

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE**

LUANA CAROLINA GOMES JONCK

**INTERFERÊNCIA DA INOCULAÇÃO DE *Nitrospirillum amazonense* NA
CAPACIDADE COMPETITIVA DE MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR E TOXICIDADE DE HERBICIDAS À BACTÉRIA**

ARARAS, 2025.

Luana Carolina Gomes Jonck

Engenheira Agrônoma

**INTERFERÊNCIA DA INOCULAÇÃO DE *Nitrospirillum amazonense* NA
CAPACIDADE COMPETITIVA DE MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR E TOXICIDADE DE HERBICIDAS À BACTÉRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias (UFSCar/CCA), para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Andrea Monquero
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Maria Rosa Magri

ARARAS, 2025.

Jonck, Luana Carolina Gomes

Interferência da inoculação de *Nitrospirillum* amazonense na capacidade competitiva de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e toxicidade de herbicidas à bactéria: // Luana Carolina Gomes Jonck -- 2025. 96f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Patrícia Andrea Monquero
Banca Examinadora: Patricia Andrea Monquero, Renato Nallin Montagnolli, Kassio Ferreira Mendes
Bibliografia

1. Fitotecnia. 2. Microbiologia do solo. 3. Toxicidade de herbicidas. I. Jonck, Luana Carolina Gomes. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Luana Carolina Gomes Jonck, realizada em 23/07/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Patricia Andrea Monquero (UFSCar)

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar)

Prof. Dr. Kassio Ferreira Mendes (CENA/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Jesus Cristo por serem a razão, a força e a luz que me sustentaram, me capacitaram e me guiaram a realizar este trabalho. "Não a nós, Senhor, nenhuma glória para nós, mas sim ao teu nome, por teu amor e por tua fidelidade" - Sl 115:1.

À minha mãe, Francineide, e ao meu pai, Almir, por todo o amor, cuidado, ensinamentos, esforços e sacrifícios para que eu pudesse chegar aqui.

Às minhas irmãs, Leticia e Ana Lara, por serem minha alegria. Ter vocês é o melhor presente que eu poderia ter.

À Professora Dr.^a Patrícia Andrea Monquero, pela paciência, apoio, por todo conhecimento compartilhado e por me proporcionar tantas oportunidades em toda a minha trajetória acadêmica. Foi uma verdadeira honra ser orientada por uma profissional de tamanha excelência, a qual admiro tanto.

À Professora Dr.^a Márcia Maria Rosa Magri, por todo o apoio. Agradeço profundamente pelo suporte, pela dedicação e pelas valiosas contribuições para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Professor Dr. Fernando Dini Andreote (USP), pela parceria e apoio técnico prestado para a realização das análises metataxonômicas deste trabalho.

Ao Dr. Felipe Martins do Rêgo Barros (USP), por todo auxílio e conhecimento compartilhado na execução e análise estatística dos dados.

Aos Professores Dr. Paulo Vinicius da Silva (UFGD), Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar), Dr. Kassio Ferreira Mendes (CENA) e à Dr.^a Dania Elisa Christofolletti Mazzeo Morales (UFSCar), pela participação nas bancas de qualificação e defesa e contribuições ao trabalho.

Aos técnicos Alan e Céli, por todo suporte e auxílio prestados no laboratório.

A todos os integrantes do Grupo de Estudos em Ciências Agrárias (GECA/UFSCar). Em especial à Carina de Fátima Felipe, por todo o apoio fornecido na execução dos experimentos.

À minha amiga Jéssica L. Penteado, por ter trazido alegria e leveza aos meus dias na universidade.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Centro de Ciências Agrárias (CCA) e ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) e a todos os

professores que, compartilhando seu conhecimento, tornam possível a construção do meu aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo 2022/08100-3).

A todos aqueles com quem compartilho a caminhada e que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Graças ao grande amor do Senhor é que não somos consumidos, pois as suas misericórdias são inesgotáveis. Renovam-se a cada manhã; grande é a tua fidelidade.” (Lamentações 3:22-23)

RESUMO

A inoculação com *Nitrospirillum amazonense* promove fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de fitormônios, o que pode influenciar a competitividade de mudas pré-brotadas (MPBs) de cana-de-açúcar frente a plantas daninhas, e herbicidas pré-emergentes podem ser tóxicos às células bacterianas. Desse modo, o objetivo com esse estudo foi avaliar o impacto da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*) na competitividade de MPBs de cana-de-açúcar, assim como o efeito da matocompetição na microbiota rizosférica e avaliar a toxicidade de herbicidas pré-emergentes às células bacterianas. A competitividade de MPBs de cana-de-açúcar foi avaliada em um experimento realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2. Três espécies de plantas daninhas (*Merremia aegyptia*, *Urochloa decumbens* e *Cyperus rotundus*) foram avaliadas em 4 densidades (10, 20, 40 e 80 plantas m⁻²), convivendo com MPBs na presença e ausência da inoculação com *N. amazonense*, além de controles (somente MPB, com e sem inoculação). Aos 90 dias após o transplantio (DAT), as mudas foram avaliadas em relação à altura (cm), área foliar (cm²), biomassa da parte aérea (g) e biomassa seca da raiz (g). Ainda aos 90 DAT, o solo rizosférico foi avaliado em relação à diversidade bacteriana e fúngica por meio da análise metataxonômica do solo, através de extração e sequenciamento de DNA, com alvo nas regiões 16S rDNA de bactérias e na região intergênica ITS de fungos, e em relação à atividade microbiana, por meio da análise da atividade das enzimas β-glicosidase e arilsulfatase, pelo método de quantificação do *p*-nitrofenol. Para avaliar a toxicidade de herbicidas à bactéria *N. amazonense*, foram realizados quatro ensaios *in vitro*. No primeiro ensaio, nove herbicidas pré-emergentes registrados para cana-de-açúcar (clomazone, imazapic, tebuthiuron, indaziflam, *S*-metolachlor, metribuzin, isoxaflutole, sulfentrazone, flumioxazin) foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI). Os herbicidas foram avaliados em cinco doses correspondentes a 1/4, 1/2, 1, 1,5 e 2 vezes a dose comercial (DC), além de tratamento controle sem herbicida. No segundo ensaio, foi avaliada a resistência de *N. amazonense* à aplicação dos mesmos herbicidas no solo, por meio da quantificação do Número Mais Provável (NMP) de unidades formadoras de colônia (UFC) de *N. amazonense* g.solo⁻¹ utilizando a tabela de McCrady. O terceiro ensaio avaliou o impacto dos herbicidas sobre a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) da bactéria em meio semissólido NFb isento de nitrogênio, pelo método de digestão semimicro de Kjeldahl. Por fim, o quarto ensaio verificou o efeito dos herbicidas sobre a produção de ácido indol-acético (AIA) pela bactéria. As células bacterianas foram analisadas pelo método colorimétrico por meio da adição do reagente de Salkowski. A inoculação com *N. amazonense* gerou incrementos somente no parâmetro altura de MPBs em competição com *U. decumbens*. Interação significativa entre inoculação e densidade de plantas foi observada apenas para o parâmetro área foliar de MPBs em competição com *M. aegyptia*. A inoculação demonstrou induzir uma correlação negativa entre aumento da densidade de *M. aegyptia* e redução da área foliar das mudas. A presença de *U. decumbens*, *M. aegyptia* e *C. rotundus* gerou reduções na altura, biomassa aérea e área foliar das MPBs independentemente da inoculação com *N. amazonense*. A inoculação microbiana e a matocompetição não alteraram significativamente a estrutura da comunidade bacteriana e fúngica e a atividade enzimática

do solo rizosférico das MPBs. Contudo, táxons atribuídos ao gênero *Nitrospirillum* (classificados como *Azospirillum* na base utilizada) foram encontrados apenas nos tratamentos MPBs inoculadas e MPBs inoculadas em competição com *U. decumbens*. As diferentes moléculas herbicidas geraram respostas diferenciais à sobrevivência e à atividade funcional de *N. amazonense*. Indaziflam, metribuzin, S-metolachlor e sulfentrazone não impactaram a sobrevivência nem a funcionalidade da bactéria, mas promoveram o aumento do crescimento celular e estimularam a produção de AIA e/ou a FBN. Isoxaflutole estimulou o crescimento bacteriano em subdoses, entretanto, gerou inibição a partir da dose comercial, contudo sem interferir na produção de AIA ou FBN. Clomazone e imazapic adicionados ao meio de cultura diminuíram o crescimento bacteriano, mas não afetaram a sobrevivência no solo, além de aumentarem a produção de AIA e FBN. Flumioxazin e tebutiuron estimularam o crescimento bacteriano e a FBN, mas reduziram a produção de AIA. Dadas as condições do presente estudo, pode-se concluir que, embora *N. amazonense* apresente potencial, a inoculação não foi capaz de mitigar os efeitos adversos da competição com plantas daninhas no crescimento de mudas pré-brotadas, sugerindo que ajustes metodológicos ou práticas complementares sejam necessários para aumentar sua eficácia. Ademais, nossos resultados destacam a importância de uma seleção criteriosa de herbicidas, considerando não apenas sua toxicidade aguda, mas também seus efeitos diferenciais sobre processos microbianos essenciais, de modo a favorecer estratégias sinérgicas que combinem o controle eficaz de plantas daninhas e o uso de inoculantes microbianos.

Palavras chave: bactérias promotoras de crescimento, fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, inibição microbiana, matocompetição, metataxonômica.

ABSTRACT

Inoculation with *Nitrospirillum amazonense* promotes biological nitrogen fixation (BNF) and phytohormone production, which can influence the competitiveness of sugarcane pre-sprouted seedlings (PSS) against weeds. However, pre-emergence herbicides may be toxic to bacterial cells. Therefore, the objective of this study was to evaluate the impact of inoculation with Aprinza (*N. amazonense*) on the competitiveness of sugarcane PSS, as well as the effect of weed competition on the rhizosphere microbiota, and to assess the toxicity of pre-emergence herbicides to bacterial cells. The competitiveness of sugarcane PSS was evaluated in a completely randomized design (CRD) in a 4×2 factorial arrangement. Three weed species (*Merremia aegyptia*, *Urochloa decumbens*, and *Cyperus rotundus*) were assessed at four densities (10, 20, 40, and 80 plants/m²), coexisting with PSS in the presence or absence of inoculation with *N. amazonense*, in addition to controls (PSS only, with and without inoculation). At 90 days after transplanting (DAT), seedlings were evaluated for height (cm), leaf area (cm²), shoot dry biomass (g), and root dry biomass (g). Also at 90 DAT, rhizospheric soil was analyzed for bacterial and fungal diversity through soil metataxonomic analysis, using DNA extraction and sequencing targeting the bacterial 16S rDNA and fungal ITS intergenic regions. Microbial activity was assessed by measuring the activity of β-glucosidase and arylsulfatase enzymes using the *p*-nitrophenol quantification method. To evaluate herbicide toxicity to *N. amazonense*, four in vitro assays were conducted. In the first assay, nine pre-emergence herbicides registered for sugarcane (clomazone, imazapic, tebuthiuron, indaziflam, S-metolachlor, metribuzin, isoxaflutole, sulfentrazone, and flumioxazin) were assessed for their minimum inhibitory concentration (MIC). Herbicides were tested at five doses corresponding to 1/4, 1/2, 1, 1.5, and 2 times the commercial dose (CD), along with a control treatment without herbicide. In the second assay, the resistance of *N. amazonense* to the application of the same herbicides in soil was evaluated by quantifying the Most Probable Number (MPN) of colony-forming units (CFU) of *N. amazonense* per gram of soil using the McCrady table. The third assay assessed the impact of herbicides on the bacterium's BNF capacity in nitrogen-free semi-solid NFB medium using the semi-micro Kjeldahl digestion method. Lastly, the fourth assay examined the effect of herbicides on indole-3-acetic acid (IAA) production by the bacterium. Bacterial cells were analyzed by the colorimetric method using the Salkowski reagent. Inoculation with *N. amazonense* led to increases only in the height of PSS under competition with *U. decumbens*. A significant interaction between inoculation and plant density was observed only for the leaf area parameter in PSS competing with *M. aegyptia*. Inoculation induced a negative correlation between increasing *M. aegyptia* density and a reduction in seedling leaf area. The presence of *U. decumbens*, *M. aegyptia*, and *C. rotundus* caused reductions in the height, shoot biomass, and leaf area of PSS, regardless of inoculation with *N. amazonense*. Microbial inoculation and weed competition did not significantly alter the structure of the bacterial and fungal communities or the enzymatic activity of the rhizospheric soil of PSS. However, taxa attributed to the genus *Nitrospirillum* (classified as *Azospirillum* in the reference database used) were found only in the inoculated PSS treatments and inoculated PSS under competition with *U. decumbens*. Different herbicide molecules elicited distinct responses in the survival and functional activity of *N. amazonense*. Indaziflam, metribuzin, S-metolachlor, and sulfentrazone did not affect bacterial survival or functionality, but promoted increased cell growth and stimulated IAA production and/or BNF. Isoxaflutole stimulated bacterial growth at sublethal doses; however, it exhibited inhibitory effects at commercial application rates, while not interfering with IAA production or BNF capacity. Clomazone and imazapic, when added to the culture medium, reduced bacterial growth but

did not affect survival in soil, and increased IAA production and BNF. Flumioxazin and tebuthiuron stimulated bacterial growth and BNF but reduced IAA production. Under the conditions of the present study, it can be concluded that although *N. amazonense* shows potential, inoculation was not able to mitigate the adverse effects of weed competition on the growth of pre-sprouted seedlings, suggesting that methodological adjustments or complementary practices are necessary to increase its efficacy. Furthermore, our results highlight the importance of a careful selection of herbicides, considering not only their acute toxicity but also their differential effects on essential microbial processes, thereby favoring synergistic strategies that combine effective weed control with the use of microbial inoculants.

Keywords: biological nitrogen fixation, growth-promoting bacteria, metataxonomics, microbial inhibition, phytohormones, weed competition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química e física de amostras de solo utilizadas no experimento	32
Tabela 2. Lista de tratamentos herbicidas	37
Tabela 3. Altura (cm), biomassa aérea (g), área foliar (cm ²) e biomassa seca da raiz (g) de MPBs em competição com <i>U. decumbens</i> em função da inoculação com Aprinza (<i>N. amazonense</i>)	42
Tabela 4. Altura (cm), biomassa aérea (g), área foliar (cm ²) e biomassa seca da raiz (g) de MPBs em função da densidade de plantas de <i>U. decumbens</i>	43
Tabela 5. Altura (cm), biomassa aérea (g), área foliar (cm ²) e biomassa seca da raiz (g) de MPBs em competição com <i>M. aegyptia</i> em função da inoculação com Aprinza (<i>N. amazonense</i>)	44
Tabela 6. Altura (cm), biomassa aérea (g), área foliar (cm ²) e biomassa seca da raiz (g) de MPBs em função da densidade de plantas de <i>M. aegyptia</i>	44
Tabela 7. Altura (cm), biomassa aérea (g), área foliar (cm ²) e biomassa seca da raiz (g) de MPBs em competição com <i>C. rotundus</i> em função da inoculação com Aprinza (<i>N. amazonense</i>)	45
Tabela 8. Altura (cm), biomassa aérea (g), área foliar (cm ²) e biomassa seca da raiz (g) de MPBs em função da densidade de plantas de <i>C. rotundus</i>	46
Tabela 9. Valores estatísticos de R do teste de pareamento de análise de similaridade (ANOSIM) da estrutura da comunidade bacteriana e fúngica do solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> , em competição com plantas daninhas....	51
Tabela 10. Índices de riqueza, diversidade e uniformidade bacteriana e fúngica, de solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> , em competição com plantas daninhas.....	55
Tabela 11. Abundância relativa (%) do gênero <i>Azospirillum</i> no solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> , em competição com plantas daninhas.....	57
Tabela 12. Atividade enzimática do solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com Aprinza (<i>N. amazonense</i>) em competição com plantas daninhas	58
Tabela 13. Log10 de UFC mL ⁻¹ de <i>N. amazonense</i> em meio contendo diferentes doses do herbicida tebutiuron	64

Tabela 14. Log10 do número mais provável de UFC.g ⁻¹ de solo de <i>N. amazonense</i>	66
Tabela 15. Produção de ácido indol-acético (AIA) em mg L ⁻¹ , por <i>N. amazonense</i> em meio contendo diferentes herbicidas	67
Tabela 16. Fixação biológica de nitrogênio de <i>N. amazonense</i> em meio contendo diferentes tratamentos herbicidas	68
Tabela 17. Resumo da análise de variância referente aos ensaios de CMI	96
Tabela 18. Significância dos parâmetros e coeficiente de determinação (R ²) dos modelos polinomiais de regressão testados nos ensaios de CMI	96
Tabela 19. Características físico-químicas dos herbicidas utilizados	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) da comunidade (a) fúngica e (b) bacteriana do solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> e em competição com plantas daninhas	50
Figura 2. Abundância relativa percentual dos 20 gêneros mais abundantes do solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> , em competição com plantas daninhas. a) comunidade fúngica; b) comunidade bacteriana	54
Figura 3. Abundância relativa de enzimas preditas, relacionados ao ciclo do a) Nitrogênio, b) Fosforo, c) Carbono e d) Enxofre, do solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> , em competição com plantas daninhas	61
Figura 4. Log10 de UFC mL ⁻¹ de <i>N. amazonense</i> em meio de cultura contendo diferentes herbicidas	65
Figura 5. Heatmap dos efeitos de diferentes herbicidas sobre <i>N. amazonense</i> : sobrevivência no solo (NMP), produção de ácido indol-acético (AIA) e fixação biológica de nitrogênio (FBN)	68
Figura 6. Curva de crescimento de <i>N. amazonense</i> em meio caldo nutriente (CN)	93
Figura 7. Produção de ácido indol-acético (AIA) em mg L ⁻¹ por <i>N. amazonense</i> em meio caldo nutriente (CN) suplementado com triptofano (1mg L ⁻¹)	93
Figura 8. Curva padrão de β-glicosidase	94
Figura 9. Curva padrão de arilsulfatase	94
Figura 10. Curva padrão de ácido indol-acético	95

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Importância da cultura da cana-de-açúcar	18
2.2 Mudas pré-brotadas (MPBs).....	20
2.3 Bactérias promotoras de crescimento (BPC).....	21
2.4 <i>Nitrospirillum amazonense</i>	22
2.5 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal	23
2.5.1 Fixação Biológica de Nitrogênio	23
2.5.2 Produção de fitormônios	24
2.6 Plantas daninhas e a interferência na cultura canavieira	25
2.7 Interações microbiota-plantas sobre a capacidade competitiva.....	27
2.8 Toxicidade de herbicidas à BPC.....	29
2.9 Análise metataxonômica do solo	30
3. HIPÓTESES	31
4. OBJETIVO	31
4.1 Objetivos específicos	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 Efeito da inoculação com <i>N. amazonense</i> na competitividade de mudas pré-brotadas	32
5.2 Efeito da matocompetição na microbiota rizosférica.....	34
5.3 Avaliação da toxicidade de herbicidas à bactéria <i>N. amazonense</i>	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 Impacto da inoculação com Aprinza (<i>N. amazonense</i>) na competitividade de MPBs de cana-de-açúcar	42
6.2 Estrutura da comunidade microbiana do solo rizosférico	48
6.3 Atividade enzimática do solo rizosférico	58
6.4 Toxicidade de herbicidas à bactéria <i>N. amazonense</i>	63
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS	75
9. APÊNDICES	93

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é considerada uma das culturas mais importantes da atualidade, fornecendo matéria-prima para a produção de açúcar, etanol, bioeletricidade e outros produtos essenciais a demanda alimentar e energética global (Ferreira, 2019; Silva, 2021; Zhang et al., 2025).

Diante desse cenário, para acompanhar o aumento contínuo da demanda e enfrentar desafios de sustentabilidade e eficiência produtiva, novas estratégias estão sendo desenvolvidas (Huang, 2024). Entre elas, destaca-se o uso de bactérias promotoras de crescimento (BPC). Esses microrganismos, capazes de colonizar a rizosfera das plantas e estimular seu crescimento e desenvolvimento, vêm sendo incorporados ao sistema canavieiro como uma solução inovadora para aumentar de maneira sustentável a produtividade da cultura (Fiuza, 2022).

A ação benéfica destas bactérias pode ocorrer de forma direta, por meio da fixação biológica de nitrogênio e produção de substâncias fitoestimuladoras, ou de forma indireta através da indução de resistência sistêmica a patógenos e pela produção de sideróforos (Machado, 2015; Labanca, 2019).

Atualmente, a bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense*, formulada no produto comercial Aprinza[®], possui registro no MAPA para ser utilizada comercialmente como bioestimulante no crescimento da cana-de-açúcar (BASF, 2019). A inoculação de *N. amazonense* tem se mostrado capaz de promover aumento significativo na produtividade da cultura. Plantas inoculadas com a espécie têm apresentado aceleração na brotação das gemas, modificações na arquitetura do sistema radicular, com aumento de tamanho e número de raízes secundárias de menor diâmetro, e aumento no perfilhamento e área foliar, resultando em maior produtividade de colmos (EMBRAPA, 2018; De Santis et al., 2020; Schwab et al., 2023).

Além de contribuir para o desenvolvimento da cultura, o uso de bactérias promotoras de crescimento pode representar uma ferramenta útil para mitigar os efeitos negativos de fatores bióticos, como a interferência causada por plantas daninhas. A incidência dessas plantas nos canaviais é considerada o principal fator biótico que compromete a produtividade da cultura, e a competição direta por recursos do meio representa a principal forma de interferência dessas plantas (Martinelli et al., 2019).

Espécies como *Cyperus rotundus*, *Merremia aegyptia* e *Urochloa decumbens* são comumente encontradas nesses ambientes e apresentam alta agressividade competitiva, causando declínios de produção que variam desde de reduções significativas até perda completa da produtividade de colmos, dependendo do período de convivência (Amaral et al., 2018; Azania, 2018; Giraldele et al., 2024).

A intensidade da competição por recursos entre as raízes da cultura e das plantas daninhas varia de acordo com a disponibilidade e tipo de recursos presente no solo, das espécies vegetais e da capacidade que estas possuem de desenvolver de forma rápida um sistema radicular extenso, de diâmetro reduzido e área superficial ampla (Galon et al., 2012).

Por meio da liberação de seus exsudatos radiculares, as plantas em competição possuem a capacidade de provocar modificações na comunidade microbiana, que se transforma em uma comunidade diferente das visualizadas em monoculturas, induzindo simbioses e associações benéficas, que são capazes de promover seu próprio desenvolvimento e inibir o crescimento de outras espécies vegetais (Sanon et al., 2009; Massenssini et al., 2014a).

Contudo, a interferência consiste em um fenômeno recíproco, onde tanto cultura quanto planta daninha são capazes de interagir com o meio e limitar o desenvolvimento de plantas concorrentes (Kuva et al., 2000; Massenssini et al., 2014b).

Deste modo, a inoculação da cana-de-açúcar com BPC, por potencializar as interações benéficas cana-microbiota, pode atuar de modo a alterar a dinâmica da competição planta daninha-cultura, trazendo vantagens à cana-de-açúcar nas fases iniciais de seu desenvolvimento (Matos, 2017).

Ademais, o controle químico com herbicidas consiste na tática de controle de plantas daninhas mais empregada nos canaviais, com diversas moléculas registradas para essa cultura, a exemplo de clomazone, imazapic, tebuthiuron, indaziflam, *S*-metolachlor, metribuzin, isoxaflutole, sulfentrazone e flumioxazin. Entretanto, a aplicação desses herbicidas pré-emergentes sobre o solo pode atingir a microbiota rizosférica e afetar direta ou indiretamente a quantidade e atividade dos microrganismos ali presentes (Ahemad e Khan, 2010; Staley et al., 2015).

Os herbicidas podem gerar danos específicos às células bacterianas, podendo haver efeitos bacteriostáticos e bactericidas (Lino, 2018), e redução ou inibição de sua capacidade de realizar funções fisiológicas, tais como a FBN e a produção de auxinas (Ahemad e Khan, 2012).

Embora seja conhecido que as interações entre as plantas e a microbiota rizosférica possam influenciar diretamente o desempenho agrônomo das culturas, ainda são escassos os estudos que investigam como a inoculação com BPC pode afetar a dinâmica competitiva entre culturas e plantas daninhas. Além disso, pouco se sabe sobre a seletividade e os efeitos ecotoxicológicos de herbicidas pré-emergentes, amplamente utilizados em canaviais, sobre o funcionamento fisiológico de rizobactérias benéficas como *N. amazonense*. Tais lacunas limitam a adoção segura e eficaz dessas tecnologias no manejo integrado de plantas daninhas e na promoção da produtividade da cana-de-açúcar.

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto da inoculação com *N. amazonense* na competitividade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar frente a diferentes espécies de plantas daninhas, investigar o efeito da matocompetição sobre a composição da microbiota rizosférica e avaliar a toxicidade de herbicidas pré-emergentes sobre as funções fisiológicas de *N. amazonense*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Atualmente, o Brasil é uma das principais potências mundiais, ocupando a décima posição entre as maiores economias do mundo (FMI, 2025). No âmbito nacional, o agronegócio se apresenta como um dos pilares da economia, sendo responsável por aproximadamente 21,8 % do produto interno bruto (CEPEA, 2024). Dentre as culturas de maior importância e representatividade do agronegócio brasileiro, destaca-se a cana-de-açúcar.

Originária do sudoeste asiático, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das mais produtivas espécies de plantas conhecidas (Tejera et al., 2007). Pertencente à família Poaceae, a espécie semi-perene de metabolismo C4 possui alta eficiência na conversão de energia, e elevada capacidade de produção de biomassa e acúmulo de sacarose (Silva, 2022).

Devido às suas características, a cana-de-açúcar é considerada uma das matérias-primas mais importantes da atualidade, tendo seus produtos e subprodutos extrema relevância no suprimento da demanda alimentar e energética da população mundial (Zhang et al., 2025).

O Brasil lidera a produção e exportação mundial de cana-de-açúcar e seus derivados, sendo responsável por mais de 40% do cultivo da cultura em todo o mundo (Lima et al., 2022). A área cultivada com cana-de-açúcar no país abrange cerca de 8,69 milhões de hectares. A região Centro-sul destaca-se como polo de produção nacional, concentrando cerca de 91% da área total cultivada no país. Dentre os estados da federação, São Paulo se apresenta como maior estado produtor, sendo responsável por mais de 50% da produção nacional, seguido respectivamente pelos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (CONAB, 2024).

Dentre os principais produtos obtidos a partir da cana-de-açúcar, tem-se o açúcar e o etanol. Não obstante, a partir de seus subprodutos e resíduos, a cultura fornece ainda insumos para produção de bioeletricidade, biogás, bioplásticos, biofertilizantes, cosméticos, entre outros produtos (Ferreira, 2019).

O cultivo da cana-de-açúcar é conduzido principalmente pela demanda mundial de açúcar, sendo a cultura utilizada como matéria-prima para produção de aproximadamente 80% de todo açúcar consumido no mundo (Mantovani, 2022). Contudo, visando atenuar os efeitos do aquecimento global, pela diversificação da matriz energética e diminuição do uso de combustíveis fósseis, a demanda por etanol tem crescido cada vez mais, ocasionando contínua expansão do cultivo de cana-de-açúcar para produção do biocombustível (Mialiachi Júnior et al., 2020).

No que concerne o cenário nacional, o Brasil apresenta protagonismo na produção de açúcar e etanol, liderando a produção e exportação mundial de açúcar e ocupando a segunda posição na produção mundial do biocombustível (UNICA, 2024a). Segundo dados da CONAB (2024), o país estima produzir cerca de 44 milhões de toneladas de açúcar e 28,86 bilhões de litros de etanol na safra 2024/2025.

