

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

TOLERÂNCIA DE ESTIRPES E ISOLADOS DE *Bradyrhizobium* E DE *Azorhizobium* A ZINCO, CÁDMIO E COBRE “*IN VITRO*”⁽¹⁾

I. C. B. TRANNIN⁽²⁾, F. M. S. MOREIRA⁽³⁾,
J. O. SIQUEIRA⁽³⁾ & A. LIMA⁽⁴⁾

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a tolerância a metais pesados “*in vitro*” de estirpes inoculantes (I), isolados de solos contaminados com metais (ISC) e de solos não contaminados (ISNC) de *Bradyrhizobium*, simbiotes de *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) e de *Acácia mangium* (acácia) e de *Azorhizobium*, simbiotes de *Sesbania virgata* (sesbânia), foram realizados dois experimentos. No primeiro, dez estirpes e, ou, isolados para cada espécie vegetal foram testados em meio YMA modificado por adição de tampões biológicos (HEPES e MES), suplementado com diferentes concentrações de Cu, Cd e Zn. Cobre e Cd foram testados em concentrações de 0 a 40 mg L⁻¹, para ambos os gêneros, enquanto Zn variou de 0 a 1.000 mg L⁻¹, para *Bradyrhizobium*, e de 0 a 500 mg L⁻¹, para *Azorhizobium*. O crescimento de rizóbio nas diferentes concentrações de metais foi avaliado com atribuição de valores para os padrões observados (0 a 5). Os ISC de ambos os gêneros foram mais tolerantes, mas *Bradyrhizobium* tolerou Zn (800 mg L⁻¹) até duas vezes e Cu (40 mg L⁻¹) até oito vezes mais que *Azorhizobium*. No segundo experimento, estirpes e isolados tolerantes (T), sensíveis (S) e de tolerância média (TM) a metais selecionados em meio YMA modificado foram estudados em soluções aquosas com diferentes concentrações de Cu (0 a 0,01 mg L⁻¹), Cd e Zn (0 a 1,0 mg L⁻¹). A avaliação do número de células viáveis em soluções de metais foi feita por contagem das unidades formadoras de colônia em 0, 24, 48, 72 e 96 h de incubação, pelo método das diluições sucessivas e inoculação em YMA. Embora as soluções de metais tenham sido mais discriminatórias quanto a tolerância a metais que o meio YMA, estes dois métodos mostraram que: (a) *Azorhizobium* foi mais sensível que *Bradyrhizobium*, (b) os ISC de ambos os gêneros foram mais tolerantes do que os ISNC e (c) a ordem de toxicidade dos metais foi Cu > Cd > Zn.

Termos de indexação: rizóbio, metais pesados, contaminação do solo, simbiotes.

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

⁽²⁾ Doutoranda do CPGSNP, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA. Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista do CAPES. E-mail: itrannin@ufla.br

⁽³⁾ Professor do Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista do CNPq.

⁽⁴⁾ Iniciação Científica, Bolsista do CNPq.

SUMMARY: *TOLERANCE OF Bradyrhizobium AND Azorhizobium STRAINS AND ISOLATES TO COPPER, CADMIUM AND ZINC "IN VITRO"*

Two experiments were carried out at the Soil Science Department of the Federal University of Lavras (MG), to assess the tolerance to heavy metals "in vitro" of inoculant strains (I), and isolates from both heavy metals contaminated soil (ICS) and uncontaminated soil (IUS) of *Bradyrhizobium* from *Enterolobium contortisiliquum* and *Acacia mangium* and of *Azorhizobium* from *Sesbania virgata*. In the first experiment ten strains and, or, isolates of each plant species, were tested in YMA media modified by addition of biological buffers (HEPES and MES), supplied with different concentrations of Cu, Cd and Zn. Copper and Cd were tested at concentrations from 0 to 40 mg L⁻¹ for both genera, whereas Zn varied from 0 to 1.000 mg L⁻¹ for *Bradyrhizobium* and from 0 to 500 mg L⁻¹ for *Azorhizobium*. Growth at the different metal concentrations was evaluated with attribution of values to patterns observed (0 to 5). The ICS of both genera were more tolerant but Zn tolerance to *Bradyrhizobium* (800 mg L⁻¹) and Cu (40 mg L⁻¹) was, respectively, two and eight times higher than that of *Azorhizobium*. In the second experiment, strains and isolates tolerant (T), sensitive (S) and medium tolerant (MT) to metals selected in modified YMA media, were studied in aqueous solutions with different concentrations of Cu (0 to 0.01 mg L⁻¹) Cd and Zn (0 to 1.0 mg L⁻¹). The evaluation of the number of viable cells in metallic solutions was accomplished by counting colony forming units at 0, 24, 48, 72 and 96 h of incubation, by the method of successive dilutions and inoculation in YMA. Although the metal solutions have been more selective than modified YMA media, the two methods showed that: (1) *Azorhizobium* was more sensitive than *Bradyrhizobium*, (2) ICS of both genera were more tolerant than IUS and (3) the order of toxicity of heavy metals was Cu > Cd > Zn.

Index terms: rhizobia, heavy metals, contamination of soil, symbionts.

INTRODUÇÃO

As leguminosas fixadoras de N₂ atmosférico oferecem inúmeras vantagens na revegetação de áreas degradadas por representarem importante via de adição de N ao solo (Franco et al., 1992). No entanto, pouco se conhece sobre o comportamento dessas leguminosas em solos tropicais contaminados com metais pesados, onde a tolerância das plantas e do microssimbionte (rizóbio) precisa ser avaliada.

Estudos de toxidez de metais pesados a bactérias de diferentes origens (Duxbury & Bicknell, 1983; Rózycki, 1992), inclusive rizóbio (Borges & Wollum, 1981; Kinkle et al., 1987; Martensson, 1992; Angle et al., 1993), em sua maioria, utilizam meios nutritivos, nos quais metais pesados são adicionados em concentrações crescentes e seus efeitos sobre o crescimento microbiano são avaliados. Apesar das limitações desta técnica, em consequência da formação de quelatos com vários compostos orgânicos e inorgânicos do meio, mudanças no pH, ligação e, ou, absorção dos metais por células microbianas (Angle & Chaney, 1989), estes meios são úteis para avaliar a "tolerância relativa" de bactérias aos metais.

