

Comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Sob efeito de componentes do glyphosate potássico¹

Behavior of *Bradyrhizobium* sp. Strains under different components of potassic glyphosate

José Barbosa dos Santos², Sérgio de Oliveira Procópio³, Rodrigo J. S. Jacques⁴,
Maria Catarina Megumi Kasuya⁵ e Antonio Alberto da Silva⁶

RESUMO

Avaliou-se neste trabalho o impacto de componentes de glyphosate potássico e da formulação comercial sobre estirpes de *Bradyrhizobium* sp. utilizadas como inoculantes na cultura da soja no Brasil. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura (YEM). Foram avaliados 12 tratamentos: controle (sem adição de herbicida), produto padrão N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), PMG + sal potássico (PMS) e o produto comercial Zapp Qi, e três estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 5019, SEMIA 5080 e SEMIA 587), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 4x3, com seis repetições. Os efeitos dos tratamentos no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. foram avaliados mediante leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro. As concentrações utilizadas foram de 18,0; 27,7 e 36,0 mg L⁻¹, respectivamente para PMG, PMS e Zapp Qi. Os resultados indicaram redução do crescimento das estirpes com os diferentes tratamentos de glyphosate. As reduções no crescimento variaram desde 7,64%, para SEMIA 5019, até 41,21%, para SEMIA 5080, ambas sob ação do Zapp Qi. Para SEMIA 587, o PMS apresentou maior toxicidade do que o PMG, 23,78 e 9,0% de redução na DO, respectivamente. Para SEMIA 5019 e 5080, PMG e PMS não diferiram na toxicidade reduzindo, em média, 32,6% do valor da DO comparadas ao controle. A ordem crescente de tolerância das estirpes aos herbicidas foi a seguinte: SEMIA 5019 = SEMIA 5080 < SEMIA 587, para o PMG e PMS, e SEMIA 5080 < SEMIA 587 < SEMIA 5019 para o Zapp Qi.

Termos para indexação: Fixação biológica de N, herbicida, N-(phosphonomethyl) glycine, rizóbio, Zapp Qi.

ABSTRACT

It was evaluated in this work the impact of isolated components potassic glyphosate and of the commercial product on *Bradyrhizobium* sp. strains, used commercially in the soybean crop, in Brazil. The strains were inoculated in yeast extract manitol (YEM). 12 treatments were appraised: control (without herbicide), standard product N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), PMG + potassic salt (PMS) and the commercial product Zapp Qi, and three *Bradyrhizobium* sp. strains (SEMIA 5019, SEMIA 5080 and SEMIA 587), disposed in completely randomized design, in a factorial design 4x3, with six replications. The effects of the treatments in the growth of the *Bradyrhizobium* sp. strains were appraised by optic density (DO) reading in spectrophotometer. The used concentrations were of 18.0; 27.7 and 36.0 µg L⁻¹, respectively for PMG, PMS and Zapp Qi. Its strain has its growth curves. The observed values of growth inhibition varied from 7.64%: SEMIA 5019, at 41.21 %: SEMIA 5019 both by Zapp Qi action. For SEMIA 587, PMS presented larger toxicity than PMG, 23.78 and 9.0% of reduction in the DO, respectively. For SEMIA 5019 and 5080, PMG and PMS they didn't differ in the toxicity reducing, on the average, 32.6% of the value compared to the control. The growing order of tolerance of strains to the herbicides was to following: SEMIA 5019 = SEMIA 5080 < SEMIA 587, for PMG and PMS, and SEMIA 5080 < SEMIA 587 < SEMIA 5019 for Zapp Qi.

Index terms: Biological fixation of N₂, herbicide, N-(phosphonomethyl) glycine, rhizobium, Zapp Qi.

¹ Trabalho parte da tese de mestrado do primeiro autor (?).

