

EFEITOS DE DIFERENTES FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLYPHOSATE SOBRE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*¹

Effects of Different Glyphosate Commercial Formulations on Bradyrhizobium Strains

SANTOS, J.B.², JACQUES, R.J.S.³, PROCÓPIO, S.O.⁴, KASUYA, M.C.M.⁵, SILVA, A.A.⁶ e SANTOS, E.A.⁷

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos de formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*, em condições de laboratório. As formulações foram aplicadas na concentração de 43,2 µg L⁻¹ do equivalente ácido. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura (YM). O efeito do herbicida no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* foi avaliado mediante leitura da densidade ótica em espectrofotômetro. Avaliou-se o crescimento das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e de *B. elkanii* SEMIA 5019 e SEMIA 587 sob efeito de nove formulações de glyphosate: Zapp Qi®, Roundup®, Roundup Multiação®, Roundup Transorb®, Roundup WG®, Trop®, Agrisato®, glyphosate técnico [padrão de N-(phosphonomethyl) glycina] e controle sem adição de herbicida (testemunha para as estirpes). Foram utilizadas seis repetições. Confeccionaram-se curvas de crescimento para cada estirpe. Pelos resultados, pôde-se observar que todas as formulações de glyphosate causaram efeitos diferenciados sobre as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587. Constatou-se que a formulação Zapp Qi foi a menos tóxica às estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas. A maior toxicidade foi observada para Roundup Transorb, que provocou reduções no crescimento acima de 94% para todas as estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas. Não se observou correlação entre o tipo de sal – isopropilamina, amônio ou potássico, presentes na formulação herbicida – e o grau de inibição no crescimento das estirpes. SEMIA 587 foi a estirpe menos tolerante à maioria das formulações testadas, porém SEMIA 5019 foi a mais sensível ao glyphosate padrão, sem adição de sais ou de outros aditivos.

Palavras-chave: fixação biológica de N₂, herbicida, rizóbio, soja transgênica.

ABSTRACT - This work aimed to evaluate the effects of glyphosate commercial formulations on *Bradyrhizobium* strains under laboratory conditions. The formulations were applied in the concentration of 43.2 µg L⁻¹ of the a.e. and the strains were inoculated in yeast extract manitol (YM). Herbicide effect on the growth of the *Bradyrhizobium* strains was assessed by optic density reading in a spectrophotometer. Twenty seven treatments arranged in a factorial design were evaluated and consisted of one strain of *B. japonicum*: SEMIA 5079; and two strains of *B. elkanii*: SEMIA 5019 and SEMIA 587, under the effect of nine glyphosate formulations: Zapp Qi®, Roundup®, Roundup Multiação®, Roundup Transorb®, Roundup WG®, Trop®, Agrisato®, technical glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] and control without herbicide addition (as the strain control treatment), with six replications. A growth curve was established for each strain. It could be observed that the different glyphosate formulations Zapp Qi, Roundup, Roundup Multiação, Roundup transorb, Roundup WG, Trop and Agrisato caused differentiated effects on the strains of *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 and SEMIA 587. It was verified that the Zapp Qi formulation was the least toxic to the strains. The highest toxicity was observed for Roundup Transorb, which reduced growth over 94% for all the strains assessed. Correlation was not

¹ Recebido para publicação em 14.5.2003 e na forma revisada em 5.3.2004.

² Mestrando, Dep. de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, 36570-000 Viçosa-MG, <jbarbosasantos@yahoo.com.br>.

³ Doutorando, Dep. de Solos – UFRGS, <rjsjacques@zipmail.com.br>. ⁴ Prof. do Dep. de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, 96010-900 Pelotas-RS; ⁵ Professora, Dep. de Microbiologia – UFV, <mkasuya@ufv.br>; ⁶ Professor, Dep. de Fitotecnia – UFV, <aasilva@ufv.br>; ⁷ Acadêmico de Agronomia, Dep. de Fitotecnia – UFV.



observed among the type of salt, isopropylamine, ammonium or potassic, present in the formulation herbicides, and the toxicity degree to the strains. The strain SEMIA 587 was the least tolerant to most formulations while SEMIA 5019 was the most sensitive to the control treatment N-(phosphonomethyl) glycine, without salts or other additives.

Key words: biological fixation of N₂, herbicide, *rhizobium*, transgenic soybean.

