

**TOLERÂNCIA “*IN VITRO*” E
SOBREVIVÊNCIA NO SOLO DE ESPÉCIES
DE RIZÓBIO DE LEGUMINOSAS TROPICAIS
A METAIS PESADOS**

ALEXANDRE MATSUDA

2000

ALEXANDRE MATSUDA

**TOLERÂNCIA “*IN VITRO*” E SOBREVIVÊNCIA NO SOLO
DE ESPÉCIES DE RIZÓBIO DE LEGUMINOSAS
TROPICAIS A METAIS PESADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
área de concentração em Solos e Nutrição de
Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof.^a PhD. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Matsuda, Alexandre

Tolerância "In Vitro" e sobrevivência no solo de espécies de rizóbio de
leguminosas tropicais a metais pesados / Alexandre Matsuda. -- Lavras : UFLA,
2000. ✓

85 p. : il.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Zinco. 2. Cobre. 3. Cádmiu. 4. Poluição do solo. 5. *Rhizobium*. 6.
B Bradyrhizobium. 7. *Azorhizobium*. 8. *Mesorhizobium*. 9. *Sinorhizobium*. 10.
Leguminosa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.46

-633.3

ALEXANDRE MATSUDA

**TOLERÂNCIA “IN VITRO” E SOBREVIVÊNCIA NO SOLO
DE ESPÉCIES DE RIZÓBIO DE LEGUMINOSAS
TROPICAIS A METAIS PESADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

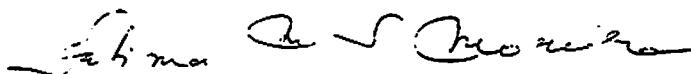
APROVADA em 16 de março de 2000

Prof. PhD. José Oswaldo Siqueira

UFLA

Dr. Avilio Antônio Franco

EMBRAPA/RJ



Prof.^a PhD. Fátima Maria de Souza Moreira

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

*Ao meu pai Otto, e à minha mãe Rosa,
pela educação, carinho e esforço
dedicado à minha formação.*

DEDICO.

*Aos meus irmãos, Sérgio Henrique,
Fabiana, Juliana e Ana Cláudia,
pelo incentivo e carinho.*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre orientou meus passos;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e à Coordenaria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, ao Departamento de Ciência do Solo (DCS/UFLA) pela oportunidade de realização do curso e à Companhia Mineira de Metais (CMM) – Três Marias-MG, pelo apoio financeiro;

Aos professores Fátima M. S. Moreira e José Oswaldo Siqueira, pela orientação e ensinamentos;

Às minhas sobrinhas Priscila e Vanessa, e ao meu cunhado Paulo, pelo apoio e carinho;

À minha namorada, Telma, pelo carinho, dedicação, convívio e apoio nos momentos difíceis;

Aos laboratoristas Marlene e Manoel, à funcionária Adriana Soares, e à ex-funcionária Cláudia Ribas, pelas ajudas e amizade;

À colega e amiga Isabel Trannin pela liberação de materiais, ajuda, sugestões, e principalmente amizade e companheirismo;

Aos colegas e amigos Marcos, Rogério, Eliane, Yanê, Cláudio, Wágner, Marco Aurélio, Divino, Diércules, Enrique, Paulo Henrique, entre tantos, pelo convívio, sugestões e palavras amigas;

Aos bolsistas de iniciação científica, Rafaela, Adão, Anderson e Adriana Lima, pelas ajudas e companheirismo;

A todo o corpo docente, discente e funcionários do Departamento de Ciência do Solo que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Sinceramente, muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral	1
2 Referencial Teórico	3
2.1 Metais pesados no solo	3
2.2 Revegetação de solos degradados por excesso de metais pesados	6
2.3 Tolerância de rizóbio e FBN a metais pesados	9
3 Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 2: Tolerância " <i>in vitro</i> " de rizóbio de diferentes procedências a zinco, cobre e cádmio.....	28
Resumo	28
Abstract	30
1 Introdução	31
2 Material e métodos	33
3 Resultados e discussão	39
4 Conclusões	56
5 Referências bibliográficas	57
CAPÍTULO 3: Sobrevivência de <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azorhizobium</i> em solo contaminado com metais pesados	60
Resumo	60
Abstract	61
1 Introdução	62
2 Material e métodos	63
3 Resultados e discussão	67
4 Conclusões	76
CONCLUSÕES GERAIS	77
5 Referências bibliográficas	78
ANEXOS.....	81

RESUMO

MATSUDA, Alexandre. Tolerância “*in vitro*” e sobrevivência no solo de espécies de rizóbio de leguminosas tropicais a metais pesados. Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)

A poluição com resíduos industriais contendo metais pesados tem gerado graves problemas ambientais. As leguminosas capazes de formar simbiose eficiente com rizóbio são espécies promissoras em programas de revegetação de solos degradados, incluindo os contaminados com metais pesados. O desenvolvimento de trabalhos que visem essa revegetação com leguminosas requer uma gama de estudos que envolvem diversos fatores, entre eles a obtenção de rizóbio tolerante a concentrações tóxicas de metais pesados. Dois experimentos foram conduzidos no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (MG), com o objetivo de avaliar a tolerância a metais pesados “*in vitro*” de estirpes e isolados, de nódulos de leguminosas, pertencentes a diferentes gêneros. No primeiro experimento, 60 estirpes e/ou isolados, simbiontes de hospedeiros das três subfamílias e oriundos de diversos locais, foram testados em meio YMA suplementado com diferentes concentrações de Zn (0 a 1000 mg L⁻¹), Cu e Cd (0 a 60 mg L⁻¹). O comportamento de rizóbio nas diferentes concentrações de metais foi avaliado atribuindo-se valores aos diferentes padrões de crescimento (0 a 5). Foram determinadas as concentrações máximas toleradas aos metais Zn, Cu e Cd, e estimadas as doses (concentrações) tóxicas destes metais que reduzem o padrão de crescimento em 25% e 50%. Foi verificado que: não houve influência da origem (subfamílias e locais) na concentração máxima tolerada de cada metal; a ordem de sensibilidade aos metais, considerando-se as concentrações máximas toleradas, foi *Azorhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*; a DT₂₅ e a DT₅₀ foram úteis para diferenciarem algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd; e a ordem de toxicidade foi Cu>Cd>Zn. No segundo experimento, dois dos três microrganismos mais tolerantes [BR-4406 (estirpe recomendada para inoculação de *Enterolobium*) e UFLA-01-457 (isolado de solo contaminado), ambos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*] e os dois mais sensíveis (UFLA-01-486 e UFLA-01-510, isolados de solo contaminado, pertencentes ao gênero *Azorhizobium*), selecionados do

* Comitê Orientador: Fátima M. de Souza Moreira - UFLA (Orientadora), José Oswaldo Siqueira - UFLA (Co-Orientador).

experimento anterior, foram analisados quanto à capacidade de sobrevivência saprofítica em misturas de solos autoclavadas, contendo diferentes proporções [0, 15 e 45% (v/v)] de solo contaminado (PSC) com Zn, Cd, Pb e Cu (18600, 135, 600 e 596 mg dm⁻³ extraídos por *aqua regia*, respectivamente) diluído em latossolo vermelho escuro (LE) de baixa fertilidade. Cada PSC foi inoculada com 20 mL de cultura em YEM (*Bradyrhizobium*: 1,2x10¹⁰ cel mL⁻¹; *Azorhizobium*: 10⁹ cel mL⁻¹) das estirpes mencionadas, testadas separadamente com três repetições. A avaliação do número de células viáveis foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) a 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação, pelo método das diluições sucessivas e inoculação em placas com meio YMA. A sobrevivência de *Azorhizobium* foi mais afetada por metais pesados no solo do que a de *Bradyrhizobium*. Houve relação entre tolerância “*in situ*” e tolerância “*in vitro*”. A porcentagem de células de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* que sobreviveram ao final de 28 dias de incubação, em 0%, 15% e 45% de PSC, respectivamente, foi: BR-4406: 95,8%, 83,3% e 20,4%, UFLA-01-457: 95,8%, 79,6% e 21,9%, UFLA-01-486: 164,4%, 1,7% e 0% e UFLA-01-510: 99%, 2,2% e 0%.

ABSTRACT

MATSUDA, Alexandre. **In vitro tolerance and in soil survival of species of rhizobia from tropical legumes to heavy metals.** Lavras: UFLA, 2000. 85p (Dissertation - Master in Agronomy)*

The pollution with industry residues containing heavy metals has generated serious environmental problems. The legumes capable of forming efficient symbiosis with rhizobia are important species in revegetation plans of degraded soils, including the ones contaminated with heavy metals. The development of studies aiming this revegetation with legumes requires a series of works which involve several factors, among them the obtaining of rhizobia which tolerates toxic concentrations of heavy metals. Two experiments were conducted at Soil Science Department, Federal University of Lavras (MG), with the objective of evaluating the *in vitro* tolerance of strains and isolates of legumes nodules, pertaining to different genera, to heavy metals. In the first experiment, 60 strains and, or, isolates from hosts of three subfamilies and from diverse places were tested in YMA medium supplement with different Zn (0 to 1000 mg L⁻¹), Cu and Cd (0 to 60 mg L⁻¹) concentrations. The rhizobia behavior at the different metal concentrations was evaluated through values attributed to patterns (0 to 5). The tolerated maximum concentrations to Zn, Cu, and Cd metals were determined, and the toxic doses (concentrations) of these metals which reduce the growth standard in 25% and 50% were estimated. It was verified that there was no influence of the origin (host and local) at the tolerated maximum concentration of each metal; the order of sensitivity to heavy metals, considering the tolerated maximum concentrations, was *Azorhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*; the DT₂₅ and the DT₅₀ were useful to differentiate same strain/isolates of the same genus, which reached the same tolerated maximum concentration to Zn, Cu, and Cu; and the order of toxicity was Cu>Cd>Zn. In the second experiment, two out of the three most tolerant microorganisms [BR-4406 (strain recommended as inoculant of *Enterolobium*) and UFLA-01-457 (isolated from contaminated soil), both belonging to the genus *Bradyrhizobium*] and the two most sensitive microorganisms (UFLA-01-486 and UFLA-01-510, both isolated from contaminated soil and belonging to the genus *Azorhizobium*), selected from the previous experiment, were analysed with respect to the saprophytic survival in mixtures of pre-prepared soils,

* Guidance Committee: Fátima M. de Souza Moreira - UFLA (Major Professor), José Oswaldo Siqueira - UFLA.

containing different proportions [0, 15 and 45% (v/v)] of contaminated soil (PCS) with Zn, Cd, Pb and Cu (18600, 135, 600, and 596 mg dm⁻³ extracted by "aqua regia" diluted in a low natural fertility Latosol (Oxisol). Each PCS was inoculated with 20 mL of culture in YM (*Bradyrhizobium*: 1.2x10¹⁰ cel mL⁻¹; *Azorhizobium*: 10⁹ cel mL⁻¹) of the above strains, tested separately with 3 replications. Evaluation of viable cell numbers in the different PCS was done by counting colony forming units (CFU) at 0, 7, 14, 21, and 28 days of incubation by the method of successive dilutions inoculated in YMA medium. The survival of *Azorhizobium* was more affected by heavy metals in soil than *Bradyrhizobium*. There was relationship between in situ and in vitro tolerance. The percentage of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* cells which survive to the end of 28 days of incubation, in 0%, 15%, and 45% of PCS, was respectively: BR-4406: 95.8%, 83.3% and 20.4%, UFLA-01-457: 95.8%, 79.6% and 21.9%, UFLA-01-486: 164.4%, 1.7% and 0% and UFLA-01-510: 99%, 2.2% and 0%.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O aumento crescente da demanda de minerais e metais pela sociedade moderna tem feito com que haja uma expansão das áreas de descarte de resíduos provenientes da exploração e industrialização de minérios, ricos em elementos tóxicos, chamados de metais pesados. Paralelamente, tem aumentado a preocupação com a questão ambiental em relação às áreas em que estes resíduos têm sido descartados e às suas circunvizinhanças. Os problemas de degradação ambiental, observados há muito tempo em países desenvolvidos industrialmente, finalmente despertam a consciência global. No Brasil, a preocupação com o meio ambiente tem recebido, recentemente, atenção muito especial. Atualmente, a legislação ambiental brasileira exige que áreas degradadas pela atividade de extração e industrialização de minérios sejam recuperadas. A recuperação destas áreas visa restaurar a biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas, de modo a preservá-los para as gerações futuras.

A revegetação é uma das técnicas de recuperação de solos degradados por excesso de metais pesados, e as leguminosas possuem um grande potencial para esta finalidade por serem geralmente de crescimento rápido, possuírem sistema radicular agressivo que auxilia na melhoria dos aspectos físicos do solo, permitirem rápida formação de serapilheira pela queda de folhas, repondo a matéria orgânica e beneficiando, assim, o restabelecimento da biota do solo. Além disso, muitas destas realizam simbiose eficiente com rizóbio, na qual a fixação biológica de nitrogênio representa importante via de adição de nitrogênio ao solo, diminuindo a necessidade deste insumo.

A busca por microsimbiontes tolerantes a metais pesados e que beneficiem o desenvolvimento de plantas, permitindo o seu uso em projetos de revegetação de áreas degradadas pelo acúmulo destes elementos, pode tornar possível o reflorestamento destas áreas. Em regiões de clima temperado, onde o problema já foi detectado, existem resultados de pesquisa que indicam a existência de estirpes de rizóbio tolerantes a estes elementos. Para áreas de clima tropical, ainda não existem, nesta linha, resultados concretos de pesquisa, apesar do problema da contaminação ambiental por metais pesados já estar presente. Este fato mostra a necessidade de estudos voltados às contaminações por atividades industriais nos trópicos, onde existe ampla diversidade de simbioses rizóbio-leguminosas, favorecendo a seleção de genótipos promissores para os programas de reabilitação destes solos.

Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar a tolerância a cobre, cádmio e zinco em meio YMA modificado, de rizóbio (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*) de diferentes procedências de hospedeiros (subfamílias das leguminosas: Papilionoideae, Mimosoideae e Cesalpinoideae) e locais (Mata Atlântica, Amazônia e experimentos com metais pesados); 2) avaliar a sobrevivência de dois microrganismos mais tolerantes e dois mais sensíveis selecionados no meio YMA modificado, em solo contaminado com metais pesados; 3) verificar se a tolerância em meio de cultura se relaciona à sobrevivência do rizóbio em solo contaminado com metais pesados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados no solo

A definição de “metal pesado” tem gerado uma certa divergência e até confusão entre estudiosos. Alguns autores classificam como metais pesados elementos de massa atômica superior à do ferro e que possuem a propriedade de acumular no organismo humano (Coker e Matthews, 1983). Jardim (1983) considera o termo metal pesado incorreto, pois não caracteriza um número definido para os metais da tabela periódica, podendo, assim, gerar dúvidas quanto ao seu emprego. No entanto, o termo metais pesados é amplamente utilizado na literatura científica para designar metais que apresentam uma densidade relativa maior que 5 g cm^{-3} (Jones e Javis, 1981, citados por Cotrim, 1994). Na natureza, estes são 38 elementos, mas comumente faz-se referência a As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn e Zn, que são encontrados com maior frequência e concentração nos materiais residuais de várias atividades antrópicas e que são suscetíveis de reciclagem na agricultura e nos ecossistemas naturais.

De qualquer forma, metal pesado não quer dizer necessariamente “metal tóxico”. Muitos deles, como Fe, Cu, Mn, Zn e Mo, são, desde há muito, conhecidos como essenciais às plantas, mas são requeridos em pequenas quantidades, sendo, portanto, chamados de micronutrientes, e outros, como Ni e Co, são benéficos para plantas e microrganismos (McBride, 1994); já o Cd, Hg e Pb não têm funções biológicas e/ou fisiológicas conhecidas (Alloway, 1993). Por outro lado, um fornecimento excessivo desses elementos, mesmo dos essenciais, pode causar toxidez à fauna e à flora (Babich e Stotzky, 1980, 1982; Babich, Schiffenbauer e Stotzky, 1982; Kabata-Pendias e Pendias, 1985).

A contaminação dos solos por metais pesados acarreta sérias consequências sobre os componentes funcionais dos ecossistemas, interferindo nos seres produtores (plantas), consumidores (homens e animais) e redutores (microrganismos). A ação destes metais (considerados como tóxicos), ao serem absorvidos do meio ambiente por plantas e microrganismos, mesmo em baixas concentrações, causa estresse, proporcionando mudanças fisiológicas, reduzindo o vigor e, em casos extremos, inibindo totalmente o crescimento, conduzindo-os à morte (Baker, 1987).

Para Tavares e Carvalho (1992), as principais fontes de contaminação de metais pesados no ambiente são o uso indiscriminado de fertilizantes, tanto orgânicos quanto minerais, pesticidas, água de irrigação contaminada, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, incineração de resíduos urbanos e industriais e, principalmente, mineração, fundição e refinamento.

As concentrações normais de metais pesados no solo estão na faixa de partes por milhão (ppm) ou partes por bilhão (ppb), e a natureza se encarrega de oferecer as quantidades necessárias para a manutenção do ciclo vital. Aqueles que não exercem nenhuma função conhecida no ciclo biológico têm suas concentrações na faixa de partes por bilhão ou (ppt) partes por trilhão (Tavares e Carvalho, 1992).

Segundo Amaral Sobrinho et al. (1992), no solo, os metais pesados podem estar: adsorvidos eletrostaticamente nos sítios de troca, na solução, incorporados na superfície da fase inorgânica, participando de reações de precipitação e dissolução, e ligados a compostos orgânicos. As duas primeiras formas são consideradas biodisponíveis, e as outras três, não-disponíveis, a não ser que ocorram mudanças no ambiente, como pH, potencial redox, etc. O pH é o fator mais importante para a disponibilidade de metais na água e nos solos, já que este interfere diretamente nas reações de solubilização (Verloo, Kiekens e Conttenie, 1980). Em solos ácidos, alguns metais são mais móveis, e

consequentemente, mais disponíveis para absorção das plantas (Mulchi et al., 1987); já nos solos com alto conteúdo de matéria orgânica e argila, os metais são menos móveis, e portanto, menos disponíveis (Cottenie, Kiekens, e Van Landschoot, 1983; Koskela, 1985).

A utilização de parâmetros microbiológicos tem sido extremamente útil no monitoramento da poluição dos solos por metais pesados (Brookes, 1995). Um teste de elevada importância ecológica é o índice de sensibilidade/tolerância a metais pesados da comunidade microbiana do solo (Doelman et al., 1994). Segundo esses autores, tolerância é a habilidade dos microrganismos sobreviverem, mas somente apresentarem crescimento normal e atividade máxima na ausência de concentrações elevadas dos metais; sensibilidade é a inibição da sobrevivência e atividade dos microrganismos em concentrações de metais extremamente baixas; e resistência relaciona-se à capacidade dos microrganismos de crescer e manter a habilidade de realizar seus processos na presença de altas concentrações de metais pesados. Chander e Brookes (1991) constataram que a relação C-biomassa/C-orgânico é um indicador sensível dos efeitos dos metais pesados na biomassa microbiana do solo.

A ocorrência de espécies de plantas e microrganismos tolerantes a altos níveis de contaminação por elementos tóxicos tem levado alguns pesquisadores a trabalharem com seleção de espécies cultivadas e microsimbiontes (Kabata-Pendias e Pendias, 1985; Duxbury e Bicknell, 1983).

A maioria dos trabalhos relata dados sobre o gênero *Rhizobium* em áreas temperadas, e a contaminação geralmente é atribuída à adição ao solo de lodo de esgoto urbano contendo metais pesados. No entanto, a contaminação de solo com resíduos inorgânicos, como os rejeitos das indústrias metalúrgicas contendo elevadas concentrações de metais, necessita ser pesquisada em relação a rizóbio e fixação biológica de nitrogênio. Portanto, tornam-se necessários estudos voltados às contaminações por atividades industriais nos trópicos, onde existe

ampla diversidade de simbioses rizóbio-leguminosas, favorecendo a seleção de genótipos promissores para os programas de reabilitação destes solos.

2.2 Revegetação de solos degradados por excesso de metais pesados

Solo degradado é aquele que possui a sua qualidade ou capacidade produtiva diminuída pelo uso incorreto, que resulta em mudanças na fertilidade, no teor de matéria orgânica, nos atributos físicos e estruturais ou na concentração de materiais ou produtos tóxicos no solo. A degradação pode ser de natureza química (diminuição de nutrientes e acúmulo de produtos tóxicos), física (compactação e erosão) e biológica (diminuição da atividade e diversidade da biota do solo), que resulta principalmente de ações antrópicas como o desmatamento, monocultura intensiva, uso indiscriminado de produtos químicos, mineração e construção civil (Lal e Stewart, 1989). Segundo as estimativas do GLASOD (Global assessment of soil degradation) (World Resources, citado por Siqueira et al., 1994), existem quase 4 bilhões de ha de terras degradadas em todo mundo, sendo 1,2 bilhão degradado por ações antrópicas, desde a última guerra mundial.

Na recuperação ou descontaminação de solos contaminados com metais pesados, o método de revegetação apresenta vantagens devido à sua natureza permanente, combinada aos baixos custos de manutenção, à proteção contra erosão eólica e hídrica, à maior estruturação do solo, ao aumento da fertilidade do solo e à melhoria da estética da área. Segundo Perry e Amaranthus (1990), citados por Carneiro (1997), garantir o restabelecimento da vegetação de cobertura é a primeira etapa do processo de estabilização física e reabilitação biológica do sistema. O estabelecimento de plantas protege o solo do impacto e ação erosiva da chuva, restabelece os processos de troca entre o solo e a atmosfera e facilita a atividade biológica, que melhora a nutrição e aumenta a

tolerância das plantas a estresses diversos (Siqueira et al., 1994). Na rizosfera, região de influência das raízes, em que a atividade química, física, e principalmente biológica torna-se muito maior, ocorre a liberação de compostos orgânicos, como exsudatos e secreções, para o solo adjacente, tornando este sítio muito especializado e favorecendo a população microbiana (Rovira e Davey, 1974; Siqueira e Franco, 1988). Os efeitos benéficos da presença de vegetação sobre a microbiota do solo foram verificados num trabalho na Região Sul do Brasil, no qual foram estudados diferentes tipos de manejo do solo sobre a população microbiana. Pelos resultados, houve um decréscimo de 65% na biomassa quando retirou-se a vegetação de um campo nativo, apresentando os menores valores de biomassa e atividade microbiana quando comparados aos diferentes sistemas de cultivos, consorciados ou não, além do campo nativo (Cattelan e Vidor, 1990a). A população de solubilizadores de fosfato, actinomicetos, fungos, e principalmente de bactérias, foi afetada pela retirada da cobertura vegetal neste ecossistema (Cattelan e Vidor, 1990b), corroborando a importância da presença de cobertura vegetal favorecendo a população microbiana e seus processos biológicos. Dias-Júnior et al. (1998) observaram influência positiva da vegetação sobre a biomassa microbiana em um solo contaminado por metais pesados.