² Mestrando, Depto. Fitotecnia – UFV, e-mail: jbarbosasantos@yahoo.com.br

³ Doutorando, Depto. Fitotecnia – UFV, e-mail: procopio@alunos.ufv.br

⁴ Doutorando, Depto. Solos – UFRGS, e-mail: rjsjacques@zipmail.com.br

⁵ Professora, Depto. Microbiologia – UFV, e-mail: mkasuya@ufv.br

⁶ Professor, Depto. Fitotecnia – UFV, e-mail: aasilva@ufv.br

Introdução

Com o advento da soja transgênica tolerante ao herbicida glyphosate se faz imprescindível que pesquisas avaliem o impacto da implantação desta nova tecnologia. Pode-se afirmar que, com exceção dos cultivos orgânicos que visam o consumo de soja sem a adição de agroquímicos, praticamente toda área cultivada com esta cultura aplica-se herbicidas. A grande aceitação por parte dos produtores de soja ao emprego destes insumos se deve à alta eficiência no controle das plantas daninhas, ao alto rendimento operacional, à presença de herbicidas altamente seletivos aos principais cultivares nacionais e ao menor custo, quando comparado aos outros métodos de controle disponíveis. Atualmente tem-se buscado moléculas herbicidas que causem menor impacto negativo ao ambiente sem, no entanto, diminuir a eficiência no controle.

A utilização de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2) (*Bradyrhizobium* sp.), aplicados junto às sementes de soja, é prática rotineira na condução da cultura. Essa operação tem apresentado resultados altamente positivos agronomicamente, principalmente em solos onde a cultura nunca foi conduzida, ou em solos com poucos anos de cultivo de soja, pois, a partir de um certo período com cultivo de sementes de soja inoculadas, os rizóbios já começam a estar presentes no solo (indígenos). A fixação de N_2 atmosférico, realizada pela associação soja-rizóbio, pode contribuir com mais de 70% do requerimento do N total necessário à cultura (Thurlow e Hilbold, 1985; Marengo et al., 1993).

Segundo Kishinevsky et al. (1988) é possível que substâncias químicas presentes nas formulações dos herbicidas, como solventes, surfatantes, e agentes molhantes possam contribuir para os efeitos inibitórios ao desenvolvimento de estirpes de rizóbios. Esses efeitos podem ser diretos (prejudicando os rizóbios), indiretos (prejudicando as plantas hospedeiras e/ou estimulando microrganismos antagônicos aos rizóbios), ou em ambos processos (Moorman, 1986; Cardina e Hartwig, 1988). De acordo com Gonzalez et al. (1996), herbicidas que afetam a formação e o crescimento de pêlos radiculares podem prejudicar a infecção das bactérias. O declínio induzido pelos herbicidas na nodulação de leguminosas pode ser o resultado de injúrias ao sistema radicular dessas espécies ou dos efeitos tóxicos aos rizóbios antes ou durante o processo de infecção (Eberbach e Douglas, 1989), todavia, também pode ser devido

à redução na atividade da nitrogenase, provocada pelo déficit de suprimentos de fotoassimilados aos rizóbios, causado por injúrias dos herbicidas às plantas (Haahtela et al., 1988; Patnaik et al., 1995). Os herbicidas também podem prejudicar a nodulação, por inibirem a produção de enzimas celulíticas e pectolíticas produzidas pelos rizóbios e essenciais ao processo de penetração nos pêlos radiculares (Mahmoud e Omar, 1995).

Para Gonzalez et al. (1996), os efeitos dos herbicidas sobre o crescimento rizobial devem ser avaliados usando produtos comerciais e produtos técnicos, pois assim, pode-se diferenciar os efeitos do ingrediente ativo e dos adjuvantes presentes na formulação. Para estes autores, as substâncias presentes na formulação podem mascarar o efeito “verdadeiro” do herbicida sobre os microrganismos. O glyphosate é um herbicida de amplo espectro de ação pertencente ao grupo dos herbicidas inibidores da biossíntese de aminoácidos, não-seletivo à cultura da soja. No entanto, existe a possibilidade legal da introdução, no País, de cultivares de soja transgênicos, apresentando resistência a esse herbicida. Vários trabalhos constataram que o glyphosate apresentou toxicidade a estirpes de rizóbios ou prejudicou a nodulação de leguminosas inclusive da soja (Eberbach e Douglas, 1989; Santos e Flores, 1995; Hernandez et al., 1999; Kannan et al., 1999; Busse et al., 2001). Entretanto, em razão da grande variabilidade nas respostas à presença de herbicidas por estirpes de rizóbios (Alagavadi e Reddy, 1986; Kishinevsky et al., 1988; Paromenskaya et al., 1998), são necessárias avaliações dessa natureza com as estirpes utilizadas no Brasil, uma vez que resultados importados podem não se enquadrar às condições edafoclimáticas do País.