INTRODUÇÃO

O glyphosate é o herbicida de maior participação no mercado mundial de herbicidas, caracterizando-se pelo amplo espectro de ação e por não ser seletivo à cultura da soja. Existem, atualmente, mais de 90 marcas comerciais com esse ingrediente ativo no mundo (Heap, 1997). No entanto, esse herbicida poderá ser utilizado no Brasil diretamente na cultura da soja, caso haja introdução de cultivares resistentes a essas moléculas. Por inibir a síntese da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), a molécula de glyphosate bloqueia a síntese de aminoácidos aromáticos. Cultivares de soja resistentes ao glyphosate contêm a enzima EPSPs insensível ao herbicida, todavia as bactérias fixadoras de N₂, associadas ao sistema radicular da soja, do gênero *Bradyrhizobium*, não apresentam essa insensibilidade enzimática, podendo o glyphosate interferir na interação simbiótica. Segundo Gonzalez et al. (1996), o risco de intoxicação de herbicidas sobre os microrganismos é maior quando os produtos inibem processos bioquímicos comuns entre as plantas e os microrganismos.

Em outros países, foi constatado que o glyphosate provocou intoxicação em estirpes de rizóbios ou prejudicou a nodulação de leguminosas, inclusive da soja (Mallik & Tesfai, 1985; Schuls et al., 1985; Eberbach & Douglas, 1989; Moorman et al., 1992; Haugland, 1994; Hernandez et al., 1999; King et al., 2001). Entretanto, em razão da grande variabilidade nas respostas de estirpes de rizóbio à presença de herbicidas (Kapusta & Rouwenhorst, 1973; Alagavadi & Reddy, 1986; Kishinevsky et al., 1988; Delanay et al., 1995), é importante avaliar a natureza e a intensidade de resposta das principais estirpes utilizadas no Brasil.

Segundo Malkones (2000), os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem

afetar os microrganismos e, em certos casos, até modificar o efeito do agroquímico, porém poucos trabalhos foram realizados sobre o assunto. Berner et al. (1991) mencionaram que aplicações de glyphosate, em formulações com ou sem surfatante, inibiram o crescimento micelial de *Calonectria crotalariae*.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a toxicidade das principais formulações de glyphosate comercializadas no Brasil sobre três estirpes comerciais do gênero *Bradyrhizobium*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Associações Biológicas (FBN)/BIOAGRO, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

As soluções-estoque das formulações de glyphosate foram preparadas mediante a mistura do produto comercial com água destilada e deionizada, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore 0,25 µm) em condições assépticas.

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em frascos de ágar inclinado com meio à base de extrato de levedura e manitol como fonte de carbono, meio YM, composto, em g L⁻¹, por: manitol, 10; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15; e pH ajustado em 6,8, à temperatura de 4 °C. A ativação das estirpes foi feita mediante inoculação em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio YM líquido, e incubação em agitador rotatório a 125 rpm e temperatura de 25 °C. Uma alíquota de 15 µL das estirpes ativadas foi inoculada em placas de ELISA de 96 células com capacidade volumétrica de 300 µL, contendo a mistura estéril

Tabela 1 - Formulações, fabricante e composição dos produtos comerciais de glyphosate utilizados

Formulações comerciais*	Fabricante	Composição	Formulação (expressa em equivalente ácido)
Agrisato	Alkagro	Sal de isopropilamina	Concentrado solúvel (360 g L ⁻¹)
Roundup (original)	Monsanto	Sal de isopropilamina	Concentrado solúvel (360 g L ⁻¹)
Roundup Multiação	Monsanto	Sal de amônio	Grânulos autodispersíveis em água (720 g kg ⁻¹)
Roundup Transorb	Monsanto	Sal de isopropilamina	Concentrado solúvel (480 g L ⁻¹)
Roundup WG	Monsanto	Sal de amônio	Grânulos autodispersíveis em água (720 g kg ⁻¹)
Trop	Milênia	Sal de isopropilamina	Concentrado solúvel (360 g L ⁻¹)
Zapp Qi	Syngenta	Sal potássico	Concentrado solúvel (500 g L ⁻¹)

* Marca registrada do fabricante ®.

de 180 µL de meio YM líquido (1,33 vez concentrado) e 60 µL da solução do herbicida, para cada tratamento, sendo imediatamente colocadas em câmara de incubação a 25 °C e no escuro. O crescimento das estirpes foi avaliado pela leitura da densidade ótica a 560 nm em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII, New York, USA), em intervalos de quatro horas nas primeiras 24 horas e, após, em intervalos de 12 horas até a estabilização do crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x9, totalizando 27 tratamentos, sendo estes a combinação de duas estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019, uma de *B. japonicum* SEMIA 5079 e nove formulações de glyphosate: Zapp Qi, Roundup, Roundup Multiação, Roundup Transorb, Roundup WG, Trop, Agrisato, PMG [padrão N-(phosphonomethyl) glycina com 99% de pureza] e o controle sem adição de herbicida, com seis repetições. Todas as formulações foram aplicadas na concentração de 43,2 µg L⁻¹, correspondente a 8,64 kg ha⁻¹ de glyphosate, considerando área por área.

