

# CRESCIMENTO E NODULAÇÃO DE *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* E *Sesbania virgata* EM SOLO CONTAMINADO COM METAIS PESADOS<sup>(1)</sup>

I. C. B. TRANNIN<sup>(2)</sup>, F. M. S. MOREIRA<sup>(3)</sup> & J. O. SIQUEIRA<sup>(3)</sup>

## RESUMO

Um dos desafios atuais da pesquisa é encontrar plantas e microssimbiontes tolerantes e que possibilitem a revegetação de áreas degradadas por excesso de metais pesados. Este experimento foi realizado no período de agosto a dezembro de 1998, em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da UFPA, Lavras (MG), com o objetivo de avaliar a tolerância a metais pesados e a capacidade de estabelecimento de simbiose de rizóbio de diferentes origens com *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril), *Acacia mangium* (acácia) e *Sesbania virgata* (sesbânia), em misturas de solos, que continham proporções de solo contaminado (PSC): (0, 15, 30, 45 e 60% v/v) com Zn, Cd, Pb e Cu (18.600, 135, 600 e 596 mg dm<sup>-3</sup>, extraídos por *aqua regia*, respectivamente), diluído em Latossolo Vermelho distrófico. Estirpes recomendadas (E) e isolados de solo contaminado (ISC) e de solo não contaminado (ISNC), cuja tolerância a Cu, Cd e Zn foi determinada previamente “*in vitro*”, foram inoculados. O aumento da PSC nas misturas inibiu o crescimento vegetativo, a produção de matéria seca e a nodulação das três espécies. A simbiose tamboril-BR4406 foi a mais tolerante e acácia-BR3617 a mais sensível à contaminação do solo. Os ISC que foram mais tolerantes “*in vitro*” formaram nódulos eficientes em solo sem contaminação, mas foram ineficientes em solos contaminados. Na PSC 15% (Zn = 750; Cd = 22,1; Pb = 65,1 e Cu = 111 mg dm<sup>-3</sup> extraídos por DTPA) a atividade específica da nitrogenase aumentou 5 e 10 vezes em relação ao solo sem contaminação para as simbioses sesbânia-BR5401 e tamboril-BR4406, respectivamente. A tolerância de rizóbio a metais “*in vitro*” não correspondeu à tolerância da simbiose em solo contaminado.

**Termos de indexação:** *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, fixação biológica de N<sub>2</sub>, leguminosas, poluição do solo, metal pesado, fitotoxidez, fitorremediação.

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao CPGSNP-DCS, Universidade Federal de Lavras -UFPA. Parcialmente financiado pelo convênio FAEPE/CMM e FAPEMIG. Recebido para publicação em janeiro de 2000 e aprovado em março de 2001.

<sup>(2)</sup> Doutoranda em Solos e Nutrição de Plantas, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras - UFPA. CEP 37200-000. Lavras (MG). Bolsista da CAPES. E-mail: itrannin@ufpa.br

<sup>(3)</sup> Professor do Departamento de Ciência do Solo, UFPA. Bolsista do CNPq.

**SUMMARY:** *GROWTH AND NODULATION OF Acacia mangium, Enterolobium contortisiliquum AND Sesbania virgata IN HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL*

One of the great challenges in environmental research today is to find tolerant species of plants and microsymbionts to make viable the revegetation of contaminated areas with heavy metals. This experiment was carried out under greenhouse conditions at the Soil Science Department of the Federal University of Lavras (MG), from August to December 1998, to assess the tolerance to heavy metals and the capacity to establish rhizobia symbiosis with *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril), *Acacia mangium* (acacia) and *Sesbania virgata* (sesbânia) in soil mixtures, containing different proportions of contaminated soil (PCS): 0, 15, 30, 45 and 60% (v/v) with Zn, Cd, Pb and Cu (18.600, 135, 600 and 596 mg dm<sup>-3</sup> extracted by aqua regia, respectively), diluted in a low fertility Oxisol. The species were inoculated with recommended strains (S) and isolates from soil contaminated with heavy metals (ICS) and isolates from non contaminated soil (INS), whose tolerance to Cu, Cd and Zn was previously determined "in vitro". PCS increase in the mixtures inhibited vegetative growth, dry matter production and the nodulation of the three species. The tamboril-BR 4406 symbiosis was the most tolerant and acacia-BR 3617 symbiosis the most sensitive to soil contamination. Although the ICSs that were more tolerant "in vitro" formed effective nodules in non contaminated soil, nodules were ineffective in soil mixtures with heavy metal contaminated soil. In the PCS, 15% (Zn = 750; Cd = 22.1; Pb = 65.1 and Cu = 111 mg dm<sup>-3</sup> extracted by DTPA) the specific activity of nitrogenase was stimulated, increasing 5 and 10 times in relation to the soil without contamination for the sesbânia-BR 5401 and tamboril-BR 4406 symbiosis, respectively. Rhizobia's "in vitro" tolerance to heavy metals was not related to symbiosis tolerance in contaminated soil.

*Index terms:* Bradyrhizobium, Azorhizobium, biological N<sub>2</sub>-fixation, leguminous, soil pollution, heavy metal, phytotoxicity, phytoremediation.

## INTRODUÇÃO

A fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN), realizada por rizóbio em simbiose com leguminosa, é de grande importância para programas de recuperação de solos degradados, geralmente deficientes em nitrogênio, em virtude da intensa perda de matéria orgânica. Em áreas contaminadas com metais pesados, como solos tratados com lodo de esgoto, os metais são persistentes por longos períodos e, em altas concentrações, tornam-se tóxicos às plantas e microrganismos, podendo reduzir a sobrevivência do rizóbio, a nodulação e a FBN (Reddy et al., 1983; McGrath, 1987; McGrath et al., 1988; Giller et al., 1989; Witter, 1989; Martensson & Witter, 1990).