Para superar essas limitações, Chaudri et al. (1992) utilizaram sais de sulfato de Cu, Cd e Zn,

diluídos em água deionizada, para avaliar a tolerância de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii de diferentes origens e detectar os metais mais tóxicos. Embora o meio sólido seja considerado menos sensível que o uso de meios líquidos, este é um método mais rápido e acessível, razão por que tem sido empregado em vários estudos comparativos de tolerância de rizóbio a metais (Kinkle et al., 1987; Martensson, 1992; Angle et al., 1993).

Nestes estudos, *Bradyrhizobium* mostrou-se mais tolerante que *Rhizobium*, fato atribuído à sua capacidade de alcalinização do meio, que diminui a biodisponibilidade e toxidez dos metais (Alexander, 1977). *Azorhizobium* também alcaliniza o meio, mas referências sobre sua tolerância a metais "in vitro" não foram encontradas.

Quanto às espécies vegetais, algumas têm sido apontadas como promissoras para projetos de revegetação de solos contaminados com metais, dentre elas as arbóreas, tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) (Mostasso, 1997) e acácia (*Acacia mangium*) (Marques, 1996), e a arbustiva, sesbânia (*Sesbania virgata*) (Mostasso, 1997), sendo as duas primeiras capazes de formar simbiose eficiente com *Bradyrhizobium* e a última com *Azorhizobium*.

O presente estudo teve como objetivo verificar diferenças entre os gêneros *Bradyrhizobium* e

Azorhizobium e entre estirpes e isolados de diferentes procedências, simbiotes de tamboril, acácia e sesbânia, com relação à tolerância a Cu, Cd e Zn, empregando dois métodos de avaliação “*in vitro*”: meio de cultura YMA (Vincent, 1970), modificado por adição de tampões biológicos (HEPES-MES), e soluções aquosas (Chaudri et al., 1992).

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1: Tolerância de rizóbio a Cu, Cd e Zn em meio YMA modificado

Estirpes e isolados de diferentes procedências dos gêneros *Bradyrhizobium*, simbiotes de tamboril e acácia e de *Azorhizobium*, simbiotes de sesbânia, foram estudados quanto à tolerância a Cu, Cd e Zn em meio YMA (Vincent, 1970) modificado, totalizando 10 estirpes e, ou, isolados, para cada hospedeiro (Quadro 1). As estirpes e isolados foram inoculados em 30 mL de meio YEM (Vincent, 1970), com pH 6,8 e estas culturas foram mantidas sob agitação orbital a 105 rpm a 28°C.

Após crescimento por quatro dias para *Azorhizobium* (10^9 cel mL⁻¹) e por seis dias para *Bradyrhizobium* (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, para centrifugação a 8.000 rpm, a 25°C, por quatro min. O sobrenadante foi descartado e as células de rizóbio foram ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 5,5 g L⁻¹) e centrifugadas novamente, repetindo o processo de lavagem por três vezes.

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de suspensões de células lavadas de rizóbio em solução salina foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalsky em placas que continham 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 & Elkan, 1973) e por suplementação com diferentes concentrações de Zn (0 a 500 mg L⁻¹) Cd e Cu (0 a 10 mg L⁻¹) nas formas ZnSO₄·7H₂O, 3CdSO₄·8H₂O e CuSO₄·5H₂O, testadas individualmente (Angle et al., 1993).

Em ensaio prévio, verificaram-se que as concentrações toleradas a Zn foram de 200 e 500 mg L⁻¹, para todos os isolados e estirpes de *Azorhizobium* e de *Bradyrhizobium*, respectivamente. Desta forma, testaram-se, posteriormente, as concentrações de Zn: 0; 50;100; 200; 500; 600; 800 e 1.000 mg L⁻¹, para *Bradyrhizobium*, e 0; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 mg L⁻¹, para *Azorhizobium*.

Feita a adição das soluções de ZnSO₄·7H₂O, o pH dos meios foi ajustado para 6,8 com solução de KOH 0,5 mol L⁻¹ esterilizada. As concentrações de Cd e Cu testadas foram: 0; 1,25; 2,5; 5,0; 10, 20, 30 e 40 mg L⁻¹,

para ambos os gêneros. Tratamentos-controles, sem inoculação, foram mantidos para cada nível de contaminação com metal, para melhor visualizar as alterações em pH do meio durante a avaliação. Os tratamentos foram distribuídos inteiramente ao acaso, com três repetições. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias, para *Bradyrhizobium*, e por 6-10 dias, para *Azorhizobium*.

O crescimento, resultante do somatório da multiplicação de células e da produção de polissacarídeos extracelulares (goma), foi utilizado para avaliar o comportamento de rizóbio nas diferentes concentrações de metais, atribuindo-se valores aos diferentes padrões de crescimento (PC)

Quadro 1. Estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* testados em meio YMA modificado

Estirpe/isolado	Procedência
<i>Bradyrhizobium/Enterolobium contortisiliquum</i>	
BR 4406 ⁽¹⁾	CNPAB/EMBRAPA-RJ
INPA 404 ⁽²⁾	Instituto de Pesquisa da Amazônia-INPA
INPA 398 ⁽²⁾	Instituto de Pesquisa da Amazônia-INPA
UFLA 01-291 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-288 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-297 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-298 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-456 ⁽³⁾	20% de solo contaminado-CMM-MG
UFLA 01-457 ⁽³⁾	40% de solo contaminado-CMM-MG
UFLA 01-469 ⁽³⁾	20% de solo contaminado-CMM-MG
<i>Bradyrhizobium/Acacia mangium</i>	
BR 3617 ⁽¹⁾	CNPAB/EMBRAPA-RJ
UFLA 01-270 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-271 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-272 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-273 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-274 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-275 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-277 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-282 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
UFLA 01-286 ⁽²⁾	DCS-UFLA, Lavras-MG
<i>Azorhizobium/Sesbania virgata</i>	
BR 5401 ⁽¹⁾	CNPAB/EMBRAPA-RJ
BR 5404 ⁽¹⁾	CNPAB/EMBRAPA-RJ
BR 5422 ⁽¹⁾	Campo grande-RJ
BR 5413 ⁽¹⁾	Paracambi-RJ
BR 5416 ⁽¹⁾	Itaguaí-RJ
BR 5420 ⁽²⁾	Volta Redonda-RJ
UFLA 01-480 ⁽²⁾	Jaguara-MG
UFLA 01-483 ⁽³⁾	5% de solo contaminado – CMM-MG
UFLA 01-510 ⁽³⁾	10% de solo contaminado – CMM-MG
UFLA 01-515 ⁽³⁾	10% de solo contaminado – CMM-MG

⁽¹⁾ Estirpe recomendada como inoculante. ⁽²⁾ Isolado de solo sem contaminação. ⁽³⁾ Isolado de misturas de solos, com proporções de solo contaminado (%), proveniente da Companhia Mineira de Metais (CMM), Três Marias (MG).

observados: 0 = sem crescimento; 1 = sem colônias visíveis, mas com alcalinização do meio 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.