Os resultados obtidos, após 122 horas de incubação, foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Também se utilizou análise de regressão para traçar curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação, para os diferentes tratamentos avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sete marcas comerciais testadas afetaram o desenvolvimento das estirpes; todavia, entre as formulações houve diferença no grau

de intoxicação (Figuras 1, 2 e 3 e Tabela 3).

A estirpe SEMIA 5019 foi a mais sensível à molécula pura do glyphosate (PMG) (Figura 1 e Tabela 3). Para esta estirpe, as inibições máximas de crescimento medidas pelo aumento da densidade ótica (DO), observadas entre os tratamentos, variaram desde 25,87%, para Zapp Qi, até 97,82%, para R. Transorb (Tabela 3). A formulação Zapp Qi (mais tolerada por esta estirpe) foi menos tóxica do que o padrão N-(phosphonomethyl) glycina (PMG), utilizado como controle para os herbicidas (Figura 1 e Tabela 3). As formulações Roundup (original), Trop, Agrisato e Roundup Multiação foram semelhantes quanto à toxicidade a esta estirpe, proporcionando, em média, inibição do crescimento de 56% em relação ao controle (Figura 1 e Tabela 3). A formulação Roundup WG reduziu o crescimento desta estirpe em mais de 65%, comparado ao controle sem adição de herbicida. Roundup Transorb afetou drasticamente esta estirpe (Figura 1 e Tabela 3). Pelas equações das curvas de regressão, observou-se ausência de crescimento desta estirpe sob efeito de R. Transorb (Tabela 2).

A estirpe SEMIA 5079 apresentou, quando submetida à formulação Trop, crescimento similar ao do controle (Figura 2 e Tabela 3). As formulações Zapp Qi e Roundup Multiação inibiram o crescimento desta estirpe em 22,79 e 26,48%, respectivamente, em relação ao controle sem adição de herbicida; contudo, 122 horas após a inoculação, esses valores não diferiram significativamente do controle herbicida PMG (16,64% de inibição) (Tabela 3). Conforme pode ser observado na Figura 2, esta estirpe se mostrou altamente sensível às



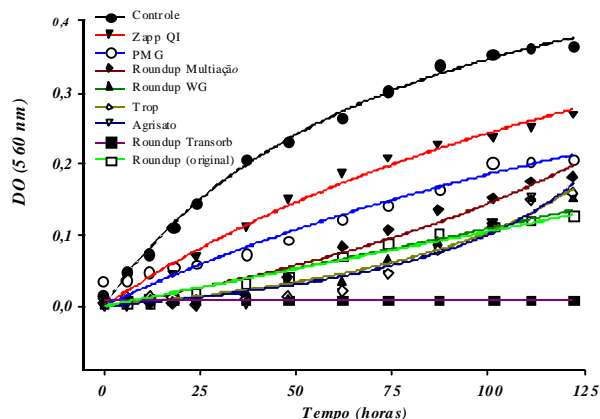


Figura 1 - Efeito de diferentes formulações de glyphosate (43,2 µg L⁻¹ de e.a.) sobre o crescimento da estirpe de *B. elkanii* SEMIA 5019 - média de seis repetições.

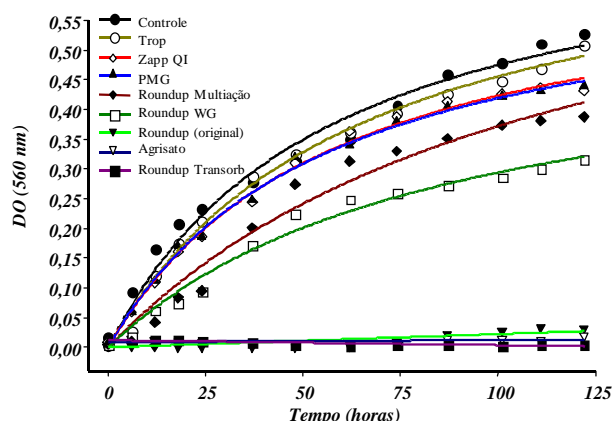


Figura 2 - Efeito de diferentes formulações de glyphosate (43,2 µg L⁻¹ de e.a.) sobre o crescimento da estirpe de *B. japonicum* SEMIA 5079 - média de seis repetições.

