

TOLERÂNCIA DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. A DIFERENTES HERBICIDAS¹

DÉRCIO SCHOLLES², FERNANDO GUSTAVO MOHRDIECK³, LUCIANO KAYSER VARGAS⁴

RESUMO - A aplicação de herbicidas pode afetar a microbiota do solo como um todo e, mais especificamente, as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, responsáveis pelo processo de fixação biológica do nitrogênio em simbiose com a soja. Em função de sua variabilidade genética, as estirpes de *Bradyrhizobium* podem apresentar diferenças na sensibilidade aos diversos herbicidas utilizados na cultura da soja. Com o objetivo de testar a sensibilidade de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, foram realizados dois estudos em laboratório. Em um primeiro estudo, avaliou-se a tolerância de 15 estirpes de *Bradyrhizobium* aos glifosato e atrazina, utilizando-se o método da placa inclinada. No outro estudo, avaliou-se a tolerância das estirpes a doses extremas de oito herbicidas adicionados em doses crescentes ao meio de cultura LMÁ. O efeito dos herbicidas metolachlor e imazaquin sobre populações de rizóbios estabelecidas em solo foi verificado em um terceiro estudo, realizado em casa de vegetação. Os resultados obtidos variaram com a metodologia empregada, sendo o método da placa inclinada mais limitado do que o método de adição de doses crescentes de herbicidas em meio de cultura sólido. Dentre as estirpes avaliadas, SEMIA 586, SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5061 foram as mais tolerantes, enquanto SEMIA 5039 e SEMIA 5074, as mais sensíveis aos herbicidas utilizados. A aplicação dos herbicidas metolachlor e imazaquin no solo, mesmo em uma dose cinco vezes superior à recomendada, não afetou a densidade populacional das estirpes recomendadas SEMIA 587 e SEMIA 5079 previamente estabelecidas.

Palavras-chave: *Rhizobium*; bactéria, herbicida.

TOLERANCE OF *Bradyrhizobium* sp. STRAINS TO DIFFERENT HERBICIDES

ABSTRACT - The use of herbicides may affect soil microorganisms as a whole and, more specifically, bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium*, responsible for nitrogen fixation in soybean. Due to their genetic variability, *Bradyrhizobium* strains could show different degrees of sensibility to herbicides used in soybean crops. In order to examine the sensibility of different *Bradyrhizobium* strains to herbicides, two assays were conducted under laboratory conditions. In the first assay, the tolerance of 15 *Bradyrhizobium* strains to glyphosate and atrazine was tested by the gradient plate technique. On other assay, the *Bradyrhizobium* strains tolerance to extreme concentration of herbicide was examined by adding increasing herbicide dosages to YMA media. The effect of the herbicides metolachlor and imazaquin on established soil populations of *Bradyrhizobium* strains was assessed on a third assay, conducted in greenhouse. The results obtained varied, depending on the methodology used, being the gradient plate technique more limited than the method of addition of increasing dosages to YMA media. Among the analyzed strains, SEMIA 586, SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5061 were more tolerant, while SEMIA 5039 and SEMIA 5074 were more sensitive. The use of metolachlor and imazaquin in soil, even in rates 5 times the recommended field use rates, had no effect on the density of previously established populations of recommended *Bradyrhizobium* strains SEMIA 587 e SEMIA 5079.

Key words: *Rhizobium*; bacterium, herbicide.

¹Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo segundo autor à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

²Eng. Agr., MSc., Departamento de Solos, UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 90001-970, Porto Alegre-RS

³Eng. Agr., MSc., FEPAM, Rua Carlos Chagas, 55 - 5º andar, 90030-020, Porto Alegre, RS

⁴Eng. Agr., Dr., FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 90130-060, Porto Alegre - RS

Recebido para publicação em 14-11-2002

INTRODUÇÃO:

A aplicação de herbicidas é uma prática usual na cultura da soja, principalmente no sistema de plantio direto. A aplicação de tais produtos, mesmo nas doses recomendadas, traz, entre outros riscos, a possibilidade de afetar outros organismos que não a população alvo (ECHEVERRIGARAY et al., 1999).