Verificou-se alcalinização do meio onde se detectou crescimento de ambos os gêneros. Quando não houve alcalinização, foi avaliada a possível presença de células sobreviventes raspando-se a superfície do meio com alça de platina, transferindo-se o "raspado" para meio sem metal, caso em que não foi observado crescimento. A concentração máxima tolerada (CMT) correspondeu à maior concentração que apresentou PC igual ou superior a 1. No final de cada avaliação, foram determinados os valores de pH para todos os tratamentos, por meio da diluição (1:1) do meio YMA em água deionizada com pH ajustado a 7,0 com KOH 0,5 mol L⁻¹.

Experimento 2: Tolerância de rizóbio a Cu, Cd e Zn em solução aquosa

Estirpes inoculantes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, tolerantes^(T), sensíveis^(S) e de tolerância média^(TM) a metais selecionados no experimento anterior, foram estudados quanto à tolerância em soluções com diferentes concentrações de Cu, Cd e Zn em água deionizada estéril, conforme método empregado em Chaudri et al. (1992). De *Bradyrhizobium*, testaram-se BR4406^(T), UFLA 01-457^(T) e INPA398^(S), simbioses de tamboril e BR3617^(TM) de acácia. De *Azorhizobium*, testaram-se BR5401^(S), UFLA 01-483^(T) e UFLA 01-515^(T), simbioses de sesbânia.

As estirpes e os isolados foram inoculados em 50 mL de meio extrato de levedura-manitol-glutamato (YEMG), que continha (g L⁻¹): 1,80 Na-L-glutamato; 5,0 manitol; 0,20 MgSO₄.7H₂O; 0,10 NaCl; 0,20 CaCl₂.6H₂O; 0,0014 K₂HPO₄; 0,01 FeCl₃.6H₂O e 0,40 de extrato de levedura, em água deionizada (Johnson & Wood, 1987), com pH ajustado a 6,8, e incubados em agitador orbital a 105 rpm a 28°C por seis dias. Em seguida, procedeu-se à lavagem das células bacterianas para eliminação de resíduos do meio de cultura, conforme experimento anterior. Zinco e Cd foram testados como ZnSO₄.7H₂O e 3CdSO₄.8H₂O, nas concentrações: 0; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, e Cu, na forma de CuSO₄.5H₂O, nas concentrações: 0; 0,002; 0,004; 0,008 e 0,01 mg L⁻¹. Erlenmeyers de 125 mL, que continham 50 mL de solução aquosa de Cu, Cd e Zn, testados individualmente em diferentes concentrações, foram inoculados com 0,15 mL de suspensões de células lavadas de rizóbio em solução salina estéril (NaCl 5,5 g L⁻¹). Estas culturas foram incubadas a 28°C, sob agitação orbital a 105 rpm por 96 horas.

A avaliação do número de células viáveis das estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de

Azorhizobium, presentes em cada concentração de metal em solução, foi efetuada por contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) a 0; 24; 48; 72 e 96 h, após a inoculação. Para estas contagens, foram utilizadas diluições decimais das suspensões de rizóbio em soluções de metais 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. O pH das soluções foi determinado no final de cada experimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984), sendo considerado o maior nível de significância na seleção dos modelos de regressão. A percentagem de células viáveis após 96 h de incubação nas soluções de metais foi calculada em relação ao inóculo inicial de 10¹⁰ e 10⁹ cel mL⁻¹, para *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Tolerância de rizóbio a Cu, Cd e Zn em YMA modificado

Os padrões de crescimento (PC) de rizóbio cultivado em meio YMA modificado e suplementado com Cu, Cd e Zn encontram-se nas figuras 1, 2 e 3, respectivamente. O menor crescimento de *Azorhizobium* em relação a *Bradyrhizobium* em YMA impossibilitou a comparação entre gêneros por este parâmetro. Contudo, a utilização dos PC foi útil para diferenciar o comportamento de estirpes e isolados de mesmo gênero, expostos a concentrações crescentes de metais. Para *Bradyrhizobium*, a estirpe BR 4406 e os isolados de solo contaminado, UFLA 01-456, UFLA 01-457 e UFLA 01-469, apresentaram melhor PC que os demais isolados de tamboril e de acácia. As estirpes e os isolados de *Azorhizobium* apresentaram menor variação do PC que os de *Bradyrhizobium*, quando expostos aos metais. No entanto, os isolados de solo contaminado UFLA 01-483 e UFLA 01-515 apresentaram maior PC (2), em concentrações mais elevadas de Cd (Figura 2), o que também foi verificado para as estirpes BR 5401 e BR 5404, quando expostas a Zn (Figura 3).

Comparando o comportamento das estirpes e isolados expostos a concentrações iguais de Cu e Cd, verifica-se que Cu foi o metal que causou maior inibição do crescimento em ambos os gêneros.