A magnitude desses efeitos depende das características químicas do solo, do gênero e das espécies de rizóbio e do tempo de exposição ao solo contaminado (Giller et al., 1993). *Bradyrhizobium japonicum* apresentou maior tolerância a Zn, Cd, Cu e Ni em meio de cultura do que espécies do gênero *Rhizobium*, o que refletiu em ótimo desempenho de sua simbiose com soja, em solo contaminado (Angle et al., 1993). Diferenças na sensibilidade de rizóbio a metais foram detectadas também entre isolados, tendo sido *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

isolado de parcelas que receberam resíduos de esgoto mais tolerante aos efeitos tóxicos de Zn e Cu do que isolados de parcelas que receberam esterco. Esses isolados, apesar de mais tolerantes, foram ineficientes em simbiose com trevo, em solos tratados com lodo de esgoto, onde o baixo teor de N, a clorose e o atrofiamento das plantas de trevo deveriam-se não à fitotoxicidade dos metais, mas, sim, à ausência de FBN (McGrath et al., 1988).

Por outro lado, rizóbio eficiente foi isolado de nódulos de planta hospedeira nativa em solos contaminados, independentemente da concentração de metal (Martensson & Witter, 1990; Obbard et al., 1993), sugerindo que os bacteróides são protegidos dos efeitos tóxicos dos metais, no interior dos nódulos radiculares (Rother et al., 1983; McGrath et al., 1988; Giller et al., 1989; Smith & Giller, 1992).

Estes estudos, realizados em países de clima temperado, tratam da FBN por *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em simbiose com leguminosas herbáceas crescidas em solos contaminados por adição de resíduos orgânicos, particularmente de lodo de esgoto urbano. No entanto, a contaminação do solo com metais pesados, gerada por resíduos inorgânicos de atividades industriais nos trópicos, geralmente mais danosa ao meio ambiente, é um

tema de interesse atual que necessita de maiores pesquisas, principalmente relacionadas com a seleção de plantas e microssimbiontes tolerantes, que possibilitem a revegetação destes solos.

Algumas leguminosas arbóreas tropicais têm sido apontadas como promissoras para programas de recuperação de solos degradados por excesso de metais, destacando-se tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) (Rojas et al., 1996; Mostasso, 1997) e acácia (*Acacia mangium*) (Marques et al., 2000) e, entre as arbustivas, a sesbânia (*Sesbania virgata*) (Mostasso, 1997), sendo as duas primeiras capazes de formar simbiose eficiente com *Bradyrhizobium* e, a última, com *Azorhizobium*.

Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, tolerantes e sensíveis a metais "in vitro", em estabelecer simbiose com acácia, tamboril e sesbânia, em misturas de solo que continham proporções crescentes de solo contaminado com metais pesados por rejeitos da industrialização de zinco.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de 25 de agosto a 3 de dezembro de 1998. Utilizou-se material de solo contaminado com metais pesados, coletado em área industrial da Companhia Mineira de Metais-CMM, no município de Três Marias (MG), classificado como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico plântico (LVAd) (Ribeiro-Filho et al., 1999), e de um Latossolo Vermelho distrófico (LVd) não contaminado, coletado na camada superficial (0-20 cm), na região de Jaguara (MG). Considerando os elevados teores de

metais no solo da CMM (Zn = 18.600, Cd = 135, Pb = 600 e Cu = 596 mg kg<sup>-1</sup> de solo, extraídos por *aqua regia*) e com base em estudos anteriores (Mostasso, 1997; Marques et al., 2000), foram utilizadas misturas que continham diferentes proporções de solo contaminado (PSC): 0, 15, 30, 45 e 60% (v/v), diluído em LVd. Após calagem do LVd, os solos foram misturados e fumigados com Bromex, durante quatro dias, e receberam adubação básica, com solução nutritiva de sais p.a de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, de modo a fornecer: 60 mg de N; 250 mg de P e 150 mg dm<sup>-3</sup> de K no solo. As misturas foram incubadas com umidade correspondente a 70% do VTP, durante 20 dias, em vasos de PVC, com capacidade para 1,250 dm<sup>-3</sup> de solo seco ao ar, revestidos com sacos de polietileno esterilizados. Após esse período, as misturas que continham diferentes PSC foram homogeneizadas e analisadas (Quadro 1).

Foram estudadas três leguminosas, sendo duas arbóreas, tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) e acácia (*Acacia mangium*), e uma arbustiva, sesbânia (*Sesbania virgata*), todas com capacidade para estabelecer simbiose eficiente com rizóbio e com potencialidade para revegetação de solos degradados por excesso de metais (Mostasso, 1997; Marques et al., 2000). As sementes das três espécies foram submetidas à quebra de dormência, conforme Davide et al. (1995), por meio de escarificação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguida de lavagem durante uma hora em água corrente e esterilização por imersão em álcool e lavagem em água esterilizada. Foram semeadas três sementes por vaso, mantendo-se uma planta após o desbaste.

A inoculação de rizóbio específico a cada espécie foi efetuada durante a semeadura, por meio da adição de 2,0 mL vaso<sup>-1</sup> de cultura em YEM (Vincent, 1970), produzida sob agitação orbital de 105 rpm a 28°C durante 6 dias (10<sup>9</sup> e 10<sup>10</sup> cel mL<sup>-1</sup>, para *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, respectivamente).

**Quadro 1. Características químicas e físicas das misturas de LVd não contaminado com diferentes proporções de LVAd contaminado com metais pesados (PSC), após correção de acidez e adubação**

PSC	Química													Física				
	pH	P <sup>(1)</sup>	K <sup>(1)</sup>	Mn <sup>(2)</sup>	Fe <sup>(2)</sup>	Zn <sup>(2)</sup>	Cu <sup>(2)</sup>	Cd <sup>(2)</sup>	Pb <sup>(2)</sup>	Ca <sup>(3)</sup>	Mg <sup>(3)</sup>	Al <sup>(3)</sup>	H + Al	M.O.	Areia	Silte	Argila	
%	mg dm <sup>-3</sup>													cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	dag kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>		
0	6,0	29	182	3,2	37,1	0,4	1	0,1	1,4	2,8	1,3	0	1,9	3,1	170	290	540	
15	6,1	31	181	4,2	31,4	750	111	22,1	65,1	2,9	1,6	0	2,1	3,1	210	320	470	
30	6,1	36	182	2,4	31,0	1.125	184	42,5	87,5	3,0	1,4	0	1,9	3,1	250	310	440	
45	6,1	32	182	1,5	26,0	1.250	206	67,5	192,5	3,1	1,9	0	2,3	3,1	310	330	360	
60	6,1	31	176	0,9	1,9	1.344	254	90,0	207,5	3,2	1,7	0	2,1	2,6	330	370	300	

<sup>(1)</sup> Extraído por Mehlich-1. <sup>(2)</sup> Extraído por DTPA. <sup>(3)</sup> Extraído por KCl 1M.