Os microrganismos do solo estão entre as populações que podem ser afetadas indevidamente pelo uso de herbicidas, comprometendo processos biológicos importantes. Grupos de microrganismos benéficos, como as microrrizas e os rizóbios, podem ser prejudicados (ABD-ALLA et al., 2000), sendo esses últimos fundamentais para a cultura da soja, que depende do processo de fixação biológica do nitrogênio. Os prejuízos da aplicação de herbicidas sobre o processo de fixação do nitrogênio podem ser decorrentes de efeitos sobre a leguminosa, sobre o rizóbio ou sobre a simbiose rizóbio-leguminosa (ARRUDA et al., 2001).

A avaliação da ação direta do herbicida sobre o rizóbio é, muitas vezes, dificultada pela associação do microssimbionte com a planta hospedeira. Para contornar esse obstáculo, têm sido realizados estudos com culturas puras, cultivadas em meio de cultura contendo o herbicida (KAPUSTA e ROUWENSHORST, 1973; SINGH e WRIGHT, 2002). A composição do meio, no entanto, influencia a sensibilidade do rizóbio aos herbicidas. Em meio sólido, a sensibilidade é atenuada, em comparação ao meio líquido, possibilitando o desenvolvimento da estirpe em concentrações mais elevadas de herbicida (ROSLYCKY, 1985). A maior sensibilidade das estirpes em meio líquido parece ser devida à maior solubilidade e difusão do produto no meio, levando a um maior contato com a bactéria. Independentemente do meio de cultura utilizado, os testes *in vitro* não reproduzem as condições de campo, uma vez que eliminam as interações entre os organismos, o solo e os herbicidas. Em função disso, como alternativa ou complemento aos ensaios em laboratório, pode-se analisar a população de rizóbios em solo

tratado com herbicida, através de contagens em meio seletivo (MOORMAN, 1986) ou da determinação do número mais provável por infecção em plantas (KAPUSTA e ROUWENSHORST, 1973).

O presente trabalho teve como objetivo testar a sensibilidade de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* a herbicidas por meio de experimentos *in vitro*, realizados em laboratório, ou com amostras de solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. a herbicidas, foram realizados dois estudos em laboratório. Em ambos, foram testadas as estirpes SEMIA 527, SEMIA 566, SEMIA 586 (= CB 1809), SEMIA 587, SEMIA 5019 (= 29 W), SEMIA 5020 (= J 5030), SEMIA 5025 (= TAL 411, THA 3), SEMIA 5039, SEMIA 5061 (= INPA 037), SEMIA 5069 (= 8 W), SEMIA 5070 (= 74 K), SEMIA 5072 (= NC 1005), SEMIA 5073 (= NC 1005 ERY/SPC/A-1), SEMIA 5074 (= USDA 123 ERY/SPC/A-1) e SEMIA 5079 (= CPAC 15, DF 24), pertencentes à Coleção de Culturas de Rizóbio SEMIA da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/Microbial Resources Centres. O efeito dos produtos sobre a sobrevivência do rizóbio no solo foi avaliado em um terceiro estudo, realizado em casa de vegetação.

Estudo 1 - Tolerância de *Bradyrhizobium* sp. a herbicidas: foi avaliada *in vitro* pelo método da placa inclinada (SZYBALSKI, 1952). As placas de Petri foram inclinadas e, posteriormente, receberam 20 mL de meio LMA (SOMASEGARAM e HOBEN, 1985). Após a solidificação dessa camada de meio de cultura, a placa foi disposta horizontalmente, recebendo, a seguir, 20 mL de meio LMA contendo o herbicida a ser estudado. O processo de difusão do produto para a camada inferior possibilitou a formação de um gradiente de concentração na placa. Nesse estudo, foram utilizados os herbicidas atrazina e glifosato,

adicionados ao meio LMA na concentração de 1 000 µL/L.

Em cada placa, foram inoculadas cinco estirpes. A inoculação foi feita, com o auxílio de alça de platina, no sentido da menor para a maior concentração. As placas foram incubadas por oito dias a 28 °C, realizando-se a avaliação visual após esse período. Foram consideradas resistentes as estirpes que cresceram até o extremo da placa com maior concentração, moderadamente resistentes as que cresceram até a metade da placa e sensíveis as que apresentaram crescimento apenas no setor com menor concentração de herbicida.