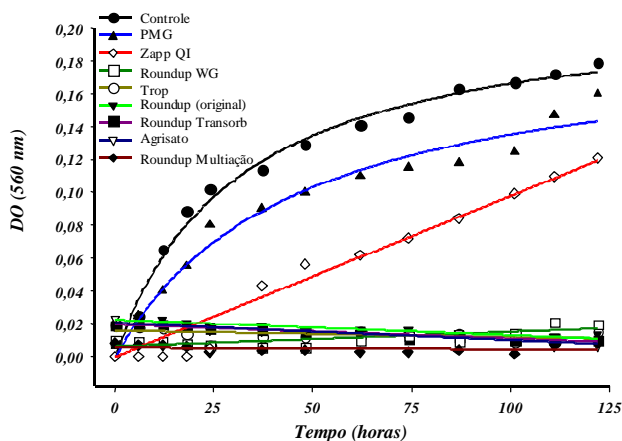


Figura 3 - Efeito de diferentes formulações de glyphosate (43,2 µg L⁻¹ de e.a.) sobre o crescimento da estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587 - média de seis repetições.

formulações Roundup (original), Agrisato e Roundup Transorb, visto estas terem reduzido o crescimento em mais de 90%. Dessa forma, SEMIA 5079 sob efeito de tais herbicidas, na concentração testada, em condições de laboratório, apresentou desenvolvimento quase nulo. Novamente Roundup Transorb foi a formulação mais tóxica, sendo observada inibição no crescimento acima de 99%, em relação ao controle (Tabela 3), contudo não diferiu das formulações Roundup (original) e Agrisato (Figura 2 e Tabela 3).

Tabela 2 - Equações das curvas de regressão relacionando densidade ótica (DO) e tempo de avaliação (horas), para diferentes formulações de glyphosate testadas sobre o crescimento das estirpes de *B. elkanii* SEMIA 5019 e SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079

Tratamento	Equação*	Coefficiente de determinação (R ²)
SEMIA 5019		
Controle (sem herbicida)	$\hat{Y} = 0,0079x / (1 + 0,0128x)$	0,99
PMG**	$\hat{Y} = 0,0026x / (1 + 0,0039x)$	0,96
Zapp Qi	$\hat{Y} = 0,0037x / (1 + 0,0050x)$	0,98
Agrisato	$\hat{Y} = 0,0004x / (1 - 0,056x)$	0,99
Roundup Transorb	$\hat{Y} = (0,007 - 0,0008x)$	0,86
Roundup WG	$\hat{Y} = 0,0010x / (1 - 0,0005x)$	0,98
Roundup Multiação	$\hat{Y} = 0,0010x / (1 - 0,0033x)$	0,95
Roundup (original)	$\hat{Y} = 0,0010x / (1 - 0,0002x)$	0,97
Trop	$\hat{Y} = 0,0005x / (1 - 0,0051x)$	0,95
SEMIA 5079		
Controle (sem herbicida)	$\hat{Y} = 0,7401x / (55,8535 + x)$	0,98
PMG**	$\hat{Y} = 0,6505x / (55,1917 + x)$	0,99
Zapp Qi	$\hat{Y} = 0,6673x / (57,6099 + x)$	0,99
Agrisato	$\hat{Y} = (0,0114 + 0,0001x)$	0,84
Roundup Transorb	$\hat{Y} = (0,0118 - 0,0005x)$	0,80
Roundup WG	$\hat{Y} = 0,5460x / (85,6901 + x)$	0,98
Roundup Multiação	$\hat{Y} = 0,8037x / (115,9907 + x)$	0,97
Roundup (original)	$\hat{Y} = (0,0119 + 0,0001x)$	0,79
Trop	$\hat{Y} = 0,7430x / (63,0312 + x)$	0,99
SEMIA 587		
Controle (sem herbicida)	$\hat{Y} = 0,2170x / (30,5341 + x)$	0,98
PMG**	$\hat{Y} = 0,1963x / (45,1041 + x)$	0,97
Zapp Qi	$\hat{Y} = 1421,23x / (1,45E6 + x)$	0,95
Agrisato	$\hat{Y} = (0,0203 - 0,0001x)$	0,82
Roundup Transorb	$\hat{Y} = (0,0195 - 0,0001x)$	0,93
Roundup WG	$\hat{Y} = (0,0062 + 0,0001x)$	0,85
Roundup Multiação	$\hat{Y} = (0,0056 - 0,00001x)$	0,86
Roundup (original)	$\hat{Y} = (0,0223 - 0,0001x)$	0,91
Trop	$\hat{Y} = (0,0157 - 0,00001x)$	0,91

* Significativo pelo teste t (P<0,05) e ** produto puro padrão de N-(phosphonomethyl) glycina com 99% de pureza.