Foram utilizadas as estirpes recomendadas pelo CNPAB/EMBRAPA como inoculantes (E) e os isolados de solo contaminado (ISC) e de solo não contaminado (ISNC) selecionados em trabalho anterior (Trannin et al., 2001) quanto à tolerância a metais pesados “*in vitro*”, como tolerantes (T), sensíveis (S) e de tolerância média (TM), dentro de cada gênero. De *Bradyrhizobium*, foram testados BR4406 (E,T), UFLA 01-457 (ISC,T) e INPA398 (ISNC,S), simbiotes de tamboril e BR3617 (E,TM), de acácia e de *Azorhizobium*, BR5401 (Moreira et al., 1998) (E,S), UFLA 01-483 (ISC,TM) e UFLA 01-515 (ISC,T), simbiotes de sesbânia. Somente a estirpe BR3617 foi utilizada em simbiose com acácia neste estudo, porque não diferiu de outros isolados desta espécie quanto à tolerância a metais, na seleção “*in vitro*”.

O experimento foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado, e os tratamentos para tamboril e sesbânia originaram-se do fatorial 5 x 5 (cinco PSC e cinco tratamentos de N: 3 estirpe/isolados de rizóbio; fertilizante nitrogenado e controle absoluto), enquanto para acácia os tratamentos originaram-se do fatorial 5 x 3 (cinco PSC e três tratamentos de N: estirpe de rizóbio; fertilizante nitrogenado e controle absoluto), com cinco repetições.

A umidade do solo foi mantida próxima a 70% do VTP, por meio de pesagens dos vasos e irrigação com água deionizada. As plantas foram coletadas 100 dias após a semeadura, quando se avaliaram a altura, o diâmetro do caule e as raízes noduladas foram submetidas à avaliação da atividade da nitrogenase, utilizando o método da redução de acetileno (Dilworth, 1966). Para isto, as raízes foram colocadas em recipientes de polietileno com capacidade de 250 mL, hermeticamente fechados, dos quais se retiraram alíquotas de 25 mL de ar, que foi substituído por acetileno.

Após três horas de incubação, retirou-se do recipiente uma amostra de 1 mL de gás, para a determinação da quantidade de etileno produzido, utilizando o cromatógrafo a gás, VARIAN STAR 3400 CX. Logo após, os nódulos foram destacados das raízes para determinação do número e do peso. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 68°C, anteriormente à pesagem. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de médias e regressão, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984). Os modelos de regressão foram selecionados, considerando o maior nível de significância. O número de nódulos foi transformado, seguindo a expressão  $\sqrt{x+0,5}$ . Em decorrência da morte das plantas de sesbânia, a partir da PSC 30%, nos tratamentos de inoculação com rizóbio, as variáveis desta espécie foram avaliadas somente até à PSC 15%.

Para comparar a tolerância das três espécies vegetais cultivadas com diferentes tratamentos de

N (estirpe recomendada de rizóbio, N mineral e controle absoluto) nas PSC, utilizou-se a fórmula seguinte:  $[IT = (PSC/CT) \times 100]$ , sendo IT = índice de tolerância, PSC = valor da variável de produção e crescimento vegetativo em cada proporção de solo contaminado; CT = valor da variável no controle (solo sem contaminação).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção e crescimento vegetativo

A produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e de raízes (MSR), altura e diâmetro do caule (DC) de cada espécie vegetal, em diferentes tratamentos de nitrogênio (N) e proporções de solo contaminado (PSC), encontram-se nos quadros 2, 3 e 4, para tamboril, acácia e sesbânia, respectivamente. O aumento da PSC na mistura de solos exerceu efeito significativo sobre a produção e sobre o crescimento das três espécies, sendo esse efeito dependente dos tratamentos de N. Para tamboril, os tratamentos de N diferiram para MSPA, MSR, altura e DC, somente em 0%, somente em 15%, até 30% e em todas as PSC, respectivamente. Para acácia, com exceção da MSPA, que só diferiu em solo sem contaminação, as demais variáveis diferiram de acordo com os tratamentos de N até a PSC 15%. Plantas de sesbânia sobreviveram até a PSC 15% quando rizóbio foi inoculado e até a PSC 30% quando adubadas com fertilizante nitrogenado, sendo por isso analisadas somente por teste de médias até a PSC 15%. Verificou-se que todas as variáveis de produção e crescimento de sesbânia diferiram com os tratamentos de N somente em solo sem contaminação, mostrando que, independentemente do tratamento de N, essa espécie foi muito sensível à contaminação com metais. Isso pode ser atribuído ao crescimento inicial mais vigoroso de sesbânia comparado ao das demais espécies estudadas, tornando-a mais sensível aos metais por acumulá-los mais rapidamente em seus tecidos, o que também foi verificado por Mostasso (1997).

Em geral, a inoculação de rizóbio foi menos eficiente que a adubação nitrogenada na promoção do crescimento inicial dessas espécies, principalmente de acácia e sesbânia. Marschener (1995) atribuiu a deficiência de N em leguminosas inoculadas com rizóbio a um período de carência desse elemento entre a infecção da raiz e o início da fixação de N<sub>2</sub>, que é prejudicial à formação da área foliar necessária para suprir os fotoassimilados para a formação do nódulo e sua atividade.