Estudo 2 – Tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium* a concentrações extremas de herbicidas: as 15 estirpes de *Bradyrhizobium* foram testadas quanto à sua tolerância a concentrações extremas de herbicidas. Nesse estudo foram utilizados os herbicidas trifluralina (44,5 % de ingrediente ativo), glifosato (48 % i. a.), imazaquin (15 % i. a.), atrazina (50 % i. a.), alaclor (48 % i. a.), metolacoloro (72 % i. a.), metribuzin (48 % i. a.) e linuron (50 % i. a.), todos em suas formulações comerciais. Os tratamentos consistiram na adição de cada herbicida, em doses crescentes, a placas de Petri contendo meio LMA sólido. Aplicaram-se as doses de 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000 e 3 000 µL/L, com duas repetições por tratamento. Após um período de oito dias de incubação a 28 °C, verificou-se o crescimento ou não do rizóbio na placa.

Estudo 3 - Efeito de herbicidas sobre as populações de *Bradyrhizobium* sp. do solo: o efeito da aplicação de herbicidas sobre populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* foi avaliado pelo método de diluição e infecção em plantas e estimativa do número mais provável (NMP) (SOMASEGARAM e HOBEN, 1985).

Foram avaliadas as populações de rizóbio das estirpes recomendadas SEMIA 587 (*B. elkanii*) e SEMIA 5079 (*B. japonicum*), estabelecidas no solo de vasos que haviam sido utilizados em um experimento anterior para o cultivo de soja. As estirpes haviam sido inoculadas, em vasos distintos, a

um Argissolo Vermelho-Amarelo, originalmente isento de rizóbios capazes de nodular soja. Os tratamentos usados consistiram da aplicação do herbicida imazaquin ou do metolacoloro, nas doses recomendada (1x) e cinco vezes maior (5x), aos vasos com população estabelecida de cada uma das estirpes. Como testemunha, utilizaram-se vasos sem a aplicação dos herbicidas. O experimento foi conduzido sob um delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições para cada tratamento.

As sementes de soja, utilizadas para avaliar a infecção em plantas, foram desinfestadas com álcool 90% por 2 minutos e bicloreto de mercúrio 0,1% (p/v) pelo mesmo tempo, sendo feitas seis lavagens posteriores com água destilada estéril. As sementes foram postas a germinar em papel *germitest* em estufa a 26 °C, até a obtenção de plântulas. Essas foram dispostas duas a duas em bolsas de polietileno contendo papel *germitest* e 150 mL de solução nutritiva sem nitrogênio (SPECHT et al., 1956). As bolsas foram ordenadas em estantes de madeira com suportes de arame.

A coleta das amostras de solo dos vasos para a realização das diluições ocorreu 15 dias após a aplicação dos herbicidas. Com o auxílio de uma espátula, retiraram-se, de cada vaso, 100 g de solo a 20 cm de profundidade. A partir dessas amostras, foram coletadas sub-amostras de 10 g, as quais foram diluídas em série decimal, com diluições entre 10^{-2} e 10^{-8} . Alíquotas de 1,0 mL de cada diluição foram inoculadas em cada bolsa, 5 dias após a colocação das plântulas. O teste do NMP foi realizado com quatro repetições por diluição.

Como controle, foram usadas bolsas com plântulas não inoculadas e outras inoculadas com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079. Após a primeira rega, a solução nutritiva foi utilizada com 50% de sua concentração.

As estantes foram colocadas em casa de vegetação e a avaliação efetuada após 45 dias, sendo verificada a presença ou ausência de nodulação.

A estimativa da população de *Bradyrhizobium* foi feita com o uso da tabela de Fisher e Yates (SOMASEGARAM e HOBEN, 1985) a partir do número de amostras positivas para a presença de nódulos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Estudo 1 - Tolerância de *Bradyrhizobium* sp. a herbicidas: a avaliação realizada pelo método da placa inclinada indicou uma grande variação na sensibilidade das 15 estirpes aos herbicidas (Tabela 1). Apenas a estirpe SEMIA 5069 cresceu até a maior concentração nos dois herbicidas. Por outro lado, as estirpes SEMIA 5020, SEMIA 5070, SEMIA 5072 e SEMIA 5074 cresceram apenas na região com menor concentração nos gradientes, tendo sido sensíveis aos dois herbicidas. Já as estirpes SEMIA 527 e SEMIA 5025 apresentaram resistência a atrazina e sensibilidade a glifosato, enquanto a estirpe SEMIA 5073 apresentou um comportamento inverso.