Além do fornecimento de matéria-prima para o suprimento da demanda de açúcar e etanol, a cana-de-açúcar tem se destacado ainda na geração de bioeletricidade. De acordo com dados da UNICA (2024b), a produção de energia proveniente da cana-de-açúcar gerou em 2023 cerca de 21 mil GWh, representando cerca de 75% de toda bioeletricidade proveniente de biomassa do país, tornando a cultura a 3ª maior fonte da matriz elétrica nacional. Por ser produzida próximo aos centros consumidores e possuir pico de geração nos períodos de estiagem, a bioeletricidade obtida a partir dos resíduos da cana-de-açúcar se apresenta como uma importante fonte complementar a energia hidroelétrica, contribuindo

de forma sustentável para o aumento da segurança energética do país (Guido, 2022; UNICA, 2024b).

O setor sucroenergético exerce ainda importante papel econômico-social, à medida que gera em toda a cadeia produtiva aproximadamente 2,4 milhões de empregos diretos e indiretos, sendo diretamente responsável por 2% do Produto Interno Bruto (PIB) (Lima et al., 2022).

Dada a grande importância socioeconômica e ambiental da cana-de-açúcar, visando aumentar a produtividade e sustentabilidade da cultura, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e aplicadas ao sistema produtivo, a exemplo do uso de mudas pré-brotadas e da aplicação de inoculantes à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal.

2.2 MUDAS PRÉ-BROTADAS

O sistema de plantio utilizando mudas pré-brotadas (MPBs) tem sido recomendado para substituir o sistema convencional de plantio por toletes, visto suas vantagens econômicas, fitossanitárias e ambientais (Landell et al., 2013). As MPBs são obtidas por meio de gemas contidas nos nós dos colmos da cana-de-açúcar, denominados de minirrebolos, os quais são tratados com inseticidas e fungicidas e plantados em tubetes contendo substrato (Sandrini et al., 2021).

Além de proporcionar alto padrão clonal, uniformidade de plantio e vigor, as MPBs permitem reduzir substancialmente a quantidade de matéria prima para instalação do canavial. Quando comparadas ao sistema de plantio convencional, as mudas geram economia de até 90% de colmos-sementes, implicando em redução de custos e aumento de lucratividade ao produtor (Nicchio et al., 2020).

Por serem previamente tratadas com inseticidas e fungicidas, as MPBs promovem elevada qualidade fitossanitária ao canavial, diminuindo a incidência de pragas e doenças que poderiam ser disseminadas através dos colmos (Elia, 2015). A alta sanidade do material propagativo implica na redução de aplicações de agrotóxicos nas áreas de cultivo e permite o aumento da longevidade dos canaviais, resultando em economia de insumos químicos, redução do tráfego de máquinas e uso de combustíveis fósseis.

A tecnologia de multiplicação MPB tem se expandido rapidamente, principalmente em implantação de viveiros, replantio de áreas comerciais, e na expansão e renovação de áreas com introdução de novas variedades de cana-de-açúcar (Souza et al., 2019). Entre 2019

e 2022, a participação das MPBs plantadas pelos produtores brasileiros, cresceu de 41% para 74%, representando um aumento de 82% em três anos (IAC, 2024).

Contudo, algumas desvantagens desse sistema de plantio incluem a necessidade de irrigação após o transplante para garantir o melhor "pegamento" das mudas no campo. Além disso, a falta de informações sobre a compatibilidade com outras tecnologias, como a inoculação de bactérias promotoras de crescimento, representa desafios a serem superados (Perez, 2017).

2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

O solo consiste em um ambiente que abriga grande quantidade e diversidade de microrganismos. Na rizosfera, região do solo localizada próxima às raízes, os microrganismos estabelecem interações com as plantas, podendo colonizar a superfície (colonização epifítica) ou ocupar os espaços intercelulares (colonização endofítica) dos tecidos vegetais (Reis, 2005).

A comunicação entre a microbiota e os vegetais se apresenta como uma via de mão dupla, mediada pela liberação de exsudatos radiculares por parte da planta e pela produção e excreção de diversos compostos por parte dos microrganismos (Bezerra, 2021). A interação microrganismo-planta pode promover respostas benéficas, neutras ou prejudiciais ao desenvolvimento vegetal (Godoy, 2020).

Bactérias do solo que colonizam a rizosfera das plantas e contribuem positivamente no seu crescimento e desenvolvimento via produção e excreção de produtos químicos liberados nas proximidades da rizosfera são comumente denominadas de bactérias promotoras de crescimento - BPC (Fiuza, 2022). A ação benéfica das BPC sobre as plantas pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, podendo estes serem classificados como biofertilizantes, fitoestimuladores e biopesticidas, sendo a maioria das espécies capaz de atuar simultaneamente sobre mais de um mecanismo (Mendonça et al., 2020).

Em termos didáticos esses mecanismos podem ser divididos em mecanismos de ação direta e indireta. A ação direta engloba os mecanismos relacionados ao aumento da disponibilidade de nutrientes, tais como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e a produção de substâncias fitoestimuladoras, a exemplo dos hormônios pertencentes aos grupos das auxinas, giberelinas e citocininas. Já os mecanismos de ação indireta envolvem a indução de resistência sistêmica a patógenos, pela produção de

compostos como ácido cianídrico, antibiose, chitinases, glucanases e sideróforos (Machado, 2015; Labanca, 2019).

Várias espécies de bactérias diazotróficas associativas têm demonstrado capacidade de promover o crescimento vegetal na cultura da cana-de-açúcar, dentre elas, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Beijerinckia*, *Herbaspirillum*, *Paraburkholderia* e *Gluconacetobacter* (Lopes, 2013).

2.4 *Nitrospirillum amazonense*

Pertencente à classe Alphaproteobacteria, família Rhodospirillaceae, a espécie *Nitrospirillum amazonense*, anteriormente descrita como *Azospirillum amazonense*, consiste em uma bactéria de vida livre, gram-negativa, aeróbica, que se apresenta em colônias circulares e lisas de coloração creme quando cultivadas em meio ágar. Diazotrófica associativa facultativa, a espécie é capaz de colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes das plantas a ela associadas (Lin et al., 2014; Santos, 2020).

A espécie foi inicialmente isolada de gramíneas forrageiras nativas da Amazônia brasileira e posteriormente pôde ser também encontrada colonizando plantas de cana-de-açúcar e de cereais em diversas regiões do Brasil (Terra, 2018).

No que tange os mecanismos de promoção de crescimento, é conhecido que *N. amazonense*, além de atuar realizando a fixação biológica de nitrogênio, também age por meio da síntese e liberação de fitormônios tais como auxinas (principalmente AIA), citocinas e giberelinas (Reis Júnior et al., 2004; Cecagno, 2007).

A inoculação de *N. amazonense* na cultura de cana-de-açúcar tem se mostrado capaz de promover aumento significativo na produtividade da cultura, sendo visualizados em plantas inoculadas com a espécie aceleração na brotação das gemas, modificações na arquitetura do sistema radicular, com aumento de tamanho e número de raízes secundárias de menor diâmetro e aumento no perfilhamento e área foliar, resultando em maior produtividade de colmos (De Santis et al., 2020; Schwab et al., 2023).

Os estudos direcionados na área resultaram no desenvolvimento de um inoculante microbiológico líquido. O produto, que é denominado Aprinza[®] (BASF) contém células de *Nitrospirillum amazonense* (estirpe CBAmC – BR11145) e possui registro no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), para ser usado comercialmente como bioestimulante no crescimento da cana-de-açúcar (EMBRAPA, 2018).

Na literatura podem ser encontrados trabalhos que evidenciam o efeito promotor de crescimento da bactéria *N. amazonense* sobre a cana-de-açúcar. Reis et al. (2020), analisando a performance da variedade RB966928 inoculada com o produto Aprinza® (*N. amazonense*) em condições de campo, visualizaram aumento de 41% no crescimento médio das plantas inoculadas, quando comparadas com as testemunhas sem inoculação. De forma análoga, Mascarenhas (2021), também observou aumento de 41% no peso seco de colmos, quando a mesma variedade foi inoculada com o inoculante Aprinza®. Semelhantemente, De Santis et al. (2020) também observaram efeito significativo da inoculação com o produto, visto que foram observados aumento de 20% no peso de colmos e 25% no rendimento total de açúcar de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515.

2.5 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

2.5.1 *Fixação biológica de nitrogênio*

A fixação biológica de nitrogênio é um processo realizado por rizobactérias denominadas diazotróficas, que possuem o complexo enzima nitrogenase, capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), sendo esta uma forma combinada passível de assimilação pelas plantas (Lima, 2020).

O nitrogênio (N) consiste em um nutriente fundamental para a nutrição vegetal, por participar diretamente de processos essenciais como a fotossíntese e ser constituinte obrigatório de biomoléculas a exemplo de aminoácidos, proteínas e enzimas (Ferreira, 2017).

Três são as formas passíveis de o nitrogênio ser importado pela cultura no sistema solo-planta: por meio da decomposição atmosférica, fixação biológica de nitrogênio ou através de adubações químicas e orgânicas. Contudo, atualmente adubações nitrogenadas utilizando fertilizantes sintéticos são as predominantes nos canaviais (Barreiros, 2020).

O nitrogênio é exigido em grandes quantidades pela cana-de-açúcar, sendo necessário para um bom rendimento de colmos, uma média de até 130 kg de N-fertilizante por hectare (Simões et al., 2018). Estima-se que a adubação nitrogenada em cana seja responsável por até 23% da energia fóssil utilizada nas operações da cultura (Joris, 2015).

Além do alto custo, que representa um fator limitante para a produção, a utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos possui ainda baixo desempenho, visto que grande parte do nutriente aplicado é perdido por processos microbiológicos (nitrificação,

desnitrificação, imobilização), químicos (trocas, fixação, precipitação, hidrólise) e físicos (lixiviação, volatilização). Não obstante, a lixiviação de nitrato é considerada a principal via de perda de N disponível às plantas, ocorrendo alto risco de contaminação ambiental (Stacciarini, 2020).

Diante do exposto, a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar se apresenta como uma alternativa viável para aumentar a sustentabilidade do processo produtivo, visto que a fixação biológica de nitrogênio por microrganismos diazotróficos tem potencial para substituir total ou parcialmente a adubação nitrogenada, gerando redução do uso de fertilizantes nitrogenados provenientes de combustíveis fósseis não renováveis (Duarte, 2018).

Estudos demonstram que a depender da variedade e das espécies de bactérias diazotróficas associadas, a contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cana-de-açúcar pode fornecer até 70% do nitrogênio requerido pela cultura (De Santis et al., 2020).

2.5.2 Produção de fitormônios

Fitormônios ou hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham funções na regulação do crescimento das plantas (Pedrinho et al., 2010).

Estas substâncias agem como mensageiros químicos influenciando a capacidade de reação dos vegetais ao ambiente, ao atuarem diretamente na transdução de sinais intra e intercelulares, que estão envolvidos em processos de divisão e diferenciação celular, fototropismo, dominância apical e diferenciação vascular (Sousa, 2015).

Diversos microrganismos, como bactérias e fungos, possuem a capacidade de sintetizar hormônios de crescimento idênticos aos encontrados nas plantas (Pedrosa et al., 2015). Pela produção e liberação de fitormônios, as BPC possuem a capacidade de reprogramar de forma eficaz o metabolismo vegetal primário e secundário, facilitando a resposta das plantas a condições de estresses, causados por fatores bióticos e abióticos, como é o caso de estresses hídricos e nutricionais, ataque de pragas e doenças e matocompetição (Castrilho et al., 2017; Labanca, 2019).

As auxinas destacam-se dentro do grupo de reguladores de crescimento. Estas consistem em uma classe hormonal responsável por atuar na expansão, alongamento e divisão celular, principalmente no enraizamento, além de agir no aumento da formação de primórdios radiculares (Aguiar, 2012).

Dentre as auxinas, o ácido indol-acético (AIA) é o fitormônio mais produzido pelas bactérias promotoras de crescimento (Rezende et al., 2021). O AIA é reconhecido por sua capacidade de atuar sobre o metabolismo vegetal estimulando a planta a respostas rápidas, como na proliferação de células e alongamento celular, e respostas lentas como na divisão e diferenciação celular, provocando desta forma alterações morfológicas do sistema radicular, tais como aumento do comprimento da raiz, e número de pelos radiculares e raízes laterais (Mendonça et al., 2020). Modificações no sistema radicular, induzidas pela ação do AIA, foram comprovadas em estudos com mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, nas quais a inoculação com uma mistura de cinco bactérias promotoras de crescimento, incluindo *N. amazonense*, resultou em incrementos expressivos no comprimento (51%) e no volume das raízes (70%) (Santos et al., 2019).

2.6 PLANTAS DANINHAS E A INTERFERÊNCIA NA CULTURA CANAVIEIRA

A incidência de plantas daninhas em canaviais consiste no principal fator biótico responsável por comprometer a produtividade da cultura. Estas plantas competem diretamente com a cultura pelos recursos do meio, tais como água, luz, CO₂ e nutrientes; podem liberar substâncias alelopáticas, ser hospedeiras de pragas e doenças, causar prejuízos às operações de colheita, gerar decréscimo da longevidade dos canaviais e interferir na qualidade agroindustrial da cana-de-açúcar (Ferreira et al., 2010; Martinelli et al., 2019).

Diversas são as espécies de plantas daninhas que podem ser encontradas infestando áreas cultivadas com cana-de-açúcar, contudo, as espécies *Cyperus rotundus* (tiririca), *Merremia aegyptia* (merremia) e *Urochloa decumbens* (capim-braquiária) estão entre as mais abundantes e frequentes (Azania, 2018; Chinelato, 2021).

Dentre as espécies de plantas daninhas, *Cyperus rotundus* é considerada a mais disseminada e agressiva em cultivos agrícolas de todo o mundo, sendo responsável por causar reduções quantitativas e qualitativas nas principais culturas de valor econômico (Heck et al., 2020). A espécie de difícil controle apresenta rápido crescimento vegetativo e intensa produção de tubérculos, o que lhe confere alta capacidade competitiva. Os tubérculos, principal meio de disseminação da espécie, possibilitam grande infestação de áreas agrícolas em um curto período de tempo (Jakelaitis et al., 2003). A competição imposta pela tiririca tem impacto direto no rendimento da cana-de-açúcar, com registros de perdas que variam de 13% a 45% conforme a infestação (Durigan et al., 2005).

As espécies de corda-de-viola pertencentes ao gênero *Merremia* prejudicam a cana-de-açúcar em todas as fases de seu ciclo. Na fase inicial de desenvolvimento da cultura, atuam principalmente na competição por macronutrientes, já após a fase de perfilhamento, devido ao seu hábito trepador, competem agressivamente por luz ao se envolver aos colmos da cultura dificultando a absorção da radiação solar e acúmulo de sacarose, além de prejudicarem o rendimento operacional da colheita (Azania et al., 2011). O efeito cumulativo da competição por recursos faz com que infestações de corda-de-viola reduzam a produtividade da cana em até 46% (Silva et al., 2009).

Entre as gramíneas invasoras, *Urochloa decumbens* destaca-se como a espécie mais disseminada em todo país. Sua agressividade decorre de um sistema radicular profundo e eficiente, o qual permite fácil adaptação a diversos tipos de solo, aliado à capacidade de rebrota e contínua produção de biomassa durante o ano (Martinelli et al., 2019). Em condições de infestação predominante, essa espécie pode causar perdas de produtividade que alcançam 82% em cana-planta (Kuva et al., 2001), além de reduzir o número de cortes viáveis e elevar os custos de produção em até 30% (Ihara, 2021).

O potencial de redução da produtividade da cultura em função da interferência das plantas daninhas é variável e depende da severidade da infestação, das características das espécies competidoras, das condições edafoclimáticas, e dos tratos culturais (Santos Júnior, 2021).

Três são os períodos de interferência das plantas daninhas sobre as culturas, sendo eles: período total de prevenção a interferência - PTPI, período anterior a interferência - PAI e período crítico de prevenção a interferência - PCPI (Pitelli & Durigan, 1984). O PAI consiste no período o qual a cultura pode conviver com a planta daninha sem sofrer quaisquer interferências negativas na produtividade ou qualidade. O PCPI compreende o período empregado como medida para tomada de decisões, o qual estabelece a época crucial de intervenção com controle. Já o PTPI corresponde a somatória do PAI + PCPI e indica o período de tempo no qual a cultura deve ser mantida livre da matocompetição (Bonetti, 2021).

Quando não controladas adequadamente no PCPI (~26 a 68 dias), as plantas daninhas podem ocasionar reduções diárias de produtividade na cana-de-açúcar no sistema de MPBs, chegando a perdas de 8,22% por dia de convivência (Giraldeli et al., 2022).

A intensidade da competição por recursos entre as raízes da cultura e das plantas daninhas varia de acordo com a disponibilidade e o tipo de recursos presente no solo, das

espécies vegetais e da capacidade que estas possuem em desenvolver de forma rápida um sistema radicular extenso, de diâmetro reduzido e área superficial ampla (Galon et al., 2012). Estudos iniciais de competição entre espécies daninhas e culturas indicam que o sistema radicular é o principal fator de competitividade das plantas (Rizardi et al., 2001).

Contudo, a capacidade de interceptação da radiação solar também se apresenta como um importante fator associado à capacidade competitiva, visto que espécies que possuem como característica rápido crescimento da parte aérea, se sobressaem na competição por luz, recobrando as demais (Foerster, 2021).

Dentre as metodologias de avaliação do potencial de competição entre plantas, o método aditivo é o mais comumente utilizado para se obter dados referentes a produção e perdas ocasionadas pela matocompetição. Neste método, a densidade de uma das espécies competidoras se mantém constante (cultura), enquanto a densidade da outra (planta daninha) é variável. Neste cenário, as espécies daninhas que podem ser provenientes de infestação natural ou semeadura irão competir com a cultura de interesse por um período de tempo estabelecido no qual se queira estudar a interferência exercida por elas (Oliver e Buchanan, 1986; Paula, 2015; Radosevich, 1987).

2.7 INTERAÇÕES MICROBIOTA-PLANTA SOBRE A CAPACIDADE COMPETITIVA

Ao serem introduzidas em um novo ecossistema, as plantas possuem a capacidade de gerar alterações na composição e no funcionamento da população microbiana do solo (Sanon et al., 2009).

Por meio da liberação de seus exsudatos radiculares, as plantas modificam a estrutura das comunidades microbianas e alteram a disponibilidade de nutrientes no solo, facilitando seu próprio crescimento, sendo este um importante mecanismo capaz de alterar sua capacidade competitiva frente às demais espécies (Matos, 2017). Os exsudatos radiculares podem induzir simbioses e associações benéficas às plantas, e também atuar de modo a inibir o crescimento de espécies vegetais concorrentes (Sanon et al., 2009).

As estratégias utilizadas pelas plantas daninhas variam de acordo com a espécie e o ambiente no qual elas se encontram. Contudo, algumas espécies atuam de modo a reduzir a diversidade microbiana do meio e promover aumento de microrganismos específicos que favorecem seu crescimento (Bever, 2003). Estudos têm demonstrado que várias espécies de plantas daninhas, tais como *Ipomoea ramosíssima*, *Bidens pilosa*, *Eleusine indica* e

Ageratum conyzoides possuem a capacidade de se associar a fungos micorrízicos arbusculares, obtendo dessas associações vários benefícios nutricionais e não nutricionais que influenciam diretamente sua capacidade competitiva (Massenssini et al., 2014a; Matos, 2017).

Deste modo, é conhecido que a competição entre plantas daninhas e culturas provoca modificações na comunidade microbiana, que se transforma em uma comunidade diferente daquelas visualizadas em monoculturas (Massenssini et al., 2014a).

Contudo, a interferência consiste em um fenômeno recíproco, no qual a cultura também possui a capacidade de interagir com o meio e limitar o desenvolvimento das plantas daninhas (Kuva et al., 2000). Deste modo, tanto a planta daninha quanto a cultura são capazes de causar alterações na colonização das raízes de plantas concorrentes (Massenssini et al., 2014b).

A inoculação da cana-de-açúcar com BPC, por potencializar as interações benéficas planta-microbiota, apresenta-se como um importante fator de alteração na capacidade competitiva da cultura diante das espécies daninhas (Matos, 2017).

Embora a cana-de-açúcar apresente um metabolismo fotossintético altamente eficiente (via C4, que maximiza a fixação de CO₂ em condições de alta luminosidade e temperatura), sua produtividade ainda é comprometida pela competição com plantas daninhas, principalmente nas fases iniciais de seu desenvolvimento (Victoria Filho e Christofolleti, 2004).

A inoculação da cana-de-açúcar com BPC, pela produção de fitormônios e FBN, induz um rápido aumento no crescimento das raízes da cultura e gera modificações na arquitetura do sistema radicular, permitindo uma maior eficiência na absorção dos recursos do meio e aumento da velocidade do crescimento foliar, com conseqüente aceleração no fechamento das entrelinhas do canavial (Lopes, 2013), fatores estes que podem atuar de modo a modificar a dinâmica da competição planta daninha-cultura, trazendo vantagens à cana nas fases iniciais de desenvolvimento.

Embora seja conhecido que a interação microbiota-planta possa interferir significativamente no rendimento das culturas, estudos relacionados à interferência dessas interações na capacidade competitiva das culturas e plantas daninhas ainda são escassos.

2.8 TOXICIDADE DE HERBICIDAS A BPC

Entre as táticas de controle de plantas daninhas existentes, o controle químico se destaca devido à sua maior eficiência, rendimento operacional e menor custo por área, em comparação com os demais métodos. O uso de herbicidas consiste em uma importante ferramenta no manejo agrícola, e é empregado predominantemente em sistemas de produção do mundo todo (Lourenço, 2018).

A utilização de herbicidas pré-emergentes, ou seja, aqueles aplicados diretamente sobre o solo antes da emergência das plantas, consiste em uma prática comum nos canaviais (Silva et al., 2018). Embora a maioria dos agrotóxicos seja desenvolvido para atingir um alvo específico ou um grupo de organismos específicos, o uso destes produtos pode ter efeitos sobre organismos não-alvo (Staley et al., 2015), podendo afetar direta ou indiretamente a quantidade e atividade dos microrganismos do solo (Ahemad e Khan, 2010).

Os efeitos dos herbicidas sobre a microbiota do solo são difíceis de prever a priori. Enquanto alguns microrganismos possuem a capacidade de degradar essas moléculas, usando-as como fonte de energia, outros podem ser intoxicados (Staley et al., 2015).

Os pesticidas podem gerar danos específicos às células bacterianas, podendo haver efeitos bacteriostáticos e bactericidas pela inibição da síntese de proteínas, alterações de DNA e oxidação e destruição de membranas (Lino, 2018).

Em se tratando especificamente de moléculas herbicidas, diversos trabalhos na literatura têm demonstrado a toxicidade dessas moléculas sobre bactérias promotoras de crescimento vegetal (Peters, 2011; Silva et al., 2014; Santos et al., 2006). Procópio et al. (2013) analisaram dezoito herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar e observaram que a depender da molecular, o contato com os agrotóxicos gerou efeitos bactericidas e/ou bacteriostáticos nas células microbianas da espécie diazotrófica *G. diazotrophicus*. De forma semelhante, Procópio et al. (2011) verificaram o efeito tóxico das moléculas herbicidas sobre a sobrevivência da espécie *A. brasiliense*.

A interferência de herbicidas no metabolismo de BPC pode comprometer além do crescimento, a atividade destes microrganismos, reduzindo ou inibindo sua capacidade de realizar funções fisiológicas, tais como a FBN e a produção de auxinas (Ahemad e Khan, 2012). Schwerz et al. (2017) ao avaliar o efeito dos herbicidas diuron, imazapic, clomazone e sulfentrazone sobre a espécie *N. amazonense*, verificou que todos os herbicidas interferiram negativamente na FBN da bactéria.

Deste modo, considerando os impactos negativos documentados de herbicidas sobre a sobrevivência e funcionalidade microbiana, avaliações *in vitro* acerca dos efeitos ecotoxicológicos de moléculas pré-emergentes utilizadas na cultura da cana-de-açúcar em relação às atividades funcionais de rizobactérias promotoras de crescimento, se mostram relevantes na construção e implementação de estratégias eficientes de manejo de plantas daninhas.

2.9 ANÁLISE METATAXONÔMICA DO SOLO

A metataxonômica é uma técnica molecular que se baseia na análise genômica de moléculas de DNA extraídas diretamente de amostras ambientais, e que dispensa o cultivo ou isolamento de microrganismos (Ghosh et al., 2019; Carvalho et al., 2022). Essa abordagem possibilita a identificação e caracterização de espécies em amostras complexas, superando o viés da cultura, e fornece informações sobre a diversidade, atividade metabólica e funções dos microrganismos presentes (Rocha, 2021).

Em termos gerais, a análise metataxonômica compreende três etapas principais: extração do DNA da amostra ambiental, sequenciamento do material genético e análise de bioinformática (Conteville, 2016). Na análise da diversidade taxonômica, o material genético é avaliado pela amplificação de marcadores filogenéticos, como o gene rRNA 16S para procariotos e o gene ITS para eucariotos (Iocca, 2020).

A capacidade de gerar dados microbianos abundantes, rápidos e precisos impulsionou a adoção dessa técnica em pesquisas agrícolas (Li et al., 2020). Nesse contexto, sua aplicação tem sido ampla na avaliação da microbiota do solo, permitindo investigar como práticas como inoculações microbianas, presença de plantas daninhas e aplicação de herbicidas podem impactar a composição e funcionalidade do ecossistema microbiano (Ferrarezi et al., 2023; Ali et al., 2024; Monteiro et al., 2024). Uma pesquisa com *Azospirillum brasilense* inoculada em milho demonstrou, de forma detalhada, como a promoção de crescimento pela bactéria está diretamente associada à sua capacidade de estabelecimento no microbioma da rizosfera. A abordagem ômica permitiu correlacionar a persistência de táxons bacterianos específicos com a detecção de genes envolvidos em vias metabólicas benéficas, revelando o papel do inoculante na modulação funcional da comunidade microbiana (Ferrarezi et al., 2023). De forma análoga, um estudo recente, utilizando técnicas de sequenciamento, pôde verificar que a alteração do ambiente físico, através da matocompetição, foi capaz de remodelar significativamente a comunidade

microbiana do solo, favorecendo determinados táxons bacterianos e modificando índices de diversidade (Hammami et al., 2024).

Desta forma, dada sua capacidade de desvendar as complexas interações entre os componentes dos agroecossistemas, a metataxonômica tem se mostrado uma ferramenta chave para fomentar a inovação e o desenvolvimento de estratégias de manejo que abrangem, simultaneamente, a produtividade agrícola e a sustentabilidade ambiental (Caglan et al., 2024).

3. HIPÓTESES

- A inoculação com Aprinza (*N. amazonense*) em mudas pré-brotadas, por alterar a disponibilidade de nutrientes e gerar alterações na morfologia do sistema radicular da cultura, pode alterar a capacidade competitiva da cana-de-açúcar proporcionando vantagens competitivas.
- Plantas daninhas em competição com a cana-de-açúcar, pela liberação de seus exsudatos radiculares, podem gerar alterações na microbiota rizosférica de mudas pré-brotadas inoculadas com Aprinza (*N. amazonense*).
- A aplicação de herbicidas pré-emergentes registrados para cana-de-açúcar pode apresentar efeito tóxico sobre o crescimento e atividade da rizobactéria *N. amazonense*.

4. OBJETIVO

Avaliar o impacto da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*) na competitividade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar frente a espécies daninhas *Cyperus rotundus*, *Merremia aegyptia* e *Urochloa decumbens*, o efeito da matocompetição na microbiota rizosférica e a toxicidade de herbicidas pré-emergentes à bactéria *N. amazonense*.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*) na capacidade competitiva de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar frente às espécies de plantas daninhas *Cyperus rotundus*, *Merremia aegyptia* e *Urochloa decumbens*.