Além disso, os efeitos fitotóxicos dos metais a partir da PSC 15% foram evidentes nas três espécies e causaram redução no crescimento, clorose das folhas novas seguida por branqueamento e diminuição da ramificação das raízes, sintomas típicos de toxidez de Zn, que se encontra em maior



**Quadro 2. Matéria seca da parte aérea e de raiz, altura e diâmetro do caule, de plantas de tamboril em tratamentos de N e proporções de solo contaminado (PSC), cem dias após semeadura**

Tratamento de N	Proporção de solo contaminado (%)					Equação	R <sup>2</sup>
	0	15	30	45	60		
Matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )							
N mineral	3,03 a	0,86 a	0,65 a	0,28 a	0,22 a	Y = 2,83 - 0,12 x + 0,001 x <sup>2</sup>	0,93**
Controle	1,41 c	0,46 a	0,33 a	0,28 a	0,19 a	Y = 1,31 - 0,05 x + 0,0006 x <sup>2</sup>	0,92**
BR4406	2,14 b	0,56 a	0,27 a	0,26 a	0,26 a	Y = 2,00 - 0,09 x + 0,001 x <sup>2</sup>	0,94**
UFLA 01-457	2,50 ab	0,37 a	0,31 a	0,32 a	0,21 a	Y = 2,27 - 0,11 x + 0,001 x <sup>2</sup>	0,87**
INPA398	2,48 b	0,48 a	0,38 a	0,28 a	0,21 a	Y = 2,27 - 0,11 x + 0,001 x <sup>2</sup>	0,89**
Matéria seca de raiz (g planta <sup>-1</sup> )							
N mineral	2,08 a	0,7 ab	0,46 a	0,21 a	0,12 a	Y = 1,96 - 0,08 x + 0,0080 x <sup>2</sup>	0,95**
Controle	1,56 a	0,34 b	0,12 a	0,09 a	0,05 a	Y = 1,42 - 0,07 x + 0,0008 x <sup>2</sup>	0,93**
BR4406	1,72 a	1,23 a	0,18 a	0,13 a	0,14 a	Y = 1,82 - 0,07 x + 0,0006 x <sup>2</sup>	0,94**
UFLA 01-457	1,72 a	0,24 b	0,14 a	0,15 a	0,10 a	Y = 1,56 - 0,08 x + 0,0009 x <sup>2</sup>	0,89**
INPA398	1,92 a	0,42 b	0,17 a	0,15 a	0,12 a	Y = 1,78 - 0,09 x + 0,0010 x <sup>2</sup>	0,93**
Altura (cm)							
N mineral	26,6 a	16,6 a	13,9 a	10,9 a	9,30 a	Y = 25,86 - 0,58 x + 0,005 x <sup>2</sup>	0,97**
Controle	14,8 c	10,5 b	9,30 b	8,40 a	8,20 a	Y = 13,30 - 0,10 x	0,80**
BR4406	18,2 b	16,4 a	10,2 b	9,20 a	8,80 a	Y = 17,76 - 0,17 x	0,87**
UFLA 01-457	18,4 b	12,4 b	9,70 b	9,30 a	7,70 a	Y = 17,98 - 0,37 x + 0,004 x <sup>2</sup>	0,97**
INPA398	17,0 bc	12,8 b	11,0 ab	10,2 a	6,90 a	Y = 16,14 - 0,15 x	0,95**
Diâmetro do caule (mm)							
N mineral	6,0 a	4,1 a	3,3 a	2,9 a	2,3 a	Y = 5,87 - 0,11 x + 0,0009 x <sup>2</sup>	0,98**
Controle	4,4 b	2,9 b	2,6 ab	2,6 ab	2,7 ab	Y = 4,28 - 0,09 x + 0,0010 x <sup>2</sup>	0,95**
BR4406	4,2 b	2,3 b	1,7 b	1,7 bc	1,5 b	Y = 4,05 - 0,12 x + 0,0013 x <sup>2</sup>	0,95**
UFLA 01-457	5,0 b	2,9 b	2,2 b	1,7 bc	2,0 ab	Y = 4,91 - 0,14 x + 0,0016 x <sup>2</sup>	0,99**
INPA398	4,9 b	2,6 b	2,0 b	1,5 c	2,0 ab	Y = 4,79 - 0,15 x + 0,0018 x <sup>2</sup>	0,98**

Médias seguidas por letras iguais, na vertical, não diferem entre si (Tukey 1%). \*\* Significativo (P < 0,01).

**Quadro 3. Matéria seca da parte aérea e de raiz, altura e diâmetro do caule, de plantas de acácia em tratamentos de N e proporções de solo contaminado (PSC), cem dias após semeadura**

Tratamento de N	Proporção de solo contaminado (%)					Equação	R <sup>2</sup>
	0	15	30	45	60		
Matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )							
N mineral	3,13 a	0,29 a	0,07 a	0,07 a	0,05 a	Y = 2,84 - 0,154 x + 0,0020 x <sup>2</sup>	0,89**
Controle	1,12 c	0,08 a	0,04 a	0,04 a	0,02 a	Y = 1,01 - 0,055 x + 0,0007 x <sup>2</sup>	0,87**
BR3617	2,54 b	0,10 a	0,06 a	0,05 a	0,04 a	Y = 2,26 - 0,127 x + 0,0015 x <sup>2</sup>	0,86**
Matéria seca de raiz (g planta <sup>-1</sup> )							
N mineral	1,03 a	0,17 a	0,04 a	0,03 a	0,02 a	Y = 0,95 - 0,049 x + 0,0006 x <sup>2</sup>	0,93**
Controle	0,64 c	0,03 b	0,03 a	0,02 a	0,02 a	Y = 0,76 - 0,042 x + 0,0005 x <sup>2</sup>	0,85**
BR3617	0,86 b	0,06 b	0,03 a	0,03 a	0,02 a	Y = 0,58 - 0,031 x + 0,0003 x <sup>2</sup>	0,89**
Altura (cm)							
N mineral	36,1 a	13,7 a	4,8 a	4,8 a	3,0 a	Y = 34,66 - 1,4549 x + 0,0159 x <sup>2</sup>	0,97**
Controle	23,6 c	4,3 b	3,1 a	2,9 a	2,3 a	Y = 21,52 - 1,0209 x + 0,0120 x <sup>2</sup>	0,89**
BR3617	31,2 b	5,8 b	3,2 a	3,0 a	2,6 a	Y = 28,65 - 1,4020 x + 0,0170 x <sup>2</sup>	0,91**
Diâmetro do caule (mm)							
N mineral	3,6 a	2,3 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	Y = 3,55 - 0,1125 x + 0,0012 x <sup>2</sup>	0,98**
Controle	3,0 b	1,0 b	1,0 a	1,0 a	1,0 a	Y = 2,77 - 0,1028 x + 0,0013 x <sup>2</sup>	0,85**
BR3617	3,0 b	1,2 b	1,0 a	1,0 a	1,0 a	Y = 2,82 - 0,1004 x + 0,0012 x <sup>2</sup>	0,91**

