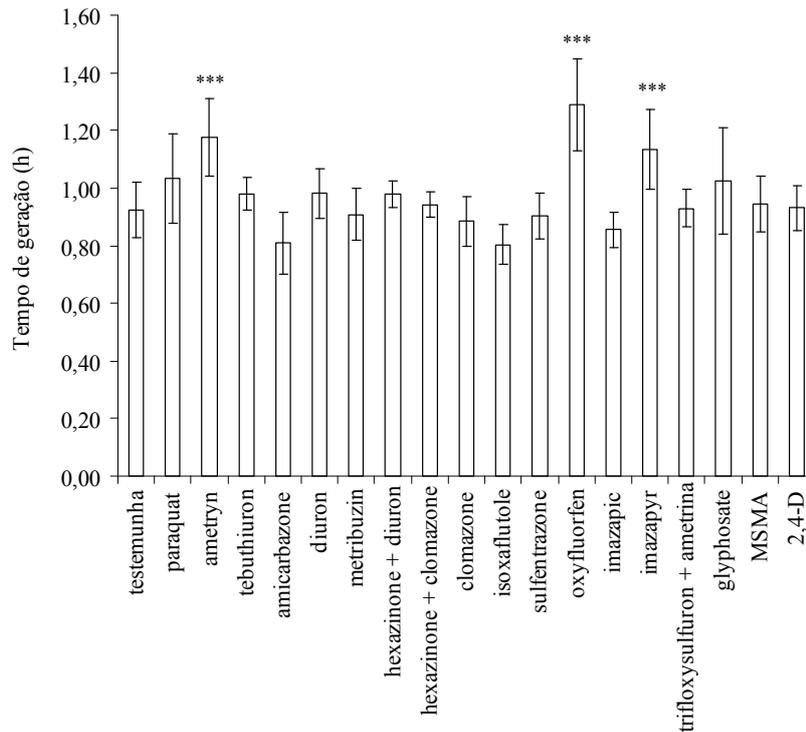
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 3. Duração da fase lag de *Herbaspirillum seropedicae* em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett.



Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 4. Tempo de geração de *Herbaspirillum seropedicae* em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett.



Fonte: Elaboração dos autores.

Os herbicidas oxyfluorfen, ametryne e imazapyr reduziram a velocidade de crescimento de *H. seropedicae*, o que foi evidenciado pelo aumento dos tempos de geração desta bactéria para valores médios de 64, 70 e 61 min, respectivamente (Figura 4). Comparativamente, o tempo de geração médio para *H. seropedicae* em meio DIGs sem adição de herbicidas foi de 54 min. Das e Debnath (2006) observaram que a aplicação do herbicida oxyfluorfen em solo rizosférico em área cultivada com arroz ocasionou aumento de 42,8% na população de micro-organismos fixadores de N aeróbios não-simbióticos com consequente aumento de 37,5% na fixação de N. Os resultados observados com os herbicidas ametryne, imazapyr e oxyfluorfen não foram regras a todos os herbicidas que possuem mecanismos de ação similares, ou seja, a avaliação de toxicidade deve ser por produto e não pode ser extrapolada ao mecanismo de ação, ou mesmo ao grupo químico.