As concentrações máximas de metal toleradas (CMT) e os respectivos PC do rizóbio mostraram que estes gêneros diferiram quanto à tolerância (Quadro 2). Para *Bradyrhizobium*, os simbioses de tamboril, BR 4406 e isolados de solo contaminado UFLA 01-456, UFLA 01-457 e UFLA 01-469 foram

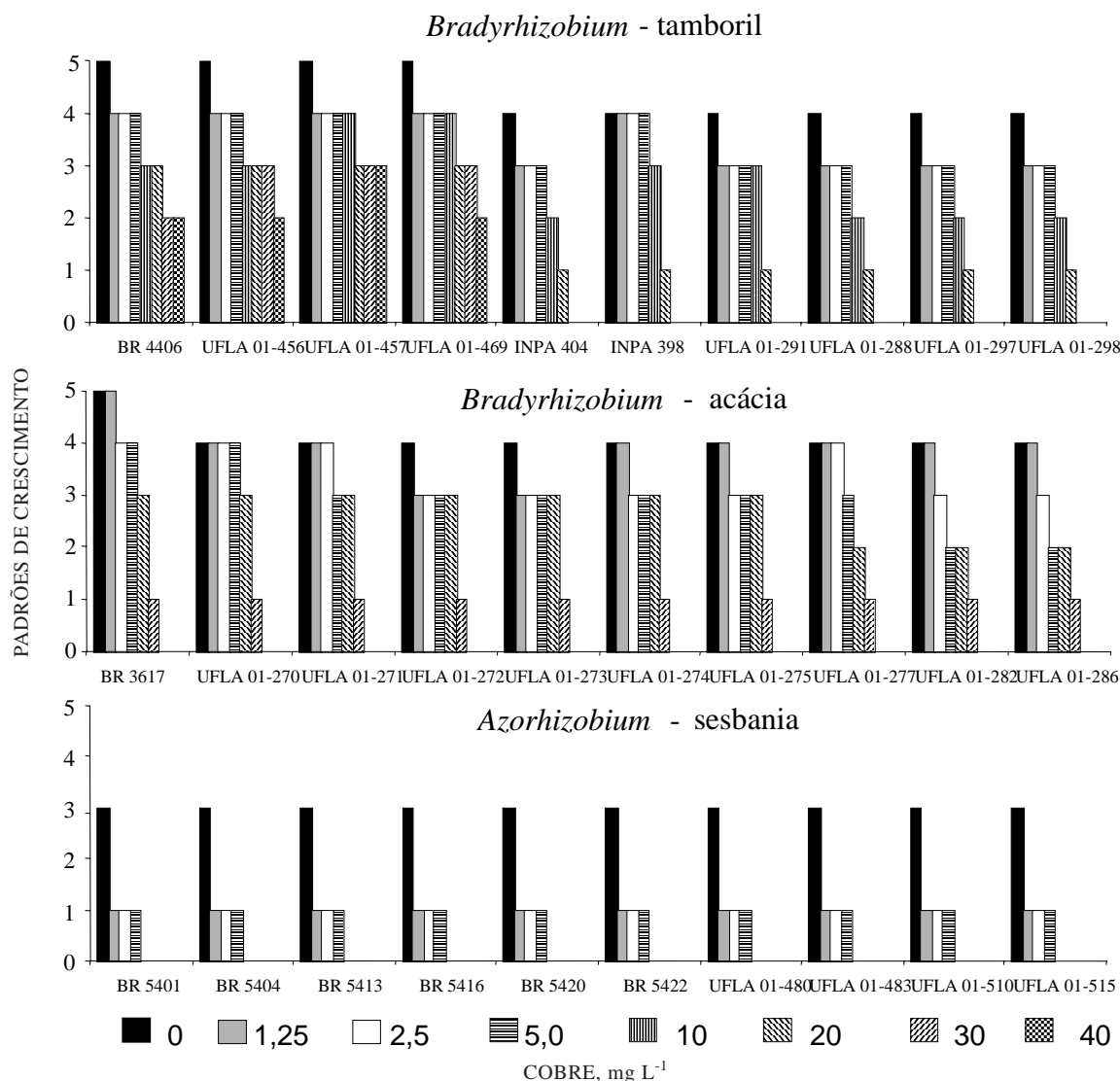


Figura 1. Padrões de crescimento (PC) de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, expostos a diferentes concentrações de Cu (mg L⁻¹) em meio YMA.

os mais tolerantes a todos os metais, crescendo em 40 mg L⁻¹ de Cu e Cd e em 800 mg L⁻¹ de Zn, enquanto INPA398 e INPA404 foram os mais sensíveis e toleraram somente até 500 mg L⁻¹ de Zn. A estirpe BR 3617 e os isolados da acácia não diferiram quanto as CMT a todos os metais e PC, que foram os mesmos dos isolados de solo não contaminado de tamboril (20, 30 e 600 mg L⁻¹ de Cu, Cd e Zn, respectivamente).

Tais resultados podem ser atribuídos ao fato de não terem sido testados isolados de acácia de solo contaminado, diminuindo, com isto, a possibilidade de serem encontradas diferenças quanto à tolerância a metais. No entanto, quando se compararam as CMT das estirpes BR 4406 (tamboril) e BR 3617 (acácia), foi possível verificar que a primeira apresentou maior tolerância a todos os metais.

Para *Azorhizobium*, as estirpes BR 5401 e BR 5404 e o isolado de solo não contaminado UFLA 01-480 foram os mais sensíveis a Zn (300 mg L⁻¹) e o isolado de solo contaminado, UFLA 01-515, o mais tolerante a Cd (30 mg L⁻¹). Não foram observadas diferenças nas CMT para Cu (5 mg L⁻¹), entre as estirpes e isolados deste gênero (Quadro 2).

Em ambos os gêneros de rizóbio, os isolados de solo contaminado foram mais tolerantes aos metais; no entanto, os de *Bradyrhizobium* toleraram Zn até duas vezes e Cu até oito vezes mais que os de *Azorhizobium*. A ordem de toxidez dos metais a todas as estirpes e isolados estudados foi Cu > Cd > Zn. Kinkle et al. (1987) e Angle et al. (1993) também estudaram a tolerância de estirpes de