Resultados semelhantes foram obtidos por ROSLYCKY (1985), que observou diferenças na tolerância a doses de paraquat entre estirpes de *Bradyrhizobium*. A variabilidade na tolerância de rizóbios a compostos xenobióticos pode estar associada a características genéticas intrínsecas a cada estirpe (MALLIK e TESFAI, 1983) ou pode ser desenvolvida a partir da exposição a algum composto, induzindo a formação de mutantes resistentes (ROSLYCKY, 1985). A formação de mutantes que apresentam resistência múltipla a metais, antibióticos e compostos orgânicos está, geralmente, associada a plasmídeos (AHMAD et al., 2001).

A tolerância de algumas estirpes à atrazina também pode ser devida à decomposição da molécula por parte dos rizóbios. Algumas espécies de *Rhizobium* (BOUQUARD et al., 1997) e de *Agrobacterium* (STRUTHERS et al., 1998), gêneros próximos ao *Bradyrhizobium*, mostraram-se capazes de degradar a molécula de atrazina. Consi-

derando-se que os genes que codificam as enzimas responsáveis pelas diversas etapas da degradação de atrazina encontram-se distribuídos em diversos gêneros e espécies (BOUQUARD et al., 1997), é possível que haja ao menos algumas estirpes de *Bradyrhizobium* capazes de proceder a degradação do herbicida.

O herbicida glifosato, por sua vez, inibe a síntese de aminoácidos aromáticos, tendo, portanto, a sua ação revertida pela adição de tais aminoácidos ao

Tabela 1 . Avaliação da tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. aos herbicidas glifosato e atrazina pelo método da placa inclinada

Estirpes	Herbicidas	
	Glifosato	Atrazina
	-----1 000	μL/L -----
SEMIA 527	S 	R _____
SEMIA 566	S 	MR ... _____
SEMIA 586	MR ... _____	R _____
SEMIA 587	R _____	MR ... _____
SEMIA 5019	R _____	MR ... _____
SEMIA 5020	S 	S
SEMIA 5025	S 	R _____
SEMIA 5039	S 	MR ... _____
SEMIA 5061	R _____	MR ... _____
SEMIA 5069	R _____	R _____
SEMIA 5070	S 	S
SEMIA 5072	S 	S
SEMIA 5073	R _____	S
SEMIA 5074	S 	S
SEMIA 5079	MR ... _____	MR ... _____

R |_____| = Resistente: crescimento em todo o gradiente:

MR |... _____| = Moderadamente resistente: crescimento até a metade do gradiente:

S |.....| = Sensível: crescimento no início do gradiente.

meio (PLINE et al., 2001). O extrato de levedura, presente no meio LMA, poderia, em alguns casos, ter suprido os rizóbios com os aminoácidos necessários, revertendo a ação do glifosato (MOORMAN, 1986).

O método da placa inclinada, apesar de seu uso tradicional, mostrou-se problemático em vários aspectos de ordem prática. A formação de gradientes de concentração homogêneos entre as placas pode ser prejudicada por irregularidades no formato das placas, pela maneira como as camadas de meio de cultura são adicionadas ou pela taxa de difusão do herbicida no meio, o que pode interferir nos resultados obtidos. Além disso, a avaliação visual, com atribuição de classes, é subjetiva, pois considera, como indicativo de crescimento, o resultado da multiplicação celular somado com a produção de goma (TRANNIN et al., 2001). Outro inconveniente do método é o fato de não definir com exatidão a concentração tolerada pela estirpe.

Estudo 2 – Tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium* a concentrações extremas de herbicidas: a exemplo do verificado no estudo anterior, houve uma grande variabilidade entre as estirpes em relação à tolerância aos oito herbicidas. (Figura 1). A estirpe SEMIA 5074 mostrou-se bastante sensível aos herbicidas, tal como indicava o método da placa inclinada. Essa estirpe, juntamente com a SEMIA 5039, geralmente cresceu em doses mais baixas do que a maioria das estirpes.