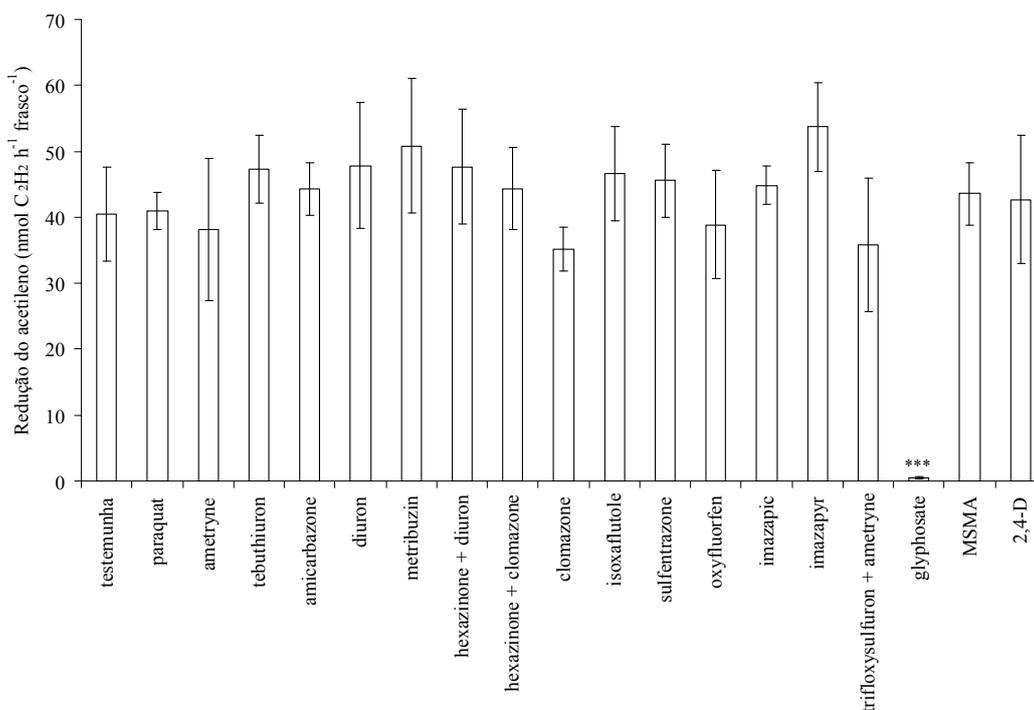
Embora os tempos de geração de *H. seropedicae* na presença de paraquat e glyphosate não tenham sido estatisticamente maiores do que no tratamento controle, observou-se uma tendência de incremento no valor deste parâmetro para estes dois herbicidas. Esta tendência pode ser determinante para o decréscimo no crescimento se considerarmos que este atraso no crescimento bacteriano acumula-se geração após geração.

É importante observar que os valores de DO máximo dos tratamentos paraquat, ametryne, oxyfluorfen, imazapyr e glyphosate não se igualaram aos máximos observados no tratamento controle, mesmo após um período prolongado de incubação. Isto indica que, além da redução na velocidade de crescimento, os recursos disponíveis no meio de cultura foram menos eficientemente usados para o crescimento bacteriano (menor coeficiente de rendimento) na presença destes cinco herbicidas

do que nos demais tratamentos. Sugere-se que o menor coeficiente de rendimento de *H. seropedicae* na presença de herbicidas paraquat, ametryne, oxyfluorfen, imazapyr e glyphosate seja derivado do custo energético requerido para manutenção

de mecanismos metabólicos que conferem esta tolerância relativa da bactéria a estes herbicidas. Os demais herbicidas não apresentaram nenhum efeito significativo sobre os parâmetros de crescimento.

Figura 5. Atividade de nitrogenase (produção de etileno) por *Herbaspirillum seropedicae* na presença de diferentes herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett.

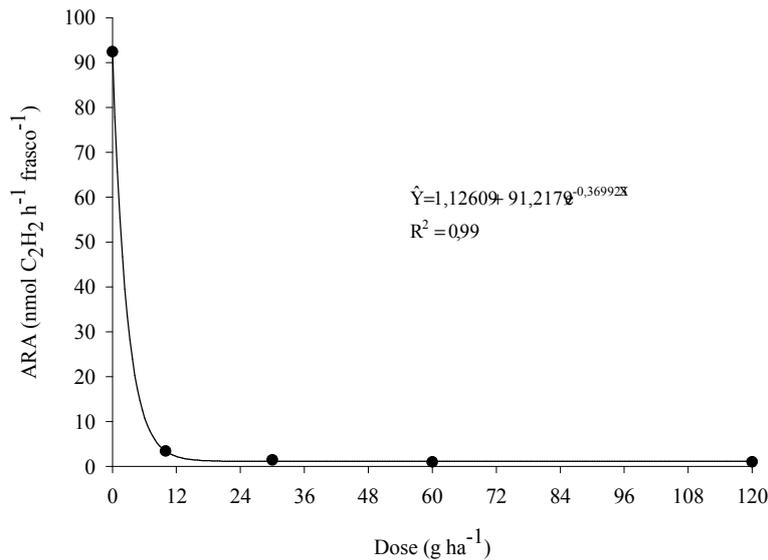


Fonte: Elaboração dos autores.

O único herbicida que prejudicou a fixação biológica de nitrogênio (FBN), quando em contato com a bactéria *H. seropedicae*, foi o glyphosate (Figura 5). A magnitude dessa redução foi extremamente drástica, pois foi necessário apenas 1,9 g ha⁻¹ de glyphosate para que 50% da FBN fosse inibida (Figura 6). Esta dose estimada pela equação de regressão é muito baixa, quando comparada com a dose normalmente aplicada desse herbicida nas diversas lavouras brasileiras, que varia de 360 a

2.520 g ha⁻¹. Este resultado foi obtido em meio de cultura (*in vitro*), onde o contato entre o herbicida e a bactéria diazotrófica é muito íntimo. Madhaiyan et al. (2006) reportaram que o herbicida 2,4-D, na sua dose recomendada, ocasionou 59,8% de redução na atividade de nitrogenase de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, enquanto que os herbicidas butachlor, alachlor e atrazine inibiram a atividade nitrogenase dessas bactérias em 22,8; 73,6 e 65,3%, respectivamente.