O aumento da consciência ecológica nos últimos anos tem levado empresas a investirem na pesquisa de métodos mais eficientes de revegetação de áreas degradadas. Desta maneira, pesquisas têm sido realizadas sobre as mais diferentes formas de degradação da natureza, e novas técnicas e espécies têm sido descobertas e aplicadas com sucesso em revegetação. A revegetação pode ser conseguida pelo crescimento de espécies remanescentes na área ou através do plantio de espécies nativas ou exóticas. Muitas espécies de plantas são conhecidas por terem desenvolvido tolerância a metais em resposta a solos metalíferos (Antonovics, Bradshaw e Turner, 1971), depois de serem

introduzidas na área. Outras espécies menos tolerantes ou sensíveis têm seu crescimento bastante afetado, impossibilitando sua sobrevivência em áreas contaminadas. Além do efeito visual e proteção de solo, a vegetação pode ser uma alternativa de remediação de áreas contaminadas. Tal processo é conhecido por fitorremediação, pois é uma maneira viável de remover elementos tóxicos do solo (Baker, 1994).

Franco, Campello e Faria (1994) enfatizam que na escolha das espécies em projetos de revegetação de áreas degradadas deve-se considerar a reposição de nitrogênio e carbono ao solo, bem como aumentar a disponibilidade dos demais nutrientes, já que a baixa fertilidade é um dos principais obstáculos na revegetação de solos em áreas degradadas. Diversos trabalhos têm demonstrado que o rápido crescimento das leguminosas e a sua elevada produção de biomassa proporcionam sombreamento e maior acúmulo de C e nutrientes no solo, principalmente o nitrogênio, devido à fixação de nitrogênio atmosférico, que favorece a germinação de espécies secundárias mais exigentes quanto à fertilidade do substrato (Campello, 1996). Em estudo realizado numa área em que rejeitos industriais foram depositados, foi verificado que somente leguminosas em simbiose com rizóbio foram capazes de sobreviver inicialmente sem adições de fertilizantes nitrogenados (Dancer, Handley e Bradshaw, 1977). Nos últimos quinze anos, levantamentos extensivos têm sido conduzidos em várias regiões do Brasil com o objetivo de identificar leguminosas arbóreas capazes de nodular (Magalhães et al., 1982; Faria et al., 1984, 1987, 1989; Moreira, Silva e Faria, 1992; Moreira et al., 1993), e selecionar estirpes de rizóbio eficientes para as espécies mais promissoras (Franco e Silva, 1985; Faria, 1994). Estes trabalhos mostraram uma enorme fonte de biodiversidade, que representa um genoma importante para projetos de seleção a diversos fatores. Portanto, as leguminosas fixadoras de nitrogênio são espécies com potencial de utilização nos programas de reflorestamento por fixarem o N_2

atmosférico através da simbiose com rizóbio, dispensando a adubação nitrogenada, o que possibilita sua adaptação a solos pobres em nitrogênio orgânico ou mineral e podendo ainda contribuir com o N₂ fixado para o estabelecimento de outras espécies não fixadoras em plantios consorciados ou em sucessão; assim, tornam-se importantes estudos visando a seleção de leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio eficientes e tolerantes a metais pesados.

2.3 Tolerância de rizóbio e FBN a metais pesados

A população microbiana do solo exerce um papel fundamental para o perfeito funcionamento do sistema solo-planta, especialmente nos ecossistemas naturais em que a fertilidade do solo depende quase que exclusivamente dos processos microbianos (Siqueira et al., 1994). No entanto, solos sob impacto da poluição com metais pesados podem apresentar significativa redução no tamanho e atividade da biomassa microbiana (Brookes e McGrath, 1984), afetando diretamente o microrganismo ou indiretamente, por efeitos tóxicos sobre as plantas, causando, com isso, um decréscimo na quantidade de substratos liberados na região rizosférica (McGrath, Brookes e Giller, 1988). Altas concentrações de metais pesados podem inibir a fixação biológica do nitrogênio, afetando desde o microsimbionte, o processo infectivo e a nodulação, até a atividade da nitrogenase (Reddy, Cheng e Dunn, 1983; McGrath, 1987; McGrath, Brookes e Giller, 1988; Giller, McGrath e Hirsch, 1989; Martensson e Witter, 1990; McGrath, 1994). Segundo Angle et al. (1993), a magnitude desses efeitos depende das características químicas e físicas do solo, das espécies vegetais e microbianas e do tempo de exposição ao solo contaminado. A inefetividade da nodulação, ou seja, a ausência de fixação do nitrogênio atmosférico pelo microsimbionte, após a nodulação da planta hospedeira, foi

observada por McGrath, Brookes e Giller (1988), que comprovaram que a redução do conteúdo de nitrogênio nas plantas, clorose e enfezamento de trevo não eram devidos à fitotoxidez dos metais, mas sim ao efeito tóxico do metal diretamente sobre o rizóbio, pois os sintomas foram reduzidos pela adição de fertilizante nitrogenado.

A formação de nódulos efetivos, e conseqüentemente a fixação biológica do nitrogênio, são processos muito afetados pela presença de elevadas concentrações de metais no solo (Smith e Giller, 1992; Obbard, Sauerbeck e Jones, 1993). A probabilidade de formação de nódulos efetivos em solo contaminado com metais pesados é maior com a sobrevivência saprofítica de um grande número de células de rizóbio efetivo (Giller, McGrath e Hirsch, 1989; Obbard, Sauerbeck e Jones, 1993). Giller, McGrath e Hirsch (1989) observaram que plantas de trevo branco formaram nódulos efetivos e tiveram crescimento normal quando solo contaminado com metais pesados foi inoculado com 10^7 cel g^{-1} solo da estirpe tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Quando o mesmo solo foi inoculado com quantidades menores ou iguais a 10^7 cel g^{-1} solo e incubado por 2 meses em condições de umidade controlada, antes da semeadura do trevo branco, houve a formação de nódulos inefetivos. No entanto, na aplicação de taxas extremamente altas de inóculo (10^{10} cel g^{-1} solo), o *Rhizobium* sobreviveu após os 2 meses de incubação, e formou nódulos efetivos em trevo branco. Isto mostra que a população reduzida de *Rhizobium* efetivo foi incapaz de sobreviver em estado de vida livre, em solo contaminado com metal. Obbard, Sauerbeck e Jones (1993) tiveram os mesmos resultados ao isolarem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* efetivo de nódulos de trevo branco nativo, independentemente do nível de contaminação do solo tratado com lodo de esgoto. No entanto, em alguns casos a nodulação não ocorreu quando o trevo branco foi introduzido, sugerindo a ausência de células viáveis de rizóbio nestes solos contaminados. Tais resultados evidenciam que os bacteróides foram

protegidos dos efeitos tóxicos dos metais no interior dos nódulos radiculares, e que rizóbio sensível à contaminação não sobreviveu em estado de vida livre. No entanto, *Rhizobium* efetivo foi encontrado, mesmo na ausência de planta hospedeira, em solo contaminado por aplicação de lodo de esgoto com grandes concentrações de metais pesado; contudo, o pH do solo estava relativamente alto (7,4 e 7,8), o que tende a reduzir a disponibilidade e, conseqüentemente, a toxicidade dos metais ao rizóbio (Smith e Giller, 1992). Para os autores, a presença de rizóbio tolerante e efetivo ocorreu devido à adaptação e desenvolvimento de mecanismos específicos de tolerância pelo *Rhizobium*. Chaudri, McGrath e Giller (1992a) aplicaram soluções de sais de Cd, Zn, Cu e Ni em solo não contaminado com população nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e verificaram que os metais mais tóxicos foram Cd e Zn, com a população não sobrevivendo em concentrações $\geq 7,1$ e ≥ 385 mg dm⁻³ de solo, respectivamente. Mesmo sobrevivendo 1% do número de células viáveis de *Rhizobium* inoculadas em concentrações de 225 mg dm⁻³ de Cu, formaram-se nódulos efetivos em plantas de trevo. Já o Ni não teve efeito sobre a população, mesmo quando elevada concentração (54 mg dm⁻³) foi adicionada ao solo; com isso, a ordem de toxicidade foi Cd>Zn>Cu>Ni. No trabalho desenvolvido por McIlveen e Cole (1974) utilizando sais de metais, a ordem de toxicidade para formação do nódulo e FBN foi Cd>Co>Cu>Zn. Um aumento da população de *Bradyrhizobium japonicum* foi observado durante o período de dez anos de aplicação de lodo de esgoto com altos níveis de contaminação com metais, sugerindo, segundo seus autores, que os metais pesados e outros componentes tóxicos do lodo, mesmo em altas concentrações no solo, não foram suficientes para afetar a sobrevivência deste microrganismo (Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Heckman, Angle e Chaney, 1987 a,b). Utilizando o método do número mais provável, Reddy, Cheng e Dunn (1983) avaliaram a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, simbionte da soja, em dois solos

(arenoso e argiloso), com diferentes proporções de lodo de esgoto contaminado com metais (controle, 13:1, 9:1 e 5:1), cujas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de metais no lodo eram Fe, 8250; Mn, 323; Zn, 1020; Cu, 496; Ni, 200; Pb, 210; Cd, 14. Depois de 42 dias, a população do rizóbio correspondeu a menos de 1% do inóculo inicial ($7,5 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$), sobrevivendo em ambos os solos e em todos os tratamentos com lodo de esgoto, sendo que na proporção 5:1 a população de rizóbio foi significativamente menor que no controle, nos dois solos. Segundo Nutman (1975), o rizóbio é capaz de viver saprofiticamente no solo, em ausência de planta hospedeira, mesmo em condições adversas. Para Giller et al. (1993), a sobrevivência de rizóbio em solos contaminados pode ser devida à localização das células na matéria orgânica ou partículas de argila, nas quais são protegidas da fitotoxicidade dos metais. Entretanto, a presença de plantas hospedeiras geralmente conduz a um aumento na população de rizóbio, que persiste por alguns anos (Hirsch et al. 1993). A produção e excreção de compostos orgânicos pelos microrganismos, em geral, podem imobilizar os metais por formação de complexos organo-metálicos (Garcia Jr., 1997), o que tem sido sugerido como um possível mecanismo pelo qual células bacterianas toleram metais pesados (Zagic, 1969, citado por Chaudri, McGrath e Giller, 1992b). Costerton, Irwin e Cheng (1981) relataram que a produção de polissacarídeos extracelulares foi necessária para a sobrevivência de células bacterianas em ambientes contaminados com metais pesados, provavelmente por modificarem o ambiente ao redor da célula.

Os trabalhos conduzidos até o presente, testando tolerância de bactérias a metais pesados, utilizaram diferentes métodos e meios de cultura (Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Martensson e Witter, 1990; Rózycki, 1992; Martensson, 1992; Chaudri, McGrath e Giller, 1992b; Chaudri et al., 1993a; Angle et al., 1993). Os meios usados geralmente são sólidos e de diferentes composições [YEM, meio YEMG, meio HM (Cole e Elkan, 1973), meio BAM (Angle e

Chaney, 1989)]. Algumas falhas são apontadas para métodos “*in vitro*”: a concentração dos íons metais não é conhecida e a atividade nos meios de cultura raramente aproxima-se da concentração de metal adicionada aos meios, sendo que os resultados sobre a tolerância de microrganismos podem ser superestimados e não se relacionarem com a concentração dos habitats dos quais foram isolados (Chaudri et al., 1993a,b). Também não é possível prever a concentração de metal inibitória para os microrganismos no solo baseado em dados de laboratório (Kinkle, Angle e Keyser, 1987), pois o solo é um substrato complexo para crescimento dos microrganismos, sendo que a argila e a matéria orgânica apresentam sítios específicos de adesão de metais pesados (Gadd e Griffiths, 1987). No entanto, os dados de tolerância “*in vitro*” são muito importantes, pois são qualitativos e servem para comparar um grande número de microrganismos, sem levar em conta que o meio sólido é um método mais rápido e acessível, tendo sido empregado em vários estudos de tolerância de rizóbio a metais (Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Martensson, 1992; Angle et al., 1993; Trannin, 1999). Em estudo com espécies de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, foi utilizado o meio HEPES-MES suplementado com sais de sulfato de Cu, Cd, Zn e Ni, nas concentrações até 10, 10, 500 e 20 mg L⁻¹, respectivamente, e verificou-se que *Bradyrhizobium japonicum* foi a espécie mais tolerante (500; 5,0; 7,5 e 5 mg L⁻¹ de Zn, Cu, Cd e Ni, respectivamente), e a ordem de toxicidade foi Cu=Ni>Cd>Zn (Angle et al., 1993). Trannin (1999) avaliou a tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* simbiotes de leguminosas tropicais em meio YMA modificado por adição de tampões biológicos (HEPES-MES) e Cu, Cd e Zn em concentrações superiores às testadas por Angle et al. (1993), sendo para Cu e Cd, 0 a 40 mg L⁻¹ para ambos os gêneros, e Zn, 0 a 1000 mg L⁻¹ para *Bradyrhizobium* e 0 a 500 mg L⁻¹ para *Azorhizobium*. Esta autora verificou que *Bradyrhizobium* foi mais tolerante (800,

40 e 40 mg L⁻¹ de Zn, Cu, Cd, respectivamente), e a ordem de toxicidade encontrada foi a mesma (Cu>Cd>Zn) obtida por Angle et al. (1993).

Chaudri, McGrath e Giller (1992b), ao avaliarem a tolerância do *Rhizobium* isolado de solo tratado com esterco (rizóbio efetivo) e de solo contaminado (rizóbio inefetivo), do experimento de McGrath, Brookes e Giller (1988), em soluções contendo sulfato de Cu, Ni, Cd e Zn diluídos em água deionizada, com pH 6,8, observaram que os isolados efetivos não sobreviveram em concentrações de 0,002, 0,2, 0,8 e 0,8 mg L⁻¹ de Cu, Cd, Ni e Zn, respectivamente, após 72 horas de incubação. Já os isolados inefetivos, mesmo em números reduzidos, sobreviveram em concentrações de 0,01 mg L⁻¹ de Cu e 1,0 mg L⁻¹ de Zn, mas morreram em 1,0 mg L⁻¹ de Ni e 0,8 mg L⁻¹ de Cu após 72 horas de incubação; a ordem de toxicidade foi de Cu>Cd>Zn=Ni e Cu>Cd>Ni>Zn para os isolados efetivos e inefetivos, respectivamente. Utilizando metodologia empregada por Chaudri, McGrath e Giller (1992b), Trannin (1999) estudou a tolerância a Zn, Cu e Cd em soluções aquosas de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* selecionados, em meio YMA modificado, como tolerantes, sensíveis e de tolerância média a estes elementos. O comportamento das estirpes e isolados variou em função das concentrações crescentes de cada metal em solução e com o tempo de incubação (0; 24; 48; 72 e 96 horas), e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) não variou no período de 96 horas de incubação na ausência dos metais. Embora ambos os gêneros tenham recebido as mesmas condições de cultivo, a contagem do número de células viáveis em água deionizada mostrou que *Azorhizobium* apresentou, geralmente, menor número de UFC. As concentrações máximas de metais testadas em soluções aquosas não causaram ausência de células viáveis de rizóbio após 96 horas de incubação, mas foram suficientes para detectar diferenças entre gêneros, estirpes e isolados, em relação ao número de UFC, que decresceu com o aumento das concentrações. A ordem de toxicidade dos metais

a todas as estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* foi Cu>Cd>Zn, a mesma encontrada em meio YMA modificado.

De acordo com os trabalhos relatados, podemos verificar variações na ordem de toxidez dos metais conforme substrato utilizado (Tabela 1).

A tolerância a metais por bactérias fixadoras de nitrogênio varia entre gêneros, espécies e estirpes estudados, sendo que o local de onde foram isolados pode interferir nesta tolerância (Smith e Giller, 1992; Turner, Giller e McGrath, 1995). Angle et al (1993), estudando espécies de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* e utilizando o meio HEPES-MES suplementado com sais de sulfato de Cu, Cd, Zn e Ni, verificaram que *Bradyrhizobium japonicum* foi a espécie mais tolerante. Trannin (1999), trabalhando com estirpes e isolados de *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* quanto à tolerância a Zn, Cu e Cd em meio YMA modificado, verificou que este último gênero foi mais tolerante (principalmente a estirpe BR-4406 e os isolados UFLA-01-456, UFLA-01-457 e UFLA-01-469), e para ambos os gêneros, os isolados originados de solos contaminados foram mais tolerantes aos metais. Para Chaudri, McGrath e Giller (1992a), a tolerância a metais por isolados de solos contaminados sugere que a bactéria, sobrevivendo em solo contaminado, desenvolve mecanismos não específicos de adaptação, em adição ao aumento da produção e excreção de polissacarídeos extracelulares em quantidades suficientes para que o metal fique aderido e não seja absorvido pela célula. Segundo Giller et al. (1993), a espécie *Rhizobium meliloti* foi mais sensível à toxicidade de metais pesados em solo que *Rhizobium loti* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Bactérias gram-negativas, como o rizóbio, mostraram-se mais tolerantes a metais que bactérias gram-positivas, isoladas de solos australianos (Duxbury e Bicknell, 1983).

TABELA 1. Resumo dos trabalhos envolvendo o comportamento do rizóbio com relação à toxicidade de metais pesados.

Substrato ^(a)	Gênero(s) de rizóbio	pH do substrato	Concentrações de metais testadas	Tolerância	Ordem de toxicidade	Referência
Solo	<i>Rhizobium</i>	6,5-6,8	em mg dm ⁻³ : Zn: 159±1,0 a 455±4,4; Cu: 58±1,2 a 225±2,3; Cd: 4±0,06 a 18±0,5; Ni: 26±1,4 a 54±1,6.	Cd e Zn: <i>Rhizobium</i> não sobreviveu em concentrações ≥ 7,1 e ≥ 385 mg dm ⁻³ de solo, respectivamente; Cu: 225 mg dm ⁻³ ; Ni: 54 mg dm ⁻³ .	Cd>Zn>Cu >Ni	Chaudri, McGrath e Giller, 1992a
Meio de cultura HEPES-MES	<i>Bradyrhizobium Rhizobium</i>	6,6	em mg L ⁻¹ : Zn: 10 a 500; Cu: 0,25 a 10; Cd: 0,5 a 10; Ni: 0,5 a 20.	em mg L ⁻¹ : <i>Bradyrhizobium</i> : Zn: 500; Cu e Ni: 5,0; Cd: 7,5; <i>Rhizobium</i> : Zn: 200; Cu: 2,0; Cd: 2,5; Ni: 4,0.	Cu>Cd>Zn	Angle et al., 1993
Meio YMA modificado por adição de tampões biológicos (HEPES-MES)	<i>Bradyrhizobium Azorhizobium</i>	6,8	em mg L ⁻¹ : Zn: 0 a 1000; Cu e Cd: 0 a 40.	em mg L ⁻¹ : <i>Bradyrhizobium</i> : Zn: 800; Cu: >40; Cd: >40; <i>Azorhizobium</i> : Zn: 400; Cu: 5,0; Cd: 30.	Cu>Cd>Zn	Trannin, 1999
Água deionizada	<i>Rhizobium</i>	6,8	em mg L ⁻¹ : Zn, Cd e Ni: 0 a 1,0; Cu: 0 a 0,01.	ISC ^(b) : não sobreviveram em concentrações de 0,002, 0,2, 0,8 e 0,8 mg L ⁻¹ de Cu, Cd, Ni e Zn, respectivamente, após 72 horas; ISSC ^(b) : mesmo em números reduzidos, sobreviveram em concentrações de 0,01 e 1,0 mg L ⁻¹ de Cu e de Zn, respectivamente, mas morreram em 1,0 de Ni e 0,8 mg L ⁻¹ de Cu após 72 horas de incubação.	ISC ^(b) : Cu>Cd>Zn =Ni; ISSC ^(b) : Cu>Cd>Ni >Zn	Chaudri, McGrath e Giller, 1992b
Água deionizada	<i>Bradyrhizobium Azorhizobium</i>	6,8	em mg L ⁻¹ : Zn e Cd: 0 a 1,0; Cu: 0 a 0,01.	As concentrações máximas de metais testadas não causaram ausência de células viáveis de rizóbio após 96 horas de incubação, sendo maior, no entanto, de <i>Bradyrhizobium</i> .	Cu>Cd>Zn	Trannin, 1999

^(a): suplementado com sais de sulfato de metais pesados; ^(b): ISC: isolados de solos contaminados; ISSC: isolados de solos sem contaminação.

Atualmente são conhecidos 6 gêneros de rizóbio: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* (Tabela 2).

TABELA 2. Gêneros de rizóbio com respectivos tempo de crescimento e reação do pH do meio.

Gênero	Tempo de crescimento	Reação do pH do meio*
<i>Bradyrhizobium</i>	lento (6-10 dias), muito lento (>10 dias)	alcaliniza
<i>Azorhizobium</i>	rápido (2-3 dias), intermediário (4-5 dias)	alcaliniza
<i>Mesorhizobium</i>	rápido (2-3 dias), intermediário (4-5 dias)	acidifica/neutro
<i>Allo/Sino/Rhizobium</i>	rápido (1-3 dias)	acidifica/neutro

*Meio de cultura YMA (Vincent, 1970).

Geralmente, as estirpes de crescimento rápido (CR) tornam o meio ácido e as de crescimento lento (CL) tornam o meio alcalino. Tan e Broughton (1981) sugerem que as mudanças de pH do meio são devidas à utilização, preferencial, de açúcares pelas estirpes de CR, e de compostos de nitrogênio pelas estirpes de CL, ou seja, a acidificação do meio se dá pela excreção de ácidos orgânicos após utilização de açúcares, e a alcalinização do meio ocorre pela utilização dos aminoácidos contidos no extrato de levedura do meio e consequente liberação de cátions.

Moreira (1991), depois de isolar 705 estirpes de rizóbio de leguminosas nativas da Amazônia e Mata Atlântica, verificou, através das características culturais em meio YMA, predominância de isolados de crescimento lento, rápido e lento nas subfamílias Cesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae, respectivamente.

