

# SEÇÃO IX - POLUIÇÃO DO SOLO E QUALIDADE AMBIENTAL

## SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium* E *Azorhizobium* EM MISTURAS DE SOLO CONTAMINADAS COM METAIS PESADOS<sup>(1)</sup>

A. MATSUDA<sup>(2)</sup>, F. M. S. MOREIRA<sup>(3)</sup> & J. O. SIQUEIRA<sup>(3)</sup>

### RESUMO

Estudos foram realizados 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 de estirpe e isolados de rizóbio em solo contaminado com metais pesados e verificar a relação entre tolerância do rizóbio a metais pesados em meio de cultura e sua sobrevivência em solo contaminado. Foram utilizados os dois microrganismos mais tolerantes [BR-4406 (estirpe recomendada para *Enterolobium* spp.) 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*), todos selecionados de um grupo de 60 estirpes/isolados em estudos prévios deste laboratório, em meio de cultura suplementado com metais pesados. Empregaram-se misturas de um Latossolo Vermelho-Escuro (LE) que continham 0, 15 e 45% (v/v) de um Latossolo Vermelho-Amarelo plúntico contaminado com Zn, Cd, Pb e Cu. As misturas de solo contaminado foram inoculadas com 20 mL de cultura em YM na fase log das estirpes mencionadas, as quais foram testadas separadamente com três repetições. A avaliação do número de células viáveis no solo, realizada aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação, pelo método das diluições sucessivas e inoculação em placas com meio YMA, revelou comportamento diferenciado entre os organismos estudados. O número médio de células que sobreviveram ao final de 28 dias de incubação foi de (em UFC g<sup>-1</sup> de solo): 10<sup>10,36</sup>, 10<sup>10,29</sup> e 10<sup>9,70</sup>, para *Bradyrhizobium*, e 10<sup>9,36</sup>, 10<sup>7,54</sup> e 0, para *Azorhizobium* em misturas de 0, 15 e 45% de solo contaminado, respectivamente. Portanto, houve maior sobrevivência de *Bradyrhizobium* do que de *Azorhizobium*, indicando maior tolerância a metais pesados do primeiro gênero. Como *Bradyrhizobium* foi também mais tolerante "in vitro", os resultados indicam haver relação entre o comportamento em solo contaminado e em meio de cultura com metais pesados.

**Termos de indexação:** rizóbio, zinco, cobre, cádmio, chumbo, tolerância, poluição do solo.

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Trabalho financiado pelo convênio FAEPE/CMM e FAPEMIG. Recebido para publicação em setembro de 2000 e aprovado em agosto de 2001.

<sup>(2)</sup> Engenheiro-Agrônomo do CPGSNP, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA. Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista da CAPES.

<sup>(3)</sup> Professor do Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista do CNPq. E-mail: fmoreira@ufla.br; siqueira@ufla.br

**SUMMARY:** *SURVIVAL OF BRADYRHIZOBIUM AND AZORHIZOBIUM IN HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL*

An experiment was carried out at the Soil Science Department of Federal University of Lavras (MG), from November/1999 to January/2000, aiming to evaluate the survival of strain and isolates of rhizobia, in heavy metal contaminated soil. The possible relationship between rhizobia tolerance in culture medium and its survival in contaminated soil was also verified. From a group of 60 strains/isolates tested at a previous study for metal tolerance in YMA medium, two out of the most tolerant microorganisms [BR-4406 (strain recommended as inoculant of *Enterolobium* spp.) 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 Latosol (*Oxisol*) was mixed with a natural low fertility Latosol at different proportions: 0, 15 and 45% (v/v). The mixtures were inoculated with 20 mL of log phase culture in YM of the above strains, tested separately with three replications. Evaluation of viable cell number at 0, 7, 14, 21, and 28 days of incubation by the method of successive dilutions inoculated in YMA medium revealed differentiated behavior among the microorganisms. The average cell numbers (CFU g<sup>-1</sup> of soil) which survived to the end of 28 days of incubation were for *Bradyrhizobium*: 10<sup>10.36</sup>, 10<sup>10.29</sup> and 10<sup>9.70</sup>, and for *Azorhizobium*: 10<sup>9.36</sup>, 10<sup>7.54</sup> and 0, at mixtures with 0%, 15% and 45% of contaminated soil, respectively, indicating that *Azorhizobium* survival was more affected by heavy metals than *Bradyrhizobium* survival. As *Bradyrhizobium* was also more tolerant to heavy metals "in vitro", results indicated that there was a relationship of tolerance between both substrates.