- Avaliar o impacto da competição das espécies *Cyperus rotundus*, *Merremia aegyptia* e *Urochloa decumbens* na atividade microbiana da rizosfera de mudas pré-brotadas inoculadas com Aprinza (*N. amazonense*).
- Avaliar *in vitro* o impacto dos herbicidas pré-emergentes clomazone, tebuthiuron, sulfentrazone, S-metolachlor, metribuzin, isoxaflutole, flumioxazin, indaziflam e imazapic sobre o crescimento, capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA da bactéria *N. amazonense*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Efeito da inoculação com *N. amazonense* na competitividade de mudas pré-brotadas

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, Araras, SP. As unidades experimentais foram compostas por vasos de polietileno com capacidade volumétrica de 30 litros, preenchidos com amostras de Latossolo Vermelho distrófico (LVd), coletadas da camada arável (0–20 cm) de uma área de mata nativa pertencente ao CCA/UFSCar, sem histórico de aplicação de pesticidas. As amostras foram peneiradas e homogeneizadas previamente à utilização nos experimentos.

A análise química e física do solo (Tabela 1) foi realizada pelo laboratório de química e fertilidade da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, utilizando-se metodologia descrita por Raij et al. (2001).

Tabela 1. Análise química e física de amostras de solo utilizadas no experimento.

Análise Química									
P	M.O	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
mg dm ⁻³	g dm ⁻³	CaCl ₂		mol _c dm ⁻³		%	mmol _c dm ⁻³		%
11	22	4,8	1,1	13	9	33	23	56	41
Micronutrientes					Análise Física				
B	Cu	Fe	Mn	Zn	Areia Total	Argila	Silte	Classificação Textural	
mg dm ⁻³ (ppm)					g dm ⁻³				
0,23	3,5	11	29,4	1,1	221	672	107	Argilosa	

Para cada espécie de planta daninha foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial $4 \times 2 + 2$, com 4 repetições. O primeiro fator foi constituído por 4 densidades de plantas e o segundo fator pela presença e ausência da inoculação microbiana das mudas, além de controles (somente mudas pré-brotadas com e sem inoculação).

O plantio da cana-de-açúcar foi realizado utilizando-se mudas pré-brotadas (MPBs), obtidas pela brotação de gemas individualizadas, conforme metodologia estabelecida por Landell et al. (2013). As mudas foram transplantadas 60 dias após a brotação das gemas, e a irrigação foi fornecida por sistema de aspersão conforme a demanda evapotranspiratória. A variedade utilizada foi a RB966928. De acordo com o Censo Varietal de cana-de-açúcar do IAC (2022/23), esta variedade se destaca em importância, como a mais plantada e cultivada no estado de São Paulo e a terceira mais cultivada no Brasil.

Três espécies de plantas daninhas: corda-de-viola (*Merremia aegyptia*), capim-braquiária (*Urochloa decumbens*) e tiririca (*Cyperus rotundus*), foram utilizadas, sendo estas as mais frequentemente encontradas em canaviais (Azania, 2018; Chinelato, 2021). As sementes foram compradas na empresa Agrocósmo, especialista em produção de sementes de plantas daninhas e a semeadura ocorreu no mesmo dia do transplante das MPBs. Cada espécie daninha foi avaliada em 4 densidades: (1, 2, 4 e 8 plantas por vaso, equivalente a 10, 20, 40 e 80 plantas.m⁻²). O desbaste e controle manual de outras plantas daninhas que germinaram durante o período de competição foram realizados para garantir a uniformidade dos tratamentos.

A inoculação das MPBs foi realizada por meio da imersão completa do sistema radicular das mudas, em solução comercial de Aprinza[®] (cuja composição consiste em células de *N. amazonense* BR11145 - estirpe CBA_mC em concentração de 1×10^8 UFC ml⁻¹). O manuseio do produto biológico foi realizado no início da manhã, de modo a garantir temperatura ambiente amena (<25°C) no momento da inoculação, conforme recomendação do fabricante (BASF, 2019). O transplante das mudas ocorreu imediatamente após a inoculação do produto, seguindo metodologia empregada por May et al. (2019).

O período de avaliação da competição das plantas daninhas sobre o desenvolvimento das MPBs com e sem inoculação compreendeu o total de 90 dias. O experimento foi conduzido entre 27 de janeiro e 27 de abril de 2024, em casa de vegetação não climatizada. Durante esse período (verão-outono), a temperatura média foi de

aproximadamente 23,5 °C e o fotoperíodo médio diário de 11,6 horas de luz natural, conforme dados da Estação Meteorológica da UFSCar (Centro de Ciências Agrárias, 2024).

Aos 90 dias após o transplântio as mudas foram avaliadas com relação aos seguintes parâmetros: altura (cm), a partir da base até a inserção da primeira folha; área foliar (cm²), utilizando-se o aparelho Licor-3000C (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA); biomassa da parte aérea (g), sendo para isto as mudas cortadas rentes ao solo e pesadas posteriormente em balança analítica; e biomassa seca da raiz (g) – sendo os vasos desmontados e as raízes lavadas e secas em estufa com circulação de ar 65°C por 48 horas e pesadas.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), precedida pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Bartlett), e quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico R (versão 4.5.1; R Core Team, 2025) por meio da interface RStudio (versão 2025.05.1+513; Posit Software, PBC).

5.2 Efeito da matocompetição na microbiota rizosférica

Aos 90 dias após o transplântio amostras do solo rizosférico das plantas de cinco tratamentos do ensaio anteriormente descrito: (1) MPB inoculada com *N.amazonense*; (2) MPB sem inoculação; (3) MPB inoculada em competição com *M. aegyptia* 40 plantas.m⁻²; (4) MPB inoculada em competição com *U. decumbens* 40 plantas.m⁻² e (5) MPB inoculada em competição com *C. rotundus* 40 plantas.m⁻², foram coletadas em tubos Falcon estéreis e armazenadas em ultrafreezer (-80°C), para posterior avaliação da diversidade microbiana através de análise metataxonômica, e da avaliação da atividade das enzimas β-glicosidase e arilsulfatase. A densidade de 40 plantas.m⁻², selecionada dentre os tratamentos em matocompetição, reflete uma densidade média de infestação observada em canaviais, e é comumente utilizada em estudos de matocompetição (Kuva et al., 2001; Silva et al., 2017; Schedenfeldt et al., 2022).

5.2.1 Análise metataxonômica do solo

As análises metataxonômicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

Para se avaliar a diversidade taxonômica da microbiota do solo rizosférico das mudas, foram utilizados métodos de sequenciamento de DNA de fungos e bactérias. O

método de análise utilizado foi baseado no sequenciamento de DNA que teve como alvo a região 16S rDNA de bactérias e a região espaçadora intergênica ITS de fungos.

O DNA total foi extraído de 0,4 g de cada amostra do solo rizosférico, utilizando um kit comercial (PowerSoil DNA Isolation, MoBio, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi verificada usando eletroforese em gel (1% de agarose), e a quantidade de DNA foi medida usando um fluorímetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

A região V3-V4 das sequências do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada utilizando os primers 515f (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806r (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (Apprill et al., 2015; Parada, Needham e Fuhrman, 2016). Para o sequenciamento da comunidade fúngica, a região do espaçador transcrito interno (ITS) do rRNA foi amplificada usando os primers (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (Gardes e Bruns, 1993).

As bibliotecas de amplicons foram criadas seguindo o protocolo padrão de preparação de bibliotecas de sequenciamento metagenômico Illumina. As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram: 95°C por 3 min, seguidas por 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 10 segundos e 72°C por 20 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 min. Todas as reações (20 µl) foram realizadas com KAPA High-Fidelity DNA Polymerase com 2 µl de DNA como molde. Todas as amostras foram quantificadas usando Qubit®, reunidas em quantidades equimolares e executadas na plataforma Illumina MiSeq com 300 leituras finais de pares de bases.

A base de dados utilizada para a identificação taxonômica das sequências foi a SILVA (SILVA rRNA gene database Project; Quast et al., 2013). Índices de alfa-diversidade (Chao, Shannon e Pielou) foram calculados utilizando o programa QIIME (Caporaso et al., 2010). Para determinar a estruturação das comunidades, foram gerados gráficos de abundância relativa dos grupos presentes nas amostras utilizando o mesmo programa. Para determinar a influência da inoculação e da matocompetição na composição das comunidades de bactérias e fungos foram realizadas análises multivariadas utilizando a Análise multivariada de Variância Permutacional - PERMANOVA, (função ANOSIM em R, permutações = 999), utilizando os softwares: Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) e Paleontological Statistics Software Package (Past), versão 4.0.

5. 2. 2 *Atividade enzimática do solo rizosférico*

As avaliações foram realizadas no laboratório de microbiologia do solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

A análise da atividade da microbiota rizosférica foi avaliada em relação à atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase, sendo estas importantes bioindicadoras da atividade biológica e qualidade do solo, por estarem associadas respectivamente ao ciclo de carbono e do enxofre (Melo et al., 2013; Peres et al., 2004).

Para tal, foram executados os métodos de determinação colorimétrica do p-nitrofenol descritos por Tabatabai et al. (1994) e Dick et al. (1996).

Amostras de 1 g do solo rizosférico foram pesadas e transferidas para tubos de ensaio estéreis. Na avaliação da atividade da enzima β -glicosidase, as amostras receberam 4 mL de solução estoque do Tampão Universal Modificado (MUB) pH 6 e 1 mL de solução de p-nitrofenil- β -D-glicosídeo (PNG), sendo posteriormente incubadas por 1 hora a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados aos tubos de cada tratamento 1 mL de CaCl_2 0,5 mol L⁻¹ e 4 mL de solução de Tris-hidroximetil-aminometano (Tris) pH 12 0,1 mol L⁻¹. Os tubos de ensaio foram então agitados em vortex por 5 segundos, e a suspensão do solo foi então filtrada em papel filtro Whatman n° 2. Após a filtragem, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (420 nm).

Na avaliação da atividade da enzima arilsulfatase, 4 mL de tampão de acetato 0,5 mol L⁻¹ e 1 mL de solução de p-nitrofenil sulfato de potássio (PNS) 0,05 mol L⁻¹ foram adicionados às amostras de solo rizosférico, que foram posteriormente incubadas por 1 hora a 37°C. Após o período de incubação, aos tubos de cada tratamento foram adicionados 1 mL de CaCl_2 0,5 mol L⁻¹ e 4 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹. A suspensão foi então filtrada em papel filtro Whatman n°2 e, posteriormente as amostras foram lidas em espectrofotômetro (410 nm).

O cálculo da atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase (expressa em μg de p-nitrofenol) foi realizado com base na comparação da leitura dos tratamentos em relação a uma curva-padrão de diferentes concentrações de p-nitrofenol (0-5 μg mL⁻¹) para cada enzima (Apêndice - Figuras 8 e 9).

5.3 Avaliação da toxicidade de herbicidas à bactéria *N. amazonense*

5.3.1. Preparo do inóculo

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, Araras, SP.

Para os testes, foi utilizada a estirpe de *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145-estirpe CBAmC) da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. As células da bactéria foram ativadas e multiplicadas em 200 mL de caldo nutriente (CN), cuja formulação, em g L⁻¹ de água destilada, consiste em: 1,0; extrato de carne; 2,0; extrato de levedura; 5,0; peptona; 5,0; cloreto de Sódio. A cultura foi incubada em shaker (30°C, 150 rpm), por 24h até atingir densidade óptica (DO600nm) maior que 0,8, equivalente a aproximadamente 2x10⁹ UFC mL⁻¹.

5.3.2 Preparo das soluções herbicidas

Nove herbicidas pré-emergentes registrados para cana-de-açúcar foram avaliados (Tabela 2). Soluções estoques dos herbicidas foram preparadas por meio de diluições, de modo que a adição de 1 mL da solução ao meio de cultura resultasse na concentração das doses desejadas. Antes e após a adição dos herbicidas, foi realizada a medição do pH do meio, sendo constatada a manutenção dos valores originais, sem alterações significativas.

Tabela 2. Tratamentos herbicidas

Ingrediente Ativo	Produto Comercial	Dose	
		g L ⁻¹ i.a ha ⁻¹	g L ⁻¹ p.c ha ⁻¹
Testemunha	-	-	-
Clomazone	Gamit	720	1440
Imazapic	Plateau	200	285
Tebuthiuron	Combine 500 SC	800	1600
Indaziflam	Alion	75	150
S-metolachlor	Dual gold	1680	1750
Metribuzin	Sencor 480	1680	3500
Isoxaflutole	Provence 750 WG	150	200
Sulfentrazone	Boral 500 SC	800	1600
Flumioxazin	Flumyzin 500 SC	150	300

*i. a = ingrediente ativo; p.c = produto comercial

5.3.3 Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI)

O delineamento experimental realizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial $9 \times 5 + 1$, sendo nove herbicidas (Tabela 2) testados em cinco doses: dose comercial (DC), dobro (2DC), um e meio da dose comercial (1,5 DC), metade ($\frac{1}{2}$ DC) e um quarto ($\frac{1}{4}$ DC) e tratamento controle, sendo cada dose considerada um tratamento, com três repetições.

A metodologia adotada para avaliar a concentração mínima inibitória foi baseada na descrita em trabalho de Procópio et al. (2011).

Deste modo, 1 mL das soluções-estoque dos herbicidas (preparadas conforme descrição anterior) foram misturadas em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo nutriente (CN). Para os tratamentos controle, foram aplicados os mesmos volumes de água destilada estéril. Posteriormente, foi adicionado ao meio 0,1 mL do inóculo microbiano. Em seguida, os tratamentos foram incubados em shaker ($30 \pm 2^\circ \text{C}$, 150 rpm) por 48h.

Após o período de incubação, as células de *N. amazonense* foram quantificadas por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Para tal, procedeu-se com a diluição seriada em solução salina (0,85%) até 10^{-8} , de cada tratamento, realizando-se, posteriormente, o plaqueamento por meio do método de espalhamento em superfície. Deste modo, 100 μL de cada diluição (em triplicata) foram espalhados com alça de Drigalski sobre placas de petri contendo meio de cultura sólido Nutriente Ágar. Em seguida as placas foram incubadas a 30°C por 24h.

A contagem do número de UFC mL^{-1} foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC mL}^{-1} = \frac{\text{Contagem de colônias} \times \text{Inverso da diluição}}{\text{Volume plaqueado (mL)}}$$

Todos os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Bartlett) para validação dos pressupostos da ANOVA. Uma vez verificadas as condições, aplicou-se análise de variância (teste F) adotando-se um nível de significância de 5% (Apêndice – Tabela 17).

Nos casos em que a ANOVA indicou efeito significativo, procedeu-se com análise de regressão para modelar a relação dose-resposta. A seleção do modelo considerou dois critérios principais: a significância estatística dos parâmetros (teste t para b_0 , b_1 , b_2 e b_3) e o coeficiente de determinação (R^2). Tratamentos que apresentaram o padrão de resposta –

estímulo em baixas doses e inibição em concentrações elevadas – foram submetidos ao modelo de Brain-Cousens, com avaliação dos parâmetros b , d , e , e f , para verificação da ocorrência de possível efeito hormético (Apêndice - Tabela 18).

As análises foram realizadas por meio do software estatístico R (versão 4.5.1; R Core Team, 2025) por meio da interface RStudio (versão 2025.05.1+513; Posit Software, PBC).

5.3.4 Avaliação da resistência de *N. amazonense* à aplicação de herbicidas no solo

Amostras de 1000 g de solo foram retiradas de uma mata nativa, localizada no Centro de Ciências Agrárias - UFSCar, na profundidade de 0-20 cm, sem aplicação anterior de nenhum pesticida. A análise química e física do solo é apresentada na Tabela 1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo as células bacterianas avaliadas na presença e ausência de nove tratamentos herbicidas, com quatro repetições. Os herbicidas foram aplicados na dosagem comercial (Tabela 2) e foram avaliadas duas testemunhas, uma sem uso de qualquer produto químico ou biológico e outra apenas com o uso do inoculante.

As amostras de solo foram destorroadas e peneiradas em malha de 2 mm, homogêneas e posteriormente submetidas ao processo de tinalização, o qual consiste na esterilização do solo para a eliminação de microrganismos edáficos (Basseto et al., 2008). Deste modo, o solo foi colocado sob pressão de vapor da autoclave, por 20min, durante três dias consecutivos, conforme metodologia descrita por Hungria e Araújo (1994).

Ao solo esterilizado, foram pulverizadas as soluções herbicidas nas doses comerciais (Tabela 2), em volume de calda equivalente a 200 L ha⁻¹.

Em seguida foi realizada a inoculação microbiana do solo, com a aplicação do inóculo em volume de calda equivalente a 150 L ha⁻¹. Para os tratamentos controle foram aplicados os mesmos volumes de água destilada estéril. As amostras de solo foram então incubadas à temperatura ambiente, por um período de 48 horas.

Para quantificação das células de *N. amazonense*, a metodologia empregada foi baseada na proposta por Videira, Araújo e Baldani (2007). Após o período de incubação, foram coletados de cada tratamento 10 g de solo, que foram diluídas em 90 mL de solução salina e, posteriormente, diluídas de forma seriada, acrescentando-se 1 mL da diluição original a tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina, sendo esse processo repetido até

a diluição 10^{-6} . De cada diluição, uma amostra (em triplicata) de 0,1 mL foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio de cultura semissólido LGI, sendo este um meio semisseletivo para o isolamento de *N. amazonense*. Posteriormente os frascos inoculados foram incubados a 30°C por um período de 7 dias.

A contagem da população bacteriana foi então realizada através da técnica do número mais provável (NMP) utilizando a tabela de McCrady para três repetições de cada diluição. O crescimento bacteriano foi detectado através da visualização da formação de película superficial característica, em forma de véu, no meio semissólido.

Os resultados obtidos na tabela McCrady (Dobereiner et al., 1995) foram submetidos à transformação logarítmica, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

5.3.5 Avaliação da capacidade de produção de ácido indol-acético (AIA)

Foram avaliados nove herbicidas registrados para cana-de-açúcar na dose comercial (Tabela 2). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições.

A metodologia utilizada para avaliar a produção de ácido indolacético (AIA) foi baseada na descrita por Cassetari (2015). Deste modo, 0,1 mL do inóculo bacteriano (preparado conforme descrição anterior) foi transferido para erlenmeyers de 125 mL contendo 50mL de caldo nutriente (CN) acrescidos de 1mg mL^{-1} de triptofano. Ao meio de cultura foi adicionado 1mL da solução-estoque dos herbicidas com as respectivas doses desejadas. Os frascos foram incubados em shaker (30 ± 2 °C, 150 rpm) por 48h.

Após o período de incubação, uma alíquota de 2 mL de cada tratamento foi transferida para tubos Falcon que foram então centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos. Uma amostra de 1 mL do sobrenadante foi transferida para microtubos, que receberam a adição de 1 mL do reagente de Salkowski (125 mL de ácido perclórico e 0,675 g de cloreto de ferro dissolvido em 5 mL de água destilada), sendo posteriormente incubada no escuro por 30 min.

A concentração de AIA foi então quantificada por absorbância em espectrofotômetro a 540nm com base em uma curva padrão de AIA (Apêndice - Figura 10).

5.3.6 Avaliação da capacidade de fixação de nitrogênio

Para avaliar o efeito dos herbicidas sobre a capacidade de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* de *N. amazonense*, a metodologia executada foi baseada na descrita em trabalho de Ferreira (2021). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos herbicidas e três repetições (Tabela 1).

Para tal, 0,1 mL do inóculo bacteriano foi adicionado a tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura NFB (livre de Nitrogênio). Ao meio de cultura NFB foram adicionados 1 mL das soluções-estoque dos herbicidas de cada tratamento. Os tubos de ensaio foram então incubados em estufa BOD (30 ± 2 °C) por sete dias.

Para determinação do nitrogênio total, o método de digestão executado foi o semi-micro Kjeldahl (Galvani e Gaertner, 2006). Desta forma, foram adicionados a cada tubo de ensaio 0,7 g de mistura de digestão (100 g de Na₂SO₄; 10 g de CuSO₄.5H₂O; 1 g de selênio em pó) e 1 mL de H₂O₂ e 2 mL de H₂SO₄, nesta ordem. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor por 8h a 100°C, posteriormente a temperatura foi elevada a 180°C por 2h e depois mantida a 360°C até que a mistura apresentasse cor verde palha.

Ao atingir a coloração desejada, foi realizada a destilação da amostra com hidróxido de sódio (40%). A amônia desprendida na reação foi coletada em erlenmeyer contendo 25 mL de solução de ácido bórico (H₃BO₃) + indicador de pH (vermelho de metila e verde de bromocresol), acoplado ao conjunto da destilação.

A solução final foi então titulada com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl) até a viragem do indicador, para quantificação do nitrogênio total (Nt) em miligramas por litro de meio, sendo este valor obtido por meio da fórmula:

$$NT = ((V_a - V_b) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100) / P1$$

Onde:

NT – Teor de nitrogênio total na amostra (%);

V_a – Volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL);

V_b – Volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL);

F – Fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹;

P1 – Massa da amostra (mL).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Impacto da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*) na competitividade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar

Em relação aos dados obtidos para as MPB em competição com a espécie *U. decumbens*, não foram observadas interações significativas entre os fatores inoculação x densidade de plantas para nenhum dos parâmetros de avaliação ($p > 0,05$). A inoculação influenciou significativamente a altura das MPBs ($p = 0,0261$), enquanto a densidade da planta daninha afetou a altura ($p = 0,0113$), biomassa aérea ($p = 0,0074$) e área foliar ($p < 0,0001$), sem interferir na biomassa de raízes ($p = 0,1604$).

N. amazonense promoveu incrementos na altura das MPB, resultando em média superior à das plantas não inoculadas. No entanto, não houve efeito estimulante significativo nas demais variáveis analisadas, haja vista que biomassa aérea (g), área foliar (cm²) e biomassa seca da raiz (g) apresentaram médias equivalentes, independentemente da aplicação do inoculante (Tabela 3).

Tabela 3. Altura (cm), Biomassa aérea (g), Área foliar (cm²) e Biomassa seca da raiz (g) de MPB de cana-de-açúcar em competição com *U. decumbens* em função da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*).

Tratamento	Altura (cm)	Biomassa aérea (g)	Área Foliar (cm ²)	Biomassa da raiz (g)
Com Inoculação	83,30 ± 11,24 a	154,08 ± 31,60 a	669,16 ± 223,30 a	46,69 ± 15,45 a
Sem Inoculação	79,55 ± 8,65 b	138,20 ± 25,52 a	571,80 ± 180,56 a	42,75 ± 16,26 a
CV (%)	11,24	17,92	22,48	29,80

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Teste de Tukey nas linhas (letras minúsculas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância.

No que tange o efeito do fator densidade (Tabela 4), foi possível observar que o aumento do número de plantas de *U. decumbens*, impactou negativamente o desenvolvimento das MPB, tanto em plantas inoculadas como não inoculadas. Reduções na altura (cm) e biomassa aérea (g) das mudas, foram observadas com a convivência de 80 plantas.m⁻². Para a área foliar (cm²), perdas foram visualizadas progressivamente a partir de 40 plantas.m⁻², com redução de mais de 50% da área foliar, em comparação ao controle, para a maior densidade analisada de 80 plantas.m⁻². Esses resultados corroboram com os encontrados por Paula et al. (2018), que visualizaram reduções de até 63% na biomassa seca

da cana-de-açúcar, quando MPBs conviveram com *U. decumbens* até os primeiros 90 dias após o transplântio.

Tabela 4. Altura (cm), Biomassa aérea (g), Área foliar (cm²) e Biomassa seca da raiz (g) de MPB de cana-de-açúcar em função da densidade de plantas de *U. decumbens*.

Densidade de Plantas (m ²)	Altura (cm)	Biomassa Aérea (g)	Área Foliar (cm ²)	Biomassa da raiz (g)
0	86,00 ± 12,86 a	154,65 ± 32,80 a	817,99 ± 172,37 a	37,99 ± 14,15 a
10	90,00 ± 7,96 a	160,46 ± 29,38 a	726,43 ± 111,25 ab	38,89 ± 10,82 a
20	87,38 ± 10,21 a	157,53 ± 31,14 a	649,71 ± 125,90 ab	51,82 ± 22,98 a
40	82,50 ± 5,42ab	141,71 ± 14,87ab	544,65 ± 177,44 bc	40,87 ± 11,43 a
80	73,75 ± 10,57 b	116,34 ± 14,30 b	363,62 ± 87,11 c	54,07 ± 12,10 a
CV (%)	10,48	16,54	20,73	35,82

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Teste de Tukey nas linhas (letras minúsculas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância.

Embora a competição com *U. decumbens* tenha demonstrado influenciar de forma negativa o desenvolvimento aéreo da cana-de-açúcar, reduções na biomassa do sistema radicular não foram observadas (Tabela 4). Este resultado pode estar relacionado ao fato de plantas em competição poderem adotar estratégias diferenciadas de alocação de recursos durante seu desenvolvimento, o que pode ocasionar alterações nas relações alométricas entre a parte aérea e o sistema radicular (Reis, 2016). Ademais, no contexto deste estudo, é importante considerar a diferença temporal no desenvolvimento das espécies em competição, pois, apesar das características agressivas das plantas daninhas, como rápida germinação, crescimento acelerado e eficiente captação de recursos, a cana-de-açúcar foi transplantada como muda e já possuía um sistema radicular desenvolvido, o que lhe conferiu uma vantagem inicial na ocupação do solo, enquanto as plantas daninhas tiveram como propágulo inicial, sementes (Castro e Garcia, 1996; Oliveira Júnior et al., 2011; Rizardi et al., 2001).

Na presença de *Merremia aegyptia*, foi observada interação significativa entre inoculação e densidade de plantas para a área foliar das MPBs ($p=0,0078$). As mudas inoculadas com *N. amazonense* apresentaram maior área foliar média em comparação às não inoculadas (Tabela 5). Para os demais parâmetros avaliados — altura ($p=0,2973$), biomassa aérea ($p=0,1215$) e biomassa de raízes ($p=0,2039$) — a interação entre os fatores não foi significativa.

Tabela 5. Altura (cm), Biomassa aérea (g), Área foliar (cm²) e Biomassa seca da raiz (g) de MPB de cana-de-açúcar em competição com *M. aegyptia* em função da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*).

Tratamento	Altura (cm)	Biomassa aérea (g)	Área Foliar (cm ²)	Biomassa da raiz (g)
Com Inoculação	80,25 ± 15,24 a	138,08 ± 40,81 a	924,69 ± 132,03 a	40,36 ± 13,63 a
Sem Inoculação	76,95 ± 9,57 a	132,05 ± 31,42 a	711,29 ± 146,75 b	42,17 ± 20,26 a
CV (%)	12,36	21,02	21,11	19,41

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Teste de Tukey nas linhas (letras minúsculas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância.

No entanto, ao analisar isoladamente os tratamentos inoculados, foi possível observar uma redução na área foliar das mudas com o aumento da densidade das plantas daninhas. Esse efeito da densidade sobre a redução da área foliar não foi visualizado nas mudas não inoculadas (Tabela 6), o que sugere que a inoculação pode ter induzido uma correlação negativa entre o aumento da densidade de *M. aegyptia* e a redução da área foliar da cana-de-açúcar.

Tabela 6. Altura (cm), Biomassa aérea (g), Área foliar (cm²) e Biomassa seca da raiz (g) de MPB de cana-de-açúcar em função da densidade de plantas de *Merremia aegyptia*.