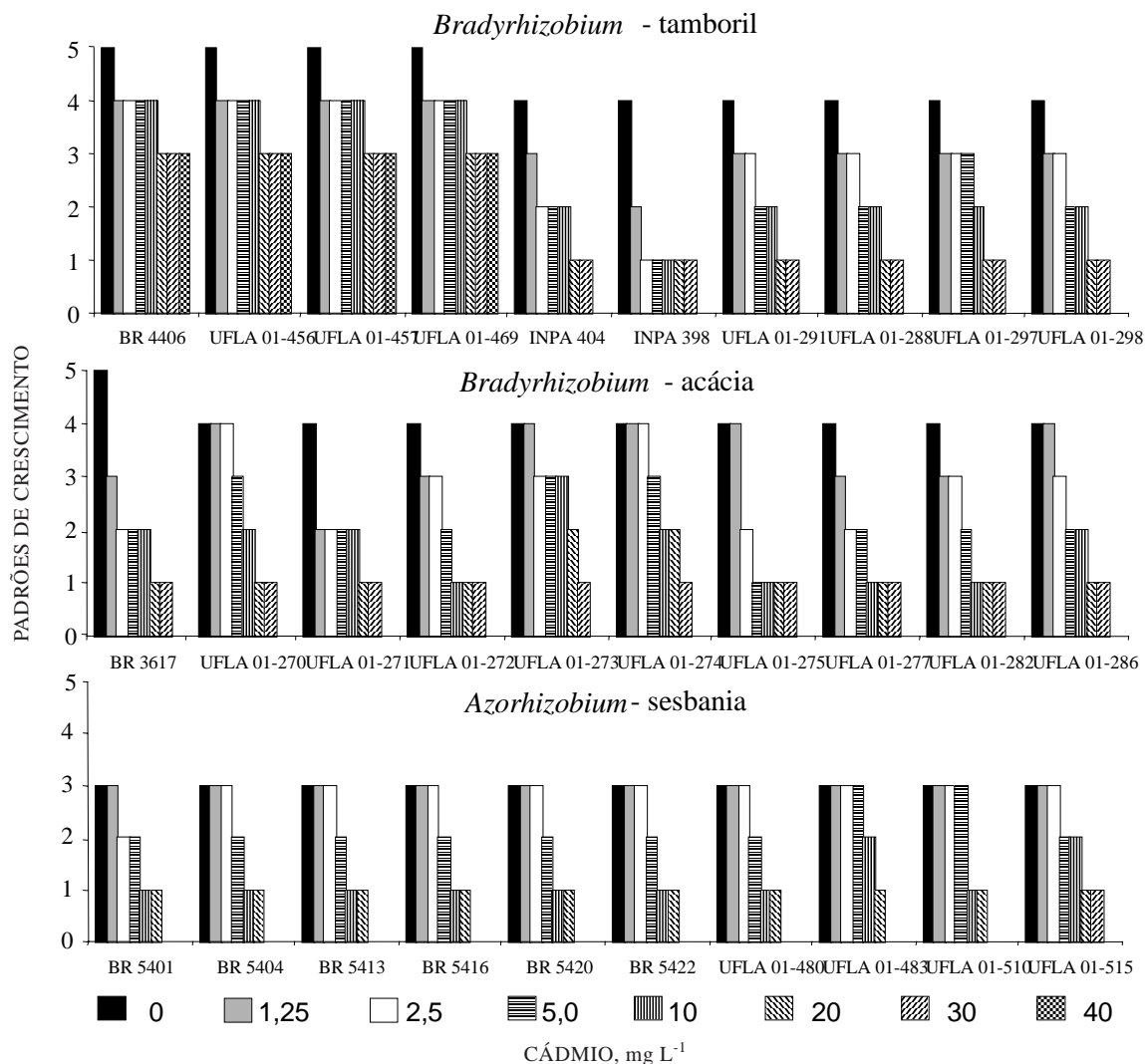


Figura 2. Padrões de crescimento (PC) de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, expostos a diferentes concentrações de Cd (mg L⁻¹) em meio YMA.

Bradyrhizobium japonicum a Zn, Cu, Cd e Ni adicionados ao meio HM (HEPES-MES).

Embora existam diferenças na composição do meio e nas concentrações de metais adicionadas, a ordem de toxicidade encontrada por estes autores foi a mesma para *Bradyrhizobium* de acácia e de tamboril em meio YMA modificado. Os PC de 2 e 3 nas concentrações máximas testadas de Cu e Cd, para a estirpe e isolados mais tolerantes de *Bradyrhizobium*, indicam que concentrações mais elevadas poderiam ser toleradas (Quadro 2).

O aumento do pH pode promover a dissociação de grupos hidroxila (OH) dos componentes do meio com predomínio de cargas negativas, às quais se ligam os metais, diminuindo com isso a solubilidade e, portanto, a toxicidade destes. A alcalinização do meio por ambos os gêneros aumentou proporcionalmente aos aumentos nas concentrações de metais. No

entanto, as leituras de pH, no final de cada teste, indicaram alcalinização maior do meio por *Azorhizobium* que por *Bradyrhizobium*, com aumentos médios nas CMT em relação ao controle (sem metal e sem inoculação), de 1,2 e 0,6 unidade de pH, respectivamente.

No controle, estes aumentos foram de 0,7, para *Azorhizobium*, e de 0,5, para *Bradyrhizobium*. A maior alcalinização promovida por *Azorhizobium* que por *Bradyrhizobium*, quando o meio de cultura foi suplementado com metais, mostra que este pode ser o principal mecanismo de defesa deste gênero contra os efeitos tóxicos, uma vez que, visivelmente, produz muito menos polissacarídeos extracelulares que *Bradyrhizobium*.

O fato de a estirpe e os isolados mais tolerantes de *Bradyrhizobium* de tamboril atingirem PC superiores aos demais, principalmente nas CMT de