O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto de componentes isolados do glyphosate potássico e da formulação comercial Zapp Qi sobre estirpes de *Bradyrhizobium* sp., utilizadas comercialmente como inoculantes na cultura da soja no Brasil.

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 dos herbicidas foram preparadas mediante a mistura de água destilada e

deionizada aos tratamentos herbicidas, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore 0,25 μm) em condições assépticas.

As estirpes de *Bradyrhizobium* sp. foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da Embrapa/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em frascos de agar inclinado com meio à base de extrato de levedura e manitol como fonte de carbono (meio YEM), composto, em g L^{-1} , por: Manitol, 10; K_2HPO_4 , 0,05; MgSO_4 , 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15 e com pH ajustado em 6,8 à temperatura de 4 °C. A ativação destas culturas foi realizada segundo método descrito pela Embrapa (1994), sendo realizada, posteriormente, sua inoculação em erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YEM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 25 °C, até atingir densidade ótica (DO) a 560 nm, equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

O efeito do herbicida no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. foi avaliado mediante leitura da DO em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII), a 560 nm, em intervalos de quatro em quatro horas, até completarem 24 horas e, após, de 12 em 12 horas, até a paralisação do crescimento. Para isso, foram utilizadas placas de ELISA com 96 células de 300 mL de capacidade volumétrica, onde foram adicionados 180 mL de meio YEM líquido estéril (1,5 vez concentrado), 60 mL da solução-estoque estéril dos herbicidas e 15 mL das culturas ativadas, totalizando 255 mL de solução. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro, em câmara de crescimento a 25 °C, de onde foram retiradas somente para as leituras de DO e imediatamente recolocadas neste local, até o final das leituras. O experimento foi constituído de um arranjo fatorial 4 x 3, totalizando 12 tratamentos, sendo a combinação de quatro tratamentos com herbicida: padrão N-(phosphonomethyl) glycine (99% de pureza) (PMG), padrão mais sal potássico, sem aditivos comerciais (PMS) e o produto comercial Zapp Qi (50% do e.a.), mais controle (sem adição de herbicida) e três estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 5019, SEMIA 5080 e SEMIA 587). Estes tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. As concentrações utilizadas foram de 18,0; 27,7 e 36,0 mg L^{-1} , respectivamente para PMG, PMS e Zapp Qi, correspondentes a, aproximadamente, 3,6 kg ha^{-1} do produto glyphosate. Os resultados obtidos após 155 horas de incubação (período este verificado em

ensaios preliminares, como de maior estabilidade no crescimento das estirpes antes da fase de decréscimo) 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 se traçar curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação para os diferentes tratamentos avaliados.

Resultados e Discussão

Foi observado, para as estirpes de *Bradyrhizobium* sp., no tratamento controle (sem adição de herbicida) lento crescimento com paralisação, em média, após 130 horas de inoculação, o que é característico do gênero *Bradyrhizobium*, conforme descrito por Embrapa (1994).

Todas as estirpes de rizóbio foram afetadas negativamente pelos tratamentos herbicidas apresentando decréscimo significativo no crescimento (Figuras 1, 2 e 3 e Tabela 2). As equações de ajuste, juntamente com o coeficiente de determinação das curvas de crescimento, para todas as estirpes, são mostradas na Tabela 1.