Densidade Plantas (m ²)	Altura (cm)	Biomassa Aérea (g)	Área Foliar (cm ²)		Biomassa da raiz (g)
			C.I	S.I	
0	86,00 ± 12,86 a	154,65 ± 32,80 a	924,69 ± 132,03 Aa	711,29 ± 146,75 Ba	37,99 ± 14,15 ab
10	82,00 ± 8,25 a	145,09 ± 28,10 a	646,63 ± 121,33 Aabc	555,42 ± 134,74 Aa	29,14 ± 11,70 b
20	68,88 ± 13,72 a	118,07 ± 43,48 a	440,76 ± 63,09 Bbc	687,18 ± 178,85 Aa	40,56 ± 4,52 ab
40	77,63 ± 11,55 a	128,48 ± 43,03 a	705,28 ± 206,62 Aab	449,89 ± 156,08 Ba	41,79 ± 14,54 ab
80	78,50 ± 12,43 a	129,04 ± 25,87 a	370,27 ± 91,01 Ac	449,49 ± 76,25 Aa	56,84 ± 24,42 a
CV (%)	15,42	25,70	23,61		38,64

*C.I: Com inoculação; S.I: Sem inoculação. Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Tukey nas linhas (letras minúsculas) e colunas (letras maiúsculas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância.

O aumento da densidade de plantas intensifica o contato e a sobreposição das raízes das espécies em competição, criando um cenário em que as plantas daninhas podem se beneficiar dos recursos nutricionais proporcionados pela microbiota associada à cultura. Além disso, as plantas daninhas podem se associar a esses microrganismos, potencializando sua capacidade competitiva e, conseqüentemente, aumentando o grau de interferência sobre

a cultura (Fialho et al., 2016). Um exemplo claro dessa dinâmica também foi observado em um estudo sobre a interferência de *Bidens pilosa* e *Eleusine indica* na cultura do milho: o contato entre raízes não apenas reduziu a colonização micorrízica nas raízes do milho, mas também aumentou essa colonização nas plantas daninhas, comprometendo o desenvolvimento da cultura (Fialho, 2013).

Ademais, *M. aegyptia* possui hábito trepador, o que implica que o aumento da densidade de plantas dessa espécie possa ter reduzido a área foliar da cana-de-açúcar, também devido à competição por luz na parte aérea (Castro e Garcia, 1996; Martins et al., 2010).

A biomassa seca da raiz (g) foi influenciada pela densidade de plantas ($p < 0,05$). Contudo, as variações observadas podem estar associadas não apenas ao volume de raízes produzidas pela cana-de-açúcar, mas também às raízes da planta daninha, considerando que ambas se desenvolveram no mesmo volume de solo.

Metodologias de avaliação da biomassa do sistema radicular de plantas em competição, principalmente em solos argilosos, como o deste estudo (Tabela 1), podem apresentar limitações operacionais. A sobreposição e o entrelaçamento das raízes e pelos radiculares das espécies concorrentes dificultam sua separação manual, o que pode levar a resultados, que podem não expressar com precisão a realidade (Vasconcelos et al., 2003).

Não foram observados efeitos da inoculação com *N. amazonense* sobre a capacidade competitiva das mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar em competição com *Cyperus rotundus*. Os resultados indicaram ausência de interação significativa entre os fatores inoculação e densidade de plantas para todos os parâmetros avaliados ($p > 0,05$). De forma isolada, a inoculação também não exerceu influência estatística sobre a altura, biomassa aérea, área foliar e biomassa seca das raízes (Tabela 7).

Tabela 7. Altura (cm), Biomassa aérea (g), Área foliar (cm²) e Biomassa seca da raiz (g) de MPB de cana-de-açúcar em competição com *Cyperus rotundus* em função da inoculação com Aprinza (*N. amazonense*).

Tratamento	Altura (cm)	Biomassa aérea (g)	Área Foliar (cm ²)	Biomassa da raiz (g)
Com Inoculação	82,05 ± 11,59 a	143,30 ± 34,64 a	685,42 ± 188,06 a	62,20 ± 26,10 a
Sem Inoculação	76,15 ± 11,14 a	130,38 ± 31,17 a	590,25 ± 159,25 a	53,67 ± 23,45 a
CV (%)	18,59	36,73	21,03	64,49

* Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Teste de Tukey nas linhas (letras minúsculas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância.

Para o fator densidade de plantas, reduções na biomassa das MPB foram visualizadas quando estas competiram com 80 plantas.m⁻² de *C. rotundus*. No parâmetro área foliar, decréscimos significativos puderam ser observados já a partir do convívio com 40 plantas.m⁻² da espécie. Entretanto, para altura e biomassa seca da raiz, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle (Tabela 8).

Os resultados deste estudo corroboram com os de Giraldeli et al. (2022) que ao estudar a interferência de *C. rotundus* no desenvolvimento da cana-de-açúcar no sistema de mudas pré-brotadas, verificou que a convivência da espécie daninha com a cultura no período crítico de prevenção à interferência (PCPI ~ 26-68 dias), pode ocasionar uma redução diária de até 8% na produtividade da cana.

Tabela 8. Altura (cm), Biomassa aérea (g), Área foliar (cm²) e Biomassa seca da raiz (g) de MPB de cana-de-açúcar em função da densidade de plantas de *Cyperus rotundus*.

Densidade de Plantas (m ²)	Altura (cm)	Biomassa Aérea (g)	Área Foliar (cm ²)	Biomassa da raiz (g)
0	86,00 ± 12,86 a	154,65 ± 32,80 a	817,99 ± 172,37 a	37,99 ± 14,15 a
10	77,38 ± 7,25 a	135,46 ± 26,75 ab	659,92 ± 138,01 b	59,79 ± 35,23 a
20	80,75 ± 11,77 a	145,67 ± 28,21 a	628,15 ± 109,94 ab	66,24 ± 31,55 a
40	80,13 ± 13,71 a	140,93 ± 40,19 ab	585,58 ± 160,87 b	61,33 ± 15,25 a
80	71,25 ± 8,61 a	107,99 ± 22,33 b	497,54 ± 166,34 b	64,33 ± 13,42 a
CV (%)	12,43	18,56	22,48	36,03

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Teste de Tukey nas linhas (letras minúsculas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância.

Embora algumas variáveis, como altura e área foliar, tenham apresentado incrementos com a inoculação microbiana em determinados tratamentos, não foi possível observar, neste trabalho, a ação promotora de crescimento da bactéria *N. amazonense* sobre as mudas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 inoculadas com Aprinza[®]. Consequentemente, não foram registradas alterações significativas na capacidade competitiva da cultura frente às espécies daninhas estudadas.

Essa ausência de resposta à inoculação não é um resultado isolado. Estudos anteriores, já relataram a ineficácia da inoculação com *N. amazonense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar cultivada no sistema MPB, com mudas inoculadas não diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (Pereira e Magri, 2021).

A falta de resposta positiva à inoculação também foi observada com outras bactérias próximas filogeneticamente a *N. amazonense*. Em um estudo com *Azospirillum brasilense*,

a inoculação antes do transplante resultou em redução da biomassa seca da parte aérea e das raízes das MPBs avaliadas após 60 dias (Gonçalves et al., 2020). Já em um ensaio com milho em competição com *Ipomoea nil* e *Cyperus rotundus*, verificou-se que a inoculação com *A. brasilense* não favoreceu o crescimento inicial da cultura, que inclusive sofreu maior prejuízo competitivo em comparação às plantas não inoculadas (Matos et al., 2024).

A variabilidade nas respostas entre diferentes variedades e condições ambientais, somada à inconsistência na eficiência da colonização microbiana, representam barreiras à adoção massiva de inoculantes na cana-de-açúcar (Li, 2024). Essa baixa eficiência pode ser atribuída a fatores associados ao microrganismo, ao ambiente, à cultura e às suas interações (Lopes et al., 2021).

Apesar da estirpe CBAmC de *N. amazonense* presente no inoculante Aprinza[®] ser descrita como uma espécie que se destaca por sua adaptabilidade, e capacidade de fixar nitrogênio e produzir fitormônios em condições de solos ácidos (Paiva et al., 2016; Reis Júnior et al., 2006), comuns à maioria dos solos brasileiros, como o utilizado neste experimento, é possível que a espécie tenha encontrado obstáculos para adaptação ao novo ambiente para seu crescimento e estabelecimento.

O solo representa um ambiente hostil à introduções microbianas, visto que as células estão sujeitas a uma série de condições bióticas (competição por espaço biológico entre a espécie introduzida e a população microbiana indígena) e abióticas (pH, temperatura, teor de umidade e disponibilidade de nutrientes) flutuantes e adversas, que podem interferir na capacidade do microrganismo de sobreviver e permanecer ativo (Van et al., 1997).

Essa complexidade ecoa em resultados práticos: estudos com misturas de bactérias diazotróficas (incluindo *N. amazonense*) demonstraram como a resposta vegetal depende criticamente da tríade genótipo-espécie bacteriana-ambiente: em solos com baixa a média fertilidade, essas interações foram capazes de gerar desde incrementos até reduções no rendimento de colmos, conforme a combinação específica adotada (Oliveira et al., 2006).

Contudo, cabe ressaltar que, especificamente neste experimento, a cana-de-açúcar foi cultivada em casa de vegetação, sendo dadas as condições necessárias para seu pleno desenvolvimento, e não apresentou quaisquer sintomas de estresse hídrico ou nutricional.

Ademais, o estágio vegetativo da cultura, o substrato e o método de inoculação são fatores que podem influenciar a eficiência da colonização e sobrevivência microbiana (Matoso et al., 2021).

O efeito de promoção de crescimento da bactéria *N. amazonense* na cultura da cana-de-açúcar tem sido evidenciado na literatura, predominantemente em cenários onde a cultura é propagada convencionalmente por meio da inoculação dos toletes (EMBRAPA, 2018; De Santis et al., 2020; Reis et al., 2020; Mascarenhas, 2021), entretanto, poucos estudos abordaram a eficiência da inoculação microbiana em MPB, cujo sistema radicular já está desenvolvido.

Mudanças no metabolismo vegetal, na composição dos exsudatos das raízes e no ambiente da rizosfera variam com a idade da planta e seu genótipo, e são determinantes para a colonização microbiana e o sucesso na promoção do crescimento (Lopes et al., 2021). Estudos recentes indicaram que a inoculação por imersão de toletes de cana-de-açúcar parece favorecer uma colonização mais eficiente de *N. amazonense* em comparação a inoculação via substrato ou aplicação foliar (Schwab et al., 2023).

Contudo, ainda que a promoção de crescimento possa não ser evidente nas fases iniciais, os efeitos benéficos da inoculação microbiana podem se manifestar em estágios mais avançados, e refletir em ganhos significativos na produtividade final de colmos da cana, pois é necessário um período de adaptação e estabelecimento da relação planta-bactéria para que tais efeitos sejam plenamente observados (Ferreira e Magri, 2021).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a necessidade de estudos adicionais acerca da elucidação dos fatores que influenciam a eficiência da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da cana-de-açúcar, especialmente no sistema MPB. Apesar do potencial dessas tecnologias para aumentar a produtividade da cana de forma sustentável, pode-se concluir neste experimento que sob as condições avaliadas, a inoculação com *N. amazonense* não resultou em melhorias no crescimento inicial de MPB de cana-de-açúcar, nem na sua capacidade competitiva frente às espécies daninhas estudadas.

6.2 Estrutura da comunidade microbiana do solo rizosférico

A análise dos componentes principais (PCA) da comunidade microbiana do solo rizosférico de MPBs de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos é apresentada na figura 1. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 59,9% e 72,8% da variância total dos dados da comunidade fúngica e bacteriana, respectivamente.

Na análise da estrutura da comunidade fúngica (Figura 1.a), é possível observar uma distribuição relativamente dispersa dos tratamentos, com pouca evidência de

agrupamentos claros. Os tratamentos CI (MPB inoculadas com *N. amazonense*) e CN (MPB não inoculadas) apresentaram sobreposição, indicando que a inoculação não gerou alterações marcantes na estruturação da comunidade fúngica. Os tratamentos associados a matocompetição das espécies *C. rotundus* (CRI), *U. decumbens* (UDI) e *M. aegyptia* (MAI) também não apresentam uma separação clara no espaço PCA, demonstrando que as espécies daninhas exerceram pouca influência na composição destas comunidades. De acordo com a análise de semelhança ANOSIM, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos ($R=0,04$; $p > 0,05$).

Ao analisar a estrutura da comunidade bacteriana (Figura 1.b) foi possível observar uma tendência de separação no espaço PCA, mas também com presença de sobreposições entre os pontos. O tratamento CI (MPB inoculada com *N. amazonense*) apresentou uma posição direcionada distinta no eixo PC1 em relação aos demais, enquanto CN (MPB não inoculada) e os tratamentos relacionados a matocompetição (CRI, UDI e MAI) apresentam maior dispersão e sobreposição, indicando alterações sutis na composição bacteriana. Entretanto, as variações visuais entre os tratamentos, de acordo com a análise de semelhança ANOSIM ($R=0,33$; $p > 0,05$), não puderam ser consideradas significativas.

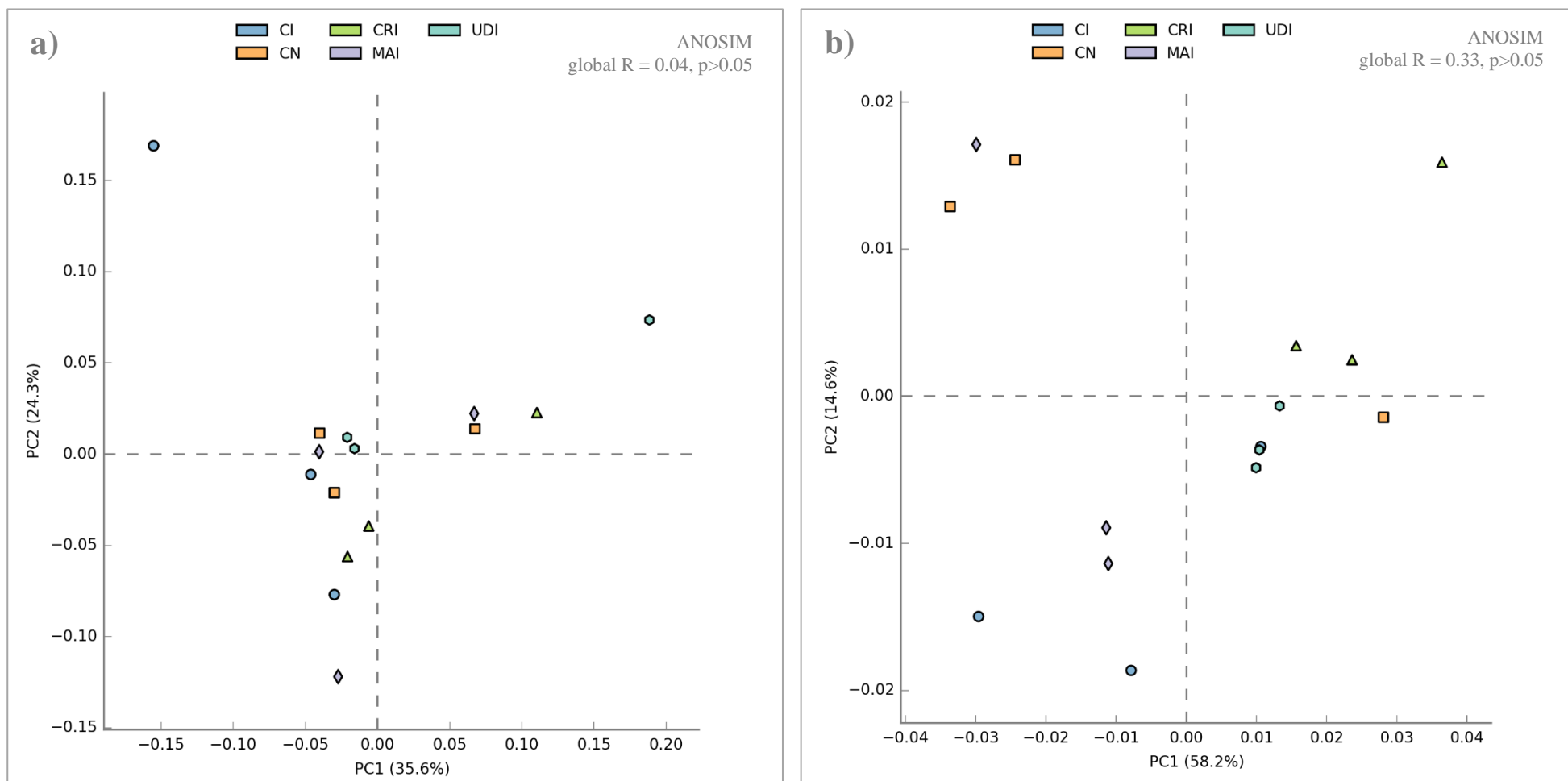


Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) da comunidade (a) fúngica e (b) bacteriana do solo rizosférico de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense* e em competição com plantas daninhas. *CI (MPB inoculada com *N. amazonense*); CN (MPB não-inoculada); CRI (MPB inoculada em competição com *C. rotundus*); UDI (MPB inoculada em competição com *U. decumbens*); MAI (MPB inoculada em competição com *M. aegyptia*). *R global > 0,75: grupos bem separados; R global > 0,5: grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados; R global < 0,25: grupos não bem separados.

Contudo, a partir da interpretação dos valores estatísticos de R do teste de pareamento da análise de similaridade (Tabela 9), foi possível observar que o tratamento CRI (MPB inoculadas em competição com *C. rotundus*), se destacou entre as demais espécies daninhas, apresentando valores de R para similaridade entre os tratamentos de MPB sem matocompetição (CI e CN), equivalentes a 0,7407 e 0,5556 respectivamente, indicando que a estrutura da comunidade bacteriana deste grupo se apresentou como claramente diferenciada, embora houvesse sobreposições.

Tabela 9. Valores estatísticos de R do teste de pareamento de análise de similaridade (ANOSIM) da estrutura da comunidade bacteriana e fúngica do solo rizosférico de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense*, em competição com plantas daninhas.

Valores de R					
Comunidade Bacteriana	CRI	MAI	CI	CN	UDI
CRI	-	0,5185	0,7407	0,5556	0,4815
MAI	0,5185	-	0,2593	-0,07407	0,4815
CI	0,7407	0,2593	-	0,2593	0,2593
CN	0,5556	-0,07407	0,2593	-	0,3333
UDI	0,4815	0,4815	0,2593	0,3333	-
Comunidade Fúngica	CRI	MAI	CI	CN	UDI
CRI	-	-0,2222	0,1481	0,2593	0,1111
MAI	-0,2222	-	-0,1481	0,07407	-0,1852
CI	0,1481	-0,1481	-	0,1852	0,03704
CN	0,2593	0,07407	0,1852	-	0,03704
UDI	0,1111	-0,1852	0,03704	0,03704	-

*CI (MPB inoculada com *N. amazonense*); CN (MPB não-inoculada); CRI (MPB inoculada em competição com *C. rotundus*); UDI (MPB inoculada em competição com *U. decumbens*); MAI (MPB inoculada em competição com *M. aegyptia*). *R>0,75: grupos bem separados; R>0,5: grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados; R<0,25: grupos não bem separados.

A espécie *C. rotundus* é amplamente reconhecida por sua capacidade de formar sistemas subterrâneos reprodutivos complexos, com rizomas e tubérculos que acumulam e liberam no ambiente metabólitos secundários, principalmente ácidos orgânicos e inorgânicos, que são capazes de modificar a composição e estrutura da comunidade microbiana do solo, influenciando as interações ecológicas (Andrade et al., 2009).

Corroborando com este estudo, resultados semelhantes foram observados em pesquisas que investigaram a matocompetição de *C. rotundus* na cultura do milho, nas quais foram identificadas alterações na microbiota do solo, com maior abundância de

microrganismos promotores de crescimento na rizosfera da planta daninha, em comparação à microbiota associada à cultura. (Liu et al., 2022). Esses achados evidenciam a capacidade de *C. rotundus* em moldar o microbioma do solo de maneira favorável ao seu próprio desenvolvimento.

As Figuras 2a e 2b apresentam a abundância relativa percentual dos 20 gêneros fúngicos e bacterianos, mais abundantes do solo rizosférico das MPB. Na composição da comunidade fúngica, os gêneros dominantes incluem *Fusarium*, *Chaetomium*, *Talaromyces*, *Pseudothielavia*, *Sistotrema*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, e representam uma fração significativa da composição fúngica em todos os tratamentos. Alterações na abundância relativa dos gêneros não foram visualizadas, apresentando todos os tratamentos composição fúngica estatisticamente similar.

Estes gêneros fúngicos têm sido comumente encontrados e isolados da rizosfera e de diferentes partes da cana-de-açúcar (Martins et al., 2009; Mehnaz, 2013; Ramos et al., 2018). *Fusarium* consiste em um dos gêneros de fungos fitopatogênicos mais importantes do mundo, e sua presença é comum em solos de regiões tropicais (Ventura, 1999). Os fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* têm sido relatados como agentes de promoção de crescimento vegetal, seja pela produção de hormônios como auxinas, pela solubilização de nutrientes no solo, ou por terem ação na indução de resistência sistêmica a patógenos (Khuna et al., 2023; Scudeletti et al., 2022). *Chaetomium*, *Pseudothielavia*, *Sistotrema* e *Talaromyces* consistem em gêneros atuantes nos ciclos biogeoquímicos, decompositores de matéria orgânica, tendo importante papel na liberação de nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal (Martins et al., 2009; Ramos et al., 2018).

Na composição da comunidade bacteriana os gêneros predominantes incluem *Rhodoplanes*, *Conexibacter*, *Bacillus*, *Anaeromyxobacter* e *Streptomyces*, que também representaram uma parcela expressiva da composição bacteriana, e se apresentaram em uma distribuição uniforme e semelhante em todos os tratamentos, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas.

As espécies bacterianas pertencentes a esses gêneros são relatadas como benéficas por promoverem a decomposição de matéria orgânica, liberando nutrientes essenciais e melhorando a saúde do solo, e também têm sido frequentemente encontradas associadas à rizosfera da cana-de-açúcar (Costa, 2021; Malviya et al., 2022; Zhaoniano et al., 2023). O gênero *Bacillus* se destaca funcionalmente por incluir espécies conhecidas por sua

capacidade de fornecer nitrogênio, fósforo, ferro e produzir hormônios como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (Silva et al., 2024).

Para ambas as comunidades, fúngica e bacteriana, a presença de táxons em menor abundância, representados pelo grupo “Outros”, representou 41,2% e 70,1% respectivamente, correspondendo a uma parcela significativa do total, demonstrando expressiva diversidade do microbioma.

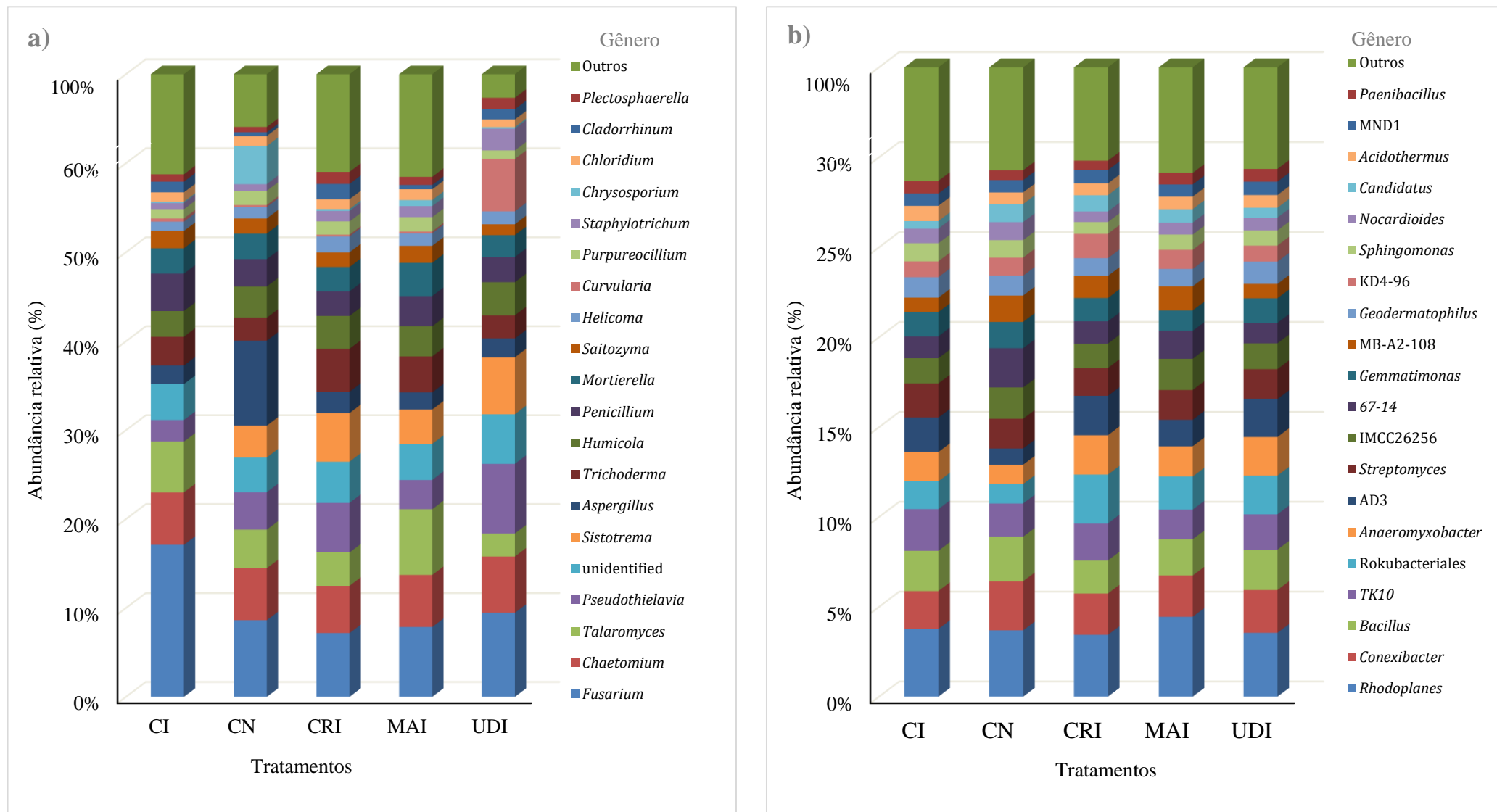


Figura 2. Abundância relativa percentual dos 20 gêneros mais abundantes do solo rizosférico de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense*, em competição com plantas daninhas. a) comunidade fúngica; b) comunidade bacteriana. *CI (MPB inoculada com *N. amazonense*); CN (MPB não-inoculada); CRI (MPB inoculada em competição com *C. rotundus*); UDI (MPB inoculada em competição com *U. decumbens*); MAI (MPB inoculada em competição com *M. aegyptia*). Pelo teste de similaridade ANOSIM, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de significância.

A similaridade entre a estrutura das comunidades microbianas entre os tratamentos foi confirmada pela análise dos índices de riqueza (Chao), diversidade (Shannon) e uniformidade (Pielou), que também não diferiram estatisticamente (Tabela 10).

Tabela 10. Índices de riqueza, diversidade e uniformidade bacteriana e fúngica, de solo rizosférico de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense*, em competição com plantas daninhas.