Para Beverikge e Doyle (1989), citados por Angle et al (1993), a diferença na tolerância a metais entre gêneros de crescimento rápido

(*Rhizobium*) e lento (*Bradyrhizobium*) (Borges e Wollum, 1980, 1981; Kinkle, Angle e Keyser, 1987) é explicada pela densa cápsula polissacarídica ao redor da célula bacteriana, principalmente do *Bradyrhizobium*, que liga e sequestra os metais, impedindo sua absorção. Exclusão de Cd pela cápsula polissacarídica foi demonstrada em *Klebsiella aerogens* (Bitton e Freihofer, 1978) e *Escherichia coli* (Mitra et al., 1975) como uma forma de proteção contra a solubilidade e atividade da maioria dos metais. Alexander (1977) atribui a tolerância destas bactérias ao fato de causarem uma reação alcalina em seu nicho adjacente, reduzindo, assim, a solubilidade e atividade destes metais. Ao contrário, *Rhizobium*, embora produza maior quantidade de polissacarídeos extracelulares que *Bradyrhizobium*, geralmente diminui o pH em seu meio, aumentando a disponibilidade e toxicidade dos metais. Por outro lado, *Azorhizobium* (crescimento rápido/intermediário), apesar de apresentar menor produção de polissacarídeos extracelulares que os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, promove maior alcalinização do meio que estes dois gêneros (Dreyfus, Garcia e Gillis, 1988). Trabalhos comparando rizóbio de crescimento lento, muito lento, rápido e intermediário, quanto à tolerância a metais pesados “*in vitro*” não foram encontrados, sendo este um dos objetivos de nosso estudo.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: J. Willey, 1977. 467p.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. New York: J. Willey, 1993. 339p.
- AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; COSTA, L.M.; OLIVEIRA, C.de; VELLOSO, A.C.X. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.16, n.2, p.271-276, maio/ago. 1992.
- ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Cadmium resistance screening in nitritotriacetate-buffered minimal media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.8, p.2101-2104, Sept. 1989.
- ANGLE, J.S.; MCGRATH, S.P.; CHAUDRI, A.M.; CHANEY, R.L.; GILLER, K.E. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.5, p.575-580, May 1993.
- ANTONOVICS, J.; BRADSHAW, A.D.; TURNER, R.G. Heavy metal tolerance in plants. **Advances Ecological Research**, v.7, p.1-85, 1971.
- BABICH, H.; SCHIFFENBAUER, M.; STOTZKY, G. Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.28, p.193-202, 1982.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.8, p.99-145, 1980.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Nickel toxicity to fungi: influence of environmental factors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.6, p.577-589, 1982.
- BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **The New Phytologist**, Cambridge, v.106, n.1, p.92-111, Jan. 1987.

- BAKER, A.J.M. Heavy metal accumulation and tolerance in british populations of the metallaphyte *Thaspi caerulescens* J-and-C Presl (Brassicaceae). *The New Phytologist*, Cambridge, v.127, n.1, p.61-68, May. 1994.
- BITTON, G.; FREIHOFER, V. Influence of extracellular polysaccharide on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella* sp. *Microbial Ecology*, New York, v.4, p.119-125, 1978.
- BORGES, A.; WOLLUM, A. A field study of a soil-soybean plant-*Rhizobium* system amended with cadmium. *Journal Environmental Quality*, Madison, v.9, p.420-423, 1980.
- BORGES, A.; WOLLUM, A. Effect of cadmium on symbiotic soybean plants. *Journal Environmental Quality*, Madison, v.10, p.216-221, 1981.
- BROOKES, P.C. The use microbial parameters in soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.19, n.4, p.269-279, Mar. 1995.
- BROOKES, P.C.; McGRATH S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *Journal Soil Science*, Oxford, v.35, n.2, p.341-346, June 1984.
- CAMPELLO, E.F.C. O papel de leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas na recuperação de áreas degradadas (Parte I). In: **RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS: 2 CURSO DE ATUALIZAÇÃO**, Curitiba, 1996. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1996. p.09-16.
- CARNEIRO, M.A.C. **Fungos micorrízicos e superfosfato no crescimento e acúmulo de nutrientes em plantas herbáceas em solo degradados.** Lavras: UFLA, 1997. 72p. (Dissertação-Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.14, n.2, p.133-142, maio/ago. 1990a.
- CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.14, n.2, p.125-132, maio/ago. 1990b.

- CHANDER, K.; BROOKES, P.C. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.10, p.927-932, May 1991.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Metal Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.7, p.625-632, July 1992a.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past application of sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.2, p.83-88, Feb. 1992b.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E.; RIETZ, E.; SAUERBECK, D.R. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.3, p.301-309, Mar. 1993a.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Screening of isolates and strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for heavy metal resistance using buffered media. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v.12, p.1643-1651, 1993b.
- COKER, E.G. ; MATTHEWS, P.J. Metals in sewage sludge and their potential effects in agriculture. **Wat. Science Technology**, v.15, n. 1, p. 209-225, 1983.
- COLE, M.A.; ELKAN, G.H. Transmissible resistance to Penicillin G, Neomycin, and Chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.4, p.248-253, Sept. 1973.
- COSTERTON, J.W.; IRWIN, R.T.; CHENG, K.Y. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.35, p.299-324, 1981.
- COTRIM, A.R. Metais Pesados na Agricultura: Conseqüências das elevadas concentrações de Mercúrio, Cádmiio e Chumbo no solo. São Paulo: Produquímica , 1994. 48 p.

- COTTENIE, A.; KIEKENS, L.; VAN LANDSCHOOT, G. Problems of the mobility and predictability of heavy metal uptake by plants. In: L'HERMITE, P; OTT, H. (eds.). **Processing and use of sewage sludge**. Dordrecht: Reidel, 1983. p.124-131.
- DANCER, W.S.; HANDLEY, J.F.; BRADSHAW, A.D. Nitrogen accumulation in kaolin mining wastes in Cornwall. I. Natural Communities. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.48, n.1, p.153-167, Sept. 1977.
- DIAS-JÚNIOR, H.E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.22, n.4, p.631-640, out./dez. 1998.
- DOELMAN, P.; JANSEN, E.; MICHELS, M.; TIL, M. VAN. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as show by the sensitivity-resistance index, an exologically relevant parameter. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.17, n.3, p.177-184, Mar.1994.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, n.1, p.89-98, Jan. 1988.
- DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal tolerant bacterial population from natural and metal-polluted soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.15, n.3, p.243-250, May/June 1983.
- FARIA, S.M. de. Occurrence and rhizobial selection for legume trees adapted to acid soils. In: INTERNATIONAL EXPERT WORKSHOP ON NITROGEN FIXING TREES FOR ACID SOILS, Costa Rica, 1994. **Anais... Costa Rica: CATIE**, 1994. p.10.
- FARIA, S.M. de; FRANCO, A.A.; JESUS, R.M.; MENANDRO, M.S., BAITELLO, J.B.; MUCCI, E.S.F.; DOBEREINER, J. ; SPRENT, J.I. New nodulating legume trees from South East Brazil. **The New Phytologist**, Cambridge, v.98, n.2, p.317-328, Oct. 1984.
- FARIA, S.M. de; LEWIS, G.O.P.; H.C.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J.M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 111, n.4, p.607-619, Apr.1989.

- FARIA, S.M. de; LIMA, H.C.; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F.; SPRENT, J.I. Nodulation of legume trees from South East Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.99, n.3, p.347-356, June 1987.
- FRANCO, A. A.; SILVA, G. G. Potential of the *Rhizobium* symbioses in tree legumes. Presented at the workshop on *Rhizobium*/legume inoculants, Porto Alegre- RS, 1985. (Mimeografado).
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, L.E.D.; FARIA, S.M. Revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombeta - PA com leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas. In: SIMPÓSIO SUL-AMERICANO, 1; SIMPÓSIO NACIONAL DE ÁREAS DEGRADADAS,2, Foz do Iguaçu, 1994. **Anais...** Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais, 1994. p.145-153.
- GADD, G.; GRIFFITHS, A. Microorganisms and heavy metal toxicity. **Microbial Ecology**, New York, v.4, p.303-317, 1987.
- GARCIA JR., O. Microorganismos e metais. In: MELO, L.S. de; AZEVEDO, J.L. de (eds.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440p.
- GILLER, K.E.; McGRATH, S.P.; HIRSCH, P.R. Absence of nitrogen-fixation in clover grown on soil subject to long term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, n.6, p.841-848, Sept. 1989.
- GILLER, K.E.; NUSSBAUM, R.; CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv.*trifolii* or *R. loti*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.2, p.273-278, Feb. 1993.
- HECKMAN, J.R.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Residual effects of sewage sludge on soybean. I. Accumulation of heavy metals. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.16, p.113-117, 1987a.
- HECKMAN, J.R.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Residual effects of sewage sludge on soybean. II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.16, p.117-124, 1987b.

- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E.** Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* populations. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.11, p.1485-1490, Nov. 1993.
- JARDIM, W.F.** Metais pesados, um dano irreparável. *Revista Brasileira Tecnologia*, Brasília, v.14, n.2, p.41-45, mar./abr. 1983.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H.** Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC Press, 1985. 315p.
- KINKLE, B.K.; ANGLE, J.S.; KEYSER, H.H.** Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.53, n.2, p.315-319, Feb. 1987.
- KOSKELA, I.** Long-term field experiments on the fertilizer value and soil ameliorating properties of dewatered sludges. In: WILLIAMS, J.H.; GUIDI, G.; L'HERMITE, P.I. (eds.). London: Elsevier, 1985. p. 98-107.
- LAL, R.; STEWART, B.A.** Soil degradation: A global threat. *Advance Soil Science*, New York, v.14, p.289-330. 1989.
- MAGALHÃES, F.M.M.; MAGALHÃES, L.M.S.; OLIVEIRA, L.A e DOBEREINER, J.** Ocorrência de nodulação em leguminosas nativas da região de Manaus-AM. *Acta Amazônica*, Manaus, v.12, n.3, p.509-514, Sept. 1982.
- MARTENSSON, A.M.** Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis wity small-seeded legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.5, p.435-445, May 1992.
- MARTENSSON, A.M.; WITTER, F.** Influence of various soil amendments on nitrogen-fixing soil microorganisms in a long field experiment, with special reference to sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.22, n.7, p. 977-982, Oct. 1990.
- McBRIDE, M.D.** *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University, 1994. 406p.

- MCGRATH, S.P. Long-term studies of metal transfer following applications of sewage sludge. In: COUGHTREY, P.J.; MARTIN, M.H.; UNSWORTH, M.H. (eds.). **Pollutant Transport and Fate in Ecosystems**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. p.301-317.
- MCGRATH, S.P. Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. In: ROSS, S.M. (ed.). **Toxic metals in Soil-Plant Systems**. New York: J. Wiley and Sons, 1994, p.247-274.
- MCGRATH, S.P.; BROOKES, P.C.; GILLER, K.E. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, n.4, p.415-424, Apr. 1988.
- MCLLVEEN, W. ; COLE, H. Influence of heavy metals nodulation of red clover. **Phytopathology**, Sant Paul, v.64, n.5, p.583-588, May 1974.
- MITRA, R.S.; GRAY, R.H.; CHIN, B.; BERNSTEIN, I.A. Molecular mechanisms of accomodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd^{+2} . **Journal of Bacteriology**, Washington, v.121, n.3, p.1180-1188, May 1975.
- MOREIRA, F.M.S. Caracterização de estirpes de rizóbio isolados de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. Rio de Janeiro: UFRJ, 1991. 160p. (Tese-Doutorado em Ciência do Solo).
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F.; FARIA, S.M. de. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **The New Phytologist**, Cambridge, v.121, n.4, p.563-570, Aug. 1992.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polycrylamide gel electroforesis or their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, p.135-146, 1993.
- MULCHI, C.L.; BELL, P.I.; ADAMU, C.; CHANEY, R.L. Long-term availability of metals in sludge amended soils. **Journal Plant Nutrition**, New York, v.10, n.7, p.1149-1161, July 1987.
- NUTMAN, P.S. *Rhizobium* in soil. In: WALKER, N. (ed.). **Soil microbiology: a critical review**. London: Butterworths, 1975. p.11-131.

- OBBARD, J.P.; SAUERBECK, D.R.; JONES, K.C. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soil amended with heavy metal contaminated sewage sludges. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.2, p.227-231, Feb. 1993.
- REDDY, G.B.; CHENG, C.N.; DUNN, S.J. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.15, n.3, p.343-345, May/June 1983.
- ROVIRA, A.D.; DALEY, C.B. Biology of the rhizosphere. In: CARSON, E.W. (ed.). *The plant root and its environment*. Charlottesville: University of Virginia, 1974. p.153-194.
- RÓZYCKI, H.A. Rapid Agar-diffusion Test for Quantifying the Toxic Effects of Copper on Microorganisms. *Acta Microbiologica Polonica*, Gagarina, v.41, n.1/2, p.469-477/57-64, Aug. 1992.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A.A. *Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. 236p.
- SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental*. Brasília: EMBRAPA -SPI, 1994. 142p.
- SMITH, S.R.; GILLER, K.E. Effective *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term applications of sewage sludge or metal mine spoil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.8, p.781-788, Dec. 1992.
- TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.13, p.389-393, 1981.
- TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplo do Recôncavo Baiano. *Química Nova*, v.15, n.2, p.147-153, 1992.
- TRANNIN, I.C.B. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a metais pesados "in vitro" e em simbiose. Lavras: UFLA, 1999. 125 p. (Dissertação-Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

TURNER, A.P.; GILLER, K.E.; McGRATH, S.P. Long term effects on *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* of heavy metal contamination of land from the application of sewage sludge. In: ALLAN, R.J.; NRIAGU, J.O. (eds.). *Heavy metals in the environment*. Toronto, 1995. p.442-445.

VERLOO, M.; KIEKENS, L.; CONTTENIE, A. Distribution patterns of essential trace elements in the soil - solution systems. *Pedologie*, v.30, p. 163-75, 1980.

VINCENT, J.M. *A Manual for the practical study of root-nodule bacteria*. London: JBP, 1970. 164p. (Handbook, 15).

CAPÍTULO 2

TOLERÂNCIA “*IN VITRO*” DE RIZÓBIO DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS A ZINCO, COBRE E CÁDMIO

RESUMO

MATSUDA, Alexandre. Tolerância “*in vitro*” de rizóbio de diferentes procedências a zinco, cobre e cádmio. Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)

A busca por microsimbiontes tolerantes a metais pesados, que beneficiem o desenvolvimento de plantas, pode facilitar o reflorestamento de áreas degradadas por excesso destes elementos. Em regiões de clima temperado, onde o problema já foi detectado, existem resultados que indicam a existência de estirpes de rizóbio tolerantes a estes elementos. Para áreas de clima tropical existem poucos resultados nesta linha de pesquisa, apesar do problema da contaminação ambiental por metais pesados já estar presente. Este fato mostra a necessidade de estudos direcionados às contaminações por atividades industriais nos trópicos, onde existe ampla diversidade de simbioses rizóbio-leguminosas, favorecendo a seleção de genótipos promissores para os programas de reabilitação destes solos. Neste experimento, desenvolvido no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (MG), no período de fevereiro a outubro de 1999, foram utilizadas 60 estirpes/isolados dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*, de diferentes procedências de hospedeiro (subfamílias das leguminosas: Papilionoideae, Mimosoideae e Cesalpinoideae) e de local (Mata Atlântica, Amazônia e experimentos com metais pesados). As estirpes/isolados foram avaliadas quanto à tolerância a Zn, Cu e Cd em meio YMA (Vincent, 1970) modificado por adição de tampões biológicos (HEPES e MES), suplementado com diferentes concentrações de sulfato de Cu, Cd e Zn. Vinte estirpes e/ou isolados de cada subfamília foram testados, e as concentrações de Cu e Cd variaram de 0 a 60 mg L⁻¹, e de Zn de 0 a 1000 mg L⁻¹. O crescimento de rizóbio nas diferentes concentrações de metais foi avaliado com atribuição de valores para os padrões observados (0 a 5). Foram determinadas as concentrações máximas toleradas ao metais Zn, Cu e Cd, e estimadas as doses (concentrações) tóxicas destes metais que reduzem o padrão de crescimento em 25% e 50%. Foi verificado que: não houve influência da origem (subfamílias e locais) na concentração máxima

tolerada de cada metal; a ordem de sensibilidade aos metais, considerando-se as concentrações máximas toleradas, foi *Azorhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*; a DT₂₅ e a DT₅₀ foram úteis para diferenciarem algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd; e a ordem de toxicidade foi Cu>Cd>Zn.

ABSTRACT

MATSUDA, Alexandre. **In vitro tolerance of rhizobia from different origins to zinc, copper, and cadmium.** Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Dissertation - Master in Agronomy)

The search for heavy metal tolerant microsymbionts, that could improve plant development, can facilitate the revegetation of areas degraded by the excess of such metals. In temperate regions, where the problem was already detected, there are data indicating the presence of rhizobia strains tolerant to these metals. For tropical regions, few data are available, although the environmental contamination problem already exists. This shows how necessary are studies about soil heavy metal contamination by industrial activities in tropical regions, where a wide diversity of rhizobia-legume symbiosis occur helping the selection of promising genotypes for rehabilitation programs in these soils. This experiment was developed at the Soil Science Department of the Federal University of Lavras (MG) from February to October/1999, with 60 strains/isolates of the genera *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Azorhizobium*, from different hosts origins (legume subfamilies: Papilionoideae, Mimosoideae and Cesalpinoideae) and from local (Atlantic Forest, Amazon region and other experiments with heavy metals). All strains were evaluated for Zn, Cu and Cd tolerance in YMA medium (Vincent, 1970) modified by the addition of biological buffers (HEPES and MES) and supplemented with different concentrations of Cu, Cd, and Zn sulphates. Twenty strains and/or isolates from each subfamily were tested, at metal concentrations varying from 0 to 60 mg L⁻¹ for Cu and Cd and 0 to 1000 mg L⁻¹ for Zn. The growth of rhizobia at the different metal concentrations was evaluated through values attributed to patterns (0 to 5). The tolerated maximum concentrations to Zn, Cu, and Cd metals were determined, and the toxic doses (concentrations) of these metals which reduce the growth standard in 25% and 50% were estimated. It was verified that there was no influence of the origin (host and local) at the tolerated maximum concentration of each metal; the order of sensitivity to heavy metals, considering the tolerated maximum concentrations, was *Azorhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*; the DT₂₅ and the DT₅₀ were useful to differentiate same strain/isolates of the same genus, which reached the same tolerated maximum concentration to Zn, Cu, and Cu; and the order of toxicity was Cu>Cd>Zn.

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por resíduos industriais contendo metais pesados tem gerado graves problemas ao ambiente, comprometendo o ecossistema. As leguminosas capazes de formarem simbiose eficiente com rizóbio são espécies promissoras em programas de revegetação de solos contaminados. O desenvolvimento de trabalhos que visem essa revegetação com leguminosas requer uma gama de estudos que envolvem diversos fatores, entre eles a obtenção de rizóbio tolerante a níveis tóxicos de metais pesados.

Os efeitos dos metais pesados sobre o rizóbio têm sido investigados através da adição de sais de metais em concentrações crescentes aos meios nutritivos (Duxbury e Bicknell, 1983; Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Rózycki, 1992; Angle et al., 1993), e seus efeitos sobre o crescimento deste microrganismo são avaliados quantitativamente, através da contagem em placa, ou através da estimativa da tolerância, atribuindo valores para os padrões de crescimento (Martensson, 1992). Uma limitação no uso de métodos "*in vitro*" é que as concentrações dos íons metálicos livres e, conseqüentemente, suas atividades reais não são conhecidas (Angle e Chaney, 1989). Além disso, alguns metais, como Cu, Pb e Ni, são geralmente menos tóxicos quando complexados com compostos orgânicos do que em forma livre (Babich e Stotzky, 1980; 1983). Como conseqüência, a utilização destes meios de cultura pode superestimar as concentrações de metais toleradas. Além disso, estas podem não estar relacionadas às concentrações metálicas reais encontradas nos habitats dos quais o rizóbio foi isolado (Chaudri et al., 1993a,b). No entanto, os dados de tolerância "*in vitro*" são muito importantes, pois são qualitativos e servem para comparar um grande número de microrganismos, sem levar em conta que o meio sólido é um método mais rápido e acessível, tendo sido empregado em vários

estudos de tolerância de rizóbio a metais (Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Martensson, 1992; Angle et al., 1993; Trannin, 1999). Nestes estudos, alguns envolvendo bactérias diazotróficas dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, e *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, as representantes do gênero *Bradyrhizobium* mostraram-se mais tolerantes aos metais pesados.

Este estudo teve como objetivo avaliar “*in vitro*” a tolerância de 60 estirpes/isolados de rizóbio (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), de diferentes procedências de hospedeiro (subfamílias das leguminosas: Papilionoideae, Mimosoideae e Cesalpinoideae) e local (Mata Atlântica, Amazônia e experimentos com metais pesados), a cobre, cádmio e zinco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta estirpes/isolados de bactérias diazotróficas que formam simbiose com leguminosas, aqui coletivamente chamadas de rizóbio, num total de 20 de cada subfamília das leguminosas, Papilionoideae, Mimosoideae e Cesalpinoideae, provenientes de diferentes locais (Tabelas 1, 2 e 3), foram estudados quanto à tolerância, em seis concentrações de Zn, Cu e Cd em meio YMA (Vincent, 1970) modificado. Cada estirpe ou isolado cresceu em 30 mL de meio YEM (Vincent, 1970) com pH 6,8, sob agitação orbital a 105 rpm a 28°C. Passados 2 dias de crescimento para *Meso/Sino/Rhizobium* ($1,3 \times 10^{10}$ cel mL⁻¹), 4 dias de crescimento para *Azorhizobium* (10^9 cel mL⁻¹) e 6 dias de crescimento para *Bradyrhizobium* ($1,2 \times 10^{10}$ cel mL⁻¹), uma alíquota de 1 mL de cultura de cada estirpe ou isolado foi transferida para tubos eppendorf de 1,5 mL esterilizados e foi centrifugada a 8000 rpm, a 25°C, por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de solução salina estéril (NaCl 5,5 g L⁻¹) e centrifugadas novamente, repetindo o processo de lavagem em solução salina por três vezes. Posteriormente, alíquotas de 0,1mL de suspensões de células lavadas de rizóbio foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalsky em placas contendo meio YMA modificado por adição de tampões biológicos HEPES (1,3 mg L⁻¹ de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) e MES [1,1 mg L⁻¹ de 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid] (Cole e Elkan, 1973), suplementado com diferentes concentrações de cada metal, testado individualmente (Figura 1).

TABELA 1. Estirpes e isolados de rizóbio de diferentes espécies da subfamília Cesalpinoideae, com seus respectivos gêneros, hospedeiros, tempo de crescimento, alteração de pH ocasionada no meio YMA, produção de goma e local de origem.

Estirpe/Isolado ^(a)	Gênero	Hospedeiro	Tempo de crescimento ^(e)	Reação do pH do meio	Produção de goma pelas colônias ^(d)	Local de origem
BR-3901 ^(a)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Melanoxylon</i> sp.	lento	alcaliniza	1/2	Mata Atlântica
BR-5004 ^(a)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra</i> sp.	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-5005 ^(a)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra</i> sp.	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
INPA-68A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-101A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-145A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-147A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-155A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Campsiandra laurifolia</i>	muito lento	alcaliniza	1	Amazônia
INPA-170B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Campsiandra comosa</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-173A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Tachigali paniculata</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-179A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Campsiandra comosa</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-191A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-547B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Tachigali paniculata</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-553A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Tachigali paniculata</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
UFLA-01-11	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i> sp.	lento	alcaliniza	2	Amazônia
FL-27	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia falcataria</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-3804 ^(a)	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Chamaecrista ensiformis</i>	rápido	acidifica	3	Mata Atlântica
BR-5001	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Dimorphandra mollis</i>	rápido	acidifica	2/3	Mata Atlântica
INPA-353B ^(b)	<i>Rhizobium</i>	<i>Vouacapoua pallidior</i>	rápido	neutro	2	Amazônia
UFLA-01-10 ^(b)	<i>Rhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i> sp.	rápido	acidifica	3	Amazônia

^(a)BR e FL: estirpes/isolados da coleção da EMBRAPA/CNPAB-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ; INPA: estirpes da coleção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; UFLA: estirpes da coleção da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.
^(b)Estirpes/isolados classificados provisoriamente, de acordo com suas características (tempo de crescimento, reação do pH do meio e produção de goma pelas colônias), como *Rhizobium*; somente testes genéticos mostrarão a que gênero realmente pertencem (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Rhizobium*).
^(c)Tempo para o aparecimento de colônias isoladas (dias): crescimento rápido: 1-3; crescimento intermediário: 4-5; crescimento lento: 6-10; crescimento muito lento: > 10.
^(d)Produção de goma pelas colônias (avaliação visual comparativa): 1-pouca; 2-média; 3-abundante; 1/2 e 2/3: intermediários (Moreira, 1991).
^(e)Estirpes recomendadas para produção de inoculante comercial.