Nesse segundo estudo, no entanto, não foi confirmada a tolerância das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5069 a doses elevadas do herbicida glifosato. Dentre essas, a estirpe SEMIA 587 foi a que apresentou maior tolerância, crescendo até a dose de 500 mL/L, metade da concentração máxima utilizada no estudo anterior. Apenas SEMIA 5061 e SEMIA 5073 confirmaram a tolerância ao herbicida, crescendo até as concentrações de 3 000 e 2 000 µL/L, respectivamente. Tais diferenças entre os dois métodos não foram tão evidentes para o herbicida atrazina. Isso

parece indicar que, no método da placa inclinada, há uma maior dificuldade na formação de gradientes de concentração do herbicida glifosato, possivelmente em função de suas características de difusão no meio. As estirpes SEMIA 5019, SEMIA 586, SEMIA 587 e SEMIA 5061 mostraram-se as mais tolerantes, sendo que as três últimas apresentaram crescimento em todos os herbicidas. A estirpe SEMIA 5019 não apresentou crescimento apenas no meio contendo glifosato.

Pode-se perceber que as estirpes recomendadas SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5079 apresentaram tolerância elevada a herbicidas comumente utilizados na cultura da soja, como trifluralina e imazaquin, tendo crescido pelo menos até a concentração 2 000 µL/L desses herbicidas. No entanto, quando expostas ao herbicida alaclor, o qual também é comumente utilizado na cultura da soja, as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentaram tolerância apenas até a dose de 200 µL/L, enquanto a SEMIA 5079 não apresentou crescimento mesmo na dose mais baixa. Esse resultado indica a necessidade de cautela no uso desse herbicida, embora a concentração tolerada pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 tenha sido mais elevada do que as que normalmente ocorrem no solo.

Dentre os herbicidas estudados, metolacoloro apresentou o maior grau de toxidez, seguido, na ordem, por alaclor, metribuzin, glifosato, atrazina, trifluralina e imazaquin. O efeito tóxico do metolacoloro impede a divisão celular e o crescimento dos microrganismos, em função de sua ação sobre a síntese protéica, a atividade enzimática e a eficiência respiratória (ECHEVERRIGARAY et al., 1999). No caso do metolacoloro, o bloqueio da síntese protéica não pode ser revertido pela adição de aminoácidos ou pela utilização do extrato de levedura, como ocorre com o glifosato, uma vez que o herbicida impede a absorção dos aminoácidos, e não a sua incorporação à proteína (ECHEVERRIGARAY et al., 1999).

A observação de que os herbicidas derivados de amidas e acetanilidas, metolacoloro e alaclor, foram