Tabela 3 - Efeito de diferentes formulações de glyphosate (43,2 µg L⁻¹) sobre o crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium*, medido por meio do aumento da densidade ótica (DO), 122 horas após inoculação

Tratamento	DO 560 nm (%)		
	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 587
Controle	100,00 a A	100,00 a A	100,00 a A
Trop	40,71 de B	96,27 ab A	22,72 c C
Roundup (original)	43,81 de A	6,09 d B	7,45 d B
Agrisato	42,21 de A	3,63 d B	3,82 d B
Roundup Transorb	2,18 f A	0,79 d A	5,59 d A
Roundup WG	34,88 e B	59,75 c A	2,89 d C
Roundup Multiação	49,95 cd B	73,52 b A	1,44 d C
Zapp Qi	74,13 b AB	77,21 b A	67,41 b B
PMG*	56,47 c B	83,36 b A	89,11 a A

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Produto puro padrão de N-(phosphonomethyl) glycina com 99% de pureza.

Com base nas equações referentes às curvas de regressão dos tratamentos, para SEMIA 5079 (Tabela 2), nota-se comportamento linear desta estirpe sob efeito das formulações Roundup (original), Agrisato e Roundup Transorb, inclusive com valores decrescentes para esta última.

SEMIA 587 foi, de maneira geral, a estirpe mais sensível às formulações do glyphosate testadas, visto que, entre estas, cinco impossibilitaram seu crescimento (Figura 3). Mesmo com o decréscimo no valor máximo de DO, foi possível observar que, além do tratamento controle (sem adição de herbicida), a estirpe apresentou crescimento somente nas formulações Zapp Qi e PMG (controle herbicida) (Figura 3 e Tabela 3). O controle PMG, após 122 horas de incubação, não apresentou diferença quando comparado ao controle sem herbicida; já nesse mesmo período a formulação Zapp Qi inibiu em 32,59% o crescimento (Tabela 3). Por meio da análise das curvas de crescimento (Tabela 2), pôde-se constatar que as formulações Agrisato, Roundup Transorb, Roundup WG, Roundup Multiação e Roundup (original) reduziram de forma drástica o crescimento de SEMIA 587. Os dados ajustaram-se em equações do primeiro grau, evidenciando comportamento linear decrescente, exceto para Roundup WG (Tabela 2). A formulação Trop

também resultou em alta inibição, alcançando valor próximo a 80% após 122 horas de incubação (Figura 3 e Tabela 3).

Haahtela et al. (1988) testaram o glyphosate puro e na formulação comercial Roundup sobre vários microrganismos e observaram que as concentrações entre 25 e 100 µg 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.

Em relação aos sais que integram as formulações estudadas, pouca inferência se pode fazer na discussão dos resultados. O sal de isopropilamina compõe as formulações Agrisato, Roundup (original), Roundup Transorb e Trop, as quais apresentaram diferentes graus de intoxicação às estirpes e entre elas. O sal de amônio presente na composição de Roundup WG e Roundup Multiação não conferiu a estes o mesmo grau de intoxicação para as três estirpes (Tabela 2). No entanto, pode-se destacar que Zapp Qi, único que se apresenta com o sal potássico, foi a formulação que se manteve menos tóxica a todas as estirpes, sendo, para SEMIA 587, o único tratamento que se apresentou não-tóxico (Figura 3 e Tabela 2).

Com base nas curvas de regressão e comparação das médias depois de 122 horas de inoculação, pode-se estabelecer a seguinte ordem crescente de intoxicação dos herbicidas às estirpes: Zapp Qi < PMG < Roundup Multiação = Roundup (original) = Agrisato = Trop = Roundup WG < Roundup Transorb, para SEMIA 5019; Trop < PMG = Zapp Qi = Roundup Multiação < Roundup WG < Roundup (original) = Agrisato = Roundup Transorb, para SEMIA 5079; e PMG < Zapp Qi < Trop < Roundup (original) = Agrisato = Roundup WG = Roundup Transorb, para SEMIA 587.