TABELA 2. Estirpes e isolados de rizóbio de diferentes espécies da subfamília Mimosoideae, com seus respectivos gêneros, hospedeiros, tempo de crescimento, alteração de pH ocasionada no meio YMA, produção de goma e local de origem.

Estirpe/Isolado ^(a)	Gênero	Hospedeiro	Tempo de crescimento ^(c)	Reação do pH do meio	Produção de goma pelas colônias ^(d)	Local de origem
BR-3617 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia mangium</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-4406 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Enterolobium ellipticum</i>	lento	alcaliniza	2/3	Mata Atlântica
BR-5610 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia sp.</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-5611 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Paraserianthes falcatula</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
INPA-10A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pithecellobium sp. cf saman</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-54B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Inga sp.</i>	lento	alcaliniza	1/2	Amazônia
INPA-72A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia lebbek</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-75A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia lebbek</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-104A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Calliandra surinamensis</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-183B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pentaclethra sp.</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-223A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pentaclethra maculosa</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
UFLA-01-457	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
UFLA-01-473	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Enterolobium timbova</i>	lento	alcaliniza	2	CMM-MG ^(e)
BR-817	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	rápido	neutro	3	CMM-MG ^(e)
BR-3452 ^{(a),(e)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Mimosa sp.</i>	rápido	acidifica	2	Mata Atlântica
BR-3460 ^{(a),(e)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Mimosa sp.</i>	rápido	neutro	3	Mata Atlântica
BR-3614 ^{(a),(e)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Acacia sp.</i>	rápido	neutro	3	Mata Atlântica
BR-4301 ^{(a),(e)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Calliandra sp.</i>	rápido	acidifica	3	Mata Atlântica
BR-4302 ^{(a),(e)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Calliandra sp.</i>	rápido	acidifica	3	Mata Atlântica
BR-6806	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Pithecellobium dulce</i>	rápido	neutro	3	Mata Atlântica

^(a)BR: estirpes/isolados da coleção da EMBRAPA/CNPAB-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica/RJ; INPA: estirpes da coleção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; UFLA: estirpes da coleção da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG. ^(b)Estirpes/isolados classificados provisoriamente, de acordo com suas características (tempo de crescimento, reação do pH do meio e produção de goma pelas colônias), como *Rhizobium*; somente testes genéticos mostraram a que gênero realmente pertencem (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Rhizobium*). ^(c)Tempo para o aparecimento de colônias isoladas (dias): crescimento rápido: 1-3; crescimento intermediário: 4-5; crescimento lento: 6-10. ^(d)Produção de goma pelas colônias (avaliação visual comparativa): 1-pouca; 2-média; 3-abundante; 1/2 e 2/3: intermediários (Moreira, 1991). ^(e)Isolado de mistura de solos contendo 40% de solo contaminado diluído em latossolo vermelho escuro (LE); solo contaminado proveniente da Companhia Mineira de Metais (CMM), Três Marias-MG. ^(f)Estirpes recomendadas para produção de inoculante comercial.

TABELA 3. Estirpes e isolados de rizóbio de diferentes espécies da subfamília Papillonoideae, com seus respectivos gêneros, hospedeiros, tempo de crescimento, alteração de pH ocasionada no meio YMA, produção de goma e local de origem.

Estirpe/ Isolado ^(a)	Gênero	Hospedeiro	Tempo de crescimento ^(c)	Reação do pH do meio	Produção de goma pelas colônias ^(d)	Local de origem
BR-29 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Glycine max</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-96 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Glycine max</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-2001 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-2613	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pueraria phaseoloides</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-2405 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Neonotonia wightii</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-2801 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Indigofera hirsuta</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-6009 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Deguelia</i> sp.	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-8402 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dalbergia</i> sp.	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-8404 ^(e)	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dalbergia nigra</i>	lento	alcaliniza	2	Mata Atlântica
INPA-33A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Derris amazônica</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-80A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Ormosia discolor</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-237B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pterocarpus</i> sp.	lento	alcaliniza	2	Amazônia
INPA-514A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Machaerium quinata</i>	lento	alcaliniza	2	Amazônia
UFLA-01-486	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania virgata</i>	intermediário	alcaliniza	1	CMM-MG ^(e)
UFLA-01-510	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania virgata</i>	intermediário	alcaliniza	1	CMM-MG ^(e)
BR-322 ^{(b), (e)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	rápido	acidifica	3	Mata Atlântica
BR-6401 ^(b)	<i>Rhizobium</i>	<i>Centrolobium</i> sp.	rápido	acidifica	3	Mata Atlântica
INPA-523B	<i>Rhizobium</i>	<i>Swartzia polyphylla</i>	rápido	acidifica	3	Amazônia
UFLA-04-708 ^(b)	<i>Rhizobium</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	rápido	neutro	3	Amazônia
UFLA-04-709 ^(b)	<i>Rhizobium</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	rápido	neutro	3	Amazônia

^(a)BR: estirpes/isolados da coleção da EMBRAPA/CNPAB-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica/RJ; INPA: estirpes da coleção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; UFLA: estirpes da coleção da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

^(b)Estirpes/isolados classificados provisoriamente, de acordo com suas características (tempo de crescimento, reação do pH do meio e produção de goma pelas colônias), como *Rhizobium*; somente testes genéticos mostrarão a que gênero realmente pertencem (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Rhizobium*). ^(c)Tempo para o aparecimento de colônias isoladas (dias): crescimento rápido: 1-3; crescimento intermediário: 4-5; crescimento lento: 6-10. ^(d)Produção de goma pelas colônias (avaliação visual comparativa): 1-pouca; 2-média; 3-abundante (Moreira, 1991). ^(e)Isolado de mistura de solos contendo 10% de solo contaminado diluído em latossolo vermelho escuro (LE); solo contaminado proveniente da Companhia Mineira de

Metais (CMM), Três Marias-MG. ^(e)Estirpes recomendadas como inoculantes.

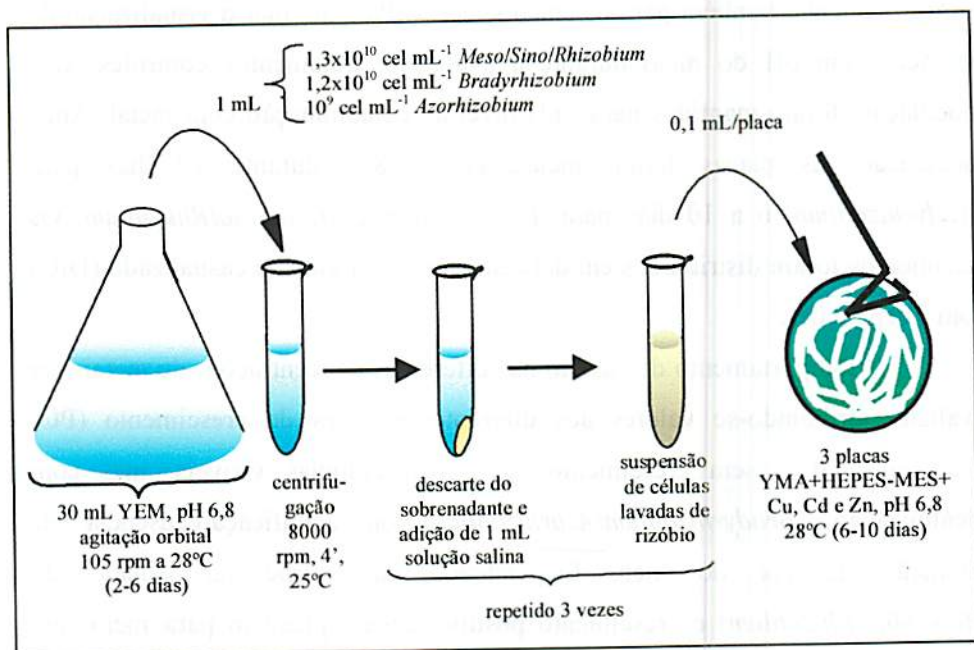


FIGURA 1. Diagrama esquemático (modificado de Trannin, 1999) da avaliação da tolerância a Cu, Cd e Zn em meio YMA (Vincent, 1970) modificado.

As concentrações de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) utilizadas foram: 0; 200; 400; 500; 600; 800 e 1000 mg L⁻¹ para os cinco gêneros, conforme Trannin (1999). Após a adição das soluções de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, o pH dos meios foi ajustado para 6,8 com solução de KOH 0,5 N esterilizada. Cádmio e cobre foram adicionados em concentrações superiores às utilizadas por Trannin (1999), já que a estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado (UFLA-01-456, UFLA-01-457 e UFLA-01-469), pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, cresceram na maior concentração testada pela autora; como a estirpe BR-4406 e o isolado de solo contaminado UFLA-01-457 também fizeram parte deste estudo, Cd e Cu foram adicionados nas formas de $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações: 0; 5,0; 10; 20; 30; 40 e 60 mg L⁻¹, e 0; 2,5; 5,0; 10; 20; 40 e 60 mg L⁻¹,

respectivamente, também para os cinco gêneros. Para auxiliar a visualização de alterações em pH do meio durante a avaliação, tratamentos controles, sem inoculação, foram mantidos para cada nível de contaminação com metal. Após inoculação, as placas foram incubadas a 28°C durante 10 dias para *Bradyrhizobium*, 6 a 10 dias para *Azorhizobium* e *Meso/Sino/Rhizobium*. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 repetições.

O comportamento de rizóbio nas diferentes concentrações de metais foi avaliado, atribuindo-se valores aos diferentes padrões de crescimento (PC) observados: 0 = sem crescimento; 1 = sem colônias visíveis, mas com alcalinização (*Bradyrhizobium/Azorhizobium*) ou acidificação/ausência de alteração da cor do meio (dependendo da estirpe ou isolado do *Meso/Sino/Rhizobium*) e crescimento positivo após repicagem para meio sem metal; 2 = pouco; 3 = médio; 4 = abundante, com distribuição heterogênea na placa; 5 = máximo, com distribuição uniforme por toda a placa, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação. A concentração máxima tolerada (CMT) correspondeu à maior concentração de metal que apresentou PC igual ou maior que 1.

Através dos valores atribuídos aos diferentes PC para avaliação do comportamento do rizóbio nas diferentes concentrações de metais, foram determinados os valores de padrões de crescimento relativos. Em seguida, utilizando-se o programa TableCurve 2D for Windows v. 2.03 (Jandel Corporation), foram obtidas as equações de regressão correspondentes a estes padrões de crescimento relativos. Com base nas equações de regressão encontradas para cada microrganismo e metal pesado, foram estimadas as doses (concentrações) tóxicas dos metais Zn, Cu e Cd no meio de cultura, que reduzem o padrão de crescimento em 25% e 50%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Zinco foi o metal menos tóxico para todas as estirpes e isolados testados. Para os dois isolados de *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510), a concentração máxima tolerada (CMT) a zinco foi 400 mg L⁻¹, diferindo, entretanto, nos PC, na concentração de 200 mg L⁻¹ (UFLA-01-486: PC=2, UFLA-01-510: PC=1) (Figura 2). Como *Azorhizobium* é restrito a hospedeiros do gênero *Sesbania*, não foi possível a comparação entre subfamílias. Esta CMT (400 mg L⁻¹) também foi encontrada pelas estirpes e isolados de *Azorhizobium* mais tolerantes a Zn estudados por Trannin (1999). A CMT a Zn por todos representantes de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* foi 500 mg L⁻¹ (Figura 3). Nesta concentração, todas estirpes/isolados de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* oriundos de Cesalpinoideae tiveram os maiores PC (2), enquanto os representantes oriundos de Papilionoideae e Mimosoideae tiveram PC 1; *Mesorhizobium* obteve PC 2 na CMT a Zn. Como *Mesorhizobium* teve apenas uma representante, a estirpe BR-3804 (Cesalpinoideae) não pode ser comparada com outras de mesmo gênero que tivessem sido isoladas de espécies de outras SF. Já os isolados de *Rhizobium* testados por Angle et al. (1993) mostraram ser menos tolerantes a Zn, apresentando CMT de 100 mg L⁻¹. A maior tolerância de estirpes oriundas da subfamília Cesalpinoideae a estresses também foi verificada por Silva e Franco (1984). Estes autores verificaram que das 211 estirpes de *Rhizobium* sp. testadas em meio de cultura sob condições de acidez, 85,7%, 48,8% e 28,0% isoladas, respectivamente, das SF Cesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae cresceram em meio de cultura com pH 4,6 com e sem 50 μM Al⁺³, e uma estirpe cresceu na ausência, mas não cresceu na presença de Al⁺³. De *Bradyrhizobium*, a estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, oriundos de Mimosoideae, foram os mais tolerantes a Zn,

atingindo a CMT de 800 mg L⁻¹, enquanto os outros representantes deste gênero atingiram a CMT de 600 mg L⁻¹, sendo que nove destes tiveram PC 2 nesta concentração, e o restante PC 1 (Figura 6). Todos os representantes da SF Cesalpinoideae tiveram PC 1 na concentração de 600 mg L⁻¹ de Zn, e os da SF Mimosoideae que tiveram PC 2 nesta concentração são de hospedeiros nativos da Amazônia. A CMT de 800 mg L⁻¹ também foi verificada por Trannin (1999) para as estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* mais tolerantes a Zn. No estudo de Angle et al. (1993), a espécie de *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium japonicum*) mais tolerante a zinco apresentou CMT de 500 mg L⁻¹, no entanto, esta foi a maior concentração testada por estes autores.

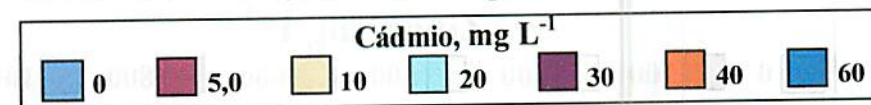
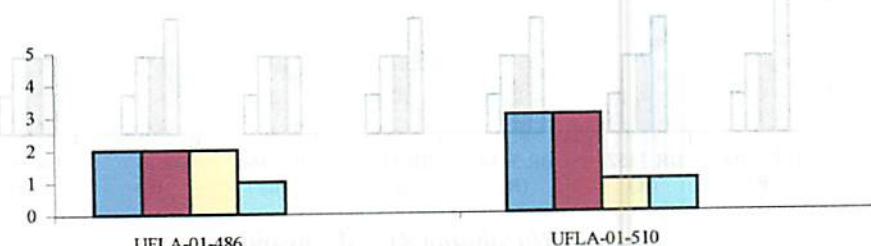
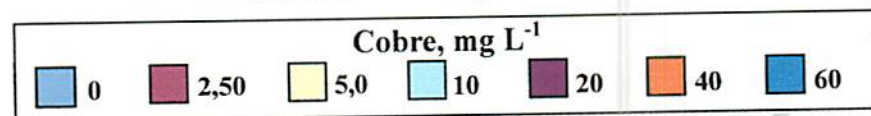
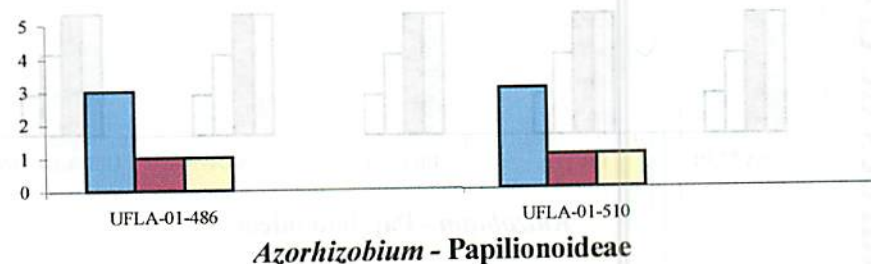
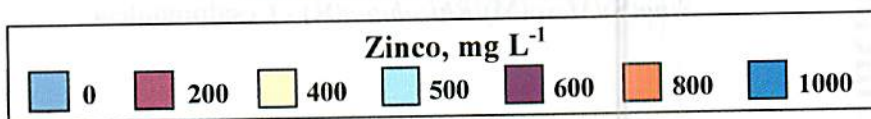
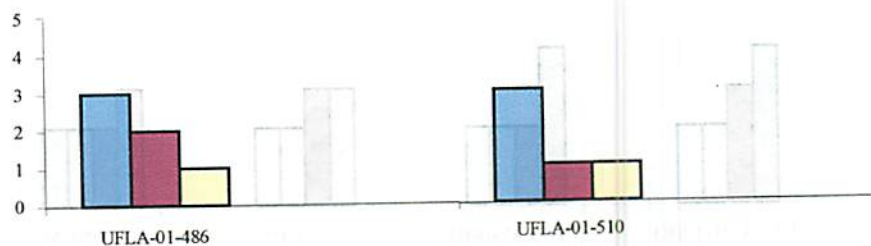
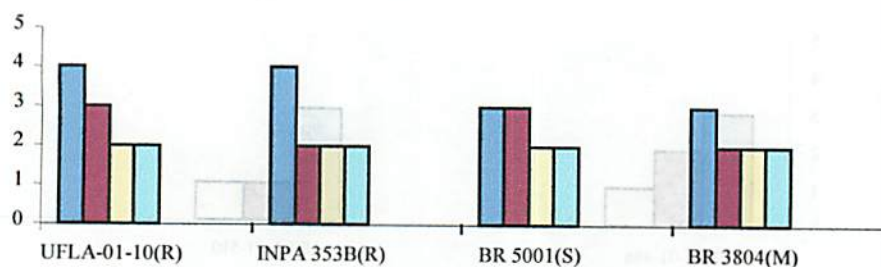
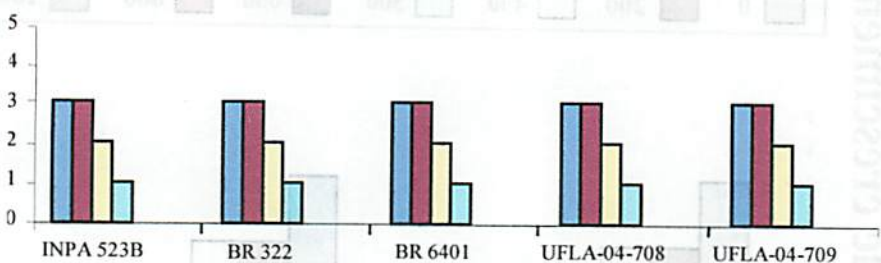


FIGURA 2. Padrões de crescimento de isolados de *Azorhizobium* expostos a concentrações de zinco, cobre e cádmio (mg L⁻¹) em meio YMA modificado.

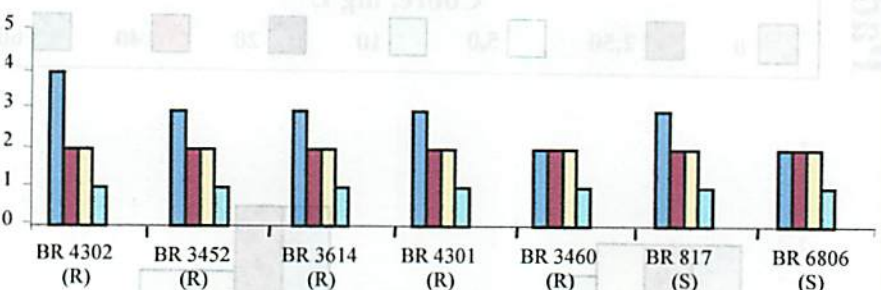
Padrões de crescimento



Sino(S)/Meso(M)/Rhizobium(R) - Cesalpinoideae



Rhizobium - Papilionoideae



Sino(S)/Rhizobium(R) - Mimosoideae

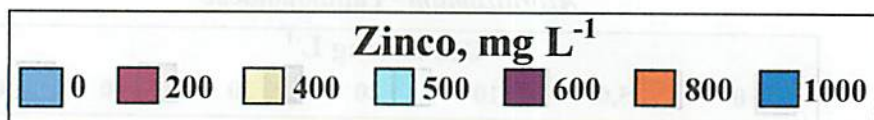


FIGURA 3. Padrões de crescimento de estirpes e isolados de *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* expostos a concentrações de zinco (mg L⁻¹) em meio YMA modificado.

Padrões de crescimento

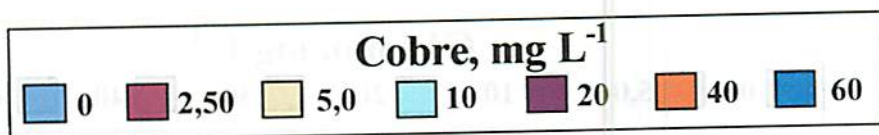
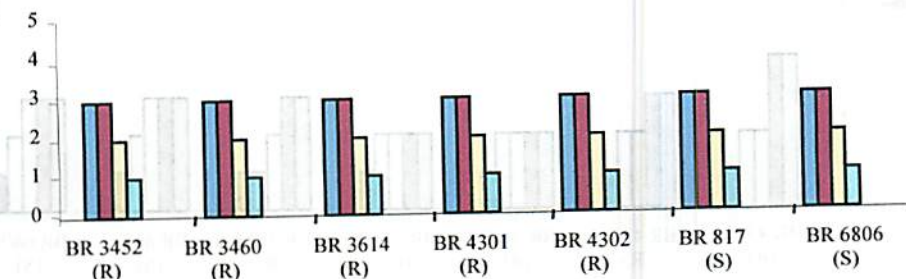
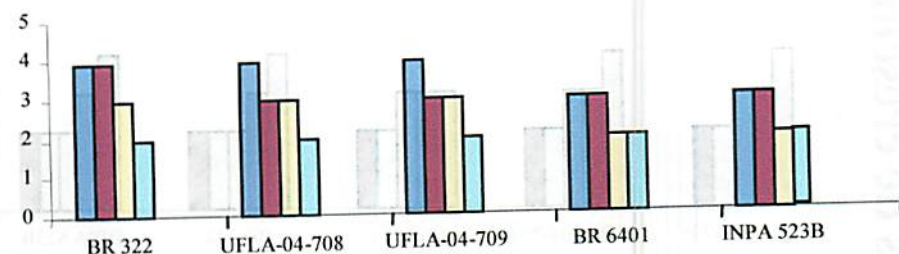
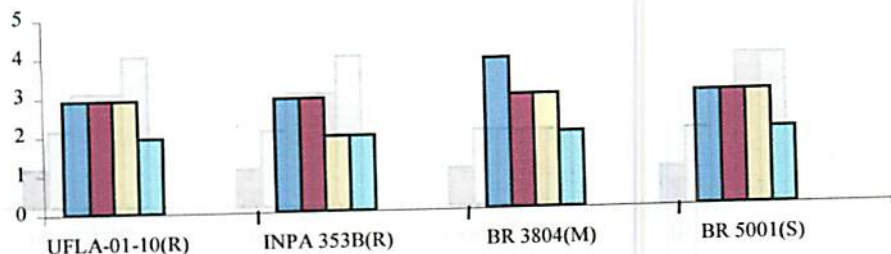


FIGURA 4. Padrões de crescimento de estirpes e isolados de *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* expostos a concentrações de cobre (mg L⁻¹) em meio YMA modificado.