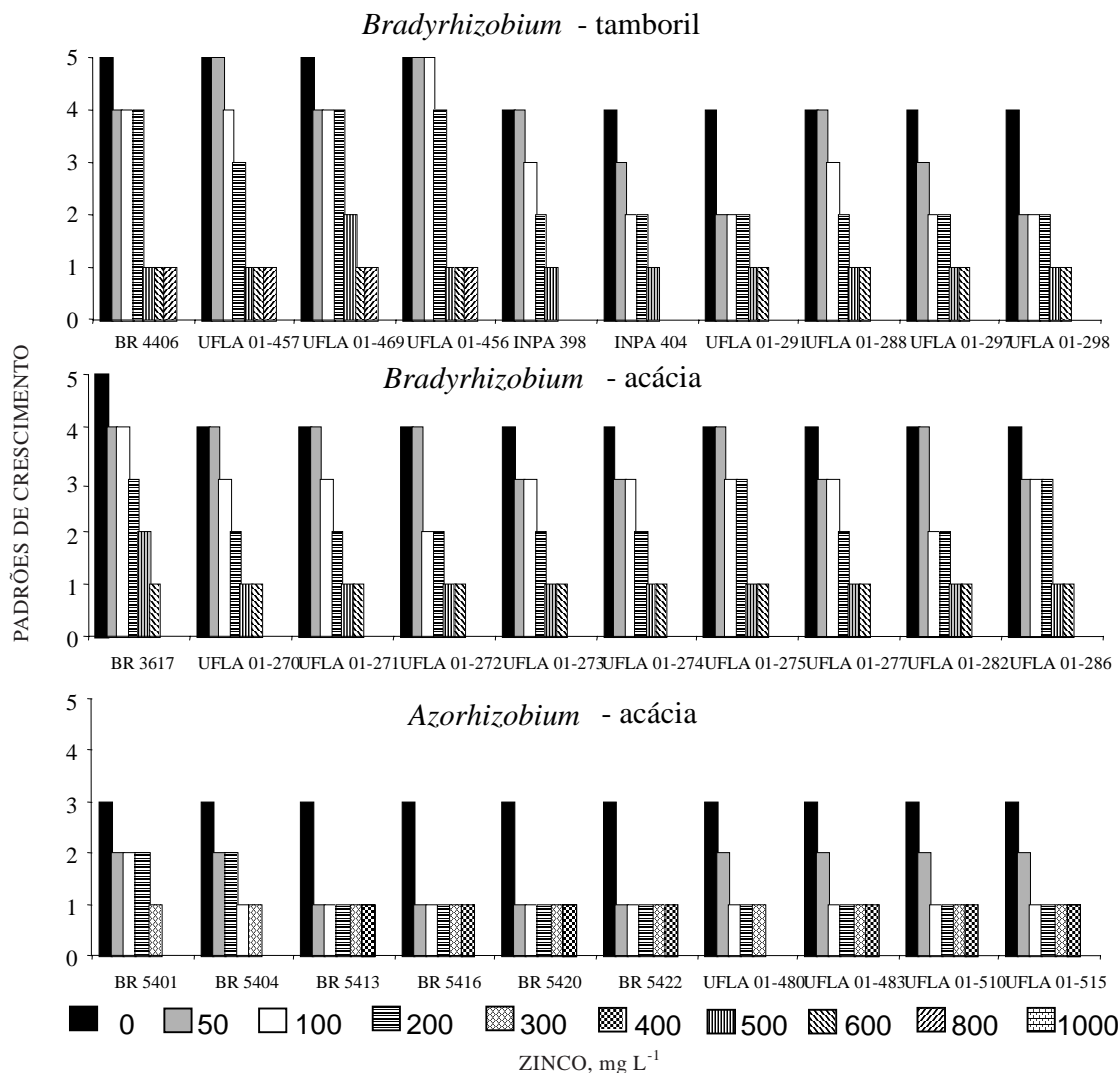


Figura 3. Padrões de crescimento (PC) de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, expostos a diferentes concentrações de Zn (mg L^{-1}) em meio YMA.

Cd e de Cu, leva a inferir que, no caso de rizóbio, a produção de polissacarídeos extracelulares em maior quantidade parece ser um mecanismo mais eficiente de tolerância a estresses causados por metais do que a alcalinização do meio.

Experimento 2 - Tolerância de rizóbio a Cu, Cd e Zn em solução aquosa

O efeito de diferentes concentrações de metais em solução aquosa sobre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) das estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* foi analisado por regressão polinomial dentro de cada período de incubação para Cu, Cd e Zn (Quadro 3). O comportamento das estirpes e isolados variou de acordo com as concentrações crescentes de cada metal em solução e com o tempo de incubação. O número de células viáveis, principalmente de

Azorhizobium, diminuiu com a transferência do inóculo inicial para a água deionizada estéril a pH 6,8, na ausência dos metais, mas manteve-se constante no período de 96 horas de incubação.

Segundo Urenha et al. (1994), mudanças significativas no meio de cultura, impostas na transferência do inóculo, podem causar redução na velocidade da divisão celular, que, muitas vezes, torna-se nula por um intervalo de tempo, e, em meios estressantes, pode ocorrer a diminuição do número de células viáveis. Durante esse período, as células vivas estão adaptando-se ao novo ambiente e sintetizando as novas enzimas necessárias para sua sobrevivência.

De acordo com Díaz-Raviña & Baath (1996), a adição de metal pode causar dois efeitos sobre o crescimento bacteriano: um efeito inibitório inicial, com morte das células sensíveis e, em seguida, um efeito estimulante sobre a taxa de crescimento das

Quadro 2. Concentrações máximas toleradas (CMT) em mg L⁻¹ e respectivos padrões de crescimento (PC) de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* expostos a Cu, Cd e Zn em meio YMA modificado

Estirpe/isolado	Cu		Cd		Zn	
	CMT ⁽¹⁾	PC ⁽²⁾	CMT ⁽¹⁾	PC ⁽²⁾	CMT ⁽¹⁾	PC ⁽²⁾
<i>Bradyrhizobium - Enterolobium contortisiliquum</i>						
BR 4406	> 40	2	> 40	3	800	1
INPA 404	20	1	30	1	500	1
INPA 398	20	1	30	1	500	1
UFLA 01-456	> 40	2	> 40	3	800	1
UFLA 01-457	> 40	3	> 40	3	800	1
UFLA 01-469	> 40	2	> 40	3	800	1
UFLA 01-291	20	1	30	1	600	1
UFLA 01-288	20	1	30	1	600	1
UFLA 01-297	20	1	30	1	600	1
UFLA 01-298	20	1	30	1	600	1
<i>Bradyrhizobium - Acacia mangium</i>						
BR3617 e isolados	20	1	30	1	600	1
<i>Azorhizobium - Sesbania virgata</i>						
BR 5401	5	1	20	1	300	1
BR 5404	5	1	20	1	300	1
BR 5422	5	1	20	1	400	1
BR 5413	5	1	20	1	400	1
BR 5416	5	1	20	1	400	1
BR 5420	5	1	20	1	400	1
UFLA 01-480	5	1	20	1	300	1
UFLA 01-483	5	1	20	1	400	1
UFLA 01-510	5	1	20	1	400	1
UFLA 01-515	5	1	30	1	400	1