*Index terms:* rhizobia, zinc, copper, cadmium, plumb, tolerance, soil pollution.

## INTRODUÇÃO

A exploração e a industrialização de minérios são atividades de importância econômica mundial; no entanto, estas causam grande interferência no ecossistema e podem promover a contaminação do solo por metais pesados, que, em altas concentrações, tornam-se tóxicos às plantas e à comunidade microbiana do solo (Doelman & Haanstra, 1984).

As leguminosas capazes de formar simbiose eficiente com rizóbio são espécies promissoras em programas de recuperação de solos contaminados, por serem geralmente de crescimento rápido, apresentarem sistema radicular agressivo, que auxilia na melhoria dos aspectos físicos do solo, e permitirem rápida formação de serapilheira pela queda de folhas, repondo a matéria orgânica e beneficiando, assim, o restabelecimento da biota do solo (Franco et al., 1992). 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.

Segundo Nutman (1975), o rizóbio é capaz de viver saprofiticamente no solo, em ausência de planta hospedeira, mesmo em condições adversas. No entanto, a probabilidade na formação de nódulos efetivos e, conseqüentemente, a ocorrência de fixação

biológica do nitrogênio, em solo contaminado com metais pesados, foram maiores quando taxas de inóculo mais altas (10<sup>10</sup> comparadas a < 10<sup>7</sup> células g<sup>-1</sup>) possibilitaram a sobrevivência de rizóbio efetivo após dois meses de incubação (Giller et al., 1989). *Rhizobium* efetivo foi encontrado, mesmo na ausência de planta hospedeira, em solo contaminado por aplicação de lodo de esgoto com grandes concentrações de metais pesados; contudo, o pH do solo estava relativamente alto (7,4 e 7,8), o que tende a reduzir a disponibilidade e, conseqüentemente, a toxidez dos metais ao rizóbio (Smith & Giller, 1992). Destaca-se, ainda, que a matéria orgânica do lodo de esgoto também contribui para diminuir a disponibilidade dos metais. Para os autores, a presença de rizóbio tolerante e efetivo foi decorrente da adaptação e desenvolvimento de mecanismos específicos de tolerância pelo *Rhizobium*.

Chaudri et al. (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 a concentrações totais ≥ 7,1 e ≥ 385 mg dm<sup>-3</sup> no solo, respectivamente. No entanto, mesmo sobrevivendo 1% do número de células viáveis de *Rhizobium*, inoculadas em concentrações de 225 mg dm<sup>-3</sup> de Cu, formaram-se nódulos efetivos em plantas de trevo.

Foi demonstrado, em solos de áreas temperadas, que a tolerância do rizóbio a metais varia entre estirpes e espécies. A maioria dos trabalhos apresenta dados sobre o gênero *Rhizobium*, sendo a contaminação geralmente atribuída à adição ao solo de lodo de esgoto urbano que continha metais pesados (Chaudri et al, 1992b; Angle et al, 1993). No entanto, a contaminação de solo com resíduos inorgânicos, como rejeitos das indústrias metalúrgicas, com elevadas concentrações de metais mais disponíveis, é ainda pouco pesquisada em relação a rizóbio e fixação biológica de nitrogênio, especialmente em condições tropicais.

Assim, torna-se necessário conhecer o comportamento de rizóbio em solos expostos às contaminações por atividades industriais nos trópicos, onde existe ampla diversidade de simbioses rizóbio-leguminosas (Moreira et al., 1992; 1993). Estudos com este enfoque permitirão selecionar de genótipos tolerantes ao excesso de metais pesados no solo e, portanto, promissores para a revegetação de áreas contaminadas, facilitando a introdução de leguminosas inoculadas com estes genótipos.

O presente estudo teve como objetivos: (a) avaliar a sobrevivência de genótipos selecionados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* em solo contaminado com metais pesados por fonte inorgânica; (b) verificar se a sobrevivência do rizóbio em solo contaminado com metais pesados relaciona-se com a tolerância em meio de cultura suplementado com metais previamente avaliadas (Matsuda et al., 2002).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a sobrevivência de rizóbio em solo contaminado com metais pesados, foram utilizados *Bradyrhizobium* tolerante [BR-4406 (estirpe recomendada para inoculação de *Enterolobium* spp.) e UFLA-01-457 (isolado de solo contaminado)], e *Azorhizobium* sensível [UFLA-01-486 e UFLA-01-510 (isolados de solo contaminado)], selecionados em estudo prévio, em meio de cultura com metais pesados, de um grupo de 60 estirpes/isolados (Matsuda et al., 2002).