A estirpe SEMIA 5019 foi menos afetada pelo produto comercial, com redução no crescimento de 7,64%, comparado ao tratamento controle sem adição de herbicida (Tabela 2). Pela curva de crescimento desta estirpe pode-se observar maior efeito

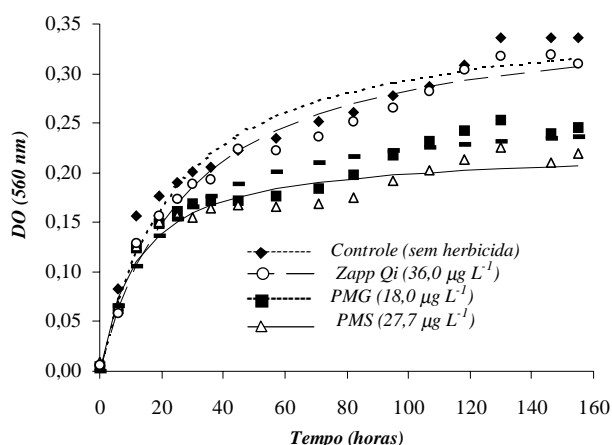


Figura 1. Efeito do glyphosate padrão N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), PMG + sal potássico (PMS) e o produto comercial Zapp Qi, sobre o crescimento da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 5019, medido pelo aumento da densidade ótica (DO).

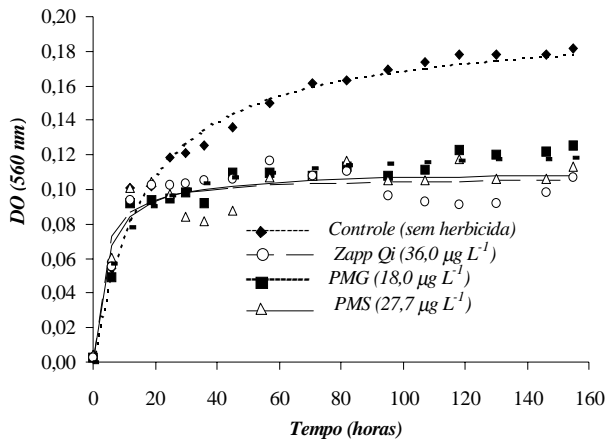


Figura 2. Efeito do glyphosate puro padrão N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), PMG + sal potássico (PMS) e o produto comercial Zapp Qi, sobre o crescimento da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 5080, medido pelo aumento da densidade ótica (DO).

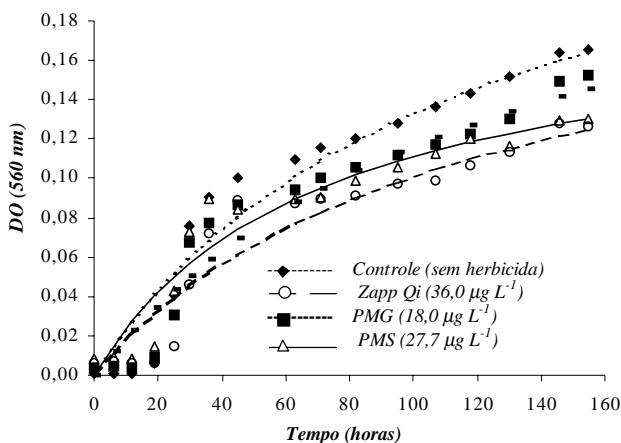


Figura 3. Efeito do glyphosate puro padrão N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), PMG + sal potássico (PMS) e o produto comercial Zapp Qi, sobre o crescimento da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 587, medido pelo aumento da densidade ótica (DO).

de toxicidade causado pelo PMG e PMS, já a partir de 40 horas após a inoculação (Figura 1). Às 155 horas da incubação os valores de DO foram de 72,97 e 65,53%, respectivamente para PMG e PMS, todavia não diferindo estatisticamente (Tabela 2).

A estirpe SEMIA 5080 foi mais sensível ao produto comercial Zapp Qi, comparada às demais, sendo observada redução no crescimento, às 155 horas após inoculação, de mais de 40% (Tabela 2). Para esta estirpe também não se observou diferença

estatística entre os tratamentos PMG e PMS, com comportamento semelhante a SEMIA 5019 (Tabela 2). Contudo, quando se avalia a evolução do crescimento para esta estirpe, observa-se maior discrepância entre o tratamento controle e os demais tratamentos herbicidas, sendo estes últimos semelhantes quanto à toxicidade (Figura 2).

Foi observado, dentre as estirpes avaliadas, menor toxicidade dos tratamentos PMG e PMS para SEMIA 587, sendo que os valores de inibição do crescimento, às 155 horas após inoculação foram de 23,78% e 9%, respectivamente para o PMS e PMG (Tabela 2). Esta estirpe se mostrou como a mais tolerante ao glyphosate puro (PMG). Para SEMIA 587, a toxicidade do produto comercial Zapp Qi foi semelhante ao produto puro mais sal potássico PMG (Tabela 2).