⁽¹⁾ CMT: corresponde à maior concentração tolerada com PC ≥ 1 . ⁽²⁾ PC: 0 = sem crescimento; 1 = sem colônias visíveis, mas com alcalinização do meio 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 metal. Alcalinização do meio nos padrões de 1 a 5.

mais tolerantes sobreviventes, graças ao aumento da disponibilidade de substratos derivados de células mortas, que é variável durante o período de incubação. Considerando todas as estirpes e isolados de ambos os gêneros, os modelos polinomiais que se ajustaram ao número de UFC em concentrações crescentes de Cu foram lineares, com proporcionalidade entre os aumentos nas concentrações deste metal e a correspondente redução no número de células viáveis (Quadro 3). Todavia, em alguns casos, não foram encontrados ajustes, em decorrência da baixa variação no número de UFC das estirpes e isolados e de concentrações deste metal no mesmo período de incubação. Com relação a Cd e Zn, foram encontrados dois tipos de resposta para o número de UFC, considerando as concentrações crescentes, com ajuste linear e quadrático.

As concentrações máximas de metais testadas em soluções aquosas não causaram ausência de células viáveis de rizóbio após 96 h de incubação, porém

foram suficientes para detectar diferenças entre gêneros, estirpes e isolados, com base no número de UFC, que decresceu com o aumento das concentrações.

No quadro 4, são apresentadas as percentagens de células viáveis das estirpes e isolados estudados, em relação ao inóculo inicial de 10^{10} e 10^9 cel mL⁻¹, para *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, respectivamente, após 96 h de incubação nas soluções aquosas que continham diferentes concentrações de Cu, Cd e Zn.

Para *Bradyrhizobium*, a estirpe BR 4406 e o isolado de solo contaminado UFLA 01-457 de tamboril foram os mais tolerantes a Cu, apresentando, respectivamente, 1,58 e 1,66% de células viáveis ($10^{8,2}$ cel mL⁻¹) na concentração máxima testada deste metal. No entanto, UFLA 01-457 foi o mais tolerante aos demais metais, com 12,88 e 18,62% ($10^{9,1}$ e $10^{9,2}$ cel mL⁻¹) de células viáveis nas concentrações máximas de Cd e Zn, respectivamente. Já o isolado INPA 398 foi o mais sensível a todos os

Quadro 3. Equações de regressão ajustadas entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC, \log_{10} mL⁻¹) de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, como variável dependente (Y) das concentrações crescentes de Cu, Cd e Zn em mg L⁻¹ em solução (x) em cada período de incubação

Estirpe/isolado	Cobre ⁽¹⁾		Cádmio ⁽¹⁾		Zinco ⁽¹⁾	
		R ²	Equações	R ²	Equações	R ²
0 Hora						
BR 4406	s.a.	-	Y = 10,23 - 3,05 x + 1,80 x ²	0,86**	Y = 10,12 + 0,23 x - 0,33 x ²	0,87*
UFLA 01-457	s.a.	-	s.a.	-	Y = 10,08 + 0,46 x - 0,31 x ²	0,83*
INPA398	s.a.	-	s.a.	-	Y = 9,06 - 0,15 x	0,92**
BR 3617	Y = 9,60 - 132,05 x	0,72**	Y = 9,85 + 0,28 x - 0,38 x ²	0,99*	Y = 9,87 + 0,24 x - 0,41 x ²	0,94**
BR 5401	Y = 7,62 - 125,89 x	0,85**	s.a.	-	Y = 7,87 + 0,36 x - 0,39 x ²	0,83**
UFLA 01-483	s.a.	-	Y = 8,21 + 0,15 x - 0,77 x ²	0,82**	Y = 8,28 + 0,33 x - 0,34 x ²	0,77*
UFLA 01-515	Y = 8,74 - 114,81 x	0,90**	s.a.	-	s.a.	-
24 Horas						
BR 4406	Y = 10,09 - 179,28 x	0,93**	Y = 10,31 - 3,57 x + 2,08 x ²	0,78**	Y = 10,09 - 0,58 x + 0,56 x ²	0,98**
UFLA 01-457	s.a.	-	Y = 10,12 - 0,43 x	0,67**	Y = 10,06 + 0,69 x - 0,52 x ²	0,99**
INPA398	s.a.	-	Y = 8,96 + 0,07 x - 0,34 x ²	0,60**	Y = 8,97 + 0,35 x - 0,42 x ²	0,81**
BR 3617	Y = 9,79 - 395,56 x	0,99**	Y = 9,91 + 0,70 x - 1,32 x ²	0,86**	Y = 10,03 - 1,13 x	0,95**
BR 5401	Y = 7,54 - 188,27 x	0,73**	Y = 7,77 - 3,97 x + 2,94 x ²	0,80**	s.a.	-
UFLA 01-483	s.a.	-	Y = 8,09 - 3,46 x + 2,25 x ²	0,88**	Y = 8,24 + 0,43 x - 0,36 x ²	0,71*
UFLA 01-515	s.a.	-	s.a.	-	s.a.	-
48 Horas						
BR 4406	s.a.	-	Y = 10,13 - 1,88 x	0,79**	Y = 10,06 + 0,46 x - 0,49 x ²	0,65**
UFLA 01-457	Y = 10,15 - 89,62 x	0,87**	Y = 10,09 - 0,03 x - 0,52 x ²	0,73**	Y = 10,03 + 0,79 x - 0,59 x ²	0,94**
INPA398	Y = 8,76 - 116,29 x	0,78**	Y = 8,73 - 1,09 x	0,90**	Y = 8,89 + 0,29 x - 0,32 x ²	0,62**
BR 3617	s.a.	-	Y = 10,16 - 1,37 x	0,83**	Y = 9,91 + 0,52 x - 1,72 x ²	0,94**
BR 5401	Y = 7,60 - 200,49 x	0,66**	Y = 7,69 - 6,16 x + 4,54 x ²	0,90**	Y = 7,81 + 1,15 x - 1,73 x ²	0,79**
UFLA 01-483	Y = 8,21 - 72,25 x	0,64**	Y = 7,88 - 1,74 x	0,70**	Y = 8,15 + 0,66 x - 0,53 x ²	0,94**
UFLA 01-515	s.a.	-	Y = 8,97 + 0,08 x - 0,80 x ²	0,72**	s.a.	-
72 Horas						
BR 4406	s.a.	-	Y = 9,97 - 2,08 x	0,81**	s.a.	-
UFLA 01-457	Y = 9,85 - 145,03 x	0,89**	Y = 10,08 + 0,19 x - 0,95 x ²	0,77**	Y = 10,03 + 0,83 x - 0,63 x ²	0,97**
INPA398	s.a.	-	Y = 8,19 - 0,67 x**	0,93**	Y = 8,45 + 0,97 x - 1,53 x ²	0,63**
BR 3617	s.a.	-	Y = 9,87 - 5,56 x + 3,58 x ²	0,97**	Y = 9,95 + 0,42 x - 1,60 x ²	0,91**
BR 5401	Y = 7,19 - 214,41 x	0,65**	Y = 7,64 - 6,70 x + 5,06 x ²	0,87**	Y = 7,81 + 1,16 x - 1,75 x ²	0,81**
UFLA 01-483	Y = 8,23 - 106,10 x	0,89**	Y = 8,04 - 5,68 x + 3,88 x ²	0,80**	s.a.	-
UFLA 01-515	s.a.	-	Y = 9,06 - 1,28 x	0,87**	Y = 8,73 + 1,35 x - 1,89 x ²	0,72**
96 Horas						
BR 4406	Y = 9,77 - 184,13 x	0,86**	Y = 9,92 - 2,21 x	0,87**	Y = 9,73 - 3,04 x + 2,16 x ²	0,80**
UFLA 01-457	Y = 9,59 - 131,69 x	0,72**	Y = 9,98 - 0,93 x	0,74**	Y = 10,19 - 0,93 x	0,82**
INPA398	s.a.	-	Y = 8,23 - 1,40 x	0,96**	s.a.	-
BR 3617	Y = 9,46 - 116,95 x	0,79**	Y = 9,86 - 5,92 x + 3,96 x ²	0,98**	Y = 10,01 - 1,17 x	0,88**
BR 5401	Y = 6,71 - 182,26 x	0,77**	Y = 7,09 - 6,80 x + 4,88 x ²	0,93**	Y = 7,22 + 0,68 x - 0,77 x ²	0,67**
UFLA 01-483	Y = 8,34 - 142,22 x	0,88**	Y = 8,26 - 5,37 x + 2,85 x ²	0,77**	Y = 8,07 + 0,97 x - 1,21 x ²	0,95**
UFLA 01-515	s.a.	-	Y = 9,12 - 2,15 x	0,91**	Y = 8,72 + 1,09 x - 1,59 x ²	0,65**