Figura 6. Atividade da nitrogenase (redução do acetileno a etileno) de *Herbaspirillum seropedicae* na presença de doses crescentes de glyphosate. $CI_{50} = 1,9 \text{ g ha}^{-1}$.



Fonte: Elaboração dos autores.

De acordo com Gonzalez, Gonzalez-Murua e Royuela (1996), o risco de intoxicação de herbicidas sobre os micro-organismos é maior quando os produtos inibem processos bioquímicos comuns entre as plantas e os micro-organismos. Glyphosate [(N-phosphonomethyl) glycine] é um herbicida não-seletivo que inibe a enzima 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphate synthase (EPSPS) que atua na rota do ácido chiquímico, envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos (PENAZOLA-VAZQUEZ et al., 1995). A rota do chiquimato ocorre também em micro-organismos e somente alguns grupos são capazes de utilizar o glyphosate como fonte de energia e nutrientes, consequentemente esse herbicida pode ser tóxico a vários grupos de micro-organismos (DICK; QUINN, 1995; SANTOS; FLORES, 1995; BUSSE et al., 2001). O herbicida glyphosate inibe a síntese de EPSP sintase, resultando no impedimento da produção dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (SANTOS et al., 2005). A falta desses aminoácidos pode ser a razão para a toxicidade desse herbicida verificada em alguns micro-organismos (EBERBACH; DOUGLAS, 1989).

Observa-se que o glyphosate foi o único herbicida a afetar tanto o crescimento da bactéria, como também, reduzir significativamente a FBN. Nos ensaios envolvendo a avaliação do crescimento de *H. seropedicae* o nitrogênio era fornecido no próprio meio de cultura, ou seja, a bactéria para garantir seu suprimento de compostos nitrogenados, como aminoácidos, não necessitava retirar esse elemento do ar, por meio do processo de fixação biológica. Já nos ensaios envolvendo os testes de FBN, o N não era disponibilizado no meio de cultura, obrigando as bactérias a retirar esse nutriente do ar. Decorrente desses resultados fica claro que o glyphosate além de ser tóxico à bactéria, também reduz a capacidade de nitrogenase dessa diazotrófica. Santos e Flores (1995) reportaram que quando adicionado nas doses recomendadas o herbicida glyphosate não provocou a redução do crescimento de *Azotobacter vinelandii* e de *Azotobacter chroococcum*, todavia a fixação de nitrogênio por essas bactérias foi prejudicada.

É importante salientar que os dados obtidos no presente trabalho foram decorrentes da utilização dos herbicidas na formulação comercial, ou seja, princípio ativo mais todos os demais ingredientes

da formulação, tal qual o mesmo é comercializado, e conseqüentemente, utilizado na agricultura. Conforme o “Working Group Pesticides and Beneficial Arthropods” of the “International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)”, os estudos de seletividade a organismos não-alvo devem ser conduzidos com as formulações comerciais (HASSAN et al., 2000), pois sabe-se que alguns adjuvantes reduzem a tensão superficial e facilitam a penetração do pesticida. Segundo Malkones (2000), os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem afetar os micro-organismos e, em certos casos, até modificar o efeito do agroquímico. Para Kishinevsky et al. (1988), é possível que solventes, surfatantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais de pesticidas contribuam para os efeitos inibitórios desses produtos no crescimento de rizóbios, um outro grupo de bactérias fixadoras de N. Haahtela, Kilpi e Kari (1988) testaram o glyphosate puro e na formulação comercial Roundup original sobre vários micro-organismos e observaram que as concentrações entre 25 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ afetaram significativamente o crescimento de bactérias do gênero *Enterobacter*; entretanto, houve maior intoxicação quando elas foram tratadas com a formulação comercial na maior concentração. Berner, Berggren e Snow (1991) mencionaram que aplicações de glyphosate, em formulações com ou sem surfatante, inibiram o crescimento micelial de *Calonectria crotalariae*.

Os resultados desse trabalho já são suficientes para propor que os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne e oxyfluorfen e principalmente o glyphosate sejam avaliados em nível de campo, já que a partir dos mesmos é possível afirmar que esses herbicidas são tóxicos a essa estirpe de *H. seropedicae*, mas não que essa toxicidade se refletirá em prejuízos à FBN, quando da utilização do inoculante na cultura da cana-de-açúcar.