A redução do crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. na presença dos componentes do glyphosate, provavelmente se deve a inibição da atividade da enzima EPSP sintase e a conseqüente redução da síntese de aminoácidos aromáticos nas células bacterianas. Quanto à resposta diferenciada entre as estirpes, é provável que os efeitos específicos do sal potássico (PMS) e dos demais aditivos presentes na formulação comercial (Zapp Qi), como solventes, surfatantes, e agentes molhantes, promovam diferentes graus de sensibilidade entre espécies de *Bradyrhizobium* sp., como é o caso de SEMIA 587 que se mostrou mais tolerante na presença do PMG do que as demais estirpes (Tabela 2).

Hahtela et al., (1988) testaram o glyphosate puro e na formulação comercial Roundup (sal de isopropilamina) sobre vários microrganismos e observaram que as concentrações entre 25 e 100 mg L⁻¹, afetaram, significativamente, o crescimento de bactérias do gênero *Enterobacter*, todavia com maior toxicidade para a formulação comercial na maior concentração.

Entre as estirpes pode-se perceber que os aditivos presentes na formulação comercial Zapp Qi diminuíram, em parte, o efeito de toxicidade do sal de glyphosate sobre SEMIA 5019, contudo não interferindo no crescimento das demais estirpes (Tabela 2).

Cardina et al. (1986) e Kishinevsky et al. (1988) verificaram efeitos inibitórios de alguns surfatantes sobre estirpes de *Rhizobium leguminosarum*. Também Malkomes (2000) verificou que os aditivos presentes na formulação dos pesticidas afetam os microrganismos.

Tabela 1. Equações das curvas de regressão relacionando densidade ótica (DO 560 nm) e tempo de avaliação (horas), para o controle (sem adição de herbicida), produto puro padrão N-(phosphonomethyl) glycine 18,0 mg L⁻¹ (PMG), PMG + sal potássico 27,7 mg L⁻¹ (PMS) e o produto comercial Zapp Qi, 36,0 mg L⁻¹, testados sobre o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 5019, SEMIA 5080 e SEMIA 587.

Estirpes	Tratamentos	Equações	Coefficiente de determinação (R ²)
SEMIA 5019	Controle	$\hat{Y} = 0,0153x/(1+0,0419x)$	0,96
	PMG	$\hat{Y} = 0,0149x/(1+0,0566x)$	0,95
	PMS	$\hat{Y} = 0,0185x/(1+0,0831x)$	0,95
	Zapp Qi	$\hat{Y} = 0,0127x/(1+0,0349x)$	0,98
SEMIA 5080	Controle	$\hat{Y} = 0,0117x/(1+0,0593x)$	0,98
	PMG	$\hat{Y} = 0,0174x/(1+0,1407x)$	0,96
	PMS	$\hat{Y} = 0,0288x/(1+0,2596x)$	0,88
	Zapp Qi	$\hat{Y} = 0,0380x/(1+0,3542x)$	0,87
SEMIA 587	Controle	$\hat{Y} = 0,0025x/(1+0,0088x)$	0,93
	PMG	$\hat{Y} = 0,0021x/(1+0,0080x)$	0,94
	PMS	$\hat{Y} = 0,0027x/(1+0,0143x)$	0,93
	Zapp Qi	$\hat{Y} = 0,0019x/(1+0,0088x)$	0,91

Tabela 2. Efeito do produto puro padrão N-(phosphonomethyl) glycine 18,0 mg L⁻¹ (PMG), PMG + sal potássico 27,7 mg L⁻¹ (PMS) e o produto comercial Zapp Qi, (36,0 mg L⁻¹) sobre o crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* sp., medido pelo aumento da densidade ótica (DO), 155 horas após inoculação.