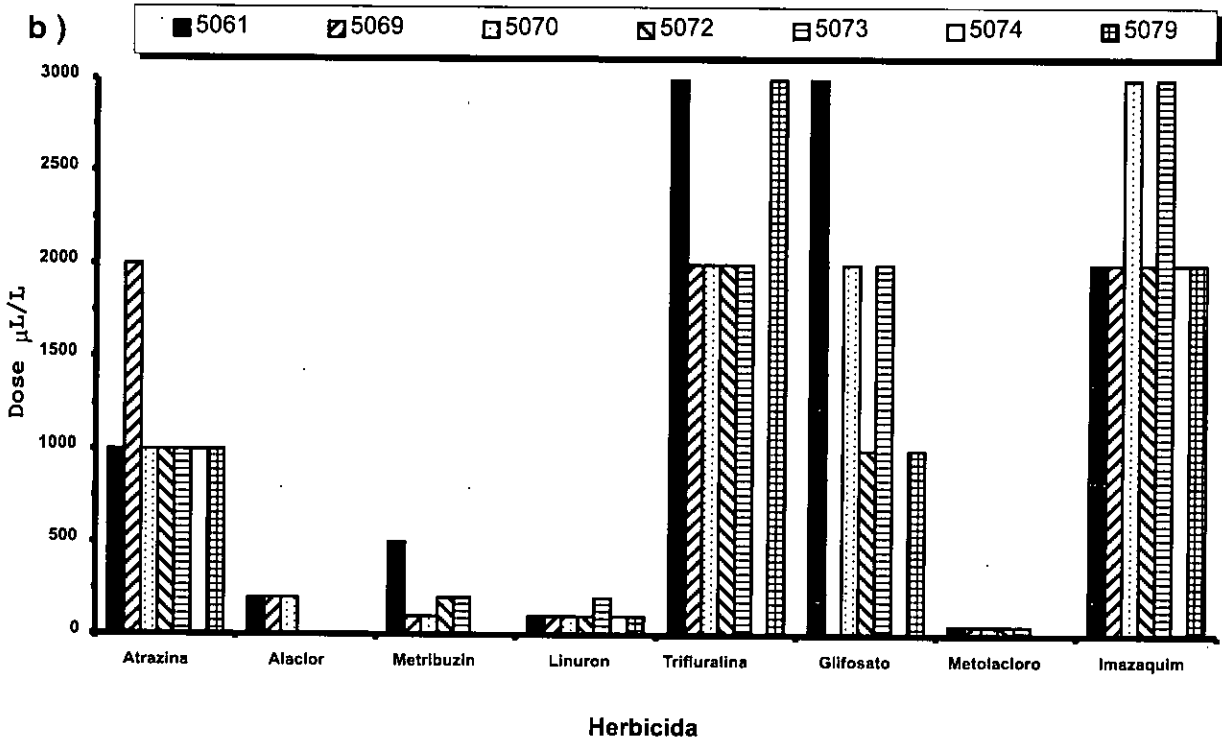
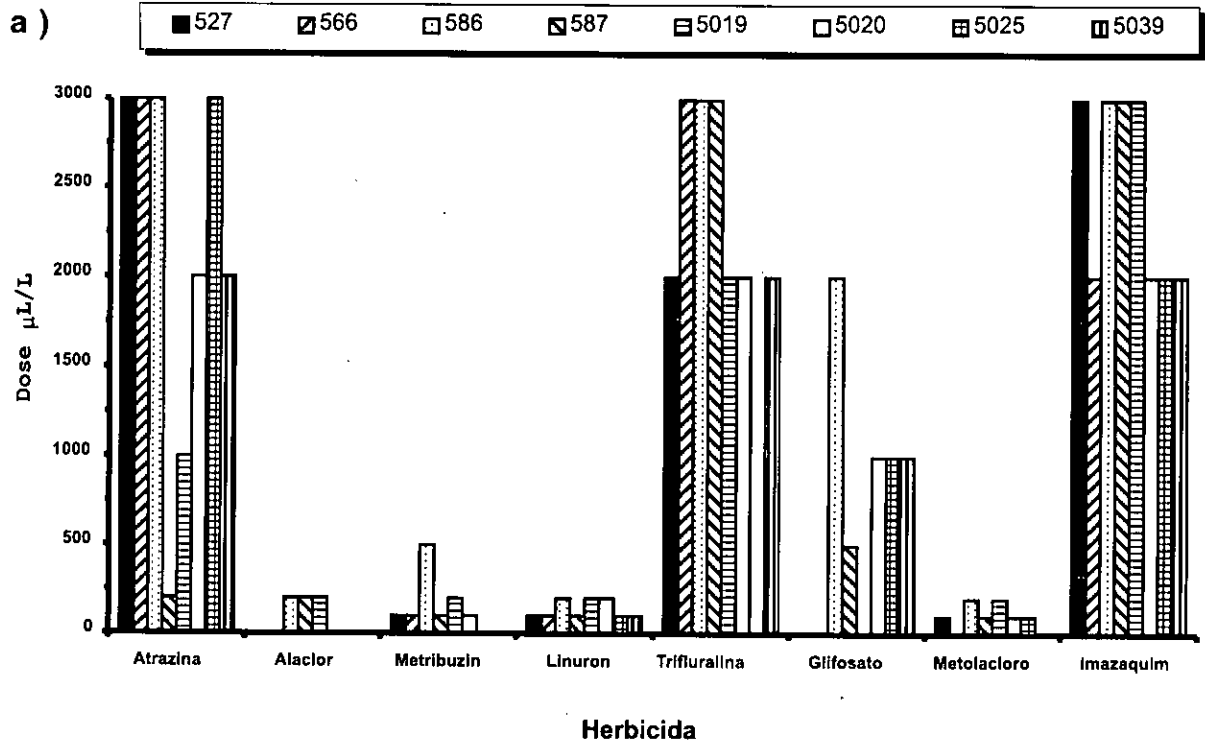