	Riqueza	Diversidade	Uniformidade
Comunidade bacteriana	Chao	Shannon (H')	Pielou (J')
CI	2.600,44 ± 371,88 a	10,24 ± 0,19 a	0,91 ± 0,00 a
CN	2.360,09 ± 56,85 a	10,21 ± 0,02 a	0,92 ± 0,00 a
UDI	2.614,32 ± 73,76 a	10,23 ± 0,03 a	0,91 ± 0,00 a
CRI	2.423,45 ± 46,78 a	10,19 ± 0,04 a	0,91 ± 0,01 a
MAI	2.199,08 ± 425,19 a	10,07 ± 0,19 a	0,91 ± 0,01 a
Comunidade fúngica	Chao	Shannon (H')	Pielou (J')
CI	901,09 ± 76,60 a	7,11 ± 0,78 a	0,72 ± 0,08 a
CN	1.027,43 ± 80,60 a	7,22 ± 0,15 a	0,72 ± 0,01 a
UDI	876,27 ± 261,64 a	6,89 ± 0,84 a	0,70 ± 0,06 a
CRI	1.016,97 ± 90,45 a	7,29 ± 0,43 a	0,73 ± 0,04 a
MAI	1.008,11 ± 136,37 a	7,25 ± 0,41 a	0,73 ± 0,03 a

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Médias com letras iguais dentro da mesma coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). *CI (MPB inoculada com *N. amazonense*); CN (MPB não-inoculada); CRI (MPB inoculada em competição com *C. rotundus*); UDI (MPB inoculada em competição com *U. decumbens*); MAI (MPB inoculada em competição com *M. aegyptia*).

Não foram visualizadas, neste trabalho, alterações significativas na comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera de MPB com a inoculação de *N. amazonense* a partir do produto comercial Aprinza[®]. Contudo, a compreensão dos fatores relacionados às condições de estabelecimento, resposta da microbiota nativa e sucessão das comunidades auxiliam na elucidação e avaliação da eficácia e dos impactos da inoculação.

O sucesso do estabelecimento de uma espécie microbiana exógena em um novo ambiente depende de sua capacidade de superar barreiras e interagir com os recursos e a microbiota nativa. Os fatores relacionados à comunidade indígena, como sua diversidade, interações e características específicas, influenciam a suscetibilidade e o estabelecimento das espécies introduzidas (Tao et al., 2018; Rodriguez et al., 2020).

A comunidade microbiana do solo geralmente apresenta resistência e/ou resiliência à introdução de microrganismos exógenos, retornando ao seu estado original. A resistência refere-se à capacidade da comunidade de permanecer insensível a uma perturbação, enquanto a resiliência é a habilidade de recuperar sua composição original após ser impactada. Dessa forma, a eficiência da inoculação pode variar significativamente, dependendo da estabilidade da microbiota nativa (Alisson e Martiny, 2008).

Nos resultados da análise metataxonômica da rizosfera das MPB foi possível observar alta diversidade bacteriana e fúngica, com microbiomas centrais compostos por gêneros que ocupavam espaços funcionais bem estabelecidos, caracterizando um cenário de um microbioma resiliente e resistente a introduções exógenas, o que pode ter limitado a introdução e o estabelecimento de *N. amazonense*. E, embora a inoculação tenha sido realizada em alta abundância de células, a introdução da espécie em linhagem única pode ter sido suprimida pela competição com a diversidade da microbiota nativa.

O uso de consórcios de bactérias promotoras de crescimento, por vezes, pode demonstrar maior eficiência para promover o crescimento das plantas quando comparado a linhagens únicas (Araújo et al., 2013). Isso ocorre pois consórcios podem amplificar as funções de diferentes mecanismos de promoção do crescimento, além de aumentar a capacidade de competição por nichos ecológicos do solo e da planta.

Contudo, é possível que a inoculação de *N. amazonense* possa ter induzido mudanças transitórias na microbiota do solo e proporcionado benefícios pontuais às MPB, apesar de não terem sido vistas alterações na estrutura das comunidades microbianas. Isto pode ter ocorrido, pois por períodos mais longos como 90 dias, a comunidade microbiana nativa, caracterizada por sua resiliência, tende a restabelecer sua estrutura original, minimizando os impactos da introdução, como observado na análise metataxonômica.

Essa hipótese é sustentada por estudos que demonstraram que a introdução de microrganismos promotores de crescimento ou associados a resíduos orgânicos não necessariamente provocam alterações duradouras na estrutura da microbiota do solo. Foi observado que, embora essas introduções possam inicialmente promover modificações na comunidade microbiana e até mesmo melhorar características do crescimento vegetal, os efeitos tendem a ser temporários, com a comunidade nativa se restabelecendo rapidamente e os microrganismos exógenos desaparecendo após alguns dias (Lourenço et al., 2018; Chaudhary et al., 2020).

Apesar de ser conhecido que a presença de plantas daninhas pode gerar alterações na comunidade microbiana do solo e sua associação a fungos e bactérias pode alterar as relações competitivas frente a culturas agrícolas (Daisog et al., 2012), não foram visualizadas neste trabalho alterações estruturais na composição microbiana da rizosfera das MPB com a presença das espécies *C. rotundus*, *M. aegyptia* e *U. decumbens*, não sendo observadas diferenças significativas para nenhum dos tratamentos. Pesquisas anteriores que analisaram os impactos de plantas daninhas sobre comunidades microbianas relataram que mudanças significativas ocorrem principalmente na estrutura das comunidades fúngicas do solo, enquanto as alterações na comunidade bacteriana tendem a se restringir à rizosfera das próprias plantas daninhas, sem se estender ao solo como um todo (Córneo et al., 2013). Dessa forma, é possível que um padrão semelhante tenha ocorrido neste estudo, com eventuais alterações microbianas limitadas às zonas radiculares das plantas daninhas, não sendo detectáveis nas análises realizadas.

E embora não tenha se apresentado entre os mais abundantes nem tenha demonstrado diferença significativa entre os tratamentos, táxons pertencentes ao gênero *Nitrospirillum* (classificados como *Azospirillum* na base utilizada), foram identificados exclusivamente nos tratamentos CN (MPB inoculadas) e UDI (MPB inoculadas em competição com *U. decumbens*), se apresentando em abundância relativa média de 0.0607% e 0.0044% respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Abundancia relativa (%) do gênero *Azospirillum* no solo rizosférico de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense*, em competição com plantas daninhas.

Tratamentos	Abundancia Relativa (%)
CN (MPB não inoculada)	0,0000 a
CI (MPB inoculada com <i>N. amazonense</i>)	0,0607 a
CRI (MPB inoculada em competição com <i>C. rotundus</i>)	0,0000 a
MAI (MPB inoculada em competição com <i>M. aegyptia</i>)	0,0000 a
UDI (MPB inoculada em competição com <i>U. decumbens</i>)	0,0044 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

A espécie *N. amazonense* tem sido frequentemente isolada em associação com gramíneas forrageiras, especialmente do gênero *Urochloa*, nas quais se observa alta incidência e densidade populacional. Evidências anteriores apontam sua ocorrência em

espécies como *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. humidicola*, o que indica uma compatibilidade natural entre a bactéria e essas plantas (Reis Júnior et al., 2004).

A associação de *N. amazonense* com gramíneas como *U. decumbens* pode criar uma vantagem competitiva para a planta daninha, potencialmente ampliando seu impacto negativo na cana-de-açúcar. Isso ressalta a necessidade de cautela no manejo do inoculante em áreas com alta infestação destas daninhas, para se evitar que os benefícios esperados para a cultura sejam transferidos indevidamente às espécies competidoras, agravando a matocompetição.

A reestruturação de um microbioma envolve a exsudação de compostos pelas plantas, que podem servir como substrato para o crescimento microbiano, facilitando a colonização das raízes (Rolf et al., 2019). Dessa forma, apesar da ausência de diferença estatística, os resultados aqui encontrados sugerem que o estabelecimento de *N. amazonense*, embora em baixa abundância relativa, tenha sido mais eficiente no ambiente rizosférico da cana-de-açúcar e de *U. decumbens*, onde a estirpe bacteriana tem sido comumente encontrada, sendo provavelmente este maior sucesso relacionado a um ambiente favorável criado pela liberação de exsudatos radiculares por estas espécies que naturalmente se associam a *N. amazonense*.

6.3 Atividade enzimática do solo rizosférico

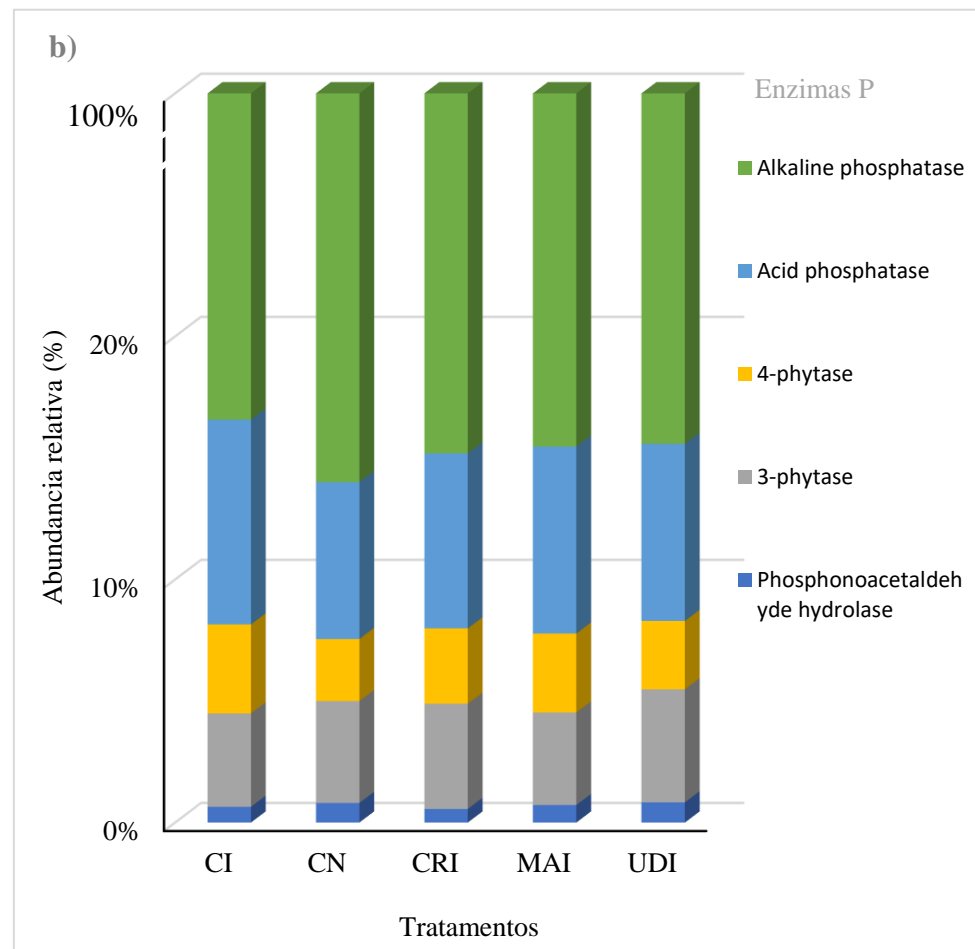
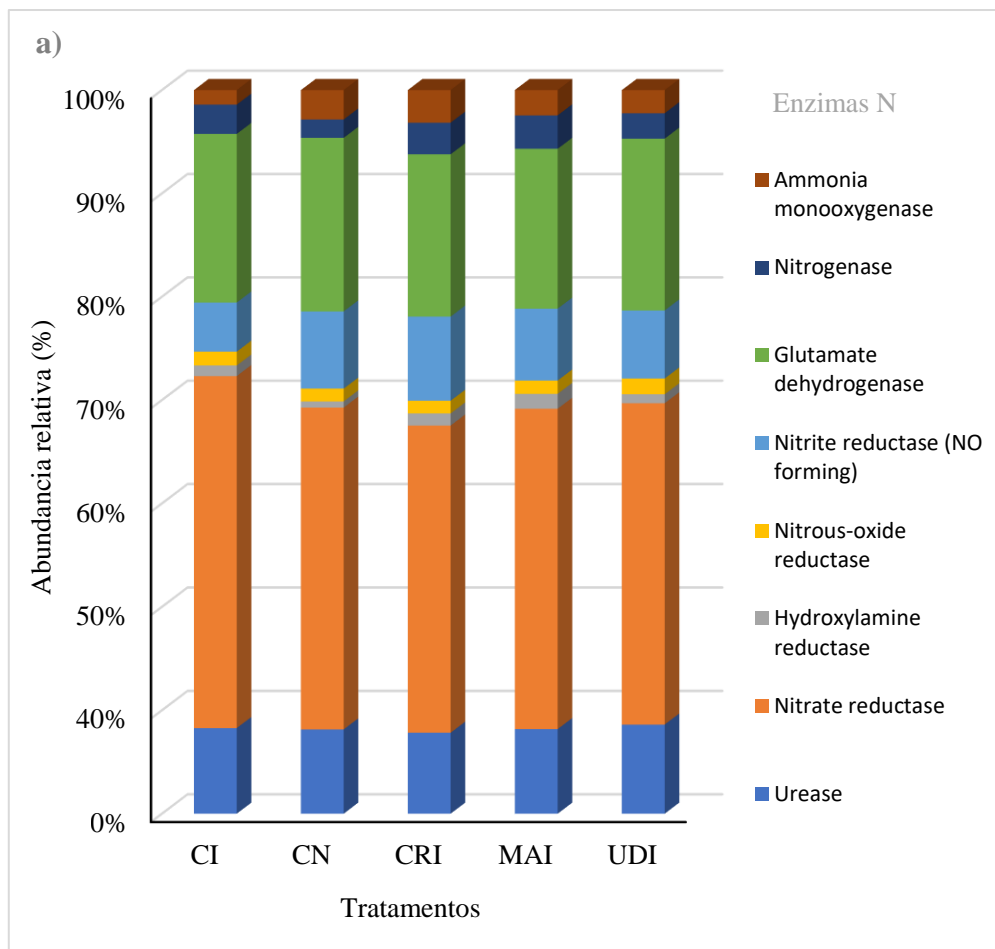
Acerca da avaliação da atividade enzimática do solo rizosférico, os resultados encontrados indicaram que tanto a inoculação de *N. amazonense* quanto a presença das plantas daninhas *C. rotundus*, *M. aegyptia* e *U. decumbens* não afetaram a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase, visto que não foram visualizadas diferenças significativas para nenhum dos tratamentos analisados (Tabela 12).

Tabela 12. Atividade enzimática do solo rizosférico de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com Aprinza (*N. amazonense*) em competição com plantas daninhas.

Tratamento	β -glicosidase	Arilsulfatase
MPB sem Inoculação	27,41 \pm 17,69 a	52,53 \pm 23,26 a
MPB com Inoculante	32,12 \pm 1,86 a	43,85 \pm 2,52 a
MPB com inoculação + <i>C. rotundus</i>	32,83 \pm 3,49 a	62,03 \pm 5,94 a
MPB com inoculação + <i>M. aegyptia</i>	34,87 \pm 4,74 a	60,51 \pm 5,55 a
MPB com inoculação + <i>U. decumbens</i>	29,59 \pm 7,15 a	49,89 \pm 10,74 a
CV (%)	28,60	22,46

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados das análises enzimáticas corroboram os encontrados no metagenoma predito das amostras, que demonstraram ausência de diferença significativa entre os tratamentos quanto à abundância relativa de genes associados a enzimas relacionadas ao ciclo do nitrogênio (N), fósforo (P), carbono (C) e enxofre (S) do solo (Figura 3).



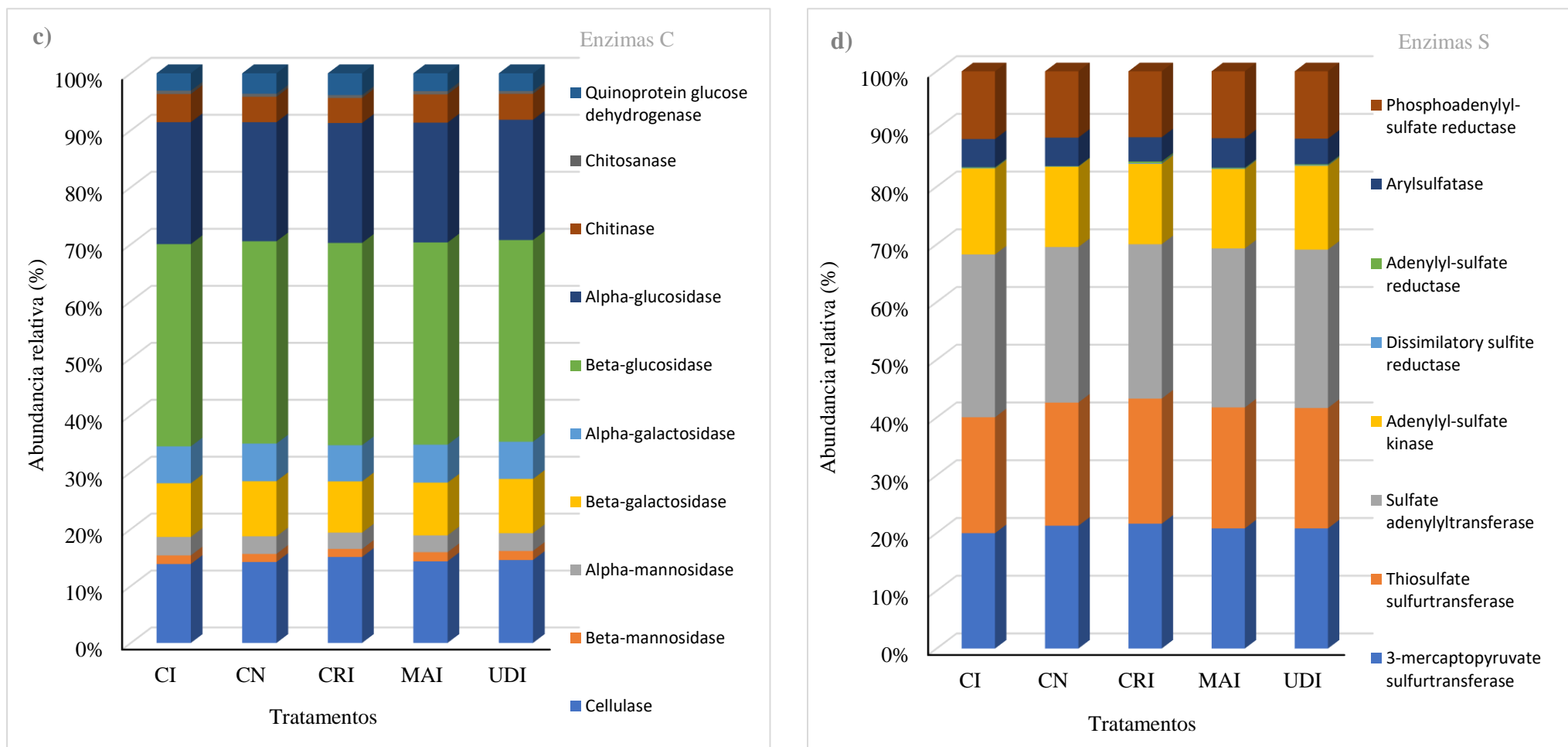


Figura 3. Abundancia relativa de enzimas preditas, relacionados ao ciclo do a) Nitrogênio, b) Fosforo, c) Carbono e d) Enxofre, do solo rizosférico de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense*, em competição com plantas daninhas. *CI (MPB inoculada com *N. amazonense*); CN (MPB não-inoculada); CRI (MPB inoculada em competição com *C. rotundus*); UDI (MPB inoculada em competição com *U. decumbens*); MAI (MPB inoculada em competição com *M. aegyptia*). Pelo teste de similaridade ANOSIM não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de significância.

As enzimas relacionadas ao ciclo do N desempenham papéis essenciais na conversão de formas nitrogenadas em compostos disponíveis para as plantas. Entre estas destaca-se a nitrogenase, enzima produzida por bactérias diazotróficas como *N. amazonense*, sendo responsável pela conversão do nitrogênio atmosférico em amônia (Berges e Mulholland, 2008). No ciclo do P, as fosfatases desempenham um papel chave na mineralização do fósforo orgânico, deixando-o disponível à absorção (Almeida et al., 2015). No ciclo do C, a β -glicosidase atua facilitando a liberação de carbono ao degradar polissacarídeos, como a celulose (Inamdar et al., 2022). No ciclo do S, a arilsulfatase converte compostos orgânicos de enxofre em formas inorgânicas assimiláveis, como o sulfato (Yu et al., 2023). Contudo, embora desempenhem papéis cruciais na dinâmica dos ciclos dos elementos no solo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto à abundância relativa de genes relacionados a essas enzimas.

Os microrganismos são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e liberação de nutrientes a formas disponíveis a assimilação. Neste processo, as enzimas são as mediadoras do catabolismo biológico dos componentes orgânicos e minerais do solo. Desta forma, a avaliação da atividade enzimática é utilizada como indicadora da qualidade do solo, devido à sensibilidade para prever informações sobre mudanças nas funções-chave do solo (Araújo e Monteiro, 2007).

Embora as enzimas possam ser originadas de microrganismos, vegetais ou animais, a microbiota constitui a maior fonte de enzimas do solo e de uma maneira geral, a atividade de enzimas é comumente mais elevada no ambiente da rizosfera do que no solo adjacente, devido à exsudação radicular das plantas que favorecem o crescimento e atividade dos microrganismos nesta região (Melo et al., 1988).

As alterações nas atividades enzimáticas do solo ocorrem quando há presença de condições de estresse, mudanças significativas no substrato do ambiente e na composição estrutural da microbiota (Burns et al., 2013).

Deste modo, a ausência de efeitos significativos nas análises enzimáticas neste trabalho indica que a inoculação de *N. amazonense* e a presença das plantas daninhas *C. rotundus*, *M. aegyptia* e *U. decumbens* não foram capazes de ocasionar mudanças significativas no ambiente e na estrutura do microbioma, não alterando consequentemente a funcionalidade enzimática do solo rizosférico das MPB.

Os resultados deste estudo corroboram os encontrados por Fialho (2013), que ao avaliar a atividade enzimática do solo rizosférico do milho submetido a competição com *U.*

decumbens também não observou diferenças significativas entre a atividade enzimática da rizosfera da cultura em monocultivo e a rizosfera do milho em competição com a daninha.

Entretanto, divergindo dos resultados encontrados neste trabalho, experimentos com a inoculação prévia de *A. brasilense* em gramíneas de cobertura visualizaram aumentos significativos na atividade de enzimas como β -glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase (Freitas et al., 2022).

Pode-se concluir neste experimento que a inoculação com *N. amazonense* e a matocompetição das espécies daninhas *U. decumbens*, *M. aegyptia* e *C. rotundus* não alterou significativamente a estrutura da comunidade bacteriana e fúngica, nem alterou a atividade enzimática do solo rizosférico das MPB de cana-de-açúcar. Os resultados evidenciam a importância de uma melhor compreensão das interações entre microrganismos e plantas, uma vez que o conhecimento dessas dinâmicas é crucial para otimizar o uso da inoculação microbiana, maximizar os benefícios desta tecnologia e melhorar a gestão integrada da cultura.

6.4 Toxicidade de herbicidas à bactéria *N. amazonense*

Os resultados acerca do crescimento de *N. amazonense* em meio contendo diferentes herbicidas são apresentados na Figura 4. Respostas diferenciais no crescimento da espécie bacteriana foram observadas para as diferentes moléculas analisadas.

O herbicida clomazone (inibidor da síntese de carotenoides; Kruse et al., 2001) demonstrou efeito tóxico sobre *N. amazonense*, com redução significativa no crescimento bacteriano a partir da menor dose testada (1/4 DC) (Figura 4a). A análise de regressão polinomial (Apêndice - Tabela 18) indicou que o modelo quadrático descreveu de forma robusta o padrão de resposta observado ($R^2 = 0,90$), caracterizado por decréscimo contínuo no número de UFC mL⁻¹ até 1,5 DC, e subsequente estabilização do efeito inibitório na presença do dobro da dose (2 DC).

Para imazapic (inibidor da acetolactato sintase; Marchi et al., 2008), a análise revelou uma correlação linear negativa entre dose e crescimento bacteriano ($R^2 = 0,91$), evidenciando que o aumento da dose do herbicida provocou redução contínua no número de UFC mL⁻¹ (Figura 4b).

No caso de isoxaflutole (inibidor da hidroxifenilpiruvato dioxigenase; Takács et al., 2024), o melhor ajuste ao padrão de resposta observado foi apresentado pelo modelo polinomial cúbico ($R^2 = 0,84$). Verificou-se um estímulo do crescimento bacteriano em

baixas doses (1/4 DC a 1/2 DC), seguido por uma redução progressiva em doses elevadas (1,5 a 2 DC) (Figura 4c). O modelo Brain-Cousens foi aplicado para avaliar a ocorrência de hormese; contudo, embora o padrão visual sugerisse tal efeito, os parâmetros estimados não atingiram significância estatística ($R^2 = 0,72$; e , $p = 0,299$; f , $p = 0,306$; Apêndice - Tabela 18).

Indaziflam (inibidor da síntese de celulose), metribuzin (inibidor do fotossistema II), S-metolachlor (inibidor de ácidos graxos de cadeia muito longa), sulfentrazone e flumioxazin (inibidores da protoporfirinogênio oxidase) (Zemolin et al., 2014; Silva Júnior et al., 2015; Sebastian et al., 2017; Gehrke et al., 2020; Iwashita et al., 2022), demonstraram estimular o crescimento bacteriano, atuando como fonte adicional de nutrientes e energia para a espécie *N. amazonense*. Na presença destes herbicidas o crescimento celular foi superior ao do tratamento controle, sendo observadas correlações positivas entre o aumento da dose e o número de UFC mL⁻¹ (Figura 4d–h).

Modelos polinomiais quadráticos (Apêndice - Tabela 18) indicaram que flumioxazin ($R^2 = 0,82$), metribuzin ($R^2 = 0,92$), sulfentrazone ($R^2 = 0,92$) e S-metolachlor ($R^2 = 0,51$) promoveram estimulação contínua do crescimento bacteriano até 1,5 vezes a dose comercial (1,5 DC), momento em que se observou o máximo de UFC mL⁻¹. Para o indaziflam, o modelo cúbico apresentou o melhor ajuste ($R^2 = 0,88$), evidenciando que o efeito estimulante sobre o crescimento se estendeu ainda mais, até 2 DC.

Não foram visualizadas quaisquer interferências da adição do herbicida tebuthiuron (inibidor do fotossistema II; Silva et al., 2013) sobre o crescimento bacteriano da estirpe analisada de *N. amazonense*, visto que todas as doses testadas apresentaram valores de UFC mL⁻¹ semelhantes ao tratamento controle (Tabela 13).

Tabela 13. Log10 de UFC/mL de *N. amazonense* em meio contendo diferentes doses do herbicida tebuthiuron.

Dose Comercial	Log10 da UFC mL ⁻¹
0	9,23 ± 0,03 a
0,25	9,19 ± 0,05 a
0,50	9,22 ± 0,21 a
1	9,14 ± 0,11 a
1,5	9,23 ± 0,18 a
2	9,20 ± 0,04 a
CV (%)	1,35

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de significância.