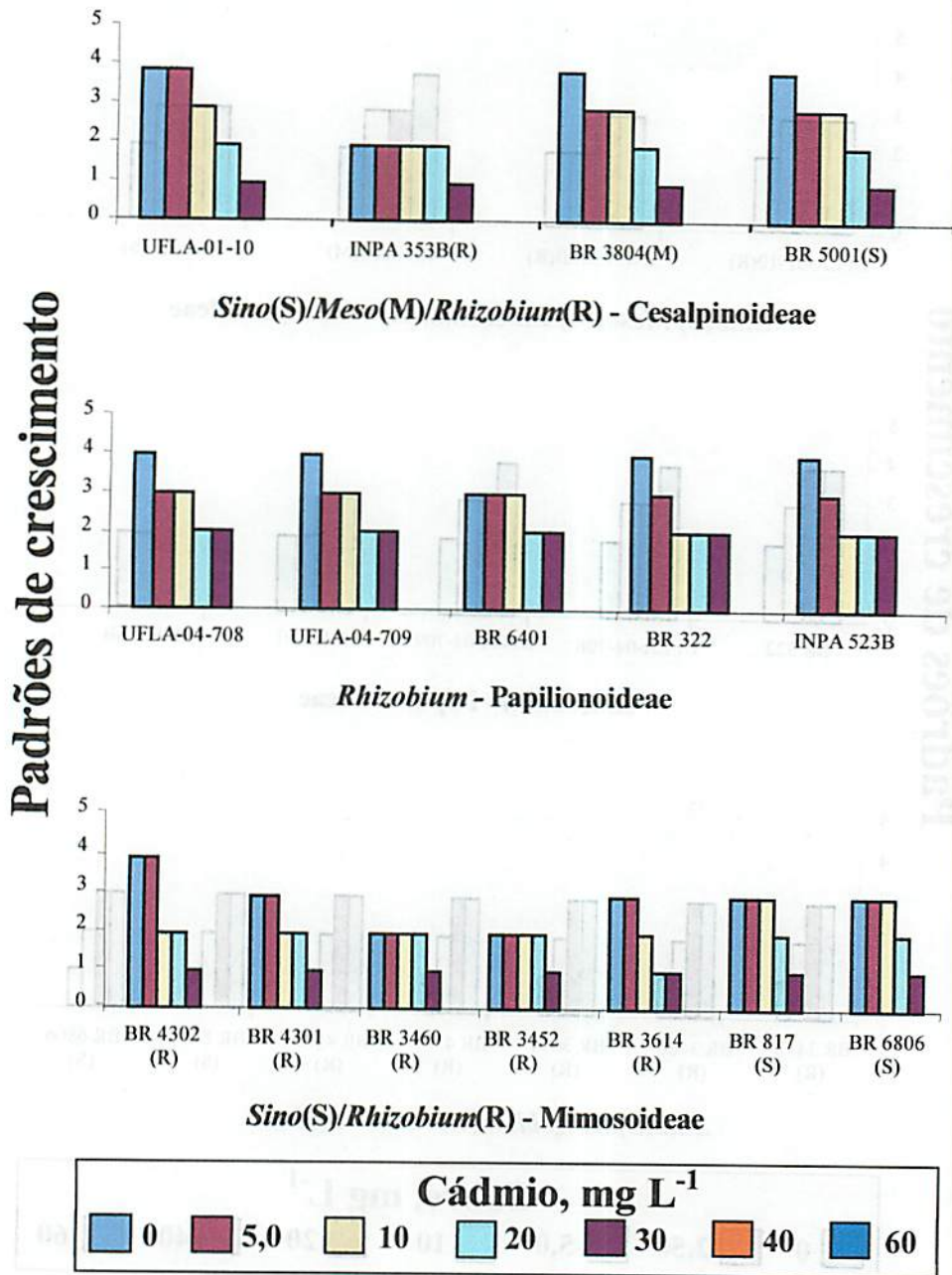


FIGURA 5. Padrões de crescimento de estirpes e isolados de *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* expostos a concentrações de cádmio (mg L^{-1}) em meio YMA modificado.

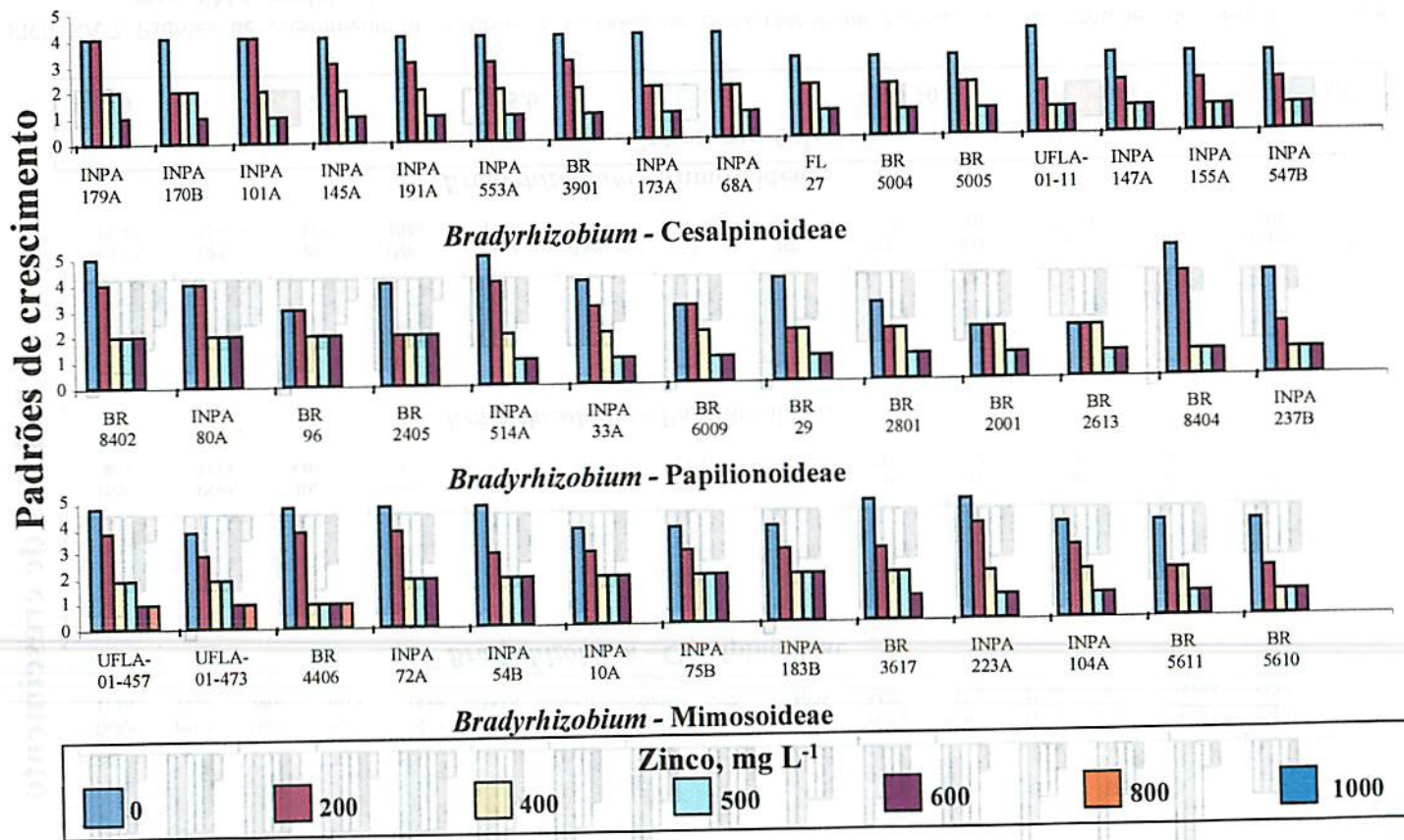


FIGURA 6. Padrões de crescimento de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* expostos a concentrações de zinco (mg L⁻¹) em meio YMA modificado.

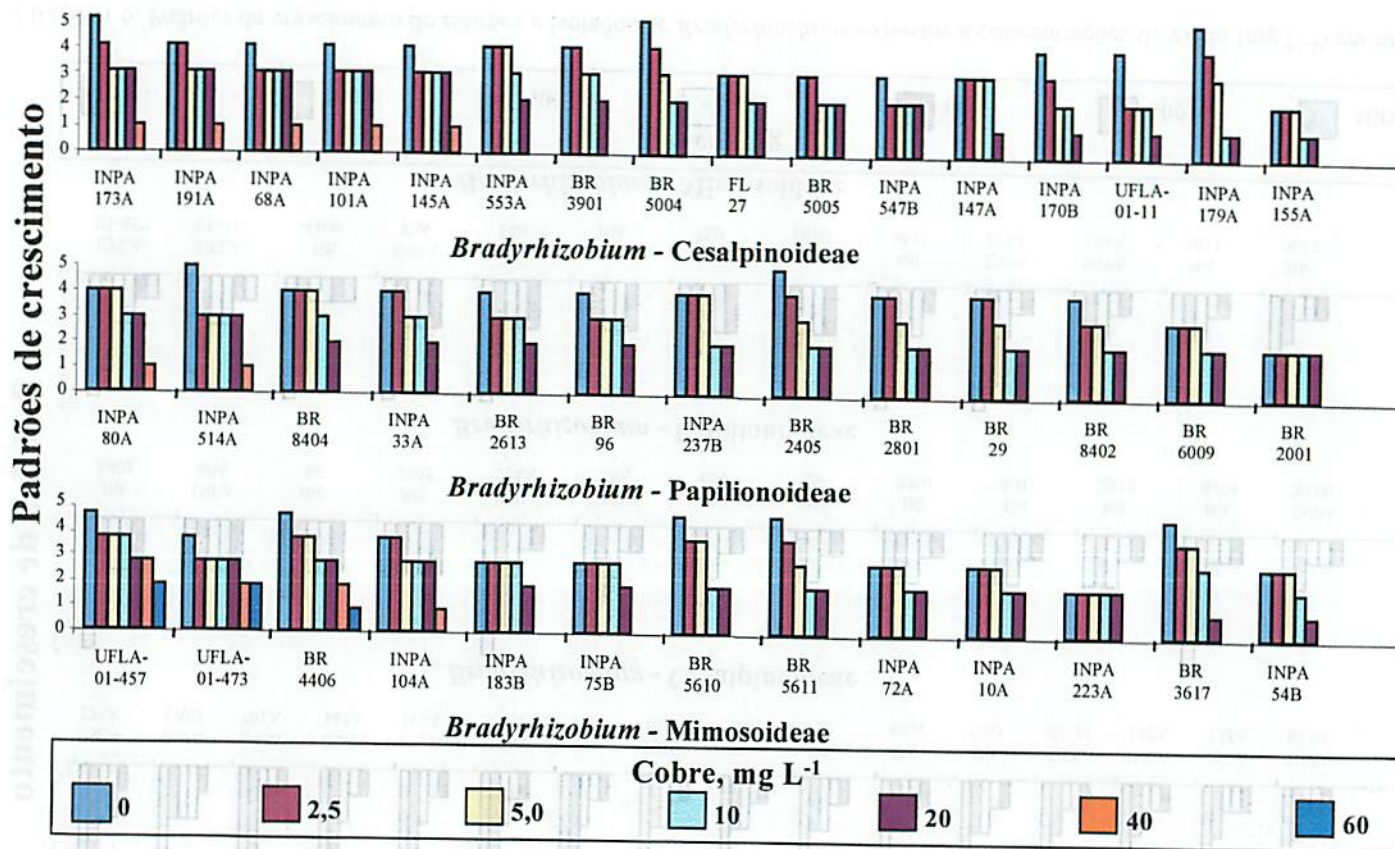


FIGURA 7. Padrões de crescimento de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* expostos a concentrações de cobre (mg L⁻¹) em meio YMA modificado.

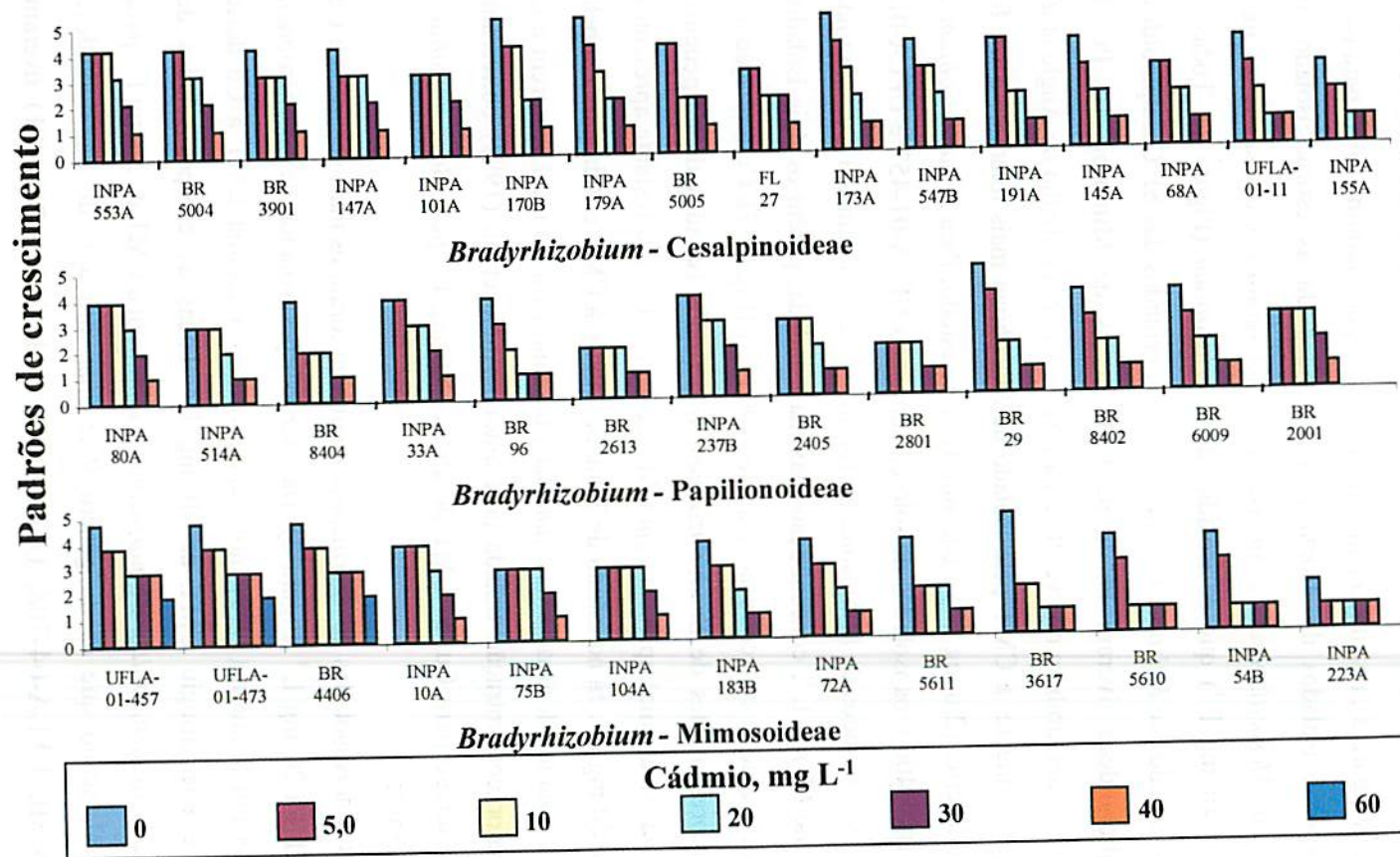


FIGURA 8. Padrões de crescimento de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* expostos a concentrações de cádmio (mg L⁻¹) em meio YMA modificado

Os isolados de *Azorhizobium* foram muito sensíveis ao Cu com CMT de 5 mg L⁻¹ (Figura 2), resultado também encontrado por Trannin (1999) para todas as estirpes e isolados de *Azorhizobium* testados. Já as estirpes/isolados de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* toleraram o Cu duas vezes mais (CMT = 10 mg L⁻¹) que os isolados de *Azorhizobium* (Figura 4). Todas as estirpes/isolados de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* oriundos das SF Cesalpinoideae e Papilionoideae tiveram PC 2 na CMT, e os de Mimosoideae, PC 1; *Mesorhizobium* também obteve PC 2 na CMT a Cu. No trabalho de Angle et al. (1993), novamente, a CMT pelo isolado de *Rhizobium* mais tolerante a Cu foi bastante inferior (2,0 mg L⁻¹) à encontrada neste estudo. Para *Bradyrhizobium*, a estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, os três oriundos de Mimosoideae, foram os mais tolerantes a Cu, atingindo a CMT de 60 mg L⁻¹, concentração máxima estudada, porém os dois isolados tiveram PC 2 nesta concentração, e a BR-4406 PC 1 (Figura 7). Com relação aos outros representantes de *Bradyrhizobium*, oito (todos isolados de hospedeiros nativos da Amazônia) apresentaram CMT de 40 mg L⁻¹, e o restante apresentou CMT de 20 mg L⁻¹. Já no estudo de Trannin (1999), a CMT obtida para Cu pela estirpe e isolados de *Bradyrhizobium* mais tolerantes foi 40 mg L⁻¹; porém esta foi a maior concentração testada pela autora. Angle et al. (1993) obtiveram, como resultado para Cu, a CMT de apenas 5,0 mg L⁻¹ pelo *Bradyrhizobium* mais tolerante.

Os dois isolados de *Azorhizobium* também foram os mais sensíveis a Cd e a CMT foi 20 mg L⁻¹ (Figura 2). Das dez estirpes/isolados de *Azorhizobium* utilizadas por Trannin (1999), nove apresentaram a mesma CMT a Cd deste estudo, e uma atingiu CMT de 30 mg L⁻¹. Todas as estirpes/isolados de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* atingiram a CMT de 30 mg L⁻¹ para este metal, sendo que os do gênero *Rhizobium* oriundos de Papilionoideae (INPA-523B, UFLA-04-708, UFLA-04-709, BR-322 e BR-6401) tiveram

maior PC (2) nesta concentração (Figura 5). No trabalho de Angle et al. (1993), como aconteceu com zinco e cobre, a CMT atingida pelos isolados de *Rhizobium* mais tolerantes a Cd foi bastante inferior (2,5 mg L⁻¹) à obtida no presente estudo. Para *Bradyrhizobium*, a estirpe e isolados de solo contaminado mais tolerantes a Zn e Cu também foram mais tolerantes a Cd, apresentando CMT de 60 mg L⁻¹, enquanto os demais representantes deste gênero toleraram até 40 mg L⁻¹, todos com PC 1 (Figura 8). No estudo de Trannin (1999), a CMT a Cd pela estirpe e isolados de *Bradyrhizobium* mais tolerantes foi 40 mg L⁻¹; porém, como ocorreu com cobre, esta foi a maior concentração testada pela autora. Já Angle et al. (1993) obtiveram, como resultado para Cd, a CMT de apenas 7,5 mg L⁻¹ pelo *Bradyrhizobium* mais tolerante. Borges e Wollum (1980; 1981), ao examinarem a tolerância a Cd de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* simbiote de soja, verificaram que as CMT variaram de 10 a 90 mg L⁻¹. Isto sugere que concentrações mais elevadas de Cd (e também de Cu) poderiam ser testadas para a estirpe e isolados mais tolerantes de *Bradyrhizobium* (BR-4406, UFLA-01-457 e UFLA-01-473) verificados neste estudo, que toleraram até 60 mg L⁻¹ de Cd e Cu, concentrações máximas estudadas.

Dentre as estirpes e isolados estudados por Trannin (1999), e que também foram testados no presente estudo, UFLA-01-457, UFLA-01-510, BR-3617 e BR-4406, a estirpe BR-3617 foi a única que apresentou resultado diferente. No presente estudo, a CMT a Cd por esta estirpe foi 40 mg L⁻¹, enquanto Trannin (1999) encontrou 30 mg L⁻¹, resultado que pode ser devido à utilização, neste estudo, de uma concentração maior de células desta estirpe no processo de inoculação.

Apesar da CMT aos três metais ter sido a mesma para todas as estirpes e isolados dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, os representantes da SF Mimosoideae mostraram ser mais sensíveis, obtendo PC 1 para todos metais

nesta concentração. A ausência de diferenças entre estirpes/isolados dentro dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, quanto à CMT aos metais, pode ser atribuída ao fato de não terem sido testados isolados de solos contaminados, diminuindo, com isto, a possibilidade de serem encontradas diferenças quanto à tolerância a metais; no caso do gênero *Azorhizobium*, essa ausência de diferenças pode ser devida à não utilização de isolados de solos não contaminados. Para *Bradyrhizobium*, não houve influências das SF na tolerância aos metais.

A ordem de toxicidade dos metais a todas as estirpes e isolados estudados foi Cu>Cd>Zn, concordando com os resultados de Chaudri, McGrath e Giller (1992), Angle et al. (1993) e Trannin (1999).

A estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e isolados de hospedeiros do gênero *Enterolobium*, apresentaram maiores PC, mostrando-se mais tolerantes a todos os metais que as estirpes e isolados deste e dos demais gêneros testados. Trannin (1999), ao avaliar a tolerância a Cu, Zn e Cd em meio de cultura de dez estirpes/isolados do gênero *Bradyrhizobium* e que foram isolados de hospedeiros do gênero *Enterolobium*, verificou que apenas quatro bactérias diazotróficas (BR-4406, UFLA-01-456, UFLA-01-457 e UFLA-01-469) atingiram a CMT a estes metais. Ao contrário de UFLA-01-457 e UFLA-01-473, os outros dois isolados de solo contaminado (UFLA-01-486 e UFLA-01-510) apresentaram grande sensibilidade aos metais.

Bradyrhizobium apresentou maior variação de PC que *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, quando exposto aos metais; como o gênero *Mesorhizobium* teve apenas um representante, não foi avaliada a variação em seu PC. Houve inibição de crescimento com o aumento nas concentrações dos metais, o que revelou que os isolados de *Azorhizobium*, seguidos das

estirpes/isolados de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* foram mais sensíveis a todos os metais estudados comparados a *Bradyrhizobium*.