Figura 1 . Tolerância das estirpes de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 527, SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5020, SEMIA 5025, SEMIA 5039 (a), SEMIA 5061, SEMIA 5069, SEMIA 5070, SEMIA 5072, SEMIA 5073, SEMIA 5074 e SEMIA 5079 (b) a herbicidas em diferentes concentrações, avaliada por crescimento em meio de cultura levedura-manitol-ágãr

os mais tóxicos difere dos resultados obtidos por MALLIK e TESFAI (1983). Os autores encontraram maior efeito tóxico de trifluralina sobre *Bradyrhizobium japonicum*, em comparação com alaclor. Esses resultados divergentes podem ser devidos às estirpes diferentes utilizadas nos experimentos ou à metodologia empregada. Aqueles autores mediram o halo de inibição em meio sólido, método que pode ser influenciado pela solubilidade do herbicida, influenciando na concentração de herbicida que entra em contato com o rizóbio. O herbicida trifluralina, usado pelos autores, pode ter se difundido mais através do meio de cultura do que o alaclor, produzindo um halo de inibição maior, sem ser, contudo, mais tóxico.

Estudo 3 - efeito de herbicidas sobre as populações de *Bradyrhizobium* sp. do solo: Os resultados de contagem do número de células de *B. japonicum* das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079, em solo submetido à aplicação de herbicidas em diferentes doses, obtidos pelo método de infecção em plantas, podem ser observados na Tabela 2. Nenhuma das causas de variação estudadas apresentou efeito significativo, pelo teste F, ao nível de probabilidade de 5%.

A aplicação dos herbicidas, mesmo em uma dose cinco vezes superior à recomendada, não afetou significativamente a população das duas estirpes. Nem mesmo o herbicida metolacolor, que havia apresentado o maior grau de toxidez quando aplicado em doses crescentes em meio de cultura, mostrou efeito sobre as populações de rizóbios. Diversos autores obtiveram resultados semelhantes em experimentos de campo, nos quais não foram constatadas alterações nas populações de rizóbios no solo (KAPUSTA e ROUWENHORST, 1973; KOOPMAN et al. 1995; SINGH e WRIGHT, 2002). Por outro lado, MOORMAN (1986) encontrou redução significativa na população do rizóbio com a aplicação de Dinoseb em dose equivalente a dez vezes a recomendada, demonstrando que alguns princípios ativos de herbicidas apresentam efeito tóxico.

As diferenças observadas entre os experimentos em laboratório e os de campo tem sido atribuídas às

Tabela 2 . Populações de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. em solo com aplicação dos herbicidas metolacolor e imazaquin em duas doses. Médias de três repetições

Herbicidas	Doses L/ha	Estirpes	
		Semia 587	Semia 5079
		log ₁₀ n° células/g solo	
Testemunha	Zero	2,32	2,58
Imazaquin	1,0 (1x)	2,15	2,31
	5,0 (5x)	2,24	2,25
Metolacolor	3,0 (1x)	2,33	2,40
	15,0 (5x)	2,15	1,92

interações que ocorrem entre as moléculas dos herbicidas e o solo. No solo, ao contrário do ocorrido em experimentos *in vitro*, o herbicida está sujeito à dissipação por meio dos processos de fotodegradação, volatilização, lixiviação, adsorção, degradação química e degradação biológica (JAVARONI et al., 1999). Além disso, as doses aplicadas no solo, mesmo quando acima das recomendadas, são significativamente menores do que as concentrações capazes de inibir os rizóbios em meio de cultura (KAPUSTA e ROUWENHORST, 1973; SINGH e WRIGHT, 2002).

No presente experimento, a aplicação superficial do herbicida pode ter afetado mais intensamente a população de rizóbios próxima à superfície, possibilitando, em camadas subsuperficiais, uma sobrevivência de rizóbios suficiente para recompor a população em um nível capaz de garantir a nodulação. Além disso, os herbicidas sofrem processos de degradação físico-químicos logo após a aplicação ao solo, reduzindo a concentração do composto que entra em contato com o rizóbio. Processos como a degradação dos herbicidas por parte da microbiota do solo (KAPUSTA e ROUWENHORST, 1973) ou a fotodecomposição do herbicida Imazaquin, a partir da ação da luz ultra-violeta (BASFIAM e

LAVY, 1986), por exemplo, pode ter reduzido a concentração do produto, atenuando o efeito sobre o rizóbio.