Amostras do solo contaminado foram coletadas em um Latossolo Vermelho-Amarelo plântico (LVp), localizado no pátio da Companhia Mineira de Metais – CMM, em Três Marias (MG) com teores totais (extraídos por água régia) (mg dm<sup>-3</sup>) de Zn, Cd, Pb e Cu de até 12.000; 109; 1.116 e 887, respectivamente, além de outros elementos com menores teores, e consideráveis concentrações de metais pesados disponíveis solúveis em água (Dias-Jr et al., 1998). 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). As proporções

de solo contaminado foram determinadas com base nos estudos de Trannin et al. (2001b) e as características químicas e físicas encontram-se no quadro 1.

Depois de serem passados em peneira de malha de 2,0 mm, 200 g de cada mistura dos solos com diferentes proporções de solo contaminado (PSC) foram autoclavados individualmente em erlenmeyers (500 mL) tampados (4 repetições), durante 1 h, a 120°C. Depois, cada 200 g das diferentes PSC foram inoculados com 20 mL de cultura em YM (Yeast extract mannitol) (Vincent, 1970) da estirpe e dos isolados testados separadamente.

Essas culturas foram produzidas em meio com pH 6,8 e sob agitação orbital de 105 rpm, a 28°C, durante quatro dias, para *Azorhizobium*, e seis dias, para *Bradyrhizobium*, tempo adequado para o alcance da fase log em cada um dos gêneros; logo em seguida, o solo foi revolvido para garantir a distribuição uniforme das células de rizóbio. O solo inoculado foi mantido com teor de umidade em torno de 70% do volume total de poros (VTP) por meio de pesagens e aplicação de água destilada autoclavada.

A avaliação do número de células viáveis da estirpe e isolado de *Bradyrhizobium* e dos isolados de *Azorhizobium*, em cada PSC, foi feita por

**Quadro 1. Características químicas e físicas de diferentes proporções de Latossolo Vermelho-Amarelo plântico contaminado (PSC) em Latossolo Vermelho-Escuro distrófico (LEd) não contaminado, após autoclavagem a 120°C durante uma hora**

Característica química e física	PSC (%)		
	0	15	45
pH em água 1:2,5	6,0	6,1	6,1
P <sup>(1)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	29	31	32
K mg dm <sup>-3</sup>	182	181	182
Al <sup>3+</sup> cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,0	0,0	0,0
m %	0,0	0,0	0,0
V %	56,8	63,6	66,1
H + Al cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	1,9	2,1	2,3
Mn <sup>(2)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	3,2	4,2	1,5
Fe <sup>(2)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	39,0	24,4	2,2
Zn <sup>(2)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	0,4	750,0	1250,0
Cu <sup>(2)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	1,0	111,0	206,0
Cd <sup>(2)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	0,1	22,1	67,5
Pb <sup>(2)</sup> mg dm <sup>-3</sup>	1,4	65,1	192,5
Ca <sup>2+</sup> <sup>(3)</sup> cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	2,8	2,9	3,1
Mg <sup>2+</sup> <sup>(3)</sup> cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	1,3	1,6	1,9
Matéria orgânica dag kg <sup>-1</sup>	3,1	3,1	3,1
Areia %	17,0	21,0	31,0
Silte %	29,0	32,0	33,0
Argila %	54,0	47,0	36,0

Extraído por: <sup>(1)</sup> Mehlich -1. <sup>(2)</sup> DTPA. <sup>(3)</sup> KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) aos 0; 7; 14; 21 e 28 dias em meio YMA (Yeast extract mannitol agar) após a inoculação de diluições sucessivas de solo em solução salina (NaCl 5,5 g L<sup>-1</sup>). As diluições em série foram preparadas, colocando-se 5 g de amostra de solo em erlenmeyer de 250 mL que continha 95 mL de solução salina autoclavada a 120°C por 20 minutos (1ª diluição). 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 1ª diluição, que foi transferida para tubos de ensaio com 9 mL de solução salina estéril e, assim, sucessivamente até à nona diluição.