O paraquat é utilizado na maioria das situações em jato dirigido, evitando-se o contato das gotas

aspergidas com a parte aérea das plantas de cana-de-açúcar, mas em algumas situações o paraquat vem sendo utilizado em pós-emergência em doses mais baixas que a de registro. Imazapyr é utilizado comumente na destruição química das soqueiras de cana-de-açúcar, principalmente em áreas infestadas com *Cyperus rotundus* e *Cynodon dactylum*, quando da renovação do canavial, ou seja, é aplicado meses antes do novo plantio da cultura. Todavia, esse herbicida apresenta alta persistência no solo, podendo vir a ser absorvido pelas plantas de cana-de-açúcar e entrar em contato com as bactérias diazotróficas. Ametryne e oxyfluorfen podem apresentar riscos maiores à FBN, pois são aplicados após o plantio da cultura, no caso do oxyfluorfen em pré-emergência e no do ametryne em pré ou mesmo em pós-inicial.

Em condições de campo, provavelmente, o contato entre *H. seropedicae* e o glyphosate deverá ser muito pequeno, pois esse herbicida ainda não é aplicado diretamente sobre as plantas de cana-de-açúcar por não apresentar seletividade a essa cultura. Excetuando sua utilização como maturador, todo seu uso na lavoura canavieira está centrado em aplicações dirigidas à folhagem das plantas daninhas, preservando as plantas de cana-de-açúcar. Também se ressalta que esse xenobiótico não apresenta atividade no solo, portanto não havendo a possibilidade de ser absorvido pelas raízes das plantas de cana-de-açúcar, e assim entrar em contato com as bactérias que estão colonizando o interior da planta. Talvez, uma preocupação relevante, seria no cultivo da cana-de-açúcar resistente ao glyphosate, que deve ser lançada no Brasil nos próximos cinco anos. Nesse cultivo o herbicida glyphosate será aplicado em pós-emergência da cultura. Pela sua alta taxa de absorção e de translocação (sistemicidade) suas moléculas facilmente encontrariam as bactérias diazotróficas, podendo assim causar efeitos deletérios sobre a capacidade de FBN, o que praticamente anularia os efeitos benéficos da inoculação da cultura, e a conseqüente redução da necessidade de adubação nitrogenada.

Os demais herbicidas avaliados não necessitariam desse tipo de investigação, pois testes *in vitro* mantêm o micro-organismo exposto ao máximo ao produto fitossanitário, o que não ocorre em condições de campo, já que ocorrem fatores externos que agem sobre o produto, principalmente radiação solar, deriva e ventos, amenizando a ação do princípio ativo (CAVALCANTI et al., 2002). Dessa forma, esperasse que produtos considerados compatíveis nesse tipo de teste também o sejam quando aplicados em condições de campo.

A partir de todas as informações geradas no trabalho podemos estabelecer algumas conclusões: 1) Os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen inibem o crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* *in vitro*; 2) Os herbicidas ametryne, oxyfluorfen e glyphosate ocasionam pequena redução na duração da fase lag da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*; 3) Os herbicidas oxyfluorfen, ametryne e imazapyr acarretam aumento no tempo de geração de *Herbaspirillum seropedicae*; e 4) O herbicida glyphosate promove redução drástica na fixação biológica de nitrogênio *in vitro* de *Herbaspirillum seropedicae*.

Referências

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004.

BALDANI, I. J.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BENTLEY, R. The Shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Boca Raton, v. 25, n. 5, p. 307-384, 1990.

BERMANN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 20-29, 2008.

BERNER, D. K.; BERGGREN, G. T.; SNOW, J. P. Effects of glyphosate on *Calonectria crotalariae* and red crown rot of soybean. *Plant Disease*, Sant Paul, v. 75, n. 8, p. 809-813, 1991.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 195-209, 1995.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood, v. 28, n. 9, p. 889-895, 2001.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 33, n. 12-13, p. 1777-1789, 2001.

CANTARELLA, H.; ROSSETO, R.; BARBOSA, W.; PENNA, M. J.; RESENDE, L. C. L. Perdas de nitrogênio por volatilização da amônia e resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada, em sistema de colheita de cana sem queima prévia. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., 1999, Londrina. *Anais...* Londrina: Álcool Subpr., 1999. p. 82-87.

CAVALCANTI, R. S.; MOINO JÚNIOR, A.; SOUZA G. C.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2002.