CONCLUSÕES

A avaliação da tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. a herbicidas é influenciada pela metodologia empregada, sendo o método da placa inclinada mais limitado do que a adição de doses crescentes de herbicida em meio de cultura sólido.

Dentre as estirpes avaliadas, SEMIA 586, SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5061 são as mais tolerantes, enquanto SEMIA 5039 e SEMIA 5074 são as mais sensíveis aos herbicidas utilizados.

Os herbicidas metolaclo e imazaquin apresentam, respectivamente, o maior e o menor grau de toxidez para as estirpes de *Bradyrhizobium*. A aplicação desses dois herbicidas, mesmo em uma dose cinco vezes superior à recomendada, não afeta a densidade populacional das estirpes recomendadas SEMIA 587 e SEMIA 5079 previamente estabelecidas no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLA, M. H.; OMAR, S. A.; KARANXHA, S. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 191-200, 2000.
- AHMAD, I.; HAYAT, S.; AHMAD, A.; INAM, A.; SAMIULLAH Metal and antibiotic resistance traits in *Bradyrhizobium* sp. (cajanus) isolated from soil receiving oil refinery wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 17, n. 3, p. 379-384, 2001.
- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A. Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330, 2001.
- BASFIAM, G. W.; LAVY, T. L. Microbial and photolytic dissipation of microbial biomass. *Weed Science*, Champaign, v. 35, n. 3, p. 865-870, 1986.
- BOUQUARD, C.; OUZZANI, J.; PROMÉ, J.; MICHEL-BRIAND, Y.; PLÉSIAT, P. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 3, p. 862-866, 1997.
- ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Isolation and characteristics of metolachlor-resistant mutants of *Sacharomices cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 15, n. 5, p. 679-681, 1999.
- JAVARONI, R. C. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. *Química Nova*, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 58-64, 1999.
- KAPUSTA, G.; ROUWENSHORST, D. L. Interaction of selected pesticides and *Rhizobium japonicum* in pure culture and under field conditions. *Agronomy Journal*, Madison, v. 65, n. 1, p. 112-115, 1973.
- KOOPMAN, D. J.; TOW, P. G.; REEVES, T. G.; GIBSON, A. H. Soil acidification, chlorsulfuron application and *Rhizobium meliloti* as factors in Lucerne yield decline. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.27, n. 4/5, p. 673-677, 1995.
- MALLIK, M. B. A.; TESFAI, K. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with commercial pesticides in vitro. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v. 31, n. 2, p. 432-437, 1983.
- MOORMAN, T. B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. *Weed Science*, Champaign, v. 34, n. 4, p. 628-633, 1986.
- PLINE, W. A.; LACY, G. H.; STROMBERG, V.; HATZIOS, K. K. Antibacterial activity of the herbicide glufosinate on *Pseudomonas syringae* pathovar glycinea. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, San Diego, v. 71, n.1, p. 48, 55, 2001.
- ROSLYCKY, E. B. Sensitivity and adaptation of selected rhizobia and agrobacteria to paraquat. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v. 65, n. 4, p. 555-562, 1985.
- SINGH, G.; WRIGHT, D. In vitro studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. *Letters in Applied Microbiology*, London, v. 35, n. 1, p. 12-16, 2002.
- SOMASEGARAM, P.; HOBEN, M. J. *Methods in legume-Rhizobium technology*. Hawaii: NIFTAL, 1985. 367 p.
- SPECHT, A. W.; ERDMAN, L. W.; MEANS, V. M.; RESNICK, J. W. Effect of nutrition on *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v. 29, n. 4, p. 489-495, 1956.
- STRUTHERS, J. K.; JAYACHANDRAN, K.; MOORMAN, T. B. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, n. 9, p. 3368-3375, 1998.
- SZYBALSKI, W. Gradient plate technique for study of bacteria resistance. *Science*, New York, v. 116, p. 46-48, 1952.
- TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre *in vitro*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 305-316, 2001.