Médias seguidas por letras iguais, na vertical, não diferem entre si (Tukey 1%). \*\* Significativo (P < 0,01).

disponibilidade no solo em estudo. A clorose pode ser sintoma de deficiência de elementos, como Fe e Mn, que participam da formação, da multiplicação e do funcionamento dos cloroplastos ou na síntese de clorofila (Malavolta, 1994). A deficiência destes nutrientes está, possivelmente, relacionada com o desequilíbrio no processo de absorção e translocação dos macronutrientes, decorrente da inibição competitiva com outros íons, como, por exemplo, Cd e Zn (Marques et al., 2000), causando o menor crescimento das plantas. O atrofiamento foi mais acentuado em plantas de acácia a partir da PSC 30%. Tamboril apresentou todos estes sintomas, mas em menor intensidade que as demais espécies.

As três espécies apresentaram baixos índices de tolerância (IT) para as variáveis de produção e crescimento vegetativo em todos os tratamentos de N, a partir da PSC 15%, mostrando que as concentrações dos metais nas misturas foram muito altas (Quadros 5 a 7). Contudo, tamboril apresentou IT superior ao das demais espécies, em todos os tratamentos de N e PSC, inclusive na PSC 60%, em que os IT para MSPA e altura foram mais altos que os de acácia e sesbânia na PSC 15% e para MSR e DC na PSC 30%. Com exceção do IT para altura, as demais variáveis de sesbânia apresentaram IT superiores aos de acácia, na PSC 15%, e inferiores nas PSC mais altas. Portanto, a ordem de tolerância

**Quadro 4. Matéria seca da parte aérea e de raiz, altura e diâmetro do caule, de plantas de sesbânia em tratamentos de N e proporções de solo contaminado (PSC), cem dias após a semeadura**

Tratamento de N	Proporção de solo contaminado (%)							
	Parte aérea		Raiz		Altura		Diâmetro	
	0	15	0	15	0	15	0	15
	g planta <sup>-1</sup>				cm		mm	
N mineral	4,02 a	0,24 a	2,38 a	0,16 a	39,9 a	9,9 a	5,3 a	2,1 a
Controle	1,96 c	0,21 a	0,93 bc	0,09 a	29,4 bc	9,0 a	4,1 bc	1,8 a
BR 5401	2,80 b	0,15 a	1,02 b	0,21 a	33,8 b	6,9 a	4,5 ab	2,0 a
UFLA 01-483	1,98 c	0,13 a	0,80 bc	0,08 a	30,0 b	6,0 a	3,3 cd	1,6 a
UFLA 01-515	1,49 c	0,14 a	0,56 c	0,08 a	24,8 c	7,8 a	2,8 d	1,7 a

Médias seguidas por letras iguais, na vertical, não diferem entre si (Tukey 1%).

**Quadro 5. Índices de tolerância para produção de matéria seca da parte aérea e de raiz, altura e diâmetro do caule de plantas de tamboril, em diferentes tratamentos de N e proporções de solo contaminado com metais pesados (PSC)**

Tratamento de N	PSC	Índice de tolerância (% <sup>(1)</sup> )			
		Parte aérea	Raiz	Altura	Diâmetro do caule
	%	g planta <sup>-1</sup>		cm	mm
N mineral	0	100	100	100	100
	15	28	34	62	68
	30	21	22	52	55
	45	9	10	41	48
	60	7	6	35	38
Controle	0	100	100	100	100
	15	32	22	71	66
	30	23	8	63	59
	45	20	6	57	59
	60	13	3	55	52
BR 4406	0	100	100	100	100
	15	26	71	90	55
	30	13	10	56	40
	45	12	7	50	40
	60	12	8	48	36

<sup>(1)</sup> Percentagem de rendimento da variável em relação ao solo sem contaminação.

das espécies à contaminação do solo foi tamboril > sesbânia > acácia na PSC 15% e tamboril > acácia > sesbânia nas PSC superiores, sendo tamboril a espécie mais tolerante e a mais promissora para programas de revegetação de solos contaminados com metais pesados.

**Nodulação e atividade da nitrogenase**

A nodulação foi inibida em todas as espécies vegetais com o aumento da PSC e foi ausente nos tratamentos com fertilizante nitrogenado e controle absoluto. A ausência de nodulação também foi verificada nos tratamentos de inoculação com rizóbio,

**Quadro 6. Índices de tolerância para produção de matéria seca da parte aérea e de raiz, altura e diâmetro do caule de acácia, em diferentes tratamentos de N e proporções de solo contaminado com metais pesados (PSC)**

Tratamento de N	PSC	Índice de tolerância (% <sup>(1)</sup> )			
		Parte aérea	Raiz	Altura	Diâmetro do caule
	%	g planta <sup>-1</sup>		cm	mm
N mineral	0	100	100	100	100
	15	9	16	38	64
	30	2	3	13	28
	45	2	3	13	28
	60	2	2	9	28
Controle	0	100	100	100	100
	15	7	5	18	33
	30	3	5	13	33
	45	3	3	12	33
	60	2	3	10	33
BR3617	0	100	100	100	100
	15	4	7	18	40
	30	2	3	10	33
	45	2	3	10	33
	60	2	3	8	33

<sup>(1)</sup> Percentagem de rendimento da variável em relação ao solo sem contaminação.