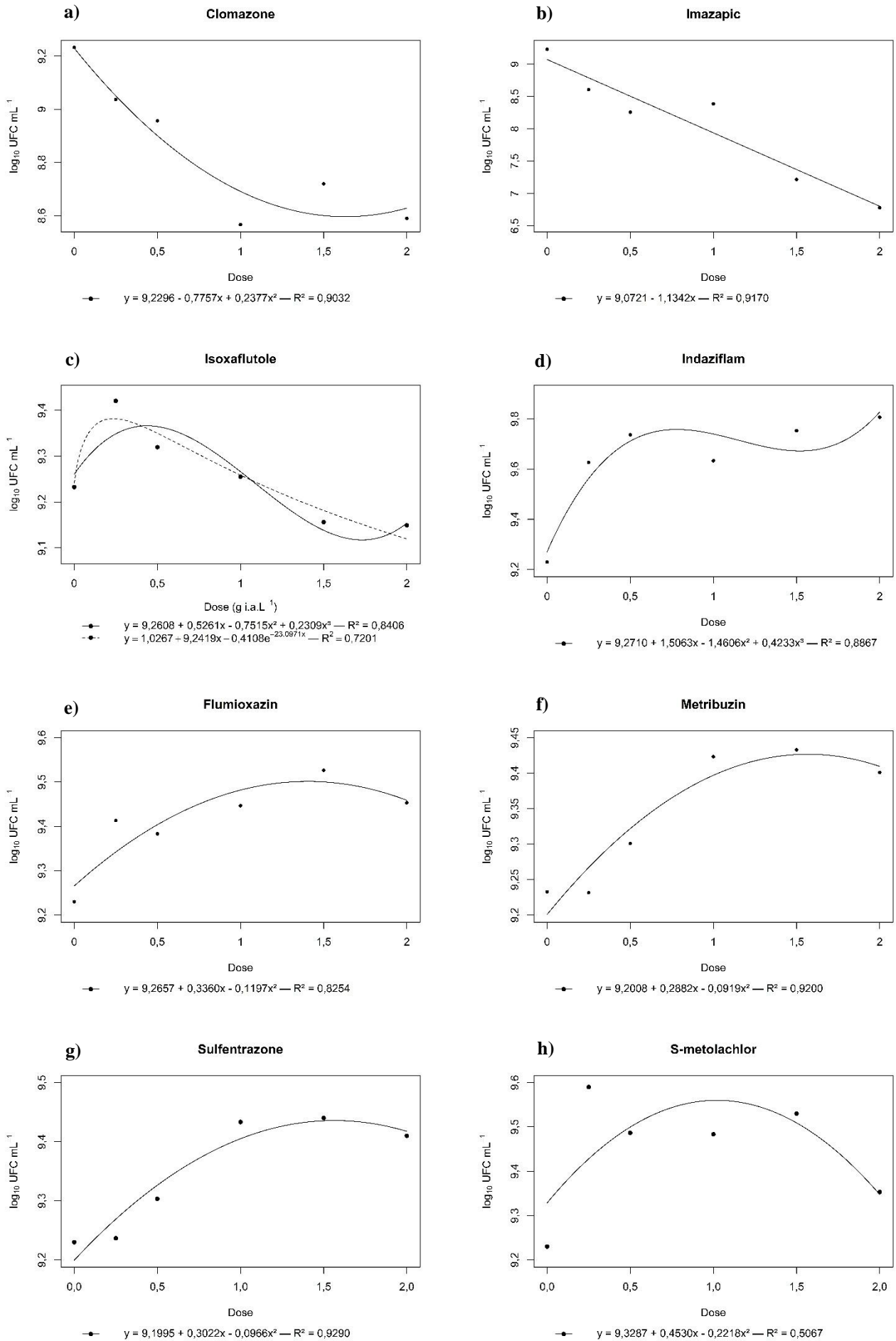


Figura 4. Log₁₀ de UFC mL⁻¹ de *N. amazonense* em meio de cultura contendo diferentes herbicidas.

No tocante à avaliação da toxicidade dos herbicidas quando aplicados ao solo (Tabela 14), foi possível observar que apenas isoxaflutole ocasionou redução significativa no número mais provável (NMP) de células de *N. amazonense*.

Tabela 14. Log10 do número mais provável de UFC.g⁻¹ de solo de *N. amazonense*

Tratamento	UFC.g ⁻¹ de solo
Controle (Somente Inóculo)	7,15 a
S-metolachlor	7,15 a
Metribuzin	7,15 a
Flumioxazin	7,15 a
Sulfentrazone	7,15 a
Indaziflam	7,15 a
Tebuthiuron	7,15 a
Imazapic	5,89 ab
Clomazone	5,54 ab
Isoxaflutole	4,17 b
Controle (Branco)	1,53 c
CV (%)	14,53

*Medias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados observados para esta molécula complementam os visualizados na avaliação da concentração mínima inibitória (CMI), onde o mesmo herbicida demonstrou ocasionar redução no número de UFC mL⁻¹ quando adicionado ao meio de cultura em doses acima da dose comercial.

Clomazone e imazapic, identificados como tóxicos a *N. amazonense* em meio de cultura, apresentaram médias de NMP de UFC.g⁻¹ numericamente inferiores ao tratamento controle, contudo, esta diferença não foi considerada significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Por sua vez, os herbicidas S-metolachlor, metribuzin, flumioxazin, sulfentrazone, indaziflam e tebuthiuron aplicados ao solo, não demonstraram causar quaisquer efeitos tóxicos a bactéria *N. amazonense*, podendo ser visualizadas médias de NMP de UFC.g⁻¹ estatisticamente iguais ao tratamento controle.

As diferenças na toxicidade dos herbicidas sobre *N. amazonense* no solo, em comparação às condições *in vitro*, podem ser atribuídas a processos complexos que alteram a disponibilidade e a ação dessas moléculas no ambiente edáfico. No solo, os herbicidas interagem com partículas minerais e matéria orgânica, sendo retidos por sorção ou precipitação, além de passarem por transformações químicas, biológicas e físicas, como degradação, lixiviação e volatilização, que podem diminuir e/ou alterar sua toxicidade. Em

contraste, as condições *in vitro*, que expõem as bactérias diretamente às moléculas ativas, sem a interferência dessas dinâmicas (Mendes et al., 2023; Price e Kelton, 2013).

Os herbicidas flumioxazin e tebuthiuron, embora não tenham afetado a sobrevivência da bactéria, tanto em meio de cultura quanto no solo, reduziram significativamente a capacidade de produção de ácido indol-acético (AIA) (Tabela 15). Em contraste, os herbicidas s-metolachlor, sulfentrazone, clomazone e imazapic estimularam a produção do fitormônio. Por sua vez, os herbicidas isoxaflutole, indaziflam e metribuzin não apresentaram influência significativa na produção da auxina, apresentando médias estatisticamente semelhantes às do tratamento controle.

Tabela 15. Produção de ácido indol-acético (AIA) em mg L⁻¹, por *N. amazonense* em meio contendo diferentes herbicidas.

Tratamento	AIA (mg L ⁻¹)
S-metolachlor	22,22 ± 2,27 a
Sulfentrazone	20,52 ± 0,91 ab
Clomazone	17,92 ± 3,72 ab
Imazapic	16,77 ± 4,76 abc
Isoxaflutole	15,40 ± 0,90 bcd
Indaziflam	14,84 ± 0,62 bcd
Controle (Somente Inóculo)	14,56 ± 1,16 bcd
Metribuzin	14,56 ± 1,34 bcd
Flumioxazin	10,39 ± 2,16 cd
Tebuthiuron	09,05 ± 1,20 d
CV (%)	14,72

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nenhum dos herbicidas testados interferiu negativamente na capacidade de fixação de nitrogênio de *N. amazonense*. Tebuthiuron, metribuzin, imazapic, sulfentrazone e isoxaflutole estimularam a fixação de nitrogênio pela bactéria. Quanto aos demais herbicidas (flumioxazin, clomazone, indaziflam e s-metolachlor), não foram observadas diferenças em relação ao controle (Tabela 16).

Tabela 16. Fixação biológica de nitrogênio de *N. amazonense* em meio contendo diferentes tratamentos herbicidas.

Tratamento	Nitrogênio fixado (mg mL ⁻¹)
Tebuthiuron	0,44 ± 0,06 a
Metribuzin	0,30 ± 0,01 ab
Imazapic	0,26 ± 0,11 bc
Sulfentrazone	0,24 ± 0,09 bc
Isoxaflutole	0,18 ± 0,08 bc
Flumioxazin	0,12 ± 0,06 c
Clomazone	0,10 ± 0,03 c
Controle (Somente Inóculo)	0,10 ± 0,03 c
Indaziflam	0,09 ± 0,03 c
S-metolachlor	0,09 ± 0,03 c
CV (%)	30,48

*Os valores são dados como médias e desvios-padrão. Medias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em suma, os herbicidas indaziflam, metribuzin, S-metolachlor e sulfentrazone não prejudicaram a sobrevivência nem a funcionalidade de *N. amazonense* em nenhuma das avaliações *in vitro*. Pelo contrário, esses herbicidas favoreceram o crescimento bacteriano. Além disso, sulfentrazone promoveu aumentos tanto na produção de AIA quanto na fixação biológica de nitrogênio, enquanto metribuzin também aumentou a capacidade de fixação de nitrogênio e S-metolachlor estimulou a produção de AIA (Figura 5).

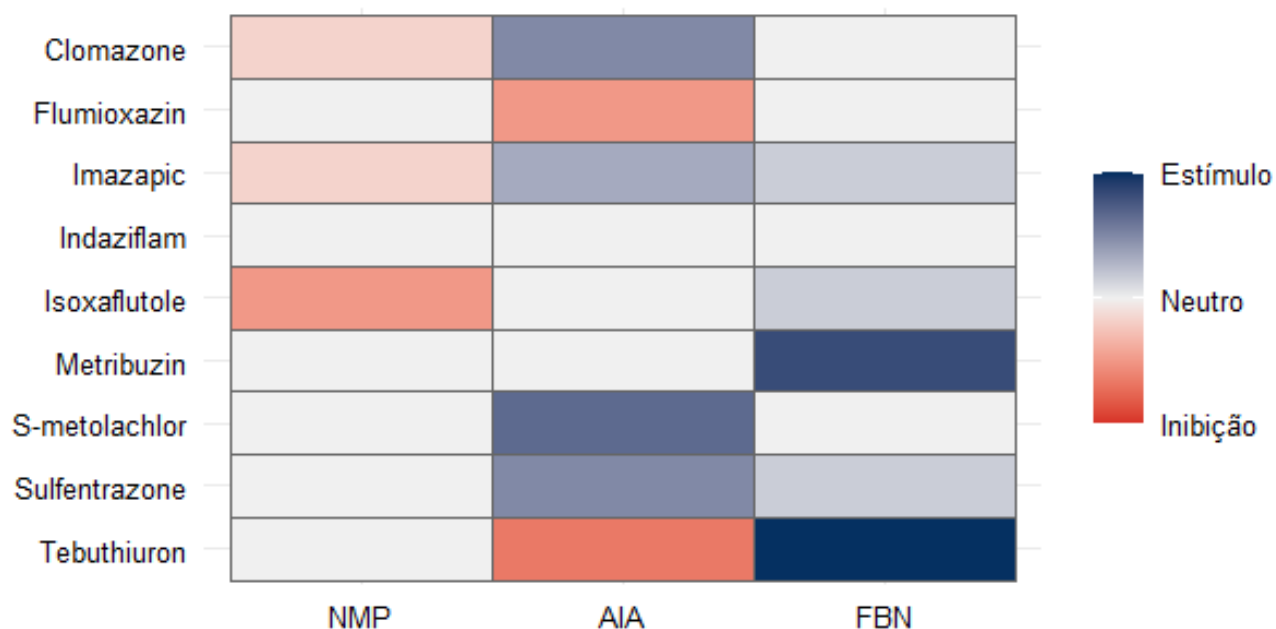


Figura 5. Heatmap dos efeitos de diferentes herbicidas sobre *N. amazonense*: sobrevivência no solo (NMP), produção de ácido indol-acético (AIA) e fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Estudos anteriores têm demonstrado resultados consistentes com esses achados. A ausência de efeitos tóxicos do indaziflam sobre o crescimento de *N. amazonense* foi documentada em trabalhos recentes (Jonck et al., 2022), assim como a falta de impactos negativos desse herbicida na respiração e biomassa microbiana do solo (Delgado et al., 2022). Evidências adicionais indicaram ainda que a aplicação de indaziflam pode ter efeito estimulante sobre a microbiota (Torres et al., 2018).

Esses achados estão em consonância com pesquisas envolvendo outras bactérias diazotróficas. Foi observada alta tolerância da espécie *Azospirillum brasilense* à presença dos herbicidas sulfentrazone e indaziflam (Rabelo et al., 2023). Da mesma forma, estudos sobre o efeito de sulfentrazone, metribuzin, clomazone, isoxaflutole, imazapic e s-metolachlor não detectaram prejuízos ao crescimento e atividade de nitrogenase em bactérias da mesma espécie (Procópio et al., 2011).

Contudo, os resultados obtidos neste trabalho divergem de observações anteriores sobre os efeitos do metribuzin em bactérias do gênero *Azospirillum*. Pesquisas anteriores reportaram efeitos tóxicos deste herbicida, incluindo redução na população de *Azospirillum* no solo (Mohiuddin e Mohammed, 2013) e diminuição da capacidade de fixação de nitrogênio (Gadkari, 1988). Também foi documentado que o metribuzin pode causar declínio significativo na população microbiana geral do solo (Lone et al., 2014).

Entretanto, as discrepâncias entre os resultados observados e a literatura podem ser atribuídas a diferenças entre as espécies microbianas avaliadas. Vale destacar que *N. amazonense*, originalmente classificada no gênero *Azospirillum*, foi recentemente reclassificada no gênero *Nitrospirillum*. Trata-se de uma bactéria ainda pouco estudada quanto à toxicidade de herbicidas, cuja utilização como inoculante comercial é um avanço recente (Lin et al., 2014; EMBRAPA, 2018).

Neste estudo, observou-se que o isoxaflutole apresentou um efeito dose-dependente sobre *N. amazonense*. Embora tenha estimulado o crescimento bacteriano nas subdoses testadas (1/4DC e 1/2DC), comprometeu o crescimento celular a partir da dose comercial, afetando inclusive a sobrevivência da bactéria no solo. Contudo, mesmo nessas condições, a aplicação do herbicida não interferiu na produção de AIA nem na capacidade de fixação biológica de nitrogênio.

O padrão de resposta observado para isoxaflutole está alinhado com o fenômeno característico da hormese (Agathokleous et al., 2023), no qual baixas concentrações de um agente estressor induzem respostas opostas às observadas em doses elevadas (Agathokleous

et al., 2023). Apesar de os dados aqui obtidos não fornecerem evidências estatisticamente conclusivas para a ocorrência de hormese ($p > 0,05$ na modelagem de Brain-Cousens), o padrão bifásico consistente observado sugere a necessidade de investigações adicionais. Estudos futuros, com delineamentos experimentais especificamente adaptados para essa detecção — incluindo maior resolução de doses na faixa sub-limiar e replicações adicionais — poderão contribuir para elucidar a presença e os mecanismos desse efeito em *N. amazonense* (Belz et al, 2012). Tal abordagem se justifica, uma vez que padrões semelhantes têm sido frequentemente relatados para herbicidas em microrganismos, sobretudo em ambientes não limitantes de energia (Agathokleous et al., 2022).

Na literatura, resultados contraditórios têm sido observados quanto aos efeitos de isoxaflutole sobre a microbiota do solo. Por um lado, estudos demonstraram que bactérias fixadoras de nitrogênio desempenham importante papel na degradação deste herbicida (Petkova et al., 2020). Por outro, há evidências de que sua presença pode reduzir a população microbiana total e afetar negativamente a atividade enzimática do solo, especialmente quando em mistura com outros herbicidas (Tomkiel et al., 2019).

A visualização de um comportamento contrastante entre crescimento e atividade funcional também foi documentada neste estudo para os herbicidas flumioxazin e tebuthiuron, que embora estimularam o crescimento bacteriano e a FBN, ocasionaram redução na produção do fitormônio AIA (Figura 5). Resultados semelhantes foram reportados em estudos recentes que demonstraram efeitos positivos de flumioxazin (Araújo et al., 2023) sobre a fixação biológica de nitrogênio no solo. Quanto ao tebuthiuron, pesquisas anteriores já haviam indicado a ausência de impactos negativos sobre bactérias diazotróficas de diferentes gêneros, incluindo *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Barbosa, 2018).

Clomazone e imazapic, apesar de reduzirem o crescimento bacteriano de *N. amazonense in vitro*, não afetaram significativamente a sobrevivência das células no solo e ainda estimularam as funções fisiológicas da bactéria, aumentando a produção de fitormônio e a FBN. Esses resultados apresentam similaridades com estudos anteriores envolvendo outras bactérias diazotróficas. Foi documentado que clomazone também inibiu o crescimento *in vitro* de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Procópio et al., 2013). Estudos em condições reais demonstraram ainda que altas doses deste herbicida prejudicaram comunidades microbianas do solo, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio (Du et al., 2018). Quanto ao imazapic, pesquisas mostraram que sua aplicação no solo reduziu a

população de diazotróficos de vida livre comparado ao solo não tratado (Angelini et al., 2013).

Flumioxazin e sulfentrazone, herbicidas com mesmo mecanismo de ação, ambos inibidores da PROTOX, induziram respostas diferenciadas de *N. amazonense* em relação à sua toxicidade: enquanto sulfentrazone estimulou a produção de AIA, flumioxazin provocou redução. Este resultado pode ser explicado pelo fato de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação e/ou herbicidas com mesmo ingrediente ativo, mas em formulações distintas apresentarem diferentes níveis de toxicidade aos microrganismos. Componentes de formulações comerciais como adjuvantes e espalhantes podem reduzir a tensão superficial e facilitar a penetração das moléculas nas células microbianas, além de poderem ser tão ou até mais tóxicos que o ingrediente ativo puro (Nagy et al., 2020).

Essa variação na resposta microbiana a formulações comerciais foi demonstrada em estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio expostas a diferentes formulações de glifosato, onde os resultados variaram desde a insensibilidade até a completa inibição do crescimento microbiano (Santos et al., 2004). Portanto, é importante destacar que os resultados apresentados neste trabalho se referem à toxicidade das moléculas herbicidas a *N. amazonense* nas formulações descritas na Tabela 2, e assim sendo, os mesmos ingredientes ativos transportados em outras formulações podem resultar em sensibilidade diferencial à estirpe microbiana.

As respostas diferenciadas de *N. amazonense* à exposição a um mesmo herbicida podem ser atribuídas à complexidade dos processos bioquímicos e fisiológicos que regulam a fixação de nitrogênio, produção de fitormônios e sobrevivência celular. Esses processos são mediados por vias metabólicas distintas, que podem reagir de forma diferente aos compostos tóxicos presentes nos herbicidas (Chubukov et al., 2014).

Quando expostos a xenobióticos, os microrganismos como *N. amazonense*, podem responder a exposição as moléculas por meio de processos simplifadamente conhecidos como metabolismo e cometabolismo (Eerd, 2003).

Os microrganismos que possuem a capacidade de metabolizar um pesticida, utilizam as reações de oxidação-redução mediadas por enzimas no catabolismo para extrair energia e nutrientes das moléculas e promover seu crescimento celular (Zhanga et al., 2020). O que provavelmente aconteceu com *N. amazonense* ao ser observado que a bactéria foi capaz de metabolizar eficientemente os herbicidas indaziflam, metribuzin, S-metolachlor e

sulfentrazone, utilizando estas moléculas como fonte adicional de nutrientes e energia para impulsionar seu crescimento.

Contudo, antes que o processo de metabolização e degradação de um herbicida possa ser iniciado, é necessário que os microrganismos sejam capazes de tolerar os estresses oxidativos causados pela toxicidade da molécula (Pileggi et al., 2020). Desta forma, vias de degradação-desintoxicação que ocorrem no cometabolismo são ativadas, para biotransformação de compostos orgânicos tóxicos que não serão usados como fonte de energia ou como elemento constitutivo do organismo (Janke e Fritsche et al., 1985).

As reações individuais de adaptação e as vias de degradação-desintoxicação não dependem somente do microrganismo e da estrutura química do composto xenobiótico, mas também das condições ambientais (Hoagland et al., 2001). Entre os mecanismos gerais de respostas microbianas ao estresse causado por pesticidas, podem ser citados a formação de biofilmes para proteção celular; resistência cruzada por bombas de efluxo que exportam moléculas tóxicas; aumento da expressão gênica e do número de cópias de genes de tolerância ao estresse; transferência horizontal de genes que conferem fenótipos multirresistentes; e a ativação de sistemas antioxidantes (Silva et al., 2023).

Embora esses processos permitam a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos, eles também podem causar um desequilíbrio energético que pode afetar outras funções celulares. No caso de *N. amazonense*, embora a bactéria tenha sido capaz de metabolizar eficientemente os herbicidas flumioxazin e tebuthiuron para impulsionar seu crescimento celular, a produção de ácido indol-acético foi comprometida. Com base nos conceitos discutidos, uma possível explicação para esse efeito seria o redirecionamento de recursos metabólicos para a degradação e desintoxicação dos herbicidas, o que pode ter prejudicado a produção de AIA.

Por outro lado, frente a condições de estresse, as células microbianas podem ser induzidas a aumentar a expressão de genes funcionais (Malhotra e Srivastava, 2009). Foi verificado que a interrupção no crescimento de *Azospirillum brasiliense* é uma condição necessária para que a bactéria expresse o gene indol-3-piruvato responsável pela produção de AIA (Ona et al., 2005). Cenário que pode ter ocorrido com os herbicidas imazapic e clomazone, que embora tenham diminuído o número de células de *N. amazonense*, induziram aumento na produção de AIA.

Ademais, ao analisar as características dos herbicidas (Apêndice - Tabela 19) que apresentaram algum efeito tóxico na sobrevivência ou na atividade funcional da bactéria *N.*

amazonense (imazapic, clomazone, tebuthiuron, isoxaflutole e flumioxazin), observa-se que com exceção de imazapic, todos são majoritariamente moléculas não iônicas e lipofílicas (Aeru, 2025), padrão que sugere uma possível influência das propriedades físico-químicas na toxicidade observada. A lipofilicidade e a ausência de carga dessas moléculas podem influenciar a dinâmica de difusão celular, visto que substâncias lipofílicas e não ionizadas, em comparação com as ionizadas, têm maior capacidade de interagir com as membranas celulares (Cserháti et al., 1991).

O imazapic, por sua vez, é um ácido fraco com solubilidade lipídica intermediária, que pode ter sua toxicidade para *N. amazonense* possivelmente relacionada à sua interação direta com o metabolismo microbiano, dada sua ação inibitória em uma via de síntese de aminoácidos essenciais, atuante tanto em plantas como em microrganismos (Souza et al., 2021).

Considerando a complexidade das interações e respostas que a exposição dos microrganismos aos herbicidas pode desencadear, torna-se evidente a importância do conhecimento da compatibilidade entre essas moléculas e os microrganismos promotores de crescimento, como a bactéria *N. amazonense*.

Neste estudo os herbicidas testados apresentaram respostas distintas à *N. amazonense*, com alguns promovendo o crescimento celular e estimulando a produção de AIA e/ou fixação de nitrogênio, enquanto outros afetaram negativamente a sobrevivência e a funcionalidade bacteriana. Os resultados destacam a necessidade de uma escolha criteriosa do herbicida, uma vez que este pode influenciar diretamente o sucesso das inoculações microbianas e afetar conseqüentemente, a sustentabilidade e eficiência do manejo integrado de plantas daninhas.

7. CONCLUSÕES

- A inoculação com *N. amazonense* não promoveu o crescimento das MPB da variedade RB966928, nem alterou sua capacidade competitiva frente às espécies daninhas *C. rotundus*, *M. aegyptia* e *U. decumbens*. A competição com as plantas daninhas, especialmente em altas densidades, prejudicou o crescimento das mudas, resultando em reduções na altura, biomassa aérea e área foliar.
- A inoculação com *N. amazonense* e a matocompetição com *C. rotundus*, *M. aegyptia* e *U. decumbens*, não alteraram significativamente a estrutura da comunidade microbiana da rizosfera das MPB de cana-de-açúcar nem a atividade enzimática do solo.
- Os herbicidas testados demonstraram respostas distintas à sobrevivência e atividade funcional de *N. amazonense*. Indaziflam, metribuzin, s-metolachlor e sulfentrazone não impactaram a sobrevivência e funcionalidade da bactéria, mas promoveram o aumento do crescimento celular e estimularam a produção de AIA e/ou fixação de nitrogênio. Isoxaflutole estimulou o crescimento bacteriano em subdoses, entretanto, gerou inibição a partir da dose comercial, contudo sem interferir na produção de AIA ou FBN. Clomazone e imazapic diminuíram o crescimento bacteriano *in vitro*, mas não afetaram a sobrevivência no solo, além de aumentarem a produção de AIA e FBN. Flumioxazin e tebuthiuron estimularam o crescimento bacteriano e a FBN, mas reduziram a produção de AIA.

8. REFERÊNCIAS

AGATHOKLEOUS, E.; LIU, C. J.; CALABRESE, E. J. Applications of the hormesis concept in soil and environmental health research. **Soil & Environmental Health**, v. 1, n. 1, 2023.

AGATHOKLEOUS, E.; WANG, Q.; IAVICOLI, I.; CALABRESE, E. J. The relevance of hormesis at higher levels of biological organization: Hormesis in microorganisms. **Current Opinion in Toxicology**, v. 29, p. 1-9, 2022.

AGRICULTURAL AND ENVIRONMENTAL RESEARCH UNIT (AERU). **Pesticide Properties DataBase**. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>. Acesso em: 5 mar. 2025.

AGUIAR, K. P. **Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Comparative toxicity of selected insecticides to pea plants and growth promotion in response to insecticide-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, v. 29, n. 4, p. 325-329, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Evaluation of plant-growth-promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1531–1540, 2012.

ALI, F.; TANG, Z.; MO, G.; ZHANG, B.; LING, X.; QIU, Z. Taxonomic and functional changes in wheat rhizosphere microbiome caused by imidazoline-based herbicide and genetic modification. **Environmental Research**, v. 262, Part 2, p. 119726, 1 dez. 2024.

ALISSON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 105, n. 1, p. 11512-11519, 2008.

ALMEIDA, C. N. S.; ARAÚJO, B. R.; PINHO, J. M. R.; PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A.; SANTOS, F. C. Atividade de fosfatases em solo cultivado com milho em resposta à adubação com fertilizantes organominerais associados a microrganismos solubilizadores de fosfato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 35., 2015, Natal. **Anais...** Natal, RN, 2015.

AMARAL, F. C. R.; NEPOMUCENO, M. P.; CHAVES, A. R. C. S.; CARLIN, S. D.; AZANIA, C. A. M.; Weed interference periods in pre-sprouted sugarcane seedlings. **Planta Daninha**, v.37, e019203772, 2019.

ANDRADE, H. M.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, Edição Especial, p. 1984-1990, 2009.

ANGELINI, J.; SILVINA, G.; TAURIAN, T.; IBANEZ, F.; TONELLI, M. L.; VALETTI, L.; ANZUAY, S.; LUDUENA, L.; MUNOZ, V.; FABRA, A. The effects of pesticides on

bacterial nitrogen fixers in peanut-growing area. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 683–692, 2013.

APPRILL, A. et al. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, p. 129–137, 2015.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

ARAÚJO, J. O.; OLIVARES, F. L.; MACTAR, S. N.; DIAS, V. M.; SILVEIRA, F. Avaliação da compatibilidade estrutural entre fungos isolados de folhas de cana-de-açúcar e bactérias promotoras do crescimento vegetal. In: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 5., 2013, Campos dos Goytacazes. **Anais...** Campos dos Goytacazes, RJ, 2013. ISSN: 2177-6180.

ARAUJO, A. S. F.; PERTILE, M.; COSTA, R. M.; COSTA, M. K. L.; AVIZ, R. O.; MENDES, L. W.; MEDEIROS, E. V.; COSTA, D. P.; MELO, V. M. M.; PEREIRA, A. P. A. Short-term responses of plant growth-promoting bacterial community to the herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Chemosphere**, v. 328, 2023.

ARAÚJO, V. L. P.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, A. M.; PEREIRA, A. P. A.; FREITAS, C. C. G.; BARROS, F. M. R.; SANTANA, M. C.; FEILER, H. P.; MATTEOLI, F. P.; FRACETTO, F. J. C.; CARDOSO, E. J. B. N. Potential of growth-promoting bacteria in maize (*Zea mays* L.) varies according to soil moisture. **Microbiological Research**, v. 271, n. 127352, 2023.

AZANIA, C. A. M.; HIRATA, A. C. S.; AZANIA, A. A. P. M. Biologia e manejo químico de corda-de-violão em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico IAC**, n. 209, Série Tecnologia APTA, IAC, Campinas, 2011.