As doses de toxidez DT_{25} e DT_{50} , definidas como aquelas exigidas para reduzir o PC do rizóbio em 25% e 50%, respectivamente, foram estimadas com base nas equações de regressão ajustadas para os valores dos padrões de crescimento relativos para cada estirpe/isolado (Tabelas 1A, 2A e 3A). Os valores obtidos mostram que algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd, apresentaram comportamento diferenciado, ou seja, DT_{25} e DT_{50} diferentes (Tabelas 4, 5 e 6). Os dois isolados de *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510), por exemplo, que atingiram CMT de 400 mg L⁻¹ a Zn (Figura 2), apresentaram DT_{25} e DT_{50} diferentes. O isolado UFLA-01-510 mostrou-se mais sensível a Zn, já que as concentrações necessárias para redução dos padrões de crescimento em 25% e 50% foram menores (Tabela 4).

TABELA 4. Doses de toxidez (mg L⁻¹) de Zn, Cu e Cd em meio de cultura para inibição de 25% (DT_{25}) e 50% (DT_{50}) do padrão de crescimento dos isolados de *Azorhizobium*.

Isolado	DT_{25}			DT_{50}		
	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd
UFLA-01-486	161	1,3	14,9	291	2,8	21,0
UFLA-01-510	62,3	1,3	15,4	207	2,8	24,8

TABELA 5. Doses de toxidez (mg L⁻¹) de Zn, Cu e Cd em meio de cultura para inibição de 25% (DT₂₅) e 50% (DT₅₀) do padrão de crescimento das estirpes/isolados de rizóbio oriundos de diferentes subfamílias.

Estirpe/Isolado	DT ₂₅			DT ₅₀		
	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd
Subfamília Cesalpinoideae						
UFLA-01-10 ^(R)	249	9,6	12,9	452	10,7	20,3
INPA 353B ^(R)	109	8,4	28,9	262	12,3	30,0
BR 3804 ^(M)	204	3,4	8,1	418	7,8	18,6
BR 5001 ^(S)	421	9,6	8,1	565	10,7	18,6
Subfamília Papilionoideae						
UFLA-04-708 ^(R)	345	3,5	8,6	452	7,9	20,4
UFLA-04-709 ^(R)	345	3,5	8,6	452	7,9	20,4
INPA 523B ^(R)	345	8,4	4,1	452	12,3	15,4
BR 322 ^(R)	345	6,2	4,1	452	9,7	15,4
BR 6401 ^(R)	345	7,1	29,6	452	13,0	30,7
Subfamília Mimosoideae						
BR 3452 ^(R)	241	5,2	28,9	437	7,5	30,0
BR 3460 ^(R)	466	5,2	28,9	605	7,5	30,0
BR 3614 ^(R)	241	5,2	9,2	437	7,5	18,6
BR 4301 ^(R)	241	5,2	13,9	437	7,5	23,9
BR 4302 ^(R)	108	5,2	8,8	257	7,5	17,9
BR 817 ^(S)	241	5,2	18,9	437	7,5	25,3
BR 6806 ^(S)	466	5,2	18,9	605	7,5	25,3

^(R): *Rhizobium*; ^(M): *Mesorhizobium*; ^(S): *Sinorhizobium*

TABELA 6. Doses de toxidez (mg L^{-1}) de Zn, Cu e Cd em meio de cultura para inibição de 25% (DT_{25}) e 50% (DT_{50}) do padrão de crescimento das estirpes/isolados de *Bradyrhizobium* oriundos de diferentes subfamílias.

Estirpe/Isolado	DT_{25}			DT_{50}		
	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd
Subfamília Cesalpinoideae						
UFLA-01-11	92,6	1,0	4,5	228	6,3	11,2
FL 27	244	14,5	20,5	447	24,8	33,6
INPA 68A	64,4	18,5	11,9	247	30,3	25,1
INPA 101A	331	18,5	27,1	440	30,3	35,6
INPA 145A	222	18,5	3,7	387	30,3	15,4
INPA 147A	141	18,2	12,2	322	19,3	28,1
INPA 155A	141	11,8	3,7	322	18,6	16,0
INPA 170B	78,0	1,7	8,7	280	7,8	20,2
INPA 173A	64,4	3,8	6,14	247	16,0	14,8
INPA 179A	336	2,6	4,7	467	6,0	16,7
INPA 191A	222	11,1	9,3	387	25,2	20,1
INPA 547B	141	3,6	7,85	322	14,7	19,1
INPA 553A	222	12,5	21,3	387	19,3	29,9
BR 3901	222	9,1	12,2	387	19,7	28,1
BR 5004	244	3,4	17,1	447	9,4	29,1
BR 5005	244	8,1	9,5	447	18,9	23,2
Subfamília Papilionoideae						
INPA 33A	222	9,1	17,1	387	19,7	29,1
INPA 80A	360	16,9	21,3	536	28,6	29,9
INPA 237B	92,6	11,8	17,1	228	18,6	29,1
INPA 514A	229	2,4	21,0	359	14,2	30,2
BR 29	64,4	7,3	4,7	247	16,6	11,9
BR 96	471	10,1	4,5	663	19,6	11,2
BR 2001	453	26,6	27,1	595	38,5	35,6
BR 2613	453	10,1	28,0	595	19,6	37,8
BR 2801	244	7,3	28,0	447	16,6	37,8
BR 2405	126	3,4	21,0	361	9,4	30,2
BR 6009	365	14,5	3,7	486	24,8	15,4
BR 8402	245	3,3	3,7	440	13,3	15,4
BR 8404	222	12,5	1,9	348	19,3	12,8
Subfamília Mimosoideae						
UFLA-01-457	174	9,8	10,9	371	45,5	45,8
UFLA-01-473	198	8,5	10,9	430	60,0	45,8
INPA 10A	202	14,5	21,3	443	24,8	29,9
INPA 54B	83,5	10,05	2,1	289	15,3	10,1
INPA 72A	245	14,5	7,85	440	24,8	19,1
INPA 75B	202	19,6	27,1	443	20,7	35,6
INPA 104A	222	11,1	27,1	387	25,2	35,6
INPA 183B	202	19,6	7,85	443	20,7	19,1
INPA 223A	229	26,6	2,3	359	38,5	17,7
BR 3617	75,9	4,7	0,9	264	10,9	6,6
BR 4406	128	5,7	10,9	279	24,7	45,8
BR 5610	92,6	4,4	2,1	228	11,0	10,1
BR 5611	64,4	3,4	1,9	247	9,4	12,8

As estirpes/isolados de rizóbio mais sensíveis a Zn (Tabelas 4, 5 e 6), ou seja, que sofreram inibição em 25% no padrão de crescimento mesmo quando expostos às menores concentrações do metal (menores DT_{25}), e respectivas doses de toxidez, foram: UFLA-01-510 (62,3 mg L⁻¹), INPA 68A (64,4 mg L⁻¹), INPA 173A (64,4 mg L⁻¹), BR 29 (64,4 mg L⁻¹) e BR 5611 (64,4 mg L⁻¹). Com relação a Cu, as estirpes/isolados mais sensíveis, e respectivas doses de toxidez, foram: UFLA-01-11 (1,0 mg L⁻¹), UFLA-01-486 (1,3 mg L⁻¹), UFLA-01-510 (1,3 mg L⁻¹), INPA 170B (1,7 mg L⁻¹), INPA 514A (2,4 mg L⁻¹) e INPA 179A (2,6 mg L⁻¹). Para Cd, as estirpes/isolados mais sensíveis, e respectivas doses de toxidez, foram: BR 3617 (0,9 mg L⁻¹), BR 5611 (1,9 mg L⁻¹), BR 8404 (1,9 mg L⁻¹), INPA 54B (2,1 mg L⁻¹), BR 5610 (2,1 mg L⁻¹) e INPA 223A (2,3 mg L⁻¹).

As estirpes/isolados de rizóbio mais tolerantes a Zn (Tabelas 4, 5 e 6), ou seja, que só sofreram inibição em 50% no padrão de crescimento quando expostos às maiores concentrações do metal (maiores DT_{50}), e respectivas doses de toxidez, foram: BR 96 (663 mg L⁻¹), BR 3460 (605 mg L⁻¹), BR 6806 (605 mg L⁻¹), BR 2001 (595 mg L⁻¹), BR 2613 (595 mg L⁻¹) e BR 3804 (586 mg L⁻¹). Com relação a Cu, as estirpes/isolados mais tolerantes, e respectivas doses de toxidez, foram: UFLA-01-473 (60,0 mg L⁻¹), UFLA-01-457 (45,5 mg L⁻¹), BR 2001 (38,5 mg L⁻¹) e INPA 223 A (38,5 mg L⁻¹). Para Cd, as estirpes/isolados mais tolerantes, e respectivas doses de toxidez, foram: UFLA-01-457 (45,8 mg L⁻¹), UFLA-01-473 (45,8 mg L⁻¹) e BR 4406 (45,8 mg L⁻¹), BR 2613 (37,8 mg L⁻¹) e BR 2801 (37,8 mg L⁻¹).

As estirpes/isolados mais sensíveis (menores DT_{25}) e mais tolerantes (maiores DT_{50}) a Zn, Cu e Cd pertencem, predominantemente, a *Bradyrhizobium*, sendo este o gênero que apresentou as maiores CMT a estes metais (Figuras 2 a 8). Nos estudos de Angle et al. (1993) e Trannin (1999), *Bradyrhizobium* também foi mais tolerante a metais pesados que *Rhizobium* e

Azorhizobium, respectivamente. *Azorhizobium*, gênero que apresentou as menores CMT aos três metais, também obteve as menores DT₅₀.

Não houve influências das procedências de subfamílias e locais na DT₂₅ e DT₅₀ a metais.

Dentre os metais pesados estudados, Zn foi o que apresentou maiores valores de DT₂₅ e DT₅₀, o que indica a menor fitotoxicidade desse elemento.

As diferenças na tolerância a metais entre *Bradyrhizobium* (crescimento lento) e *Rhizobium* (crescimento rápido) que já são conhecidas (Angle et al., 1993; Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Borges e Wollum, 1980 e 1981), estão associadas à densa cápsula polissacarídica ao redor das células, especialmente de *Bradyrhizobium*, que retém os metais, impedindo que sejam absorvidos (Beveridge e Doyle, 1989, citados por Angle et al., 1993). Além disso, *Bradyrhizobium* causa reação alcalina no meio, o que pode reduzir a solubilidade e atividade dos metais (Alexander, 1977). Ao contrário, *Rhizobium* geralmente diminui o pH em seu meio, aumentando a disponibilidade e toxicidade dos metais. Por outro lado, *Azorhizobium*, que apresenta crescimento intermediário, apesar de produzir menos polissacarídeos extracelulares que *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, promove maior alcalinização do meio que estes dois gêneros (Dreyfus, Garcia e Gillis, 1988). No entanto, o estudo envolvendo os cinco gêneros (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*) quanto à toxicidade dos metais "in vitro" está sendo realizado pela primeira vez, e pelos resultados obtidos, verificou-se que na concentração máxima tolerada aos metais, prevaleceu a maior produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) pelo *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, em detrimento da alcalinização do meio por *Azorhizobium*. Já a maior tolerância de *Bradyrhizobium* que *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, pode ser atribuída à produção de EPS associada à sua capacidade de alcalinizar o meio. Portanto, a ordem de tolerância aos metais, considerando-se as concentrações máximas toleradas, foi *Bradyrhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Azorhizobium*.

4 CONCLUSÕES

- A estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, e isolados de hospedeiros do gênero *Enterolobium* foram os mais tolerantes (maiores concentrações máximas toleradas) a Zn, Cu e Cd.
- Não houve influências das subfamílias e locais na concentração máxima tolerada a metais.
- A ordem de toxicidade dos metais a todas as estirpes e isolados de rizóbio estudados foi: Cu>Cd>Zn.
- A ordem de tolerância aos metais pesados, considerando-se as concentrações máximas toleradas, foi *Bradyrhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Azorhizobium*.
- A DT₂₅ e DT₅₀ foram úteis para diferenciarem algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. New York: J.Wiley, 1977. 467p.
- ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.55, n.8, p.2101-2104, Sept. 1989.
- ANGLE, J.S.; MCGRATH, S.P.; CHAUDRI, A.M.; CHANEY, R.L.; GILLER, K.E. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.5, p.575-580, May 1993.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, v.8, p.99-145, 1980.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Nickel toxicity to estuarine marine fungi and amelioration by magnesium in sea water. *Water Air Soil Pollut*, Dordrecht, v.19, p.193-202, 1983.
- BORGES, A.; WOLLUM, A. A field study of a soil-soybean plant-*Rhizobium* system amended with cadmium. *Journal Environmental Quality*, Madison, v.9, p.420-423, 1980.
- BORGES, A.; WOLLUM, A. Effect of cadmium on symbiotic soybean plants. *Journal Environmental Quality*, Madison, v.10, p.216-221, 1981.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past application of sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.2, p.83-88, Feb. 1992.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Screening of isolates and strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for heavy metal resistance using buffered media. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Oxford, v. 12, p. 1643-1651, 1993a.

- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E.; RIETZ, E.; SAUERBECK, D.R. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.3, p.301-309, Mar. 1993b.
- COLE, M.A.; ELKAN, G.H. Transmissible resistance to Penicillin G, Neomycin, and Chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v.4, p.248-253, Sept. 1973.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.38, n.1, p.89-98, Jan. 1988.
- DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal tolerant bacterial population from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.15, n.3, p.243-250, May/June 1983.
- KINKLE, B.K.; ANGLE, J.S.; KEYSER, H.H. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.53, n.2, p.315-319, Feb. 1987.
- MARTENSSON, A.M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.5, p.435-445, May 1992.
- MOREIRA, F.M.S. Caracterização de estirpes de rizóbio isolados de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. Rio de Janeiro: UFRJ, 1991. 160p. (Tese-Doutorado em Ciência do Solo).
- RÓZYCKI, H.A. Rapid Agar-diffusion Test for Quantifying the Toxic Effects of Copper on Microorganisms. *Acta Microbiologica Polonica, Gagarina*, v.41, n.1/2, p.469-477-64, Aug. 1992.
- SILVA, G.G.da; FRANCO, A.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. de leguminosae florestais em meio de cultura tolerantes à acidez e à toxidez do Al. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.19, s/n, p.169-173, jun., 1984.

TRANNIN, I.C.B. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a metais pesados "in vitro" e em simbiose. Lavras: UFLA, 1999. 125 p. (Dissertação-Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

VINCENT, J.M. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. London: JBP, 1970. 164p. (Handlbook, 15).

CAPÍTULO 3

SOBREVIVÊNCIA DE *BRADYRHIZOBIUM* E *AZORHIZOBIUM* EM SOLO CONTAMINADO COM METAIS PESADOS

RESUMO

MATSUDA, Alexandre. Sobrevivência de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* em solo contaminado com metais pesados. Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)

O estudo foi conduzido no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (MG), no período de novembro/1999 a janeiro/2000, com o objetivo de avaliar a sobrevivência saprofítica de estirpe e isolados de rizóbio em solo contaminado com metais pesados. Além disso, foi estudada a possível relação entre tolerância do rizóbio em meio de cultura e sua sobrevivência em solo contaminado. Foram utilizados dois dos três microrganismos mais tolerantes [BR-4406 (estirpe recomendada para inoculação de *Enterolobium*) e UFLA-01-457 (isolado de solo contaminado), ambos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*] e os dois mais sensíveis (UFLA-01-486 e UFLA-01-510, isolados de solo contaminado, pertencentes ao gênero *Azorhizobium*), selecionados previamente, em meio de cultura com metais pesados, de um grupo de 60 estirpes/isolados. Foram utilizadas três proporções [0, 15 e 45% (v/v)] de um solo contaminado (PSC) com Zn, Cd, Pb e Cu (18600, 135, 600 e 596 mg dm⁻³ extraídos por *aqua regia*, respectivamente), diluído em latossolo vermelho escuro (LE) de baixa fertilidade. Cada PSC foi inoculada com 20 mL de cultura em YEM (*Bradyrhizobium*: 1,2x10¹⁰ cel mL⁻¹; *Azorhizobium*: 10⁹ cel mL⁻¹) das estirpes mencionadas, testadas separadamente com três repetições. A avaliação do número de células viáveis nas diferentes PSC foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) a 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação, pelo método das diluições sucessivas e inoculação em placas com meio YMA. A sobrevivência de *Azorhizobium* foi mais afetada por metais pesados no solo do que a de *Bradyrhizobium*. Houve relação entre tolerância "in situ" e tolerância "in vitro". A porcentagem de células de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* que sobreviveram ao final de 28 dias de incubação, em 0%, 15% e 45% de PSC, respectivamente, foi: BR-4406: 95,8%, 83,3% e 20,4%, UFLA-01-457: 95,8%, 79,6% e 21,9%, UFLA-01-486: 164,4%, 1,7% e 0% e UFLA-01-510: 99%, 2,2% e 0%.

ABSTRACT

MATSUDA, Alexandre. Survival of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* in heavy metal contaminated soil. Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Dissertation - Master in Agronomy)

An experiment was carried out at Soil Science Department of the Federal University of Lavras (MG), from november/1999 to january/2000, aiming to evaluate the saprophytic survival of strain and isolates of rizobia, in heavy metal contaminated soil. Besides, it was studied the possible relationship between rhizobia tolerance in culture medium and its survival in contaminated soil. From a group of 60 strains/isolates tested for metal tolerance in YMA medium, two out of the three most tolerant microorganisms [BR-4406 (strain recommended as inoculant of *Enterolobium*) and UFLA-01-457 (isolated from contaminated soil), both belonging to the genus *Bradyrhizobium*] and the two most sensitive microorganisms (UFLA-01-486 and UFLA-01-510, both isolated from contaminated soil and belonging to the genus *Azorhizobium*) were selected. A heavy metal contaminated soil (18600 mg L⁻¹ Zn, 135 mg L⁻¹ Cd, 600 mg L⁻¹ Pb, and 596 mg L⁻¹ Cu, extracted by "aqua regia") was diluted in a low natural fertility Latosol (Oxisol) at different proportions (PCS): 0, 15 and 45 %. Each PCS was inoculated with 20 mL of culture in YM (*Bradyrhizobium*: 1.2x10¹⁰ cel mL⁻¹; *Azorhizobium*: 10⁹ cel mL⁻¹) of the above strains, tested separately with three replications. Evaluation of viable cell numbers in the different PCS was done by counting colony forming units (CFU) at 0, 7, 14, 21, and 28 days of incubation by the method of successive dilutions inoculated in YMA medium. The survival of *Azorhizobium* was more affected by heavy metals in soil than *Bradyrhizobium*. There was relationship between in situ and in vitro tolerance. The percentage of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* cells which survive to the end of 28 days of incubation, in 0%, 15%, and 45% of PCS, was respectively: BR-4406: 95.8%, 83.3% and 20.4%, UFLA-01-457: 95.8%, 79.6% and 21.9%, UFLA-01-486: 164.4%, 1.7% and 0% and UFLA-01-510: 99%, 2.2% and 0%.

1 INTRODUÇÃO

A exploração e industrialização de minérios são atividades de importância econômica mundial; no entanto, promovem a contaminação do solo por metais pesados, que em altas concentrações tornam-se tóxicos às plantas e à comunidade microbiana do solo. As leguminosas capazes de formar simbiose eficiente com rizóbio são espécies promissoras em programas de recuperação de solos contaminados. A probabilidade na formação de nódulos efetivos e, conseqüentemente, a ocorrência de fixação biológica do nitrogênio, em solo contaminado com metais pesados, é maior com a sobrevivência saprofítica de um grande número de células de rizóbio efetivo (Giller, McGrath e Hirsch, 1989).

Foi demonstrado, em áreas temperadas, que a tolerância do rizóbio a metais varia entre espécies e estirpe, sendo que a maioria dos trabalhos relatam dados sobre o gênero *Rhizobium*, e a contaminação geralmente é atribuída à adição ao solo de lodo de esgoto urbano contendo metais pesados. No entanto, a contaminação de solo com resíduos inorgânicos, como os rejeitos das indústrias metalúrgicas contendo elevadas concentrações de metais, necessita ser pesquisada em relação a rizóbio e fixação biológica de nitrogênio. Portanto, tornam-se necessários estudos voltados às contaminações por atividades industriais nos trópicos, onde existe ampla diversidade de simbioses rizóbio-leguminosas, favorecendo a seleção de genótipos promissores para os programas de reabilitação destes solos.

O presente estudo teve como objetivos: 1) avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* em solo contaminado com metais pesados por fonte inorgânica; 2) verificar se a tolerância em meio de cultura se relaciona à sobrevivência do rizóbio em solo contaminado com metais pesados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a sobrevivência de rizóbio em solo contaminado com metais pesados, utilizou-se *Bradyrhizobium* tolerante [BR-4406 (estirpe recomendada para inoculação de *Enterolobium*) e UFLA-01-457 (isolado de solo contaminado)], e *Azorhizobium* sensível [UFLA-01-486 e UFLA-01-510 (isolados de solo contaminado)], selecionados do experimento anterior.

O solo contaminado utilizado foi classificado por Ribeiro-Filho et al. (1999) como Latossolo Vermelho Amarelo Plíntico (LVp), proveniente da Companhia Mineira de Metais – CMM, com teores de metais atingindo 18600 mg/dm³; 135 mg/dm³; 600 mg/dm³ e 596 mg/dm³ de Zn, Cd, Pb e Cu, respectivamente, além de outros elementos com menores teores. Este solo foi misturado, em proporções de 0, 15 e 45% (v/v), com um Latossolo Vermelho Escuro (LE) não contaminado, coletado na camada superficial (0-20 cm), na região de Jaguará, MG. Estas misturas foram as mesmas utilizadas por Trannin (1999) e as características químicas e físicas se encontram na Tabela 1.

Depois de serem passadas em peneira de malha 2,0 mm, 200 g de cada mistura do solo das diferentes proporções de solo contaminado (PSC) foram autoclavadas individualmente em erlenmeyers (500 mL) tampados (4 repetições/PSC), durante 1 hora, a 120°C. Depois, cada 200 g das diferentes PSC foram inoculados com 20 mL de cultura em YEM (Vincent, 1970) da estirpe e dos isolados testados separadamente. Estas culturas foram produzidas em pH 6,8 e sob agitação orbital de 105 rpm, a 28°C, durante 4 dias para *Azorhizobium* (10^9 cel mL⁻¹, correspondente a 10^8 cel g⁻¹ solo) e 6 dias para *Bradyrhizobium* ($1,2 \times 10^{10}$ cel mL⁻¹, correspondente a $1,2 \times 10^9$ cel g⁻¹ solo); logo em seguida, o solo foi revolvido para garantir a distribuição uniforme das células de rizóbio. O

solo foi mantido com teor de umidade em torno de 70% do volume total de poros (VTP) por meio de pesagens e utilização de água destilada autoclavada.