**Quadro 7. Índices de tolerância para produção de matéria seca da parte aérea e de raiz, altura e diâmetro do caule de sesbânia, em diferentes tratamentos de N e proporções de solo contaminado com metais pesados (PSC)**

Tratamento de N	PSC	Índice de tolerância (% <sup>(1)</sup> )			
		Parte aérea	Raiz	Altura	Diâmetro do caule
	%	g planta <sup>-1</sup>		cm	mm
N mineral	0	100	100	100	100
	15	6	7	25	40
	30	2	2	10	36
	45	0	0	0	0
	60	0	0	0	0
Controle	0	100	100	100	100
	15	11	10	31	44
	30	0	0	0	0
	45	0	0	0	0
	60	0	0	0	0
BR5401	0	100	100	100	100
	15	5	21	20	44
	30	0	0	0	0
	45	0	0	0	0
	60	0	0	0	0

<sup>(1)</sup> Percentagem de rendimento da variável em relação ao solo sem contaminação.

a partir das PSC 15, 30 e 45%, para acácia, sesbânia e tamboril, respectivamente. Em solo sem contaminação, a inoculação de BR5401 em sesbânia resultou em número, peso de nódulos e atividade específica da nitrogenase superiores aos dos isolados de solos contaminados UFLA 01-483 e UFLA 01-515, que "in vitro" foram mais tolerantes a metais (Quadro 8).

Na PSC 15%, a nodulação foi muito reduzida, e os isolados UFLA 01-483 e UFLA 01-515 não diferiram de BR5401 em peso e número de nódulos, contudo, somente nódulos originados da simbiose com a estirpe BR5401 apresentaram atividade da nitrogenase cinco vezes superior à atividade dos nódulos em solo sem contaminação.

No entanto, esse aumento da atividade específica da nitrogenase não deve ser interpretado como efeito benéfico da contaminação do solo à planta ou à simbiose, visto que, na PSC 15%, ocorreu redução no crescimento vegetativo, produção de matéria seca, número e peso dos nódulos.

Este comportamento também foi observado por Matsuda et al. (1998), para mudas de guandu (*Cajanus cajan*), e por Mostasso (1997), para espécies arbóreas e arbustivas, e pode estar relacionado com um mecanismo de defesa da simbiose contra os efeitos tóxicos dos metais, ou seja, plantas e microssimbiontes em situação de estresse buscam uma forma de suprir o fornecimento e, ou, armazenamento de N nos tecidos da planta, mantendo elevada a atividade específica da nitrogenase.

Em plantas de tamboril, a estirpe BR4406 e os isolados UFLA 01-457 e INPA398 inoculados não diferiram em número e peso de nódulos em solo sem contaminação, mas a atividade específica da nitrogenase foi superior para a simbiose com BR4406 (Quadro 9). Na PSC 15%, BR4406 não diferiu de

UFLA 01-457 e superou INPA398 em número, mas não diferiu em peso de nódulos. No entanto, como ocorreu para sesbânia, também para tamboril, somente a inoculação com a estirpe BR4406 resultou em nódulos com atividade da nitrogenase 10 vezes superior à determinada em solo sem contaminação, sendo o único tratamento a apresentar nódulos, embora inativos, na PSC 30%.

A simbiose de *Bradyrhizobium* com tamboril foi mais tolerante que a simbiose com acácia, que só nodulou em solo sem contaminação. Essa ausência de nodulação pode ser atribuída aos efeitos fitotóxicos dos metais com provável decréscimo na quantidade de fotoassimilados liberados na região rizosférica, já que a inoculação de rizóbio e a adição de fertilizante nitrogenado não diferiram na produção de MSPA das plantas de acácia na PSC 15%.

Esta também pode ter sido a causa da formação de nódulos inativos em plantas de tamboril, na PSC 30%, diferindo do estudo de MacGrath et al. (1988), que verificaram que o efeito fitotóxico dos metais pesados foi superado quando plantas de trevo branco foram cultivadas com fertilizante nitrogenado em solo contaminado e concluíram que a FBN foi totalmente suprimida devido ao efeito tóxico do metal sobre o rizóbio, contudo o nível de contaminação do solo estudado por este autor foi bem inferior ao do presente estudo.

A presença dos metais na PSC 15% pode ter causado a morte ou apenas ter interferido nos processos de reconhecimento e infecção entre *Bradyrhizobium* e acácia, pois sabe-se que esta bactéria pode viver em vida livre por longos períodos, na ausência de planta hospedeira (Nutman, 1975).

Além disso, Smith & Giller (1992), sugerem que a presença de rizóbio tolerante e, ao mesmo tempo,

**Quadro 8. Número, peso e atividade da nitrogenase de nódulos de raízes de sesbânia em diferentes tratamentos de N e proporções de solo contaminado com metais pesados nas misturas de solos**

Tratamento de N	Proporção de solo contaminado (%)					
	Número <sup>(1)</sup>		Peso de nódulo fresco		Atividade da nitrogenase	
	0	15	0	15	0	15
	———— g planta <sup>-1</sup> ————				– moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> g nod <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> –	
BR5401	13,9 a	3,6 a	0,325 a	0,037 a	2336 a	11664 a
UFLA 01-483	9,8 b	2,6 a	0,166 b	0,021 a	1167 b	0 b
UFLA 01-515	11,2 b	3,4 a	0,208 b	0,030 a	1225 b	0 b
Controle	0 c	0 b	0 c	0 b	0 c	0 b
N mineral	0 c	0 b	0 c	0 b	0 c	0 b

<sup>(1)</sup> Números transformados seguindo a expressão  $\sqrt{x + 0,5}$ .