Tratamentos	Redução no crescimento (%)		
	SEMIA 5019	SEMIA 5080	SEMIA 587
Controle	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A
PMG	72,97 c B	68,86 b B	91,03 bA
PMS	65,53 c B	62,18 bc B	76,22 c A
Zapp Qi	92,36 b A	58,79 c C	73,88 c B

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

Conclusões

- Todas as estirpes avaliadas foram afetadas pelos componentes de glyphosate.
- A formulação comercial Zapp Qi, comparada ao produto puro e o produto puro + sal potássico, foi menos tóxica a estirpe SEMIA 5019.
- A seguinte ordem crescente de tolerância das estirpes aos tratamentos herbicidas pode ser estabelecida: SEMIA 5019 = SEMIA 5080 < SEMIA 587, para o produto puro N-

(phosphonomethyl) glycine e produto puro mais sal potássico, e SEMIA 5080 < SEMIA 587 < SEMIA 5019 para Zapp Qi.

- Entre os tratamentos herbicidas pode-se estabelecer a seguinte ordem crescente de toxicidade: Zapp Qi < N-(phosphonomethyl) glycine = N-(phosphonomethyl) glycine mais sal, para SEMIA 5019; N-(phosphonomethyl) glycine = N-(phosphonomethyl) glycine mais sal < Zapp Qi, para SEMIA 5080 e N-(phosphonomethyl) glycine < N-(phosphonomethyl) glycine mais sal = Zapp Qi, para SEMIA 587.

Agradecimentos

A Syngenta Proteção de Cultivos, pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ALAGAVADI, A.R., REDDY, T.K.R. Effect of trifluralin on *Rhizobium* and its nodulation on groundnut. **Pesticides**, v.20, p.27-30, 1986.
- 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 & Biochemistry**, v.33, n.1, p.1777-1789, 2001.
- CARDINA, J., HARTWIG, N.L. Atrazine, bifenox and shade effects on crownvetch (*Coronilla varia*) nodulation and nodule activity. **Weed Science**, v.36, p.535-539, 1988.
- CARDINA, J., HARWIG, N.L., LUKEZIC, F.L. Herbicidal effects on crownvetch rhizobia and nodule activity. **Weed Science**, v.34, p.338-343, 1986.
- 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**. 1 ed. Brasília, 1994, 542p.
- GONZALEZ, A., GONZALEZ-MURUA, C., ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Science**, 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*. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Ecology**, v.53, n.1, p.123-127, 1988.
- HERNANDEZ, A., GARCIA-PLAZAOLA, J.I., BACERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.) **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.47, p. 2920-2925. 1999.
- KANNAN, V., SRINIVASAN, S., KATHIRAVAN, G., RAJU, K., SUBRAMANIAN, K., SIVAKUMAR, D. Influence of glyphosate on *Mastigocladus laminosus*. **Journal of Environmental Biology**, v.20, n.3, p.199-206, 1999.
- KISHINEVSKY, B., LOBEL, R., LIFSHITZ, N., GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Research**, v.28, p.291-296, 1988.
- MAHMOUD, A.L.E., OMAR, S.A. Growth, cell wall-degrading enzymes and aflatoxin production by lemon-rotting fungi in relation to insecticide application. **Microbiology Research**, v.150, p.195-200, 1995.
- MALKOMES, H.P. Comparasion of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.8, n.5, p.781-789, 2000
- MARENCO, R.A., LOPES, N.F., MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, p.121-126, 1993.
- MOORMAN, T.B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Science**, v.34, p.628-633, 1986.
- PAROMENSKAYA, L.N., CHERNOVA, T.A., KROGLOV, Y.V. The problem of increasing the herbicide resistance of legume-rhizobial symbiosis. **Microbiology**, v.67, n.3, p.351-355, 1998.
- PATNAIK, G.K.; KANUNGO, P.K; MOORTHY, B.T.S.; MAHANA, P.K.; ADHYAT.K.; RAJARAMAMOHAN RAO, V. Effect of herbicides on nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) associated with rice rhyzosphere. **Chemosphere**, v.30, n.2, p.339-343, 1995.
- SANTOS, A., FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen-fixation of free-living heterotrophic bacteria. **Letters in applied microbiology**, v.20, n.6, p.349-352, 1995.
- THURLOW, D.L., HILBOLD, A.E. Dinitrogen fixation by soybeans in Alabama. **Agron. J.**, v.77, p.432-436, 1985.