Entre as estirpes, a ordem crescente de tolerância foi a seguinte: SEMIA 587 < SEMIA 5019 < SEMIA 5079, para as formulações Trop, Roundup WG e Roundup Multiação; SEMIA 587 = SEMIA 5079 < SEMIA 5019, para Agrisato e Roundup (original); SEMIA 5019 < SEMIA 5079 = SEMIA 587, para o controle herbicida PMG; e SEMIA 587 < SEMIA 5079, porém sem diferirem de SEMIA 5019, para



Zapp Qi. A formulação Roundup Transorb causou elevado grau de intoxicação entre todas as estirpes.

A maior sensibilidade da estirpe SEMIA 587, em relação a SEMIA 5019, também foi constatada por Ortiz et al. (1989), quando crescida em meio contendo trifluralin. Arruda et al. (2001), trabalhando com herbicidas inibidores da enzima AHAS, em diferentes concentrações, observaram que eles afetaram drasticamente as estirpes de *B. japonicum* testadas, sendo estabelecidas diferentes ordens de tolerância para cada herbicida.

A redução do crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* na presença do equivalente ácido e das formulações comerciais de glyphosate provavelmente se deve à inibição da atividade da enzima EPSP sintase e à consequente redução da síntese de aminoácidos aromáticos nas células bacterianas. Moorman (1986) não observou redução do crescimento do *Bradyrhizobium japonicum* na presença de glyphosate quando aminoácidos aromáticos foram adicionados ao meio de cultura. É provável que os efeitos específicos das formulações comerciais de glyphosate no crescimento das estirpes sejam decorrentes da presença de diferentes substâncias químicas na formulação do herbicida, como solventes, surfatantes e agentes molhantes, que podem modificar o efeito do equivalente ácido do herbicida nos organismos (Kishinevsky et al., 1988; Malkones, 2000).

AGRADECIMENTOS

À empresa Syngenta Proteção de Cultivos, pelo apoio financeiro.

LITERATURA CITADA

- ALAGAVADI, A. R.; REDDY, T. K. R. Effect of trifluralin on *Rhizobium* and its nodulation on groundnut. **Pesticides**, v. 20, p. 27-30, 1986.
- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; MOURA, A. B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, p. 111-117, 2001.
- BERNER, D. K.; BERGGREN, G. T.; SNOW, J. P. Effects of glyphosate on *Calonectia crotalariae* and red crown rot of soybean. **Plant Disease**, v. 75, p. 809-813, 1991.
- DELANAY, X. et al. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Sci.**, v. 35, p. 1461-1467, 1995.
- EBERBACH, P. L.; DOUGLAS, L. A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. **Plant Soil**, v. 119, p. 15-23, 1989.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília, 1994. 542 p.
- GONZALEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Sci.**, v. 44, 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 Microbiol. Lett.**, v. 53, p. 123-127, 1988.
- HAUGLAND, E. Ecological consequences of chemical weed control. **Norsk Landbruksf.**, v. 8, p. 1-13, 1994.
- HEAP, I. M. The occurrence of herbicide resistant weeds world wide. **Pestic. Sci.**, v. 51, p. 235-243, 1997.
- HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J. I.; BACERRIL, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2920-2925, 1999.
- KAPUSTA, G.; ROUWENHORST, D. L. Interaction of selected pesticides and *Rhizobium japonicum* in pure culture and under field conditions. **Agron. J.**, v. 65, p. 112-115, 1973.
- KING, C. A.; PURCELL, L. C.; VORIES, E. D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agron. J.**, v. 93, p. 176-186, 2001.
- KISHINEVSKY, B. et al. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Res.**, v. 28, p. 291-296, 1988.
- MALLIK, M. A. B.; TESFAI, K. Pesticidal effect of soybean-rhizobia symbiosis. **Plant Soil**, v. 85, p. 33-41, 1985.
- MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. **J. Plant Dis. Protect.**, v. 8, p. 781-789, 2000.



MOORMAN, T. B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Sci.**, v. 34, p. 628-633, 1986.

MOORMAN, T. B. et al. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 289-293, 1992.

ORTIZ, S.; MUSUMECI, M. R.; TSAI, S. M. Efeito de alguns agrotóxicos na sobrevivência e na atividade respiratória de *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 24, p. 663-667, 1989.

SCHULS, A.; KRUPER, A.; AMRHEIN, N. Differential sensitivity of bacterial S-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 28, p. 297-301, 1985.