DAS, A. C.; DEBNATH, A. Effect of systemic herbicides on N₂-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere*, Oxford, v. 65, n. 6, p. 1082-1086, 2006.

DENMEAD, O. T.; FRENEY, J. R.; JACKSON, A. V.; SMITH, J. W. B.; SAFFIGNA, P. G.; WOOD, A. W.; CHAPMAN, L. S. Volatilization of ammonia from urea and ammonium sulfate applied to sugarcane trash in North Queensland. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists*, Journsville, v. 12, n. 1, p. 72-78, 1990.

- DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glifosato-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 43, n. 3, p. 545-550, 1995.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: EMBRAP/SPI; Itaguaí: Embrapa/CNPAB, 1995. 60 p.
- EBERBACH, P. L.; DOUGLAS, L. A. Herbicide effects on the growth and nodulation potencial of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 119, n. 1, p. 15-23, 1989.
- FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Glyphosate's molecular mode of action. In: FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. (Ed.). *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington, DC: American Chemical Society, 1997. p. 521-615. (ACS Monograph, 189).
- GALLORI, E.; CASALONE, E.; COLELLA, C. M.; DALY, S.; POLSINELLI, M. 1,8-Naphthalic anhydride antidote enhances the toxic effects of captan end thiram fungicides on *Azospirillum brasilense* cells. *Research in Microbiology*, Paris, v. 142, n. 9, p. 1005-1012, 1991.
- GONZALEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). *Weed Science*, Champaign, v. 44, n. 1, p. 31-37, 1996.
- HAAHTELA, K.; KILPI, S.; KARI, K. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 123-127, 1988.
- HAAHTELA, K.; WARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V.; SKUJINS, J. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 41, n. 1, p. 203-206, 1981.
- HASSAN, S. A.; HALSALL, N.; GRAY, A. P.; KUEHNER, C.; MOLL, M.; BAKKER, F. M.; ROEMBKE, J.; YOUSEF, A.; NASR, F.; ABDELGADER, H. A laboratory method to evaluate the side effects of plant protection products on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). In: CANDOLFI, M. P.; BLÜMEL, S.; FORSTER, R.; BAKKER, F. M.; GRIMM, C.; HASSAN, S. A.; HEIMBACH, U.; MEAD-BRIGGS, M. A.; REBER, B.; SCHMUCK, R.; VOGT, H. (Ed.). *Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods*. Reinheim: IOBC/WPRS, 2000. p. 107-119.
- KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N.; GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. *Weed Research*, Oxford, v. 28, n. 4, p. 291-296, 1988.
- KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 273, n. 1-2, p. 91-99, 2005.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, V. S.; SA, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, San Diego, v. 84, n. 1, p. 143-154, 2006.
- MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Braunschweig, v. 8, n. 6, p. 781-789, 2000.
- MELLO, S. Q. S.; FRANÇA, A. F. S.; LIMA, M. L. M.; RIBEIRO, D. S.; MIYAGI, E. S.; REIS, J. G. Parâmetros do valor nutritivo de nove variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 7, n. 4, p. 373-380, 2006.
- NEMES-KÓSA, S.; CSERHÁTI, T. Quantitative structure-activity relationship study on the inhibitory effect of some herbicides on the growth of soil microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 79, n. 5, p. 483-491, 1995.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly in gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Firenze, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.
- OSANO, O.; ADMIRAAL, W.; KLAMER, H. J. C.; PASTOR, D.; BLEEKER, E. A. J. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*, Barking, v. 119, n. 2, p. 195-202, 2002.
- PENAZOLA-VAZQUEZ, A.; MENA, G. L.; HERRERA-ESTRELLA, L.; BAILEY, A. M. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, n. 2, p. 538-543, 1995.

- PRAMMANEE, P.; SAFFIGNA, P. G.; WOOD, A. W. Loss of nitrogen from urea and ammonium sulfate applied to sugar cane crop residues. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS. 11., 1989, Mackay. *Proceedings...* Mackay: Watson Ferguson, 1989. p. 76-84.
- ROYUELA, M.; GONZALEZ, A.; ARRESE-IGOR, C.; APARICIO-TEJO, P. M.; GONZALEZ-MURUA, C. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. *Pesticide Science*, Hoboken, v. 52, n. 4, p. 372-380, 1998.
- SANTOS, A.; FLORES, M. effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 20, n. 6, p. 349-352, 1995.
- SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. *Crop Protection*, Guildford, v. 24, n. 6, p. 543-547, 2005.
- SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E. A. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 457-465, 2006.
- SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R. L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2008.
- TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, Oxford, v. 52, n. 7, p. 1189-1197, 2003.