⁽¹⁾ Concentrações dos metais em solução (mg L⁻¹): Cu = 0; 0,002, 0,004; 0,008 e 0,01; Cd e Zn = 0; 0,2, 0,4; 0,8; 1,0.

**, *: Significativos (P < 0,01 e P < 0,05, respectivamente); s.a.: sem ajuste.

metais em todas as concentrações. A estirpe BR 3617 de acácia, embora tenha sido mais sensível a Cu e Cd que a estirpe BR 4406 de tamboril, superou-a quanto à tolerância a Zn (Quadro 4).

Para *Azorhizobium*, os isolados de solo contaminado UFLA 01-483 e UFLA 01-515 foram bem mais tolerantes que a BR 5401, apresentando o UFLA 01-515 tolerância superior em relação a Cd e Zn, com,

respectivamente, 0,91 e 11,48% (10⁷ e 10⁸ cel mL⁻¹), e o UFLA 01-483 tolerância superior a Cu, com 0,91% (10⁷ cel mL⁻¹) de células viáveis nas concentrações máximas testadas destes metais. Já a estirpe BR 5401 foi a mais sensível a todos os metais em relação às demais estirpes e isolados estudados, com apenas 0,01% (10⁵ cel mL⁻¹) de células viáveis, nas concentrações máximas de Cu e Cd, e 1,20% (10⁷ cel mL⁻¹) na concentração máxima testada de Zn (Quadro 4).

Quadro 4. Percentagem⁽¹⁾ de células viáveis de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium*, após 96 h de incubação, nas soluções de Cu, Cd e Zn

Metal	Estirpe/isolado						
	<i>Bradyrhizobium</i>				<i>Azorhizobium</i>		
	BR 4406	UFLA 01-457	INPA 398	BR 3617	BR 5401	UFLA 01-483	UFLA 01-515
mg L ⁻¹	% de células viáveis						
Cobre							
0	83,18	97,72	1,91	70,79	1,70	14,79	70,79
0,002	13,49	7,08	0,65	10,00	0,05	11,75	0,98
0,004	19,05	8,71	0,35	1,70	0,08	12,30	0,98
0,008	0,81	6,03	0,35	1,48	0,03	0,93	0,65
0,01	1,58	1,66	0,46	0,98	0,01	0,91	0,71
Cádmio							
0	81,28	95,50	1,91	75,86	1,78	11,22	69,18
0,2	79,43	125,89	0,91	7,24	0,05	10,72	61,66
0,4	3,55	17,78	0,44	0,95	0,01	0,06	46,77
0,8	1,10	19,50	0,09	0,66	0,01	0,16	1,55
1,0	0,85	12,88	0,09	0,62	0,01	0,04	0,91
Zinco							
0	77,62	100,00	2,04	75,86	1,86	12,02	69,18
0,2	7,59	125,89	4,37	72,44	1,86	15,85	52,48
0,4	7,94	125,89	0,79	53,70	2,24	15,85	64,57
0,8	6,76	18,62	0,85	6,92	2,34	13,49	74,13
1,0	5,50	18,62	1,07	8,51	1,20	6,17	11,48

⁽¹⁾ Em relação ao inóculo inicial de 10¹⁰ e 10⁹ cel mL⁻¹, para *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, respectivamente.

Observou-se que o isolado de tamboril de solo contaminado UFLA 01-457 de *Bradyrhizobium* foi mais tolerante que todos os outros isolados/estirpes de ambos os gêneros. Já as estirpes BR 4406, BR 3617 e o isolado INPA 398 de *Bradyrhizobium* apresentaram menor percentagem de células viáveis que o isolado de solo contaminado UFLA 