Médias seguidas por letras iguais na vertical, não diferem entre si (Tukey 1%).



eficiente em fixar N<sub>2</sub> com suas plantas hospedeiras, seja o mais esperado em solos contaminados com metais, devido à adaptação e ao desenvolvimento de mecanismos específicos de tolerância. Os isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* de solo contaminado foram capazes de formar simbiose efetiva em solos sem contaminação, diferindo do resultado encontrado por Giller et al. (1989), em que *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolado de nódulos de trevo branco cultivado em solo tratado com lodo de esgoto contaminado com metais foi ineficiente em meio sem contaminação.

Com a presença de vários metais em excesso nas misturas de solos, não foi possível determinar qual metal, ou interação de metais apresentou maior toxidez ao rizóbio, planta hospedeira e à simbiose rizóbio-leguminosa. No entanto, 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 et al. (1989), são os mais tóxicos para o rizóbio.

Trabalhos com sais de metais adicionados ao solo têm mostrado maior toxidez de Cd, comparado ao Cu ou Zn, para a formação do nódulo e FBN, com ordem de toxidez: Cd > Co > Cu > Zn (McIlveen & Cole, 1974) e Cd > Ni > Cu > Zn (Porter & Sheridan, 1981; Päivöke, 1983a,b), respectivamente. Chaudri et al. (1992b) mostraram que a ordem de toxidez de metais ao rizóbio e, indiretamente à FBN, foi Cd > Zn > Cu, quando adicionados ao solo em soluções de sulfato. Chumbo é muito insolúvel no solo e, portanto, menos tóxico às plantas e ao rizóbio (McGrath, 1987). A ausência de simbiose eficiente para tamboril-BR4406 a partir da PSC 30% é um fato preocupante, pois indica uma possível dificuldade quanto ao uso de inoculantes em solos com altas concentrações de metais.

### Tolerância de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a metais “*in vitro*” e em simbiose

Os testes de tolerância de rizóbio a Cu, Cd e Zn, utilizando o meio YMA modificado e soluções de metais, apresentaram resultados semelhantes e mostraram que, “*in vitro*”, *Azorhizobium* foi mais sensível que *Bradyrhizobium* e que, para ambos os gêneros, os isolados de solos contaminados com metais foram mais tolerantes. Além disso, a ordem de toxidez dos metais foi Cu > Cd > Zn, para todas as estirpes e isolados estudados, concordando com Chaudri et al. (1992a) e Angle et al. (1993).

No entanto, a tolerância de rizóbio a metais “*in vitro*” não se correlacionou com a tolerância da simbiose em solo contaminado, embora os metais em maiores concentrações nas misturas tenham sido os mesmos testados “*in vitro*” (Quadro 10). Isso pode ter ocorrido porque os efeitos tóxicos dos metais sobre plantas e microrganismos dependem da atividade química destes na solução do solo, ou seja, vários fatores podem afetar a solubilidade dos metais e, conseqüentemente, sua toxidez. Um desses fatores é a capacidade tamponante do solo, que pode controlar a disponibilidade do metal na solução (Ibekwe et al., 1998). Além disso, o crescimento de um microrganismo no solo pode diferir do crescimento “*in vitro*”, mesmo quando concentrações equivalentes de metais são adicionadas em meio de cultura (Nannipiere et al., 1990).

As concentrações tóxicas dos metais a *Bradyrhizobium* “*in vitro*” e à simbiose em solos contaminados foram muito superiores às encontradas por estudos semelhantes realizados em países de clima temperado, utilizando solos tratados com lodo de esgoto e espécies herbáceas em simbiose com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium japonicum*, e

**Quadro 9. Número, peso e atividade da nitrogenase de nódulos de raízes de tamboril em diferentes tratamentos de N e proporções de solo contaminado com metais pesados nas misturas de solos**

Tratamento de N	Proporção de solo contaminado (%)							
	Número <sup>(1)</sup>			Peso de nódulo fresco			Atividade da nitrogenase	
	0	15	30	0	15	30	0	15
	g planta <sup>-1</sup>						- moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> g nod <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> -	
BR4406	5,47 a	3,74 a	2,74 a	0,34 a	0,15 a	0,09 a	228 a	2325 a
UFLA 01-457	5,88 a	3,19ab	0 b	0,38 a	0,11 a	0 b	152 b	0 b
INPA398	5,72 a	2,47 b	0 b	0,33 a	0,06 b	0 b	178 b	0 b
Controle	0 b	0 c	0 b	0 b	0 c	0 b	0 c	0 b
N mineral	0 b	0 c	0 b	0 b	0 c	0 b	0 c	0 b

<sup>(1)</sup> Números transformados seguindo a expressão  $\sqrt{x + 0,5}$ .

Médias seguidas por letras iguais na vertical, não diferem entre si (Tukey 1%).

**Quadro 10. Concentrações máximas toleradas (CMT) a Cu, Cd e Zn, por estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, em meio YMA (mg L<sup>-1</sup>) e em simbiose em solo contaminado (mg dm<sup>-3</sup>), com respectivos coeficientes de correlação**

Estirpe/isolado	Cu		Cd		Zn	
	Solo <sup>(1)</sup>	YMA	Solo <sup>(1)</sup>	YMA	Solo <sup>(1)</sup>	YMA
<i>Bradyrhizobium</i> - tamboril						
BR4406	184	> 40	42,5	> 40	1125	800
INPA398	111	20	22,1	30	750	500
UFLA 01-457	111	> 40	22,1	> 40	750	800
<i>Azorhizobium</i> - sesbânia						
BR5401	111	5	22,1	20	750	300
UFLA 01-483	111	5	22,1	20	750	400
UFLA 01-515	111	5	22,1	30	750	400
<i>Bradyrhizobium</i> - acácia						
BR3617	1,2	20	0,08	30	0,4	600
Correlação	0,28 <sup>ns</sup>		0,34 <sup>ns</sup>		0,13 <sup>ns</sup>	

Limites permissíveis no solo pela Comissão da Comunidade Européia (1986) citada em McGrath et al. (1995): 1,0; 50 e 150 mg dm<sup>-3</sup> de Cd, Cu e Zn, respectivamente, extraídos por "aqua regia".