Na contagem, foram utilizadas a segunda até a nona diluição, e de cada diluição foram retiradas três alíquotas de 20 µL inoculadas em placas com meio YMA, divididas em seis partes, de forma que cada placa possibilitasse a avaliação de duas diluições, com três repetições (Miles & Misra, 1938). Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de médias e regressão, utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984). Os modelos de regressão foram selecionados com base no maior nível de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento de cada isolado e da estirpe, considerando os períodos de incubação, foi analisado por regressão polinomial (Quadro 2).

Verificou-se que o número de UFC da estirpe BR-4406 e dos isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-510 não foi influenciado no solo não contaminado com metais (Quadro 2). Trannin et al. (2001a) e Chaudri et al. (1992b), trabalhando com estirpes/isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* e isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, respectivamente, também 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), trabalhando com *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 16 meses, o número de células permaneceu estável. 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) foram bastante afetados na presença de concentrações elevadas de metais pesados no solo (PSC 15 e 45%) (Quadro 2).

**Quadro 2. Número médio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) 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 crescentes, em cada mistura de solos com diferentes proporções de solo contaminado**

Estirpe/isolado	Período de incubação (dia)					Regressão	R <sup>2</sup>
	0	7	14	21	28		
0% (solo não contaminado) log UFC g <sup>-1</sup>							
UFLA-01-457	10,41 a	10,34 a	10,43 a	10,40 a	10,36 a	sem ajuste	-
BR-4406	10,38 a	10,33 a	10,38 a	10,33 a	10,36 a	sem ajuste	-
UFLA-01-510	9,30 b	9,24 b	9,23 b	9,31 b	9,25 c	sem ajuste	-
UFLA-01-486	9,25 b	9,22 b	9,19 b	9,49 b	9,47 b	$\hat{Y} = 9,1833 + 0,0101x$	0,603**
15% de solo contaminado log UFC g <sup>-1</sup>							
UFLA-01-457	10,38 a	10,27 a	10,27 a	10,26 a	10,28 a	sem ajuste.	-
BR-4406	10,36 a	10,22 a	10,25 a	10,24 a	10,30 a	$\hat{Y} = 10,3456 - 0,0161x + 0,0005x^2$	0,805*
UFLA-01-510	9,23 b	8,21 b	7,74 b	7,73 b	7,60 b	$\hat{Y} = 8,8540 - 0,0536x$	0,777**
UFLA-01-486	9,28 b	8,13 b	7,67 b	7,63 b	7,49 b	$\hat{Y} = 8,8567 - 0,0582x$	0,770**
45% de solo contaminado log UFC g <sup>-1</sup>							
UFLA-01-457	10,40 a	10,22 a	10,24 a	10,04 a	9,72 a	$\hat{Y} = 10,4307 - 0,0219x$	0,877**
BR-4406	10,38 a	10,11 a	10,23 a	9,93 a	9,69 a	$\hat{Y} = 10,3820 - 0,0223x$	0,846**
UFLA-01-510	9,25 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	$\hat{Y} = 5,5520 - 0,2644x$	0,500**
UFLA-01-486	9,23 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	$\hat{Y} = 5,5400 - 0,2638x$	0,500**

Na coluna, as médias de UFC seguidas por letras iguais não diferem entre si, dentro de cada percentagem de solo contaminado (Tukey 1%); \*, \*\*: Significativos (P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente).



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 (Quadro 2), resultado que também foi encontrado com relação à sua tolerância em meio de cultura com metais pesados (Matsuda et al., 2002).

Dentre os representantes de *Azorhizobium*, o isolado UFLA-01-486 superou em número de UFC o isolado UFLA-01-510 no solo não contaminado somente após 28 dias de incubação na PSC 0%, mas não diferiu deste nas PSC 15 e 45%. Estes dois isolados também não apresentaram diferenças em YMA que continha metais pesados (Matsuda et al., 2002).

Para os três isolados, os modelos polinomiais que se ajustaram ao número de UFC, conforme o período de incubação crescente nas misturas de solos, foram lineares (Quadro 2). Porém, no solo não contaminado (UFLA-01-457 e UFLA-01-510) e na PSC 15% (UFLA-01-457), não foram encontrados ajustes, graças à baixa variação no número de UFC destes isolados, dependendo dos períodos de incubação, na mesma PSC.