AZANIA, C. A. M. Manejo de plantas daninhas em cana-de-açúcar. **O Agrônomo**, v. 70, 2018. Disponível em: <http://oagronomico.iac.sp.gov.br/?tag=v-70>. Acesso em: 31 mar. 2022.

BARBOSA, E. S. **Impacto de herbicidas sobre bactérias diazotróficas associadas à cultura do arroz vermelho**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Instituto Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

BARREIROS, A. R. D. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal em Capim Paiaguás e Capim Ruziziensis**. 2020. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2020.

BASSETO, M. A.; FILHO, W. V. V.; SOUZA, E. C.; CERESINI, P. C. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência a mela da soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 183-189, 2008.

BASF. **Muneo® BioKit**, 2019. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/muneo-biokit.html#section1905>. Acesso em: 31 mar. 2022.

BELZ, Regina G.; PIEPHO, Hans-Peter. Modeling effective dosages in hormetic dose-response studies. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 7, n. 3, e33432, 16 mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033432>.

BERGES, J. A.; MULHOLLAND, M. R. Enzymes and nitrogen cycling. In: CAPONE, D. G.; BRONK, D. A.; MULHOLLAND, M. R.; CARPENTER, E. J. (Ed.). **Nitrogen in the marine environment**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 1385-1444. ISBN 9780123725226.

BEVER, J. D. Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist*, v. 157, p. 465-473, 2003.

BEZERRA, G. A. **Isolamento e seleção de microrganismos de cana-de-açúcar com potencial de promoção de crescimento vegetal**. 2021. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, 2021.

BONETTI, J. E. B. **Determinação dos períodos de interferência de plantas daninhas na cultura da cana-energia**. 2021. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2021.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J. L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M. D.; WEINTRAUB, M. N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 58, p. 216-234, 2013.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CARVALHO, L.; FUNNICELLI, M.; PINHEIRO, D. Metataxonômica: análise de diversidade taxonômica de microbiomas. In: PENARIOL, G. (Org.). **Tópicos especiais em genética aplicada - volume VII**. 1. ed. Jaboticabal, SP: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP), 2022. p. 7-13.

CASSETARI, A. S. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. 2015. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2015.

CASTRILHO, G.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; PAREDES, S. H.; LAW, T. F.; LORENZO, L.; FELTCHER, M. E.; FINKEL, O. M.; BREAKFIELD, N. W.; MIECZKOWSKI, P.; JONES, C. D.; ARES, J. P.; DANGL, J. L. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature*, v. 542, n. 7646, p. 513-518, 2017.

CASTRO, C. R. T.; GARCIA, R. Competição entre plantas com ênfase no recurso luz. *Ciência Rural*, v. 26, n. 1, p. 167-174, 1996.

CECAGNO, R. **Análise de genes de *Azospirillum amazonense* envolvidos na resposta ao estresse oxidativo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (UFSCar). *Dados meteorológicos médios referentes ao período de janeiro a abril de 2024*. Araras: Estação Meteorológica Automática da Universidade Federal de São Carlos, 2024. Disponível em: <https://www.meteorologia-ara.ufscar.br>. Acesso em: 30 jul. 2025.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do agronegócio brasileiro**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2024. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 15 dez. 2024.

CHAUDHARY, D. R.; RATHORE, A. P.; SHARMA, S. Effect of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria inoculation on soil microbial community structure and nutrients. **Applied Soil Ecology**, v. 150, n. 103, 2020.

CHINELATO, G. **Plantas daninhas na cana-de-açúcar e indicação de manejo**. CHB Agro, 2021. Disponível em: <https://blog.chbagro.com.br/user-files/blog/plantas-daninhas-na-cana-de-acucar-e-indicacao-de-manejo.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2022.

CHUBUKOV, V.; GEROSA, L.; KOCHANOWSKI, K.; SAUER, U. Coordination of microbial metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 327-340, 2014.

CLAGNAN, E.; COSTANZO, M.; VISCA, A.; DI GREGORIO, L.; TABACCHIONI, S.; COLANTONI, E.; SEVI, F.; SBARRA, F.; BINDO, A.; NOLFI, L.; MAGARELLI, R. A.; TRUPO, M.; AMBRICO, A.; BEVIVINO, A. Culturomics- and metagenomics-based insights into the soil microbiome preservation and application for sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, e1473666, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1473666>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - Safra 2024/2025**, v. 12, n. 3, Terceiro Levantamento, dezembro, 2024. Disponível em: file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/E-book_BoletimZdeZSafrazcana_3ZlevZ2024.pdf. Acesso em: 15 dez. 2024.

CONTEVILLE, L. C. **Metagenômica na investigação de agentes infecciosos em amostras clínicas humanas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2016.

CÓRNEO, P. E.; PELLEGRINI, A.; CAPPELLIN, L.; GESSLER, C.; PERTOT, I. Weeds influence soil bacterial and fungal communities. **Plant and Soil**, v. 373, p. 107-123, 2013.

COSTA, P. H. O. **Diversidade microbiana associada a rizosfera de *Dioclea apurensis* Kunth em áreas de Canga e de recuperação ambiental em Carajás**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Instituto Tecnológico Vale, Belém, PA, 2021.

CSERHÁTI, T.; ILLÉS, Z.; NEMES, I. Effect of non-ionic tensides on the growth of some soil bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 115-118, 1991.

DAISOG, H.; SBRANA, C.; CRISTANI, C.; MOONEN, A. C.; GIOVANETTI, M.; BARBERI, P. Arbuscular mycorrhizal fungi shift competitive relationships among crop and weed species. **Plant and Soil**, v. 353, p. 395-408, 2012.

- DE SANTIS SICA, P.; SHIRATA, E. S.; RIOS, F. A.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; SCHWAN ESTRADA, K. R. F.; DE OLIVEIRA, R. S. Impact of N-fixing bacterium *Nitrospirillum amazonense* on quality and quantitative parameters of sugarcane under field condition. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 12, p. 1870-1875, 2020.
- DELGADO, A. M. G.; JACINTHE, P. A.; SHUKLA, M. K. Effect of indaziflam on microbial activity and nitrogen cycling processes in an orchard soil. **Pedosphere**, v. 32, n. 6, p. 803-811, 2022.
- DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzymes activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 247-271. (Special publication, 49).
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, DF:EMBRAPA-SPI, 60p, 1995.
- DU, P.; WU, X.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, Y. Clomazone influence soil microbial community and soil nitrogen cycling. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 475-485, 2018.
- DUARTE, C. F. D. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal e nitrogênio no estabelecimento e no desenvolvimento de *Urochloa spp.*** 2018. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2018.
- DURIGAN, J. C.; TIMOSSI, P. C.; CORREIA, N. M. Densidade e manejo químico da tiririca na produtividade de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 23, n. 3, p. 463-469, 2005.
- EARTH MICROBIOME PROJECT. **Protocolo Amplicon 16S Illumina**, 2018. Disponível em: <https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>. Acesso em: 12 fev. 2023.
- EARTH MICROBIOME PROJECT. **Protocolo Amplicon ITS Illumina**, 2018. Disponível em: <http://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/its/>. Acesso em: 12 fev. 2023.
- EERD, L. L. V.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, n. 4, p. 472-495, 2003.
- ELIA, P. **Estabelecimento e desenvolvimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar sob diferentes lâminas de irrigação**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Agrícolas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2015.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa**, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39688081/inoculante-para-fixacao-de-nitrogenio-para-cana-e-lancado-pela-basf-e-embrapa>. Acesso em: 7 abr. 2022.
- FERRAREZI, J. A.; DEFANT, H.; SOUZA, L. F.; AZEVEDO, J. L.; HUNGRIA, M.; QUECINE, M. C. Meta-omics integration approach reveals the effect of soil native microbiome diversity in the performance of inoculant *Azospirillum brasilense*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1172839, 2023.
- FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; GALON, L.; FRANCA, A. C.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. A.; ASPIAZU, I.; SILVA, A. F.; TIRONI, S. P.; ROCHA, P. R. R. Manejo de plantas daninhas em cana-crua. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 915-925, 2010.

FERREIRA, T. E. **Decomposição da palha de cana-de-açúcar em área de recolhimento variável sob adubação nitrogenada mineral ou inoculação com bactérias diazotróficas.** 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2017.

FERREIRA, T. S. **Desenvolvimento inicial da cana-soca sob diferentes lâminas de irrigação de salvamento.** 2019. Monografia (Bacharelado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

FERREIRA, L. C. **Avaliação de isolados de *Bacillus* spp. quanto à sua capacidade de promover crescimento em mudas de Tangor Murcott.** 2021. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, 2021.

FERREIRA, V. H.; MAGRI, M. M. R. Compatibilidade entre a bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense* e vinhaça: alternativa para a nutrição de cana-de-açúcar. **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 11, p. 1-8, 2021.

FIALHO, C. M. T.; SILVA, G. S.; FAUSTINO, L. A.; CARVALHO, F. P.; COSTA, M. D.; SILVA, A. R. Mycorrhizal association in soybean and weeds in competition. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 38, n. 2, p. 171-178, 2016.

FIALHO, C. M. T. **Interação entre microrganismos do solo, plantas daninhas e as culturas do milho e da soja.** 2013. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

FIUZA, D. A. F. **Rizobactérias de solos agrícolas com potencial para a promoção do crescimento de soja (*Glycine max* L.).** 2022. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde, GO, 2022.

FMI - Fundo Monetário Internacional. **World economic outlook update: global growth - divergent and uncertain,** 2025. Disponível em: <https://www.imf.org/en/Publications/WEO/Issues/2025/01/17/world-economic-outlook-update-january-2025#Overview>. Acesso em: 15 jun. 2025. ISBN 979-8-40029-167-8.

FOERSTER, A. M. L. **Períodos de interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas.** 2021. Monografia (Bacharelado em Agronomia) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, AM, 2021.

FREITAS, B. S. **Bioindicadores de qualidade do solo e produtividade da soja em função do residual da adubação fosfatada e inoculação das gramíneas antecessoras com *Azospirillum brasiliense*.** 2022. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, 2022.

GADKARI, D. Influence of herbicides on growth and nitrogenase activity of *Azospirillum*. In: KLINGMÜLLER, W. (Ed.). **Azospirillum IV.** Berlin, Heidelberg: Springer, 1988. p. 19-24. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73072-6_19.

GALON, L.; TIRONI, S. P.; SILVA, A. F.; BEUTLER, A. N.; ROCHA, P. R. R.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A. Disponibilidade de macronutrientes em cultivares de cana-de-açúcar submetidas à competição com *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, 2012.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 9 p. (Circular Técnica, 63).

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GEHRKE, V. R.; CAMARGO, E. R.; AVILA, L. A. Sulfentrazone: environmental dynamics and selectivity. **Planta Daninha**, v. 38, 2020.

GHOSH, A.; MEHTA, A.; KHAN, A. M. Metagenomic analysis and its applications. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 3, p. 184-193, 2019.

GIRALDELI, A. L.; SILVA, A. F. M.; PAGENOTTO, A. C. V.; BACCIN, L. C.; ARAÚJO, L. S.; SILVA, G. S.; BRITO, F. C.; VICTORIA FILHO, R. Períodos de interferência de plantas daninhas em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 5, n. 59, p. 223-232, 2022.

GODOY, F. A. **Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera**. 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2020.

GONÇALVES, M. C.; SILVA, K. C.; OLIVEIRA, C. E. S.; STEINER, F. Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 2, p. 72-81, 2020.

GUIDO, A. **Análise da utilização da bioeletricidade gerada na indústria sucroalcooleira como alternativa ao atendimento da demanda energética**. 2022. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, 2022.

HAMMAMI, I.; FERCHICHI, N.; TOUKEBRI, W.; M'SEHLI, W.; BEN HAMMOUDA, T.; AJENGUI, A.; GUIGA, C.; TRABELSI, D. Effects of weed management on soil metagenomic composition in cultivated chickpea fields. **Environmental Research Communications**, v. 7, n. 1, p. 015011, 2025. doi.org/10.1088/2515-7620/ad8c19.

HECK, T.; CINELLI, R.; POLITO, R. A.; RIBAS, J. L.; BAGNARA, F.; HAHN, A. M.; NUNES, A. L. A importância dos herbicidas residuais no controle da tiririca. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 65147-65163, 2020.

HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; SALÃO, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms: an overview. In: **Pesticide biotransformation in plants and microorganism**. Washington: American Chemical Society, 2001. p. 2-27. (ACS Symposium Series, v. 777). ISBN 978-0841237049.

HUANG, W. Z. Advancements in symbiotic nitrogen fixation: enhancing sugarcane production. **Molecular Soil Biology**, v. 15, p. 28-36, 2024.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPAP, 1994. 46 p. (Documentos, 46). ISSN 0101-9716.

IAC - Instituto Agronômico de Campinas. **Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2022/23**. Campinas: IAC, 2023. (Boletim Técnico, 235). Disponível em: <https://www.iac.sp.gov.br/media/publicacoes/iacbt235.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2024.

IAC - Instituto Agronômico de Campinas. **82,6% das empresas do setor sucroenergético pretendem usar sistema MPB para renovação de canavial**. 2024. Disponível em: <https://www.iac.sp.gov.br/noticiasdetalhes.php?tag=1486>. Acesso em: 19 dez. 2024.

IHARA. **Ficha técnica Capim-braquiária**. 2021. Disponível em: <https://ihara.com.br/wp-content/uploads/sites/96/2021/03/ficha-tecnica-capim-braquiaria-ihara-1.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2022.

INAMDAR, A.; SANGAWE, V.; ADHAPURE. Chapter 14 - Enzymes in rhizosphere engineering. In: **Rhizosphere engineering**. London: Academic Press, 2022. p. 259-272.

IOCCA, A. B. A. D. **Caracterização de novos microrganismos cultivados a partir de solos do Cerrado**. 2020. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2020.

IWASHITA, K.; HOSOKAWA, Y.; IHARA, R.; MIYAMOTO, T.; OTANI, M.; ABE, J.; ASANO, K.; MERCIER, O.; MIYATA, K.; BARLOW, S. Flumioxazin, a PPO inhibitor: A weight-of-evidence consideration of its mode of action as a developmental toxicant in the rat and its relevance to humans. **Toxicology**, v. 472, 2022.

JAKELAITIS, A.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; AGNES, E. L.; MIRANDA, G. V.; MACHADO, A. F. L. Efeitos de sistemas de manejo sobre a população de tiririca. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 89-95, 2003.

JANKE, D.; FRITSCH, W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. **Journal of Basic Microbiology**, v. 25, n. 9, p. 603-619, 1985.

JONCK, L. C. G.; MAGRI, M. M. R.; MONQUERO, P. A. Interference of herbicides in association of diazotrophic bacterium *Nitrospirillum amazonense* and sugarcane pre-sprouted seedlings. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 27, n. 3, p. 175-183, 2022.

JORIS, H. A. W. **Nitrogênio na produção de cana-de-açúcar: aspectos agronômicos e ambientais**. 2015. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 2015.

KHUNA, S.; KUMLA, J.; SRINUANPAN, S.; LUMYOUNG, S.; SUWANNARACH, N. Multifarious characterization and efficacy of three phosphate-solubilizing *Aspergillus* species as biostimulants in improving root induction of cassava and sugarcane stem cuttings. **Plants**, v. 12, n. 3630, 2023.

KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; BAUMAN, T. T.; TREZZI, M. M. Sinergismo potencial entre herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 569-575, 2001.

KUVA, A. A.; PITELLI, R. A.; CHRISTOFOLLETI, P. J.; ALVES, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, 2000.

KUVA, M. A.; GRAVENA, R.; PITELLI, R. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; ALVES, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar II – Capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*). **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 323-330, 2001.

LABANCA, E. R. G. **Impacto de bactérias promotoras de crescimento de plantas no microbioma radicular e na fisiologia da cana-de-açúcar em solo com excesso de alumínio**. 2019. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, 2019.

LANDELL, M. G. A. et al. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: IAC, 2013. 16 p. (Documentos IAC, 109).

LI, A. Role of diazotrophic bacteria in promoting sugarcane growth and yield. **Field Crop**, v. 7, n. 3, p. 171-181, 2024.

LI, R.; PANG, Z.; ZHOU, Y.; FALLAH, N.; HU, C.; LIN, W. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in sugarcane fields applied with organic fertilizer. **BioMed Research International**, v. 2020, 11 p., 2020.

LIMA, A. T.; MARJOTTA-MAISTRO, M. C.; SANTOS, J. A. Setor sucroenergético: dinâmica produtiva e econômica do açúcar no Brasil. **Studies in Social Sciences Review**, v. 3, n. 1, p. 362-388, 2022.

LIMA, L. M. **O uso de rizobactérias promotoras de crescimento na fixação biológica de nitrogênio na cultura do amendoim**. 2020. Monografia (Bacharelado em Agronomia) - Centro Universitário de Anápolis UniEvangélica, Anápolis, GO, 2020.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 1149-1162, 2014.

LINO, A. C. M. **Fixação biológica de nitrogênio em soqueira de cana-de-açúcar com *Azospirillum brasilense* e na compatibilidade com agroquímicos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Solos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2018.

LIU, S. Y.; WEI, C. Y.; TONG, Y.; CHEN, W.; HAN, Z. Y.; ZENG, D. Q.; TANG, W. W. *Cyperus rotundus* L. drives arable soil infertile by changing the structure of soil bacteria in the rhizosphere, using a maize field as an example. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 29, p. 79579-79593, 2022.

LONE, A. H.; RAVERKAR, K. P.; PAREEK, N. In-vitro effects of herbicides on soil microbial communities. **The Bioscan**, v. 9, n. 1, p. 11-16, 2014.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. Micróbios promotores de crescimento de plantas bem-sucedidos: métodos de inoculação e fatores abióticos. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-13, 2021.

LOPES, V. R. **Melhoramento genético de cana-de-açúcar em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.

LOURENÇO, K. S.; SULEIMAN, A. K. A.; PIJL, A.; VEEN, J. A.; CANTARELLA, H.; KURAMAE, E. E. Resilience of the resident soil microbiome to organic and inorganic amendment disturbances and to temporary bacterial invasion. **Microbiome**, v. 6, n. 142, 2018.

LOURENÇO, M. F. C. **Manejo químico de vassourinha-de-botão (*Spermacoce* sp.) na cultura da soja**. 2018. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Instituto Federal Goiano, Urutaí, GO, 2018.

MACHADO, R. G. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento para plantas forrageiras**. 2015. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 73-80, 2009.

MALVIYA, M. K.; LI, C. N.; LAKSHMANAN, P.; SOLANKI, M. K.; WANG, Z.; SOLANKI, A. C.; NONG, Q.; VERMA, K. K.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SHARMA, A.; GUO, D. J.; DESSOKY, E. S.; SONG, X. P.; LI, Y. R. High-throughput sequencing-based analysis of rhizosphere and diazotrophic bacterial diversity among wild progenitor and closely related species of sugarcane (*Saccharum* spp. inter-specific hybrids). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

MANTOVANI, F. E. **Avaliação do coeficiente de variação em experimentos com a cultura da cana-de-açúcar**. 2022. Monografia (Bacharelado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Ilha Solteira, SP, 2022.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Documentos, 208).

MARTINELLI, R.; ORZARI, I.; FERREIRA, C. S. S. **Controle de plantas daninhas**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional, 2019. 192 p.

MARTINS, T. A.; CARVALHO, L. B.; BIANCO, M. S.; BIANCO, S. Acúmulo de matéria seca e macronutrientes por plantas de *Merremia aegyptia*. **Planta Daninha**, v. 28, p. 1023-1029, 2010.

MARTINS, T. D.; MENTEN, J. O. M.; SANGUINO, A. Fungos associados às sementes (cariopses) de cana-de-açúcar: métodos para detecção, incidência e relação entre incidência fúngica e ambiente de produção das sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 173-178, 2009.

MASCARENHAS, L. S. **Uso de inoculantes microbiológicos para otimização do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit**

- hídrico**. 2021. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2021.
- MASSENSINI, A. M.; BONDUKI, V. H. A.; MELO, C. A. D.; COSTA, M. D. Efeito da competição na colonização micorrízica de culturas e plantas daninhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 2014, Araxá. **Anais...** Araxá: FertBio, 2014b.
- MASSENSINI, A. M.; BONDUKI, V. H. A.; MELO, C. A. D.; TÓTOLA, M. R.; FERREIRA, F. A.; COSTA, M. D. Soil microorganisms and their role in the interactions between weeds and crops. **Planta Daninha**, v. 32, n. 4, p. 873-884, 2014a.
- MATOS, C. C. **Influência das interações planta daninha-microbiota do solo sobre a capacidade competitiva vegetal e mineralização rizosférica da matéria orgânica**. 2017. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.
- MATOS, C. C.; MEDEIROS, V. C.; SILVA, L. A.; OLIVEIRA FILHO, M. A. Influence of *Azospirillum brasilense* on interactions between maize and weeds. **Revista de Educação, Ciência e Tecnologia de Almenara**, v. 6, n. 1, 2024.
- MATOSO, E. S.; REIS, V. M.; GIACOMINI, S. J.; SILVA, M. T.; AVANCINI, A. R.; SILVA, S. D. A. Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 1, 2021.
- MAY, A.; RAMOS, N. P.; SILVA, E. H. F. M.; MELO, I. S. **Promoção de crescimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com *Bacillus aryabhatai* em diferentes frequências de irrigação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2019. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 80).
- MEHNAZ, S. Microbes - Friends and foes of Sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 953-1033, 2013.
- MELO, E. N. P.; BOMBONATTO, A. K. G.; MOREIRA, L. M. O.; FALEIRO, D. S.; FERREIRA, M. E.; CAMARORI, S. S. Avaliação sazonal da atividade da enzima β -glicosidase em solos do Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 53., 2013, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2013.
- MELO, W. J.; MONIZ, A. C. et al. Enzimas no Solo. In: **A responsabilidade social da Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1988. p. 365-378.
- MENDES, K. F.; SOUSA, R. N.; LIMA, A. C.; GODOI JUNIOR, M. A. Understanding the Environmental Behavior of Herbicides: A Systematic Review of Practical Insights. In: **Pesticides - Agronomic Application and Environmental Impact**, London, IntechOpen, 2023. DOI: 10.5772/intechopen.1002280.
- MENDONÇA, J. J.; LIRA JÚNIOR, M. A.; CARVALHO, E. X.; FRACETTO, G. G. M.; FRACETTO, F. J. C.; ALVES, M. J. G.; OLIVEIRA, J. P. Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 25, n. 2, 2020.
- MIALICHE JÚNIOR, A. J.; ALVES, A. B.; BAZELA, C.; FARIA, F. A. Torta de filtro e micronutrientes no plantio de cana-de-açúcar. **Revista Ciência & Tecnologia Fatec (Fatec-JB)**, v. 12, n. 1, 2020.

MOHIUDDIN, M.; MOHAMMED, M. K. Influence of fungicide (Carbendazim) and herbicides (2, 4-D and Metribuzin) on non-target beneficial soil microorganisms of Rhizospheric Soil of Tomato Crop. **Journal of Environmental Science**, v. 5, n. 1, 2013.

MONTEIRO, L. C. P.; DIAZ-GALLO, S. A.; MATOS, C. C.; SILVA, C. G.; MASSENSINI, A. M.; MENDES, T. A. O.; COSTA, M. D. Rhizosphere microbial community changes due to weed-weed competition. **European Journal of Soil Biology**, v. 120, p. 103594, 2024.

NAGY, K.; DUCA, R. C.; LOVAS, S.; CRETA, M.; SCHEEPERS, P. T. J.; GODDERIS, L.; ADAM, B. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, v. 181, 2020.

NICCHIO, B.; CARDOZO, C. C.; VIEIRA, M. A. M. Efeitos de substratos na qualidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 25, n. 1, 2020.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDINI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. 348 p.

OLIVER, L. A.; BUCHANAN, G. A. Weed competition and economic thresholds. In: CAMPER, N. D. (Ed.). **Research Methods In Weed Science**. Champaign: Southern Weed Science Society, 1986. p. 72-91.

ONA, O.; IMPE, J. V.; PRINCESA, A.; VANDERLEYDEN, J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 1, p. 125-132, 2005.

PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A.; SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. **Microrganismos promotores de crescimento vegetal em cana-de-açúcar e outras gramíneas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 51 p. (Documentos, 208).

PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.

PAULA, R. J. **Interferência de plantas daninhas no desenvolvimento inicial de mudas meristemáticas de cana-de-açúcar**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2015.

PAULA, R. J.; ESPOSTI, C. D.; TOFFOLI, C. R.; FERREIRA, P. S. H. Weed interference in the initial growth of meristem-grown sugarcane plantlets. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 9, p. 634-639, 2018.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEDROSA, M. V. B.; ALVES, L. P.; PASCHOA, R. P.; AMARAL, A. A. Importância ecológica dos microrganismos do solo. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 100-114, 2015.

- PERES, T. B.; ANDRÉA, M. M.; LUCHINI, L. C. Agrotóxicos usados na cultura do algodão: Efeito na atividade das enzimas desidrogenase e arilsulfatase do solo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 363-369, 2004.
- PEREZ, L. L. **Seletividade de sulfentrazone e clomazone aplicados em pré-plantio de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar CTC11**. 2017. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2017.
- PETERS, L. P. **Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano**. 2011. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.
- PETKOVA, M.; NAYDENOV, M.; MITKOV, A.; NESHEV, N.; YANEV, M.; TONEV, T. Isolation and characterization of soil microorganisms degrading the herbicide isoxaflutole. **Scientific Papers. Series A. Agronomy**, v. 13, n. 1, 2020.
- PILEGGI, M.; PILEGGI, S. A. V.; SADOWSKY, M. J. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. **Heliyon**, v. 6, 2020.
- PITELLI, R. A.; DURIGAN, J. C. Terminologia para períodos de controle e convivência das plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 15., 1984, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 1984. p. 37.
- PRICE, A. J.; KELTON, J. A. **Herbicides: Current Research and Case Studies in Use**. Rijeka: InTech, 2013. ISBN 978-953-51-1112-2. DOI: 10.5772/56743.
- PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; C. FILHO, A.; VARGAS, L.; SANT'ANNA, S. A. C. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar a bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1079-1089, 2011.
- PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; FILHO, J. G. S.; FILHO, A. C.; VARGAS, L. Tolerância da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* a herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 4, p. 610-617, 2013.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590-D596, 2013.
- RABELO, J. S.; SANTOS, E. A.; MELO, E. I.; VAZ, M. G. M. V.; MENDES, G. O. Tolerance of microorganisms to residual herbicides found in eucalyptus plantations. **Chemosphere**, v. 329, 2023.
- RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.
- RAMOS, S. M. S.; CRUZ, R.; BARBOSA, R. N.; MACHADO, A. R.; COSTA, A. F.; MOTTA, C. M. S.; OLIVEIRA, N. T. *Penicillium* and *Talaromyces* communities of sugarcane soils (*Saccharum officinarum* L.): Ecological and phylogenetic aspects. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 4, 2018.

RADOSEVICH, S. R. Methods to study interactions among crops and weeds. **Weed Technology**, v. 1, n. 3, p. 190-198, 1987.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; MENDES, I. C.; MEHTA, A. **Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 206).

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. C. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônios pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS, V. M. **Interações entre plantas e microrganismos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. (Documentos, 194). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/32768/1/doc194.pdf>. Acesso em: 6 maio 2022.

REIS, V. S. **A competição intraespecífica influencia o investimento em partes aéreas em plântulas de uma espécie arbórea de floresta de restinga**. 2016. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4883515/mod_resource/content/2/pi_2015_vinicius_reis_plantulas_calophyllum_alocacao_competicao_intraespecifica.pdf. Acesso em: 30 out. 2024.

REIS, V. M.; RIOS, F. A.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; HIRATA, E. S.; BIFFE, D. F. Agronomic performance of sugar cane inoculated with *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, p. 918-926, 2020.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, R. D.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, 2021.

RIZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A.; MEROTTO JR, A.; AGOSTINETTO, D. Competição pelos recursos do solo entre ervas daninhas e cultura. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 707-714, 2001.

ROCHA, A. C. **Diversidade de bactérias do ciclo do nitrogênio em amostras de solo sob diferentes manejos agrícolas e mata nativa**. 2021. Monografia (Bacharelado em Biologia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2021.

RODRIGUEZ, R.; DURAN, P. Natural holobiome engineering by using native extreme microbiome to counteract the climate change effects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

ROLF, S. A.; GRIFFITHS, J.; TON, J. Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 49, p. 73-82, 2019.

SANDRINI, M. E. N.; DALRI, A. B.; COELHO, A. P.; FARIA, R. T.; PALARETTI, L. F. Evapotranspiração, coeficiente de cultura e crescimento de cana-de-açúcar plantada por mudas pré-brotadas e por toletes. **Irriga**, v. 1, n. 3, p. 517-529, 2021.

SANON, A.; ADRIANJAKA, Z. N.; PRIN, Y.; BALLY, R.; THIOULOUSE, J.; COMTE, G.; DUPONNOIS, R. Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. **Plant and Soil**, v. 321, p. 259-278, 2009.

SANTOS, J. B.; JAQUES, R. J. S.; PROCOPIO, S. O.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. **Planta Daninha**, v. 22, p. 293-299, 2004.

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**, v. 24, n. 3, p. 457-465, 2006.

SANTOS, K. D. **Genômica comparativa e diversidade de operons contendo genes nif em bactérias diazotróficas**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

SANTOS, S. G.; CHAVES, V. A.; RIBEIRO, F. S.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2019.

SANTOS JÚNIOR, R. F. **Variabilidade espacial do banco de sementes e plantas daninhas em área de cana-de-açúcar**. 2021. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2021.

SCHEDENFFELDT, B. F.; SANTOS, P. H. V.; HIRATA, A. C. S.; SOARES, M. R.; MONQUERO, P. A. Influence of the density and distance of *Digitaria horizontalis* Willd in the biometric and nutritional parameters of pre-sprouted seedlings of sugarcane. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 3, p. 528-536, 2022.

SCHWAB, S.; HIRATA, E. S.; AMARAL, J. C. A.; SILVA, C. G. N.; PEREIRA, J. P.; SILVA, L. P.; ROUWS, J. R. J.; ROUWS, L. F. M.; BALDINI, J. I.; REIS, V. M. Quantificação e visualização de *Nitrospirillum amazonense* cepa CBAmC em cana-de-açúcar após uso de diferentes métodos de inoculação. **Solo vegetal**, n. 488, p. 197-216, 2023.

SCHWERZ, L. A.; TIRONI, S. P.; PETRY, S.; PIES, W.; LUZ, A. C. P.; WERLANG, T. Desenvolvimento e fixação de nitrogênio in vitro de *Azospirillum amazonense* em diferentes doses de herbicidas. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9., 2017. **Anais...** 2017. v. 9, n. 4.

SCUDELETTI, D.; CRUSCIOL, C. A. C.; BOSSOLANI, J. W.; MORETTI, L. G.; MOMESSO, L.; TUBANA, B. S.; CASTRO, S. G. Q.; OLIVERIRA, E. F.; HUNGRIA, M. *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 645542, 2022.

SEBASTIAN, D. J.; FLEMING, M. B.; PATTERSON, E. L.; SEBASTIAN, J. R.; NISSEN, S. J. Indaziflam: a new cellulose-biosynthesis-inhibiting herbicide provides long-term

control of invasive winter annual grasses. **Pest Management Science**, v. 73, p. 2149-2162, 2017.

SILVA, F. J. C. da; CAMPOS, A. P. de; CAMELO, A. D.; MOREIRA, W. M. Q. Evaluation of phytosociological indices of weeds in soils with three different textures in the culture of sugar cane. **Revista Fafibe On-Line**, v. 10, n. 1, p. 223-240, 2017.

SILVA, G. B. **Bagaço de cana-de-açúcar como fonte alimentar alternativa para ruminantes**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Produção e Utilização de Alimentos para Animais de Interesse Zootécnico) - Instituto Federal Goiano, Ceres, GO, 2021.

SILVA, G. S.; MELO, C. A. D.; FIALHO, C. M. T.; SANTOS, L. D. T.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A. Impacto de sulfentazona, isoxaflutol e oxyfluorfem sobre a microbiota de dois solos florestais. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 292-299, 2014.

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

SILVA, I. A. B.; KUVA, M. A.; ALVES, P. L. C. A.; SALGADO, T. P. Interferência de uma comunidade de plantas daninhas com predominância de *Ipomoea hederifolia* na cana-soca. **Planta Daninha**, v. 27, p. 265-272, 2009.

SILVA, I. P. de F.; JUNIOR, J. F. da S.; PUTTI, F. F.; LATORRE, D. de O.; SCHIMIDT, A. P.; LUDWIG, R. Herbicidas inibidores do fotossistema II - Parte I. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2013.

SILVA, J. H. B. **Desempenho vegetativo, trocas gasosas e produtividade de cana-de-açúcar adubada com torta de filtro enriquecida**. 2022. Monografia (Bacharelado em Engenharia Agrônoma) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2022.

SILVA, C. R.; ROVIDA, A. F. S.; MARTINS, J. G.; FREITAS, P. N. N.; OLSCHANESKI, L. R.; GRANGE, L.; PILEGGI, S. A. V.; PILEGGI, M. Bacterial adaptation to rhizosphere soil is independent of the selective pressure exerted by the herbicide saflufenacil, through the modulation of catalase and glutathione S-transferase. **PLoS ONE**, v. 18, n. 11, p. 1-25, 2023.

SILVA, M. T.; GASPAROTTO, F.; SANCHES, G. S.; RESENDE, J. F.; BERGAMASO, R. Inoculação de vinhaça com *Bacillus subtilis* e aplicação em mudas de cana-de-açúcar. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 6, p. 1-20, 2024.

SIMÕES, W. L.; OLIVEIRA, A. R.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; LIMA, J. A. Aplicação de bactérias diazotróficas via sistema de irrigação para fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar. **Revista Energia na Agricultura**, v. 33, n. 1, p. 45-51, 2018.

SOUSA, M. O.; ARAÚJO, T. J.; CANTUÁRIO JÚNIOR, O. A.; DIDONET, C. C. G. M.; LAZÁRO, F. N. P. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias da família *Rhizobiaceae* isoladas de nódulos das raízes de plantas de arroz sequeiro. **Anais do 55º Congresso Brasileiro de Química - CBQ**, 2015. Disponível

em: <http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/11/7433-21348.html>. Acesso em: 6 maio 2022.

SOUZA, A. H. S.; LUIZ, G. F.; MARTINELLI, P. R. P. Taxa de multiplicação de variedades de cana-de-açúcar provenientes de mudas pré-brotadas no sistema meiosi. **Science and Technology Innovation in Agronomy**, v. 3, n. 1, p. 171-177, 2019.

SOUZA, P. M. A.; GONÇALVES, L. M.; BARROS, M. C. R. e; MIRANDA, L. G. de; SCHINDEL, N. Y. A. Systematic analysis around metabolical responses of microorganisms under preemergent herbicides application in tropical soils. **Revista Científica Rural**, v. 23, n. 1, p. 1-30, 2021.

STACCIARINI, T. C. V. **Adubação suplementar de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar**. 2020. Dissertação (Mestrado em Bioenergia e Grãos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, GO, 2020.

STALEY, Z. R.; HARWOOD, V. J.; ROHR, J. R. A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 813-836, 2015.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P. J. (Eds.). **Methods of Soil Analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 778-835. (Special Publication, 5).

TAKÁCS, E.; LÁZÁR, D.; SIAKWA, A.; KLÁTYIK, S.; MORTL, M.; KOCSÁNYI, L.; BARÓCSI, A.; LENK, S.; LENGYEL, E.; SZÉKÁCS, A. Ecotoxicological Evaluation of Safener and Antimicrobial Additives in Isoxaflutole-Based Herbicide Formulations. **Toxics**, v. 12, n. 238, 2024.

TAO, J.; QIN, C.; FENG, X.; MA, L.; LIU, X.; YIN, H.; LIANG, Y.; LIU, H.; HUANG, C.; ZHANG, Z.; XIAO, N.; MENG, D. Traits of Exogenous Species and Indigenous Community Contribute to the Species Colonization and Community Succession. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3087, 2018.

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

TERRA, L. A. **Genômica Funcional da Bactéria Fixadora de Nitrogênio *Nitrospirillum amazonense* em Interação com o Fluido do Apoplasto de Cana-de-açúcar: Abordagens Transcriptômica e Proteômica**. 2018. Tese (Doutorado em Agrobiologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

TOMKIEL, M.; BACMAGA, M.; BOROWIK, A.; KUCHARSKI, J.; WYSZKOWSKA, J. Effect of a mixture of flufenacet and isoxaflutole on population numbers of soil-dwelling microorganisms, enzymatic activity of soil, and maize yield. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 54, n. 10, 2019.

TORRES, B. A.; MENEGHIN, S. P.; RIBEIRO, N. M.; SANTOS, H. V.; SCHEDENFFELDT, B. F.; MONQUERO, P. A. Saflufenacil and indaziflam herbicide effects on agricultural crops and microorganisms. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 16, p. 872-885, 2018.

UNICA (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR). **Bioeletricidade em números**. Maio 2024. Disponível em: <https://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=134>. Acesso em: 15 dez. 2024.

UNICA (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR). **Setor Sucroenergético**. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/>. Acesso em: 15 dez. 2024.

VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 121-135, 1997.

VASCONCELOS, A. C. M.; CASAGRANDE, A. A.; PERECIN, D.; JORGE, L. A. C.; LANDELL, M. G. A. Avaliação do sistema radicular de cana-de-açúcar por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 849-858, 2003.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte I - História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, n. 1, p. 271-298, 1999.

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

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. (Documentos, 234).

YU, M.; WU, M.; SECUNDO, F.; LIU, Z. Detection, production, modification, and application of arylsulfatases. **Biotechnology Advances**, v. 67, 2023.

ZEMOLIN, C. R.; AVILA, L. A.; CASSOL, G. V.; MASSEY, J. H.; CAMARGO, E. R. Environmental fate of *S*-metolachlor – a review. **Planta Daninha**, v. 32, n. 3, p. 655-664, 2014.

ZHANGA, H.; YUANA, X.; XIONGA, T.; WANGA, H.; JIANGA, L. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 398, 2020.

ZHANG, X.; LI, Y.; WANG, J.; SMITH, A. B.; JONES, C. D.; JOHNSON, E. F. International research initiative on genomics-guided sugarcane breeding. **Molecular Plant**, v. 18, p. 171-174, 2025.

ZHAONIAN, Y.; LIU, Q.; MO, L.; PANG, Z.; HU, C. Integrating the Soil Microbiota and Metabolome Reveals the Mechanism through Which Controlled Release Fertilizer Affects Sugarcane Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14086, 2023.

9. APÊNDICES

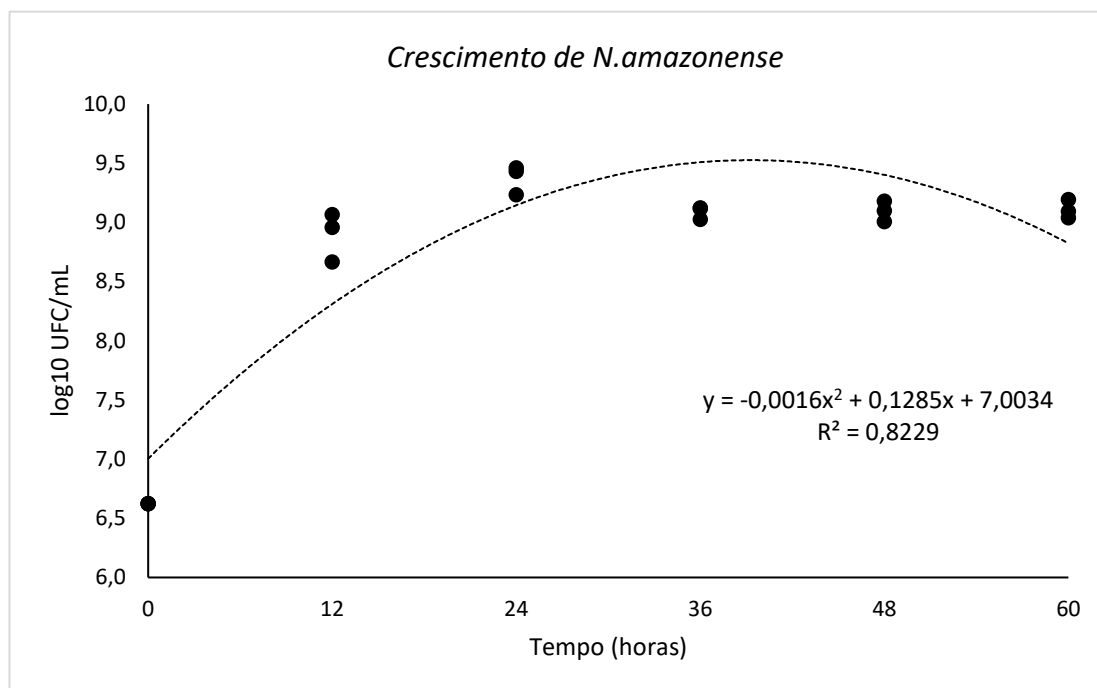


Figura 6. Curva de crescimento de *N. amazonense* em meio caldo nutriente (CN).

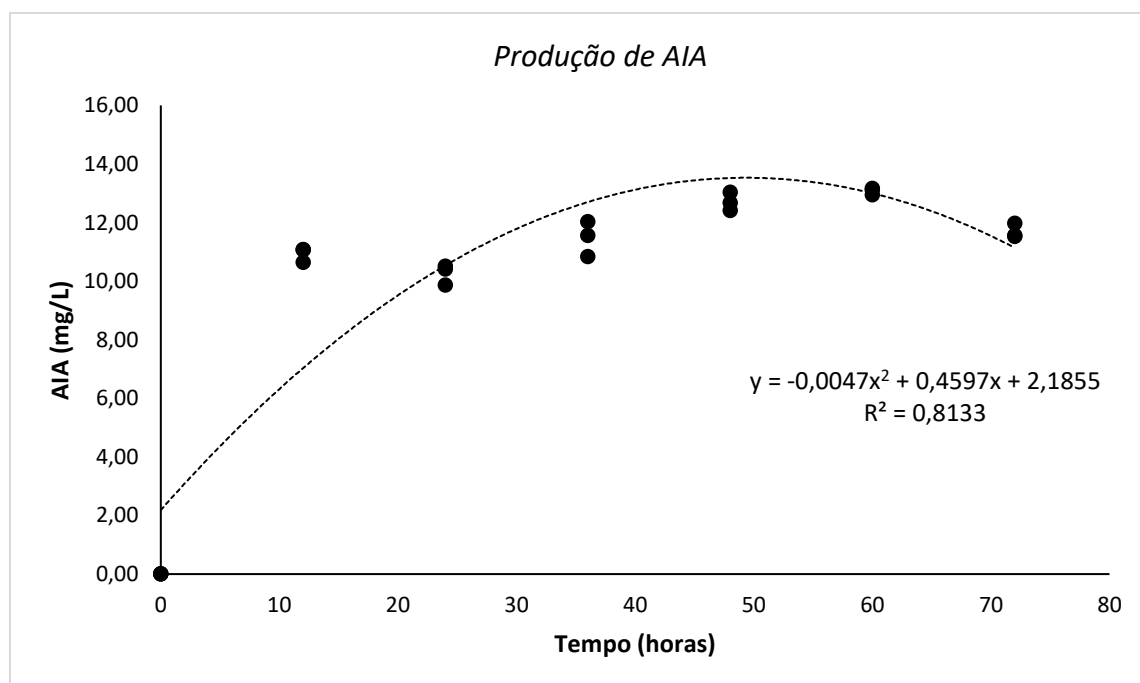


Figura 7. Produção de ácido indol-acético (AIA) em mg/L por *N. amazonense* em meio caldo nutriente (CN) suplementado com triptofano (1mg/L).

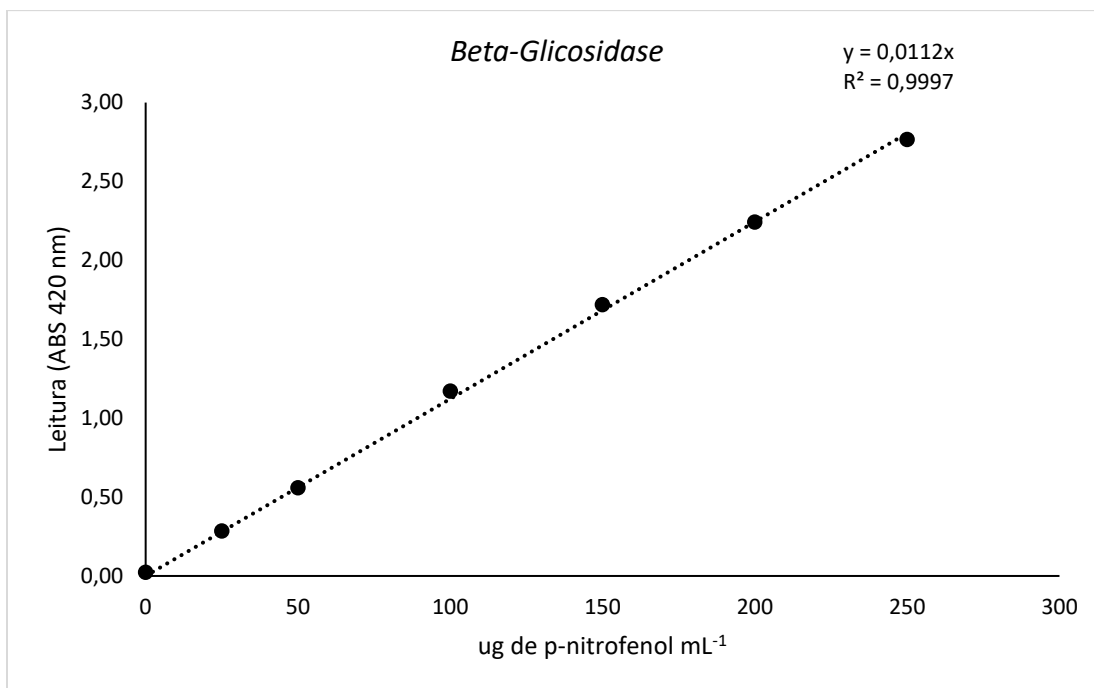


Figura 8. Curva padrão de betaglicosidase.

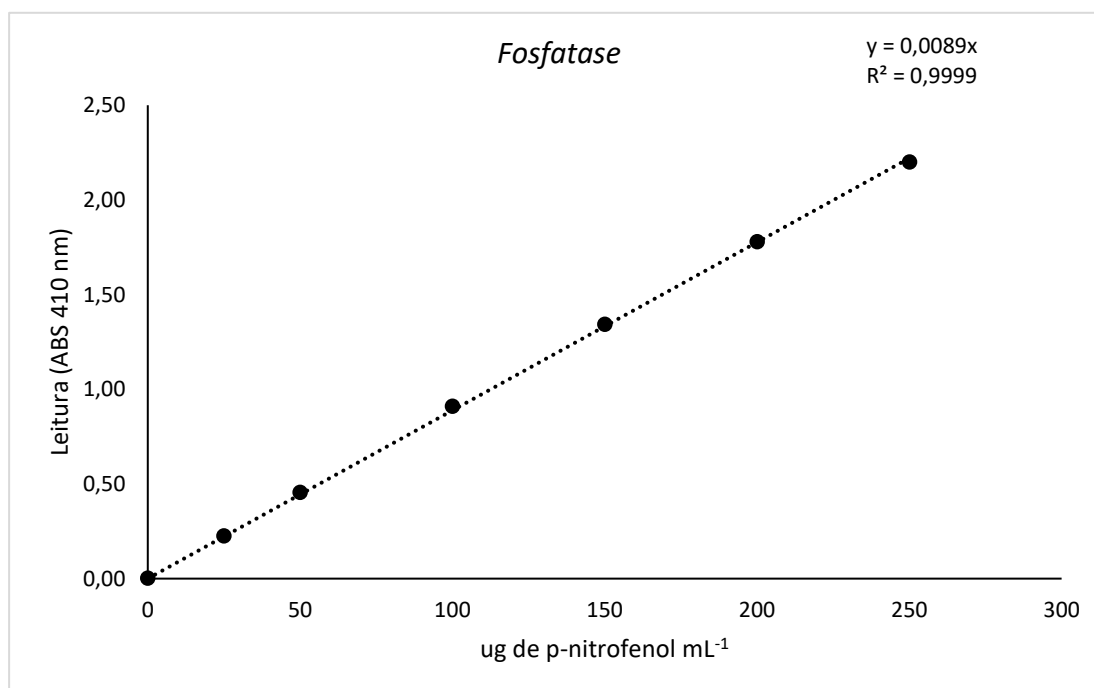


Figura 9. Curva padrão de arilsulfatase

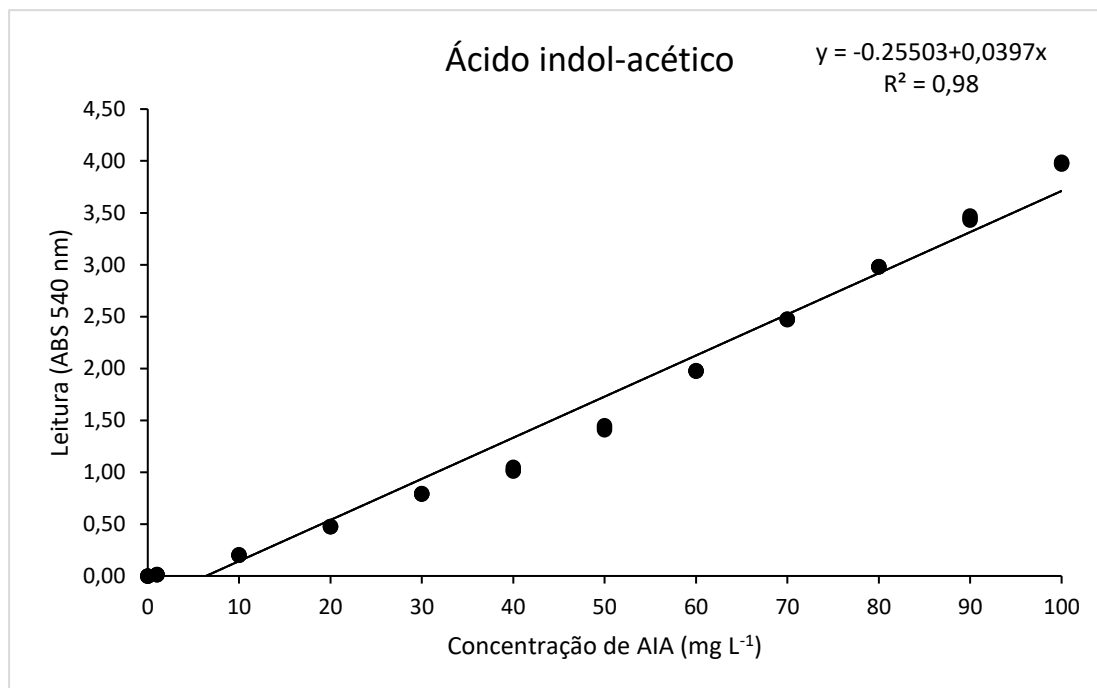


Figura 10. Curva padrão de ácido indol-acético.

Tabela 17. Resumo da análise de variância referente aos ensaios de CMI

Herbicidas	CV (%)	p (Shapiro-Wilk)	p (Bartlett)	p (ANOVA)
Imazapic	2,07	0,8794	0,2619	0,0000
Clomazone	1,93	0,4962	0,1009	0,0022
Flumioxazin	0,80	0,7323	0,5185	0,0008
Metribuzin	0,54	0,2065	0,3401	0,0005
S-metolachlor	0,48	0,1756	0,9507	0,0000
Sulfentrazone	0,53	0,4473	0,4818	0,0003
Indaziflam	1,16	0,6278	0,3807	0,0004
Isoxaflutole	0,66	0,7573	0,6768	0,0012
Tebuthiuron	1,35	0,1908	0,0873	0,9385

*CV = coeficiente de variação; p (Shapiro-Wilk) e p (Bartlett) indicam normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente (valores > 0,05 indicam conformidade); p (ANOVA) indica diferença significativa entre tratamentos (valores < 0,05).

Tabela 18. Significância dos parâmetros e coeficiente de determinação (R²) dos modelos polinomiais de regressão testados nos ensaios de CMI.

Herbicidas	Modelo	p-Valor				R ²
		b0	b1	b2	b3	
Imazapic	Linear	0	0	-	-	0,9170
	Quadrático	0	0,0006	0,4609	-	0,9183
	Cúbico	0	0,0027	0,1076	0,0812	0,9264
Clomazone	Linear	0	0,0002	-	-	0,7644
	Quadrático	0	0,0038	0,0434	-	0,9032
	Cúbico	0	0,0561	0,3571	0,5812	0,9119
Flumioxazin	Linear	0	0,0021	-	-	0,5736
	Quadrático	0	0,0042	0,0239	-	0,8254
	Cúbico	0	0,0937	0,4863	0,7956	0,8280
Metribuzin	Linear	0	0	-	-	0,7516
	Quadrático	0	0,0008	0,0124	-	0,9200
	Cúbico	0	0,5026	0,3693	0,1656	0,9625
S-metolachlor	Linear	0	0,4296	-	-	0,0052
	Quadrático	0	0	0	-	0,5067
	Cúbico	0	0	0,0008	0,0099	0,5804
Sulfentrazone	Linear	0	0	-	-	0,7573
	Quadrático	0	0,0004	0,0084	-	0,9290
	Cúbico	0	0,4042	0,4081	0,1763	0,9648
Indaziflam	Linear	0	0,0002	-	-	0,5352
	Quadrático	0	0,0017	0,0190	-	0,6748
	Cúbico	0	0,0004	0,0027	0,0059	0,8867
Isoxaflutole	Linear	0	0,0005	-	-	0,5299
	Quadrático	0	0,8585	0,1631	-	0,5820
	Cúbico	0	0,0103	0,0042	0,0062	0,8406
	Brain-Cousens	b	d	e	f	R²
		0	0	0,2988	0,3059	0,7201

* Significância estatística: *p-Valor < 0,05.

Tabela 19. Características físico-químicas dos herbicidas utilizados.

Herbicida	Solubilidade (S)		Constante de dissociação (pKa)		Coeficiente de partição octanol-água (log Kow)	
	Em água a 20 °C (mg L ⁻¹)	Interpretação	25 °C	Interpretação	Em pH7, 20 °C	Interpretação
Imazapic	2.230	Alta	3,6	Ácido fraco	0,39	Medianamente Liposolúvel
Flumioxazin	0,786	Baixa	-	Não ionizável	2,55	Muito Lipofílico
Clomazone	1.212	Alta	-	Não ionizável	2,58	Muito Lipofílico
Tebuthiuron	2.500	Alta	-	Não ionizável	1,79	Lipofílico
Isoxaflutole	-	Baixa	-	Não ionizável	2,34	Muito Lipofílico
Sulfentrazone	780	Moderada	6,5	Ácido fraco	0,99	Medianamente Liposolúvel
S-metolachlor	480	Moderada	-	Não ionizável	3,05	Muito Lipofílico
Metribuzin	10.700	Alta	1,3	Ácido forte	1,7	Lipofílico
Indaziflam	2,8	Baixa	3,5	Ácido fraco	2,8	Muito Lipofílico

Fonte: AERU (2025).