TABELA 1. Características químicas e físicas das misturas dos solos LVp e LE contendo diferentes proporções de solo contaminado (PSC), após autoclavagem à 120°C durante 1 hora.

Características		PSC, %		
		0	15	45
Químicas				
pH	em água 1:2,5	5,8	5,9	6,2
P*	mg dm ⁻³	7,0	12,0	32,0
K*	mg dm ⁻³	131,0	179,0	192,0
Mn**	mg dm ⁻³	10,0	23,5	18,0
Fe**	mg dm ⁻³	21,7	6,9	1,4
Zn**	mg dm ⁻³	0,4	645,0	1235,0
Cu**	mg dm ⁻³	1,3	102,0	197,2
Cd**	mg dm ⁻³	0,1	15,0	64,0
Pb**	mg dm ⁻³	1,34	36,8	187,0
Ca	cmol _c dm ⁻³	2,9	4,1	2,5
Mg	cmol _c dm ⁻³	1,5	0,5	1,5
Al	cmol _c dm ⁻³	0,0	0,0	0,0
H+Al	cmol _c dm ⁻³	3,6	2,9	2,3
S.B.	cmol _c dm ⁻³	4,7	5,1	4,5
t	cmol _c dm ⁻³	4,7	5,1	4,5
T	cmol _c dm ⁻³	8,3	8,0	6,8
m	%	0,0	0,0	0,0
V	%	56,8	63,6	66,1
Físicas				
Areia	%	17,0	20,0	33,0
Silte	%	29,0	33,0	32,0
Argila	%	55,0	47,0	35,0
M.O.	dag kg ⁻¹	3,1	3,1	3,1

*, **: Extraído por Mehlich I e DTPA, respectivamente.

A avaliação do número de células viáveis da estirpe e isolado de *Bradyrhizobium* e dos isolados de *Azorhizobium*, em cada PSC, foi realizada por contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a 0; 7; 14; 21 e 28 dias após a inoculação, utilizando-se o método das diluições sucessivas de solo em solução salina e inoculação em meio YMA para contagem de UFC. Para isso, diluições em série foram preparadas colocando-se 5 g de amostra de solo em erlenmeyer de 250 ml contendo 95 ml de solução salina autoclavada à 120°C por 20 minutos (diluição 20⁻¹). Estes frascos foram agitados (200 rpm) por 30 minutos, em agitador de movimento circular horizontal, para dispersão das células bacterianas. Em seguida, efetuaram-se as diluições, retirando-se, com uma pipeta estéril, 1 mL da diluição 20⁻¹, que foi transferida para tubos de ensaio com 9 mL de solução salina estéril (diluição 10⁻¹) até a diluição 10⁻⁸ (Figura 1). Para contagens foram utilizadas as diluições 10⁻¹ a 10⁻⁸, e de cada diluição foram retiradas 3 alíquotas de 20 µL inoculadas em placas contendo meio YMA, divididas em 6 partes, de forma que cada placa possibilitasse a avaliação de duas diluições, com 3 repetições (Miles e Misra, 1938). Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de médias e regressão, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira Junior, 1984). Os modelos de regressão foram selecionados considerando-se o maior nível de significância.

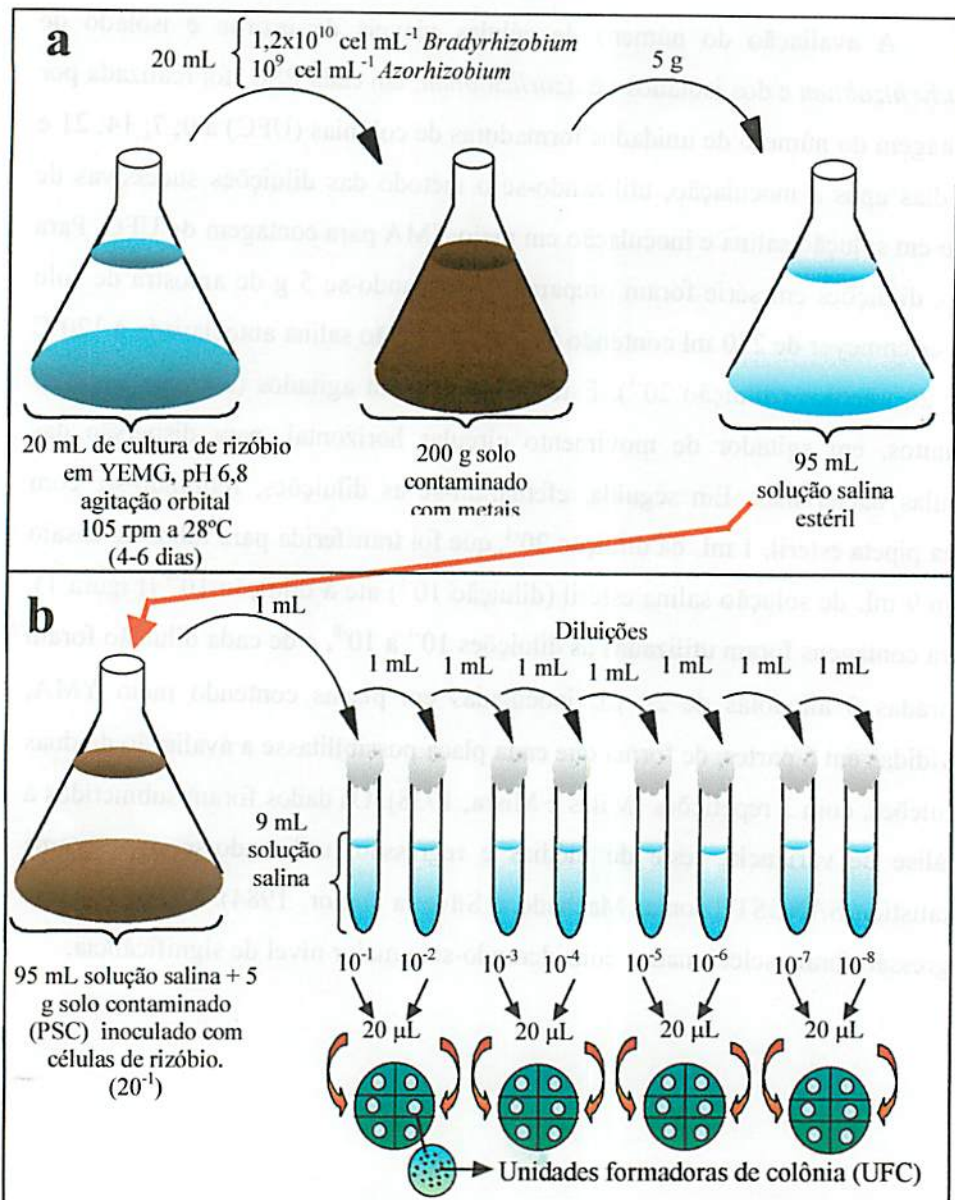


FIGURA 1. Diagrama esquemático (modificado de Trannin, 1999) da avaliação da sobrevivência de rizóbio em estado saprofítico em solo contaminado com metais pesados: a) cultivo de rizóbio em meio YEMG e inoculação em solo contaminado com metais; b) método das diluições sucessivas para determinar o número de UFC (Miles e Misra, 1938) de rizóbio em solo contaminado com metais, avaliado em 0; 7; 14; 21 e 28 dias de incubação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo resumo da ANAVA para número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, em função de diferentes períodos de incubação (PI), e mistura de solos contendo diferentes proporções de solo contaminado (PSC), podemos verificar que todos os tratamentos, bem como suas interações, exerceram efeitos significativos sobre o número de UFC dos representantes dos dois gêneros (Tabela 4A).

O efeito da interação EI x PI sobre o número de UFC foi analisado dentro de cada PSC, e encontra-se na Tabela 2. O comportamento de cada isolado e da estirpe em função dos períodos de incubação crescentes (dias) foi analisado por regressão polinomial dentro de cada PSC:

O número de UFC da estirpe BR-4406 e isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-510 não variaram no solo não contaminado com metais (Figura 2). Estes resultados diferem dos obtidos por Reddy, Cheng e Dunn (1983), segundo o qual a população de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 correspondeu a menos de 1% do inóculo inicial ($7,5 \times 10^7$ cel mL⁻¹) após 42 dias de incubação em solo com concentração não tóxica de metal. Já Trannin (1999) e Chaudri, McGrath e Giller (1992a), trabalhando com estirpes/isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, e isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, respectivamente, não observaram variação no número de UFC na ausência de metais, porém o substrato utilizado foi água deionizada estéril a pH 6,8. Crist et al. (1984), ao trabalhar com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* na ausência de fonte de carbono, verificaram que durante os primeiros dias após a inoculação em água destilada e incubação a 24°C, houve um aumento no número de células viáveis, e após dezesseis meses, o número de células permaneceu estável.

TABELA 2. Número médio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC, log mL⁻¹) de isolados de *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510) e estirpe/isolado de *Bradyrhizobium* (BR-4406 e UFLA-01-457), e regressões em função de períodos de incubação (dias) crescentes, em cada mistura de solos contendo diferentes proporções de solo contaminado.

Estirpe/ Isolado	Períodos de incubação, dias					Equação	R ²
	0	7	14	21	28		
	0% (solo não contaminado) UFC, log mL ⁻¹						
UFLA-01-457	9,11 a	9,04 a	9,13 a	9,10 a	9,06 a	s.a.	-
BR-4406	9,08 a	9,03 a	9,08 a	9,03 a	9,06 a	s.a.	-
UFLA-01-510	8,00 b	7,94 b	7,93 b	8,01 b	7,95 c	s.a.	-
UFLA-01-486	7,95 b	7,92 b	7,89 b	8,19 b	8,17 b	Y = 7,8793 + 0,0103 x	0,605**
	15% de solo contaminado UFC, log mL ⁻¹						
UFLA-01-457	9,08 a	8,97 a	8,97 a	8,96 a	8,98 a	s.a.	-
BR-4406	9,06 a	8,92 a	8,95 a	8,94 a	9,00 a	Y = 9,0448 - 0,0162 x + 0,0005 x ²	0,791*
UFLA-01-510	7,93 b	6,91 b	6,44 b	6,43 b	6,30 b	Y = 7,5487 - 0,0534 x	0,774**
UFLA-01-486	7,98 b	6,83 b	6,37 b	6,33 b	6,19 b	Y = 7,5580 - 0,0583 x	0,771**
	45% de solo contaminado UFC, log mL ⁻¹						
UFLA-01-457	9,10 a	8,92 a	8,94 a	8,74 a	8,42 a	Y = 9,1280 - 0,0218 x	0,878**
BR-4406	9,08 a	8,81 a	8,53 a	8,63 a	8,39 a	Y = 9,0673 - 0,0224 x	0,915**
UFLA-01-510	7,95 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	Y = 4,7700 - 0,2271 x	0,500**
UFLA-01-486	7,93 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	Y = 4,7580 - 0,2266 x	0,500**

Médias de UFC seguidas por letras iguais na vertical não diferem entre si, dentro de cada porcentagem de solo contaminado (Tuckey 1%); *,**: Significativos (P<0,05 e P<0,01, respectivamente); s.a.: sem ajuste.

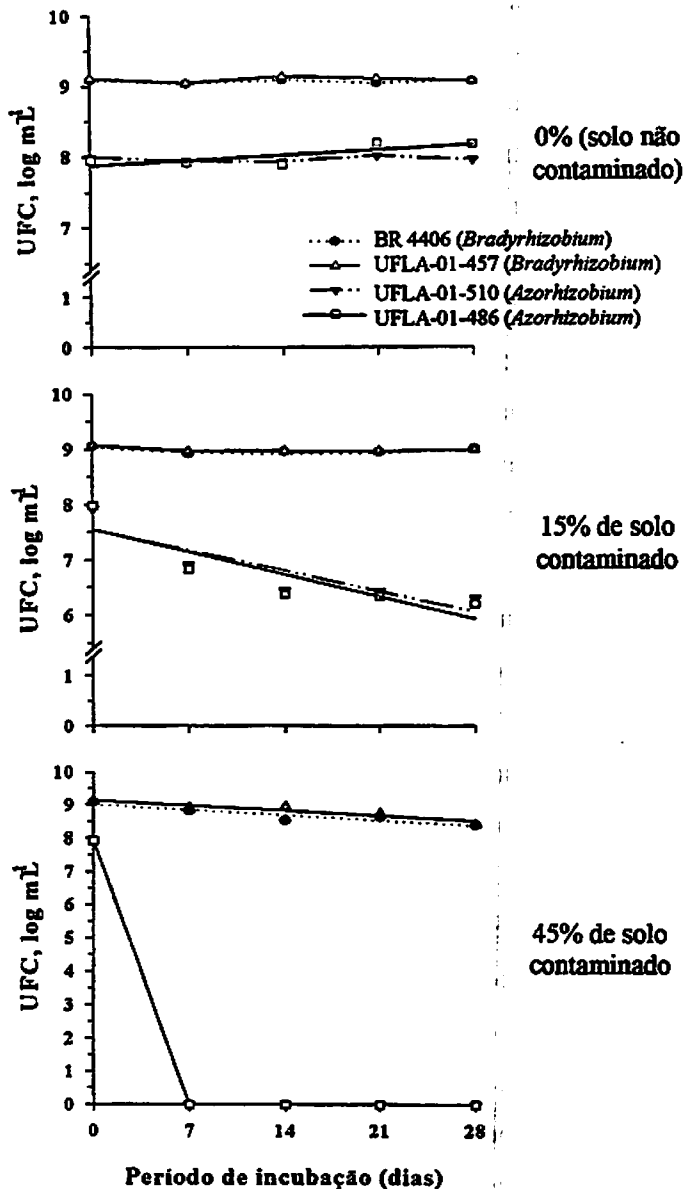


FIGURA 2. Número médio de UFC ($\log \text{mL}^{-1}$) de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* em função de período crescente de incubação (dias), em cada mistura de solos contendo diferentes proporções de solo contaminado (0%; 15% e 45%). As equações de regressão e coeficientes de determinação encontram-se na Tabela 2. Obs: As linhas que simbolizam o comportamento dos isolados UFLA-01-486 e UFLA-01-510 se sobrepuseram na PSC=45%.

Com os quatro microrganismos estudados recebendo as mesmas condições de cultivo, a contagem do número de células viáveis nos solos mostrou que os representantes de *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510) apresentaram menor número de UFC nas 3 PSC, e foi ainda mais afetada na presença de maior concentração de solo com excesso de metais pesados (Tabela 2).

O teste de médias para o número de UFC da estirpe BR-4406 e isolado UFLA-01-457, expostos a períodos de incubação crescentes em misturas de solos com diferentes PSC, mostrou que estes dois representantes de *Bradyrhizobium* não diferiram (Tabela 2), resultado que também foi encontrado em meio de cultura. Entre os representantes de *Azorhizobium*, o isolado UFLA-01-486 superou UFLA-01-510 no solo não contaminado somente após 28 dias de incubação, embora não tenham apresentado diferenças em YMA. Nos outros períodos de incubação e PSC, os números de UFC destes dois isolados foram semelhantes.

Para os três isolados, os modelos polinomiais que se ajustaram ao número de UFC em função do período de incubação crescente nas misturas de solos foram lineares (Tabela 2). Porém, no solo não contaminado (UFLA-01-457 e UFLA-01-510) e na PSC 15% (UFLA-01-457), não foram encontrados ajustes, fato este ocorrido devido à baixa variação no número de UFC destes isolados, em função dos períodos de incubação, na mesma PSC (Figura 2). Com relação à estirpe BR-4406, foram encontrados dois tipos de respostas para o número de UFC, em função do período de incubação crescente, com ajustes linear e quadrático. Foi encontrada resposta quadrática na PSC 15%, e linear na PSC 45%, mostrando que nesta última concentração a estirpe respondeu linearmente com proporcionalidade entre os aumentos dos períodos de incubação e a correspondente redução no número de UFC (Tabela 2); já no solo não contaminado, esta estirpe apresentou baixa variação no número de células

viáveis quando expostas aos diferentes períodos de incubação, comportamento que não permitiu que fosse ajustada uma equação de regressão (Figura 2).

As PSC testadas não causaram ausência de células viáveis da estirpe e isolado de *Bradyrhizobium* após 28 dias de incubação (Figura 2). Houve um declínio significativo no número de UFC no nível mais alto de solo contaminado, já que apenas 20,4% ($10^{8,39}$ UFC) e 21,9% ($10^{8,42}$ UFC) das células da estirpe BR-4406 e isolado UFLA-01-457 do inóculo inicial, respectivamente, sobreviveram ao final de 28 dias (Tabela 3). Reddy, Cheng e Dunn (1983), ao estudarem a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 em solo contendo lodo, cujas concentrações de metais (em $\mu\text{g g}^{-1}$: Fe: 8250, Mn: 323, Zn: 1020, Cu: 496, Ni: 200, Pb: 210 e Cd: 14) eram bem menores que as do solo do presente estudo, também observaram redução significativa, porém maior, na população do rizóbio, correspondendo a menos de 1% do inóculo inicial ($7,5 \times 10^7$ cel ml^{-1}) depois de 42 dias incubados. Já Turner, Giller e McGrath (1995), ao avaliarem a sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RCR221 em diferentes misturas de lodo/solo (100% solo com lodo, 5/6, 4/6, 3/6/ 2/6, 1/6 e controle), cujas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Zn, Cu, Ni e Cd no solo com 100% de lodo eram 1535, 648, 98 e 8,0, respectivamente, verificaram que somente após 156 dias houve redução significativa no número de rizóbio, com o aumento do teor total de metal no solo. No entanto, um aumento da população de *Bradyrhizobium japonicum* foi observado durante o período de dez anos de aplicação de lodo de esgoto com altos níveis de contaminação com metais, sugerindo, segundo seus autores, que os metais pesados e outros componentes tóxicos do lodo, mesmo em altas concentrações no solo, não foram suficientes para afetar a sobrevivência deste microrganismo, já que a população nativa havia se adaptado à condição de estresse (Kinkle, Angle e Keyser, 1987; Heckman, Angle e Chaney, 1987 a,b).

TABELA 3. Porcentagem de células de *Bradyrhizobium* (BR-4406 e UFLA-01-457) e *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510) que sobreviveram ao final de 28 dias de incubação, nas misturas de solos contendo diferentes proporções de solo contaminado (0%, 15% e 45%).

Isolado/Estirpe	Proporções de solo contaminado		
	0 %	15 %	45 %
UFLA-01-457	95,8 %	79,6 %	21,9 %
BR-4406	95,8 %	83,3 %	20,4 %
UFLA-01-486	164,4 %	1,7 %	0 %
UFLA-01-510	99 %	2,2 %	0 %

A estirpe BR-4406 e isolado UFLA-01-457, selecionados como tolerantes em meio YMA modificado, mostraram uma certa tolerância na PSC 15%, em que a sobrevivência das células foi de 83,3% (10^9 UFC) e 79,6% ($10^{8,98}$ UFC), respectivamente (Tabela 3). Para Chaudri, McGrath e Giller (1992b), a tolerância a metais por isolados de solos contaminados sugere que a bactéria, sobrevivendo em solo contaminado, desenvolve mecanismos não específicos de adaptação, em adição ao aumento da produção e excreção de polissacarídeos extracelulares em quantidades suficientes para que o metal fique aderido e não seja absorvido pela célula. A tolerância a metais da estirpe BR-4406 em meio YMA modificado e em solo também foi verificado por Trannin (1999), que atribuiu a uma característica genética, especialmente porque não existem registros sobre sua origem em sítio contaminado com metais pesados. No entanto, durante o processo de seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* para a espécie *Enterolobium contortisiliquum*, a estirpe BR-4406 foi uma das mais eficientes e competitivas em relação à população nativa de um latossolo ácido, característica da maioria dos solos brasileiros, segundo Ribeiro Jr., Franco e Lopes (1986). Estes autores atribuíram a maior competitividade e eficiência

desta estirpe, em relação às demais, à sua capacidade e da planta de aumentarem o pH na rizosfera, tornando-a mais tolerante à acidez. A produção e excreção de compostos orgânicos pelos microrganismos, em geral, que podem imobilizar os metais por formação de complexos organo-metálicos (Garcia Jr., 1997), têm sido sugeridas como possíveis mecanismos pelos quais células bacterianas toleram metais pesados (Zagic, 1969, citado por Chaudri, McGrath e Giller, 1992a). Costerton, Irwin e Cheng (1981) relataram que a produção e excreção de polissacarídeos extracelulares modificam o ambiente ao redor da célula, ocasionando, com isso, uma grande probabilidade da sobrevivência de células bacterianas em ambientes contaminados. A produção de quantidades elevadas de polissacarídeos extracelulares por bactérias em sedimentos contaminados foi responsável por complexar Cr, tornando-o não tóxico (Aislabie e Loutit, 1986). Rudd, Sterritt e Lester (1984) verificaram a complexação de Cu, Cd, Co e Ni por componentes proteicos e polissacarídeos extracelulares de célula de *Klebsiella aerogenes*. Por outro lado, sua capacidade de complexar é menor para Ni que para Cu, Cd e Co, indicando a presença de mais sítios de ligação em seus componentes para estes três metais, o que explica a maior toxidez de Ni para esse microrganismo. No entanto, em solo contaminado por aplicação de soluções de sais de sulfato de Zn, Cd, Cu e Ni, este último metal não teve efeito sobre a população nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, mesmo quando concentrações elevadas foram adicionadas ao solo (Chaudri, McGrath e Giller, 1992b). Segundo Nutman (1975), o rizóbio é capaz de viver saprofiticamente no solo, em ausência de planta hospedeira, mesmo em condições adversas.

Para Giller et al. (1993), a sobrevivência de rizóbio em solos contaminados pode ser devida à localização das células na matéria orgânica ou partículas de argila, nas quais são protegidas da fitotoxicidade dos metais. Este resultado foi encontrado por Turner, Giller e McGrath (1995) para *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Estes autores utilizaram dois tipos de solos (arenoso

e argiloso), cujas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Zn, Cu, Ni e Cd eram 1535, 648, 98 e 8,0, respectivamente, para o solo argiloso, e 306, 92, 30 e 9,8, respectivamente, para o solo arenoso, e verificaram que reduções no número da bactéria começaram a surgir muito mais cedo no solo arenoso, mesmo apresentando menores concentrações de metais. Reddy, Cheng e Dunn (1983), no entanto, ao avaliarem a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 em solo arenoso e argiloso contendo lodo de esgoto contaminado com metais, cujas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) eram Fe: 8250, Mn: 323, Zn: 1020, Cu: 496, Ni: 200, Pb: 210 e Cd: 14, não observaram diferenças na população do rizóbio depois de 42 dias.

Para Díaz-Ravinã e Baath (1996), o metal pesado no solo ocasiona dois efeitos no crescimento bacteriano: um efeito inibitório inicial, provavelmente causado por morte das bactérias sensíveis à toxicidade do metal, e um efeito estimulatório sobre a taxa de crescimento das bactérias mais tolerantes sobreviventes, devido ao aumento da disponibilidade de substratos derivados de células mortas, que pode variar durante o período e incubação. Esses efeitos podem explicar a redução e subsequente recuperação no número de UFC pela estirpe BR-4406 na PSC 15% (Tabela 2).