Com relação à estirpe BR-4406, foram encontrados dois tipos de respostas para o número de UFC, conforme o período de incubação crescente: resposta quadrática na PSC 15% e resposta linear na PSC 45%. Verificou-se que, nesta última concentração, a estirpe respondeu com proporcionalidade entre os aumentos dos períodos de incubação e a correspondente redução no número de UFC (Quadro 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 impossibilitou o ajuste de um modelo de regressão.

As PSC testadas não causaram ausência de células viáveis da estirpe e isolado de *Bradyrhizobium* após 28 dias de incubação (Quadro 2). Houve um declínio acentuado no número de UFC no nível mais alto de solo contaminado, já que apenas 20% ( $10^{9,69}$  UFC g<sup>-1</sup> de solo) e 21% ( $10^{9,72}$  UFC g<sup>-1</sup> de solo) das células da estirpe BR-4406 e isolado UFLA-01-457, respectivamente, em relação aos números observados no tempo 0, sobreviveram ao final de 28 dias (Quadro 3).

Reddy et al. (1983) estudaram a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 em solo que recebeu lodo de esgoto urbano que continha as seguintes concentrações totais de metais (mg kg<sup>-1</sup>): Zn: 1.020, Cu: 496, Ni: 200, Pb: 210 e Cd: 14, que eram bem menores que as encontradas nas misturas de solo do presente estudo, ainda que determinadas por extração parcial dos metais empregando DPTA. Estes autores observaram redução significativa,

**Quadro 3. Percentagem 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 que continham diferentes proporções de solo contaminado (0, 15 e 45%)**

Isolado/estirpe	Proporção de solo contaminado		
	0	15	45
	%		
UFLA-01-457	89	79	21
BR-4406	95	87	20
UFLA-01-486	166	1,6	0
UFLA-01-510	89	2,3	0

porém bem maior, na população de rizóbio, correspondendo a menos de 1% do inóculo inicial ( $7,5 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>) depois de 42 dias incubados.

Por outro lado, Turner et al. (1995), ao avaliarem a sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RCR221 em diferentes misturas de lodo/solo, cujas concentrações totais (mg kg<sup>-1</sup>) de Zn, Cu, Ni e Cd no solo com 100% de lodo eram de 1.535, 648, 98 e 8,0, respectivamente, verificaram que, somente após 156 dias, houve redução significativa no número de rizóbio, decorrente do aumento do teor de metal no solo.

No entanto, em outros estudos (Kinkle et al., 1987; Heckman et al., 1987a,b), verificou-se aumento da população de *Bradyrhizobium japonicum* durante 10 anos de aplicação de lodo de esgoto com altos níveis de contaminação com metais, evidenciando que os metais pesados e outros componentes tóxicos do lodo não influíram na sobrevivência deste microrganismo, já que a população nativa havia se adaptado à condição de estresse.

Para Díaz-Ravinã & 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 toxidez do metal, e um efeito estimulatório sobre a taxa de crescimento das bactérias mais tolerantes sobreviventes, causado pelo aumento da disponibilidade de substratos derivados de células mortas, que pode variar durante o período de incubação. Esses efeitos podem explicar a redução e a subsequente recuperação no número de UFC pela estirpe BR-4406 na PSC 15% (Quadro 2).

A estirpe BR-4406 e o isolado UFLA-01-457, selecionados como tolerantes em meio YMA modificado pela adição de metais pesados (Matsuda

et al., 2002), mostraram certa tolerância na PSC 15%, na qual a sobrevivência das células foi de 87 ( $10^{10,30}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) e 79% ( $10^{10,28}$  UFC  $g^{-1}$  de solo), respectivamente (Quadro 3). Para Chaudri et al. (1992a), a tolerância a metais por isolados de solos contaminados indica que a bactéria, sobrevivendo nestas condições, 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 (Garcia Jr., 1997). A tolerância a metais da estirpe BR-4406 de *Bradyrhizobium* em meio YMA modificado e em solo também foi observada por Trannin et al. (2001a,b), que sugeriram características genéticas específicas, tendo em vista não existirem registros sobre a origem desta em sítio contaminado com metais pesados, o que possibilitaria uma pré-adaptação a esta condição. No entanto, durante o processo de seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* para *Enterolobium contortisiliquum*, a estirpe BR-4406 foi uma das mais eficientes e competitivas em relação à população nativa de um solo ácido (Ribeiro Jr. et al., 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, que, neste caso, diminui a disponibilidade de Al e Mn no solo. Está comprovado que microrganismos tolerantes a determinado estresse são capazes de tolerar outros tipos de estresse, o que pode estar ocorrendo em relação a BR4406, que é tolerante à acidez e a metais pesados. A produção e a excreção de compostos orgânicos pelos microrganismos podem imobilizar os metais pela formação de complexos organometálicos, representando possíveis mecanismos pelos quais células bacterianas toleram metais pesados.