<sup>(1)</sup> Extraído por DTPA (mg dm<sup>-3</sup>); ns: Não-significativo.

estão muito acima dos limites permitidos pela Comissão da Comunidade Européia (McGrath et al., 1995) (Zn = 150-300; Cd = 1-3; Cu = 50-140 e Pb = 50-300 mg dm<sup>-3</sup> extraídos por *aqua regia*).

Como exemplo, solo com teores totais de Zn = 334, Cd = 10, Cu = 99 e Ni = 27 mg dm<sup>-3</sup> causou redução de 40% na produção de trevo branco, devido aos efeitos tóxicos sobre *Rhizobium*, reduzindo em 50% a fixação de N<sub>2</sub> (McGrath et al., 1988). Essas concentrações totais foram muito inferiores às toleradas em solo contaminado por rejeitos da industrialização de Zn do presente estudo, fazendo-se extração por DTPA. Além disso, na PSC 15%, que corresponde a Zn = 750, Cd = 22, Cu = 111 e Pb = 65 mg dm<sup>-3</sup>, embora tenha havido diminuição na produção e crescimento vegetativo das plantas, a atividade específica da nitrogenase foi estimulada e aumentou nas simbioses mais tolerantes à contaminação com metais.

## CONCLUSÕES

1. A contaminação inibiu o crescimento vegetativo e a nodulação das três espécies, sendo tamboril a mais tolerante e, portanto, a mais promissora para revegetação de solos com excesso de metais.

2. A simbiose de *Bradyrhizobium* com tamboril foi mais tolerante à contaminação que a simbiose com acácia e também foi mais tolerante que a simbiose de *Azorhizobium* com sesbânia.

3. Estirpes e isolados de rizóbio tolerantes e sensíveis a Cu, Cd e Zn "in vitro" não apresentaram o mesmo comportamento quando comparados "in situ".

## LITERATURA CITADA

- 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 tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past application of sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.*, 24:83-88, 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 Biol. Biochem.*, 24:625-632, 1992b.
- DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R. & BOTELHO, S.A. Propagação de espécies florestais. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1995. 41p.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta*, 127:285-294, 1966.
- 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.
- IBEKWE, A.M.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. & van BERKUM, P. Zinc and Cadmium Effects on Rhizobia and White Clover using Chelator-Buffered Nutrient Solution. Soil Sci. Soc. Am. J., 62:204-211, 1998.
- MALAVOLTA, E. Fertilizantes e seu impacto ambiental: metais pesados, mitos, mistificação e fatos. São Paulo, Produquímica Indústria e Comércio, 1994. 153p.
- MARQUES, T.C.L.L.S.M.; MOREIRA F.M.S. & SIQUEIRA J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. Pesq. Agropec. Bras., 35:121-132, 2000.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press, 1995. 889p.
- 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 Biol. Biochem., 22:977-982, 1990.
- MATSUDA, A.; SIMÃO, J.B.P.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Crescimento e nodulação de leguminosas em solo contaminado com metais pesados. In: FertBIO'98, Caxambu, 1998. Resumos. Caxambu, UFLA/SBCS/SBM, 1998. p.75.
- McGRATH, S.P. Long-term studies of metal transfers following application 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.; 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 Biol. Biochem., 20:415-424, 1988.
- McGRATH, S.P.; CHAUDRI, A.M. & GILLER, K.E. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. J. Ind. Microbiology, 14:94-104, 1995.
- McLLVEEN, W. & COLE, H. Influence of heavy metals nodulation of red clover. Phytopathol., 64:583-588, 1974.
- MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K. & YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. Mol. Ecol., 7:889-895, 1998.
- MOSTASSO, F.L. Crescimento e nodulação de leguminosas em solo contaminado com metais pesados. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1997. 50p. (Tese de Mestrado)
- NANNIPIERE, P.; GRECO, S. & CECCANTI, B. Ecological significance of biological activities in soils. In: BOLLANG, J.M. & STOTZKY, G., eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, 1990. p.293-356.
- NUTMAN, P.S. Rhizobium in soil. In: WALKER, N., ed. Soil microbiology. A critical review. London, Butterworths, 1975. p.11-131.
- OBARD, J.P.; SAUERBECK, D.R. & JONES, K.C. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soil amended with heavy metal contaminated sewage sludges. Soil Biol. Biochem., 25:227-231, 1993.
- PÄIVÖKE, A. The long-term effects of zinc on the growth and development, chlorophyll content and nitrogen fixation of garden pea. Ann. Bot. Fennici, 20:205-213, 1983a.
- PÄIVÖKE, A. The long-term effects of lead and arsenate on the growth and development, chlorophyll content and nitrogen fixation of garden pea. Ann. Bot. Fennici, 20:297-306, 1983b.
- PORTER, J.R. & SHERIDAN, R.P. Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by arsenate, heavy metals, fluoride, and simulated acid rain. Plant Physiol., 68:143-148, 1981.
- 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-FILHO, M.R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & MOTTA, P.E.F. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. R. Bras. Ci. Solo, 23:189-483, 1999.
- ROJAS, E.P.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Crescimento de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. Com e sem micorrização em solo contaminado com metais pesados. In: SOLO-SUELO-CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 23., 1996. Águas de Lindóia. Anais. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. (CD-ROM)
- ROTHER, J.A.; MILLBANK, J.W. & THORNTON, I. Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in glasslands on soils contaminated with Cd, Pb, and Zn. J. Soil Sci., 34:127-136, 1983.
- 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. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". R. Bras. Ci. Solo, 25:305-316, 2001.
- VINCENT, J.M. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. London, JBP, 1970. 164p. (Handbook, 15)
- WITTER, E. Agricultural use of sewage sludge controlling metal contamination of soils. Stockholm, Norstedts Tryckeri AB, 1989. 429p.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. & SILVEIRA Jr., P. Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1984. 151p.