Os isolados UFLA-01-486 e UFLA-01-510, mais sensíveis a metais em YMA modificado no experimento anterior, mostraram também ser bastante sensíveis a metais pesados no solo, mesmo com a inoculação de um número relativamente alto de *Azorhizobium* (10^8 cel g^{-1} solo). Giller, McGrath e Hirsch (1989), ao aplicarem taxas extremamente altas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. (10^{10} cel g^{-1} solo) em solo contaminado com metais, verificaram que o *Rhizobium* sobreviveu após os 2 meses de incubação, e formou nódulos efetivos em trevo branco. Na PSC 15%, apenas 1,7% ($10^{6,19}$ UFC) e 2,2% ($10^{6,3}$ UFC) das células dos isolados UFLA-01-486 e UFLA-01-510 do inóculo inicial, respectivamente, sobreviveram após 28 dias de incubação (Tabela 3). Já na

PSC 45%, o número de células viáveis destes dois isolados após 7 dias de incubação foi nulo. No solo não contaminado com metais, a quantidade de células do isolado UFLA-01-510 depois de 28 dias permaneceu praticamente inalterada, enquanto para UFLA-01-486, verificou-se um acréscimo de 64,4% ($10^{8,17}$ UFC).

A presença de vários metais em excesso nas misturas de solos com 15% e 45% PSC impossibilitou a determinação de qual metal ou interação de metais apresentou maior toxicidade ao rizóbio. Contudo, é de nosso conhecimento que Zn, Cd e Cu são os metais em concentrações mais elevadas no solo contaminado por rejeitos da industrialização de zinco utilizado neste estudo e, de acordo com Giller, McGrath e Hirsch (1989), são os mais tóxicos para o rizóbio. Chaudri, McGrath e Giller (1992b) mostraram que a ordem de toxicidade de metais ao rizóbio foi Cd>Zn>Cu, quando adicionados ao solo em soluções de sulfato. Chumbo é muito insolúvel no solo e, portanto, menos tóxico ao rizóbio (McGrath, 1987).

Pelos resultados obtidos podemos verificar que houve relação entre tolerância em meio YMA modificado e sobrevivência em solo contaminado com metais pesados, já que tanto no meio de cultura como no solo *Azorhizobium* mostrou-se mais sensível que *Bradyrhizobium*. Apesar da baixa sobrevivência da estirpe BR-4406 (20,4% $\Leftrightarrow 10^{8,39}$ UFC) e do isolado UFLA-01-457 (21,9% $\Leftrightarrow 10^{8,42}$ UFC) após 28 dias de incubação na PSC 45%, podemos considerar que houve uma certa tolerância se observamos as concentrações de metais existentes nesta PSC (em mg dm⁻³: Cd=64; Cu=197,2; Fe=1,4; Mn=18; Pb=187 e Zn=1235), que são bastante elevadas, e muito acima das utilizadas nos trabalhos revisados.

4 CONCLUSÕES

- A sobrevivência de *Azorhizobium* foi mais afetada por metais pesados no solo do que a de *Bradyrhizobium*.
- Houve relação entre tolerância “*in situ*” e tolerância “*in vitro*”.

CONCLUSÕES GERAIS

- A ordem de toxicidade dos metais, em meio de cultura, a todas as estirpes e isolados de rizóbio estudados foi: Cu>Cd>Zn.
- A ordem do grau de sensibilidade a metais no meio de cultura, considerando-se as concentrações máximas toleradas, foi *Azorhizobium* > *Rhizobium* / *Mesorhizobium* / *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*.
- Não houve influência das subfamílias e locais na concentração máxima tolerada a metais.
- A DT₂₅ e DT₅₀ foram úteis para diferenciarem algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd.
- A sobrevivência de *Azorhizobium* foi mais afetada por metais pesados no solo do que a de *Bradyrhizobium*.
- Houve relação entre tolerância “*in situ*” e tolerância “*in vitro*”.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISLABIE, J.; LOUITT, M.W. Accumulation of Cr (III) by bacteria isolated from polluted sediment. *Marine Environmental Research*, Oxford, v.20, p.221-232, 1986.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past application of sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.2, p.83-88, Feb. 1992a.
- CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Metal Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.7, p.625-632, July 1992b.
- COSTERTON, J.W.; IRWIN, R.T.; CHENG, K.Y. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.35, p.299-324, 1981.
- CRIST, D.K.; WYZA, R.E.; MILLS, K.K.; BAUER, W.D.; EVANS, W.R. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in suspension in water. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v.47, n.3, p.595-600, Mar. 1984.
- DÍAZ-RAVIÑA, M.; BAATH, E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.62, p.2970-2977, Aug. 1996.
- GARCIA JR., O. Microrganismos e metais. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de (eds.). *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440p.
- GILLER, K.E.; McGRATH, S.P.; HIRSCH, P.R. Absence of nitrogen-fixation in clover grown on soil subject to long term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.21, n.6, p.841-848, Sept. 1989.

- GILLER, K.E.; NUSSBAUM, R.; CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv.*trifolii* or *R. loti*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.2, p.273-278, Feb. 1993.
- HECKMAN, J.R.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Residual effects of sewage sludge on soybean. I. Accumulation of heavy metals. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v.16, p.113-117, 1987a.
- HECKMAN, J.R.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Residual effects of sewage sludge on soybean. II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v.16, p.117-124, 1987b.
- KINKLE, B.K.; ANGLE, J.S.; KEYSER, H.H. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.53, n.2, p.315-319, Feb. 1987.
- McGRATH, S.P. Long-term studies of metal transfer following applications of sewage sludge. In: COUGHTREY, P.J.; MARTIN, M.H.; UNSWORTH, M.H. (eds.). *Pollutant Transport and Fate in Ecosystems*. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. p.301-317.
- MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of blood. *Journal of Hygiene*, Cambridge, v.38, p.732-748, 1938.
- NUTMAN, P.S. *Rhizobium* in soil. In: WALKER, N. (ed). *Soil Microbiology. A Critical Review*. London: Butterworths, 1975. p.11-131.
- REDDY, G.B.; CHENG, C.N.; DUNN, S.J. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.15, n.3, p.343-345, May/June 1983.
- RIBEIRO-FILHO, M.R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O.; MOTTA, P.E.F. da. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.23, n.2, p.189-483, abr./jun. 1999.

RIBEIRO JR., W.Q.; FRANCO, A.A.; LOPES, E.S. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para *Enterolobium contortisiliquum*, em latossolo ácido. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.10, n.3, p.219-225, set./dez. 1986.

RUDD, T.; STERRITT, R.M.; LESTER, J.N. Formation and stability constants of complexes formed between heavy metals and bacterial extracellular polymers. *Water Research*, Oxford, v.18, n.6, p.379-384, Dec. 1984.

➤ TRANNIN, I.C.B. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a metais pesados "in vitro" e em simbiose. Lavras: UFPA, 1999. 125 p. (Dissertação-Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

TURNER, A.P.; GILLER, K.E.; McGRATH, S.P. Long term effects on *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* of heavy metal contamination of land from the application of sewage sludge. In: ALLAN, R.J.; NRIAGU, J.O. (eds.). *Heavy metals in the environment*. Toronto, 1995. p.442-445.

VINCENT, J.M. *A Manual for the practical study of root-nodule bacteria*. London: JBP, 1970. 164p. (Handbook, 15).

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JUNIOR, P. *Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST)*. Pelotas: UFPEL, Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Equações de regressão para determinação dos níveis críticos de toxidez de Zn, Cu e Cd em isolados de <i>Azorhizobium</i>	82
TABELA 2A Equações de regressão para determinação dos níveis críticos de toxidez de Zn, Cu e Cd em estirpes/isolados de <i>Rhizobium</i> (R), <i>Sinorhizobium</i> (S) e <i>Mesorhizobium</i> (M).....	82
TABELA 3A Equações de regressão para determinação dos níveis críticos de toxidez de Zn, Cu e Cd em estirpes/isolados de <i>Bradyrhizobium</i>	83
TABELA 4A Resumo da ANAVA para número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de isolados de <i>Azorhizobium</i> e estirpe/isolado de <i>Bradyrhizobium</i> , expostos a misturas de solos contendo diferentes proporções de solo contaminado (0%, 15% e 45%), no período de 28 dias de incubação.....	85

TABELA 1A. Equações de regressão para determinação dos níveis críticos de toxidez de Zn, Cu e Cd em isolados de *Azorhizobium*.

Isolado	Zn		Cu		Cd	
	Equação	R ²	Equação	R ²	Equação	R ²
UFLA-01-486	$\ln Y = 4,60 - 0,00014x^{1,5}$	0,93	$Y^{-1} = 0,010 + 0,0021x^{1,5}$	0,92	$Y^{-1} = 0,0096 + 1,12e-06x^3$	0,94
UFLA-01-510	$\ln Y = 4,58 - 0,0032x$	0,88	$Y^{-1} = 0,010 + 0,0021x^{1,5}$	0,92	$\ln Y = 4,57 - 0,0011x^2$	0,84

TABELA 2A. Equações de regressão para determinação dos níveis críticos de toxidez de Zn, Cu e Cd em estirpes/isolados de *Rhizobium* (R), *Sinorhizobium* (S) e *Mesorhizobium* (M).

Estirpe/Isolado	Zn		Cu		Cd	
	Equação	R ²	Equação	R ²	Equação	R ²
Cesalpinoideae						
UFLA-01-10 (R)	$Y^{0,5} = 9,76 - 0,00028x^{1,5}$	0,87	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,27e-07e^x$	0,99	$\ln Y = 4,60 - 0,0017x^2$	0,98
INPA 353B (R)	$Y = 100,1 \exp(-x/377,8)$	0,83	$Y^{-1} = 0,010 + 5,16e-06x^3$	0,92	$Y^{-1} = 0,0099 + 9,36e-16e^x$	0,99
BR 3804 (M)	$Y = -261,89 + 362,54 \exp(-x/2775,87)$	0,80	$Y = 102,28 \exp(-x/10,94)$	0,95	$Y^{0,5} = 9,89 - 0,15x$	0,96
BR 5001 (S)	$\ln Y = 4,60 - 3,83e-09x^3$	0,82	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,27e-07e^x$	0,99	$Y^{0,5} = 9,89 - 0,15x$	0,96
Papilionoideae						
UFLA-04-708 (R)	$\ln Y = 4,64 - 7,93e-09x^3$	0,97	$Y = -5,19 + 106,86 \exp(-x/12,09)$	0,96	$Y = -60,33 + 156,87 \exp(-x/58,09)$	0,91
UFLA-04-709 (R)	$\ln Y = 4,64 - 7,93e-09x^3$	0,97	$Y = -5,19 + 106,86 \exp(-x/12,09)$	0,96	$Y = -60,33 + 156,87 \exp(-x/58,09)$	0,91
INPA 523B (R)	$\ln Y = 4,64 - 7,93e-09x^3$	0,97	$\ln Y = 4,60 - 0,014x^{1,5}$	0,91	$Y = 101,55 - 13,11x^{0,5}$	0,88
BR 322 (R)	$\ln Y = 4,64 - 7,93e-09x^3$	0,97	$\ln Y = 4,60 - 0,0074x^2$	0,99	$Y = 101,55 - 13,11x^{0,5}$	0,88
BR 6401 (R)	$\ln Y = 4,64 - 7,93e-09x^3$	0,97	$\ln Y = 4,60 - 0,014x^{1,5}$	0,91	$Y^{-1} = 0,010 + 4,39e-16e^x$	0,92
Mimosoldeae						
BR 3452 (R)	$Y^{0,5} = 9,76 - 0,00029x^{1,5}$	0,86	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$Y^{-1} = 0,0099 + 9,36e-16e^x$	0,99
BR 3460 (R)	$\ln Y = 4,66 - 3,37e-09x^3$	0,76	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$Y^{-1} = 0,0099 + 9,36e-16e^x$	0,99
BR 3614 (R)	$Y^{0,5} = 9,76 - 0,00029x^{1,5}$	0,86	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$Y^{0,5} = 10,33 - 0,17x$	0,95
BR 4301 (R)	$Y^{0,5} = 9,76 - 0,00029x^{1,5}$	0,86	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$Y^{0,5} = 9,92 - 0,024x^{1,5}$	0,94
BR 4302 (R)	$Y = -20,09 + 118,76 \exp(-x/487,99)$	0,92	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$Y^{0,5} = 10,17 - 0,17x$	0,92
BR 817 (S)	$Y^{0,5} = 9,76 - 0,00029x^{1,5}$	0,86	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$\ln Y = 4,61 - 4,35e-05x^3$	0,99
BR 6806 (S)	$\ln Y = 4,66 - 3,37e-09x^3$	0,76	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99	$\ln Y = 4,61 - 4,35e-05x^3$	0,99

TABELA 3A. Equações de regressão para determinação dos níveis críticos de toxidez de Zn, Cu e Cd em estirpes/isolados de *Bradyrhizobium*.

Isolado	Zn		Cu		Cd	
	Equação	R ²	Equação	R ²	Equação	R ²
Cesalpinoideae						
UFLA-01-11	$Y = -5,37 + 103,62 \exp(-x/364,58)$	0,97	$Y^{0,5} = 9,71 - 1,05x^{0,5}$	0,94	$Y = 8,53 + 91,15 \exp(-x/14,19)$	0,96
FL 27	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93	$Y^{0,5} = 9,95 - 0,023x^{1,5}$	0,94	$Y^{0,5} = 9,60 - 0,0022x^2$	0,90
INPA 68A	$Y = 101,04 - 3,24x^{0,5}$	0,95	$\ln Y = 4,43 - 1,87e-05x^3$	0,93	$Y = -78,82 + 180,66 \exp(-x/74,16)$	0,95
INPA 101A	$\ln Y = 4,62 - 8,27e-09x^3$	0,97	$\ln Y = 4,43 - 1,87e-05x^3$	0,93	$\ln Y = 4,64 - 1,61e-05x^3$	0,99
INPA 145A	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98	$\ln Y = 4,43 - 1,87e-05x^3$	0,93	$Y = 99,40 - 12,60x^{0,5}$	0,97
INPA 147A	$Y = -32,90 + 132,47 \exp(-x/686,73)$	0,96	$Y^1 = 0,0099 + 4,12e-11e^x$	0,99	$Y = 3,41e+06 - 3,41e+06 \exp(x/2,16e+06)$	0,95
INPA 155A	$Y = -32,90 + 132,47 \exp(-x/686,73)$	0,96	$\ln Y = 4,59 - 0,0020x^2$	0,91	$Y = 98,26 - 12,05x^{0,5}$	0,95
INPA 170B	$Y = 102,92 - 3,16x^{0,5}$	0,90	$Y^{0,5} = 10,05 - 1,07x^{0,5}$	0,97	$Y = -30,96 + 129,92 \exp(-x/42,70)$	0,97
INPA 173A	$Y = 101,04 - 3,24x^{0,5}$	0,95	$Y = 98,61 - 12,15x^{0,5}$	0,94	$Y = -4,77 + 104,22 \exp(-x/22,99)$	0,99
INPA 179A	$\ln Y = 4,63 - 1,53e-07x^{2,5}$	0,97	$Y = 1,38 + 101,04 \exp(-x/8,23)$	0,97	$Y = 103,01 - 12,95x^{0,5}$	0,98
INPA 191A	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98	$Y = 99,52 - 3,05x^{0,5} \ln x$	0,94	$Y^{0,5} = 10,02 - 0,15x$	0,90
INPA 547B	$Y = -32,90 + 132,47 \exp(-x/686,73)$	0,96	$Y = 99,41 - 12,90x^{0,5}$	0,86	$Y = -25,12 + 122,27 \exp(-x/39,28)$	0,97
INPA 553A	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98	$\ln Y = 4,61 - 0,0019x^2$	0,99	$\ln Y = 4,61 - 0,00014x^{2,5}$	0,99
BR 3901	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98	$Y^{0,5} = 10,02 - 0,15x$	0,96	$Y = 3,41e+06 - 3,41e+06 \exp(x/2,16e+06)$	0,95
BR 5004	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93	$Y = -1,26 + 95,70 \exp(-x/15,09)$	0,95	$Y^{0,5} = 9,96 - 0,018x^{1,5}$	0,97
BR 5005	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93	$Y = -42,88 + 141,19 \exp(-x/45,05)$	0,90	$Y = 95,97 - 3,03x^{0,5} \ln x$	0,88
Papilionoideae						
INPA 33A	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98	$Y^{0,5} = 10,02 - 0,15x$	0,96	$Y^{0,5} = 9,96 - 0,018x^{1,5}$	0,97
INPA 80A	$Y^{0,5} = 9,77 - 1,0097e-05x^2$	0,92	$Y^{0,5} = 9,99 - 0,019x^{1,5}$	0,97	$\ln Y = 4,61 - 0,00014x^{2,5}$	0,99
INPA 237B	$Y = -5,37 + 103,62 \exp(-x/364,58)$	0,97	$\ln Y = 4,59 - 0,0019x^2$	0,91	$Y^{0,5} = 9,96 - 0,018x^{1,5}$	0,97
INPA 514A	$\ln Y = 4,59 - 5,29e-06x^2$	0,99	$Y = 92,36 - 11,23x^{0,5}$	0,89	$\ln Y = 4,59 - 0,00014x^{2,5}$	0,95
BR 29	$Y = 101,04 - 3,24x^{0,5}$	0,95	$Y^{0,5} = 9,93 - 0,17x$	0,94	$Y = 4,85 + 94,04 \exp(-x/16,18)$	0,94
BR 96	$Y^{0,5} = 9,83 - 2,44e-07x^{2,5}$	0,88	$\ln Y = 4,47 - 0,0014x^2$	0,95	$Y = 8,53 + 91,15 \exp(-x/14,19)$	0,96
BR 2001	$Y^{0,5} = 10,29 - 3,73e-07x^{2,5}$	0,93	$Y = 97,95 - 0,032x^2$	0,81	$\ln Y = 4,64 - 1,61e-05x^3$	0,99
BR 2613	$Y^{0,5} = 10,29 - 3,73e-07x^{2,5}$	0,93	$\ln Y = 4,47 - 0,0014x^2$	0,95	$Y^{0,5} = 10,08 - 0,00034x^{2,5}$	0,94

"continua"...

TABELA 3A – continuação

Isolado	Zn		Cu		Cd	
	Equação	R ²	Equação	R ²	Equação	R ²
BR 2801	$Y^{0,5}=9,73-0,00028x^{1,5}$	0,93	$Y^{0,5}=9,93-0,17x$	0,94	$Y^{0,5}=10,08-0,00034x^{2,5}$	0,94
BR 2405	$Y=98,62-0,43x^{0,5}\ln x$	0,85	$Y=-1,26+95,70\exp(-x/15,09)$	0,95	$\ln Y=4,59-0,00014x^{2,5}$	0,95
BR 6009	$\ln Y=4,62-6,14e-09x^3$	0,97	$Y^{0,5}=9,95-0,023x^{1,5}$	0,94	$Y=99,40-12,60x^{0,5}$	0,97
BR 8402	$Y^{0,5}=9,77-0,00029x^{1,5}$	0,94	$Y=99,88-13,68x^{0,5}$	0,95	$Y=99,40-12,60x^{0,5}$	0,97
BR 8404	$\ln Y=4,59-5,62e-06x^2$	0,95	$\ln Y=4,61-0,0019x^2$	0,99	$Y=90,83-11,41x^{0,5}$	0,91
Mimosoldeae						
UFLA-01-457	$Y=-38,36+141,23\exp(-x/791,07)$	0,97	$Y=96,61-6,91x^{0,5}$	0,93	$Y=98,96-7,23x^{0,5}$	0,95
UFLA-01-473	$Y=-95,91+191,63\exp(-x/1465,27)$	0,97	$\ln Y=4,56-0,084x^{0,5}$	0,86	$Y=98,96-7,23x^{0,5}$	0,95
INPA 10A	$Y=102,61-0,72x/\ln x$	0,93	$Y^{0,5}=9,95-0,023x^{1,5}$	0,94	$\ln Y=4,61-0,00014x^{2,5}$	0,99
INPA 54B	$Y=104,10-3,18x^{0,5}$	0,93	$\ln Y=4,62-0,0030x^2$	0,99	$Y^{0,5}=10,02-0,93x^{0,5}$	0,86
INPA 72A	$Y^{0,5}=9,77-0,00029x^{1,5}$	0,94	$Y^{0,5}=9,95-0,023x^{1,5}$	0,94	$Y=-25,12+122,27\exp(-x/39,28)$	0,97
INPA 75B	$Y=102,61-0,72x/\ln x$	0,93	$Y^{-1}=0,0099+1,03e-11e^x$	0,99	$\ln Y=4,64-1,61e-05x^3$	0,99
INPA 104A	$Y^{0,5}=9,88-0,00037x^{1,5}$	0,98	$Y=99,52-3,05x^{0,5}\ln x$	0,94	$\ln Y=4,64-1,61e-05x^3$	0,99
INPA 183B	$Y=102,61-0,72x/\ln x$	0,93	$Y^{-1}=0,0099+1,03e-11e^x$	0,99	$Y=-25,12+122,27\exp(-x/39,28)$	0,97
INPA 223A	$\ln Y=4,59-5,29e-06x^2$	0,99	$Y=97,95-0,032x^2$	0,81	$Y=89,35-9,36x^{0,5}$	0,72
BR 3617	$Y=103,89-3,31x^{0,5}$	0,97	$Y=-7,40+108,19\exp(-x/17,31)$	0,98	$Y^{0,5}=9,65-1,0023x^{0,5}$	0,93
BR 4406	$Y=-7,20+111,96\exp(-x/415,58)$	0,91	$Y=98,37-9,74x^{0,5}$	0,97	$Y=98,96-7,23x^{0,5}$	0,95
BR 5610	$Y=101,04-3,24x^{0,5}$	0,95	$Y=4,93+102,73\exp(-x/17,62)$	0,95	$Y^{0,5}=10,02-0,93x^{0,5}$	0,86
BR 5611	$Y=-5,37+103,62\exp(-x/364,58)$	0,97	$Y=-1,26+95,70\exp(-x/15,09)$	0,95	$Y=90,83-11,41x^{0,5}$	0,91

TABELA 4A. Resumo da ANAVA para número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de isolados de *Azorhizobium* e estirpe/isolado de *Bradyrhizobium*, expostos a misturas de solos contendo diferentes proporções de solo contaminado (0%, 15% e 45%), no período de 28 dias de incubação.

Fontes de Variação	GL	Valor F	PROB.>F
Estirpe/Isolado (EI)	3	33132,1002	0,00001
Período incubação (PI)	4	3567,7005	0,00001
Proporção Solo Contaminado (PSC)	2	34070,0815	0,00001
EI x PI	12	953,5589	0,00001
EI x PSC	6	9586,1111	0,00001
PI x PSC	8	2127,6454	0,00001
EI x PI x PSC	24	601,6988	0,00001
Coeficiente Variação (%)		1,033	