Costerton et al. (1981) relataram que a produção e a excreção de polissacarídeos extracelulares modificam o ambiente ao redor da célula, permitindo, com isso, a sobrevivência de células bacterianas em ambientes contaminados. De fato, a produção de quantidades elevadas de polissacarídeos extracelulares por bactérias em sedimentos contaminados complexa Cr, tornando-o não-tóxico para estas (Aislabie & Loutit, 1986). Rudd et al. (1984) também verificaram a complexação de Cu, Cd, Co e Ni por componentes protéicos e polissacarídeos extracelulares em *Klebsiella aerogenes*. Todavia, a capacidade desta em complexar metais é menor para Ni que para Cu, Cd e Co, indicando a presença de vários sítios de ligação em seus componentes extracelulares para estes três metais. Isto pode explicar a maior toxidez de Ni para essa bactéria. 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 (em  $mg\ dm^{-3}$ : Zn: 159 a 455, Cu: 58 a 225, Cd: 4 a 18, Ni: 26 a 54) foram

adicionadas ao solo (Chaudri et al., 1992a), o que demonstra a capacidade diferenciada na complexação de metais.

As misturas de solo utilizadas neste estudo apresentaram características bastante semelhantes, com exceção dos teores de metais pesados, mas alguma variabilidade com relação às características físicas (Quadro 1). Para Giller et al. (1993), a sobrevivência de rizóbio em solos contaminados pode ser devida à localização das células na matéria orgânica ou em partículas de argila, que são protegidas da fitotoxidez dos metais, conforme relataram Turner et al. (1995) para *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Esses autores, utilizando dois tipos de solos (arenoso e argiloso), cujas concentrações totais ( $mg\ kg^{-1}$ ) de Zn, Cu, Ni e Cd eram de 1.535, 648, 98 e 8,0, respectivamente, para o solo argiloso, e de 306, 92, 30 e 9,8, respectivamente, para o solo arenoso, verificaram que reduções no número da bactérias começaram a surgir muito mais cedo no solo arenoso, mesmo apresentando menores concentrações de metais. Portanto, no presente estudo, a maior porcentagem de areia na PSC 45% em relação às outras PSC (0 e 15%) pode ter contribuído para elevar a toxidez de metais nesta PSC. No entanto, Reddy et al. (1983), ao avaliarem a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 em solo arenoso e argiloso que continha lodo de esgoto contaminado com metais (concentrações totais ( $mg\ kg^{-1}$ ): 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 de exposição.

Os isolados UFLA-01-486 e UFLA-01-510, mais sensíveis a metais em YMA modificado pela adição de metais no trabalho anterior (Matsuda et al., 2002), mostraram-se bastante sensíveis a metais pesados no solo, mesmo com a contagem inicial (tempo 0) de um número médio relativamente alto de *Azorhizobium* ( $10^{9,26}$  UFC  $g^{-1}$  de solo). Na PSC 15%, apenas 1,6% ( $10^{7,49}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) e 2,3% ( $10^{7,60}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) das células dos isolados UFLA-01-486 e UFLA-01-510 da contagem inicial, respectivamente, sobreviveram após 28 dias de incubação (Quadro 3). Já na PSC 45%, todas as células destes dois isolados após sete dias de incubação estavam mortas. 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 66% ( $10^{9,47}$  UFC  $g^{-1}$  de solo), indicando que apenas a presença de metais foi responsável pelo declínio da população no solo.

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 são responsáveis pela maior toxidez ao rizóbio. Contudo, Zn, Cd e Cu são os metais em concentrações mais elevadas no solo contaminado empregado neste

estudo e, de acordo com Giller et al. (1989), são os mais tóxicos para o rizóbio. Chaudri et al. (1992a) também 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, pouco tóxico ao rizóbio (McGrath, 1987). Assim, pode-se inferir que Zn, Cd e Cu são os responsáveis pela redução da sobrevivência destas bactérias no solo estudado.

Neste trabalho, percebeu-se a relação entre tolerância em meio YMA suplementado com metais pesados e a sobrevivência em solo contaminado, já que em ambas as condições, *Azorhizobium* mostrou-se mais sensível aos metais que *Bradyrhizobium*. Apesar da baixa sobrevivência da estirpe BR-4406 ( $10^{9.69}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) e do isolado UFLA-01-457 ( $10^{9.72}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) após 28 dias de incubação na PSC 45%, houve certa tolerância, visto que as concentrações de metais existentes nesta PSC (em  $mg\ dm^{-3}$ , extraídos por DPTA: Cd = 64; Cu = 197,2; e Zn = 1235) foram bastante elevadas. Portanto, a estirpe BR-4406 e o isolado UFLA-01-457, ambos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, são promissores para inoculação de leguminosas em áreas de solos contaminados com metais pesados.

## CONCLUSÕES

1. A sobrevivência de genótipos de *Bradyrhizobium*, avaliada por meio do número de células viáveis após 28 dias de incubação em solo com diferentes graus de contaminação, foi maior que a de *Azorhizobium*, indicando serem os primeiros mais tolerantes à presença de metais pesados no solo.

2. Houve relação entre sobrevivência no solo contaminado com metais pesados e tolerância em meio de cultura que continha sais destes metais, já que *Bradyrhizobium* foi mais tolerante que *Azorhizobium* nestas duas condições.

3. O isolado UFLA 01-457 e a estirpe BR 4406 de *Bradyrhizobium* são recomendados para estudos que visem à fixação simbiótica de  $N_2$  em leguminosas introduzidas em áreas de solos contaminados com metais pesados.

## LITERATURA CITADA

- AISLABIE, J. & LOUTIT, M.W. Accumulation of Cr (III) by bacteria isolated from polluted sediment. *Marine Environ. Res.*, 20:221-232, 1986.
- 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 Biol. Biochem.*, 25:575-580, 1993.
- 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 Biol. Biochem.*, 24:625-632, 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 Biol. Biochem.*, 24:83-88, 1992b.
- COSTERTON, J.W.; IRWIN, R.T. & CHENG, K.Y. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35:299-324, 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:595-600, 1984.
- DIAS-JUNIOR, H.E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos da indústria de zinco. *R. Bras. Ci. Solo*, 22:631-640, 1998.
- DÍAZ-RAVIÑA, M. & BAATH, E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2970-2977, 1996.
- DOELMAN, P. & HAANSTRA, L. Short-term and long-term effects of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors. *Plant Soil*, 79:317-327, 1984.
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C.; SILVA, E.M.R. & FARIA, S.M.. Revegetação de solos degradados. Seropédica, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1992. 11p. (EMBRAPA-CNPAB, comunicado técnico, 9)
- GARCIA Jr., O. Microrganismos e metais. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L., eds. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 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 Biol. Biochem.*, 21:841-848, 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 Biol. Biochem.*, 25:273-278, 1993.
- HECKMAN, J.R.; ANGLE, J.S. & CHANEY, R.L. Residual effects of sewage sludge on soybean. I. Accumulation of heavy metals. *J. Environ. Qual.*, 16:113-117, 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. *J. Environ. Qual.*, 16:117-124, 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*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:315-319, 1987.
- MATSUDA, A.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Tolerância de rizóbio de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. *Pesq. Agrop. Bras.*, 37:343-355, 2002.



- 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. *J. Hygiene*, 38:732-748, 1938.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F. & FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol.*, 121:563-570, 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 polyacrylamide gel electrophoresis or their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.*, 16:135-146, 1993.
- 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 Biol. Biochem.*, 15:343-345, 1983.
- RIBEIRO Jr., W.Q.; FRANCO, A.A. & LOPES, E.S. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para *Enterolobium contortisiliquum*, em latossolo ácido. *R. Bras. Ci. Solo*, 10:219-225, 1986.
- RUDD, T.; STERRITT, R.M. & LESTER, J.N. Formation and stability constants of complexes formed between heavy metals and bacterial extracellular polymers. *Water Res.*, 18:379-384, 1984.
- 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 Biol. Biochem.*, 24:781-788, 1992.
- TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & LIMA, A.S. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cobre e cádmio. *R. Bras. Ci. Solo*, 25:305-316, 2001a.
- TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O.. Crescimento e nodulação de *Enterolobium contortisiliquum*, *Acacia mangium* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. *R. Bras. Ci. Solo*, 25:743-753, 2001b.
- 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, Universidade Federal de Pelotas, 1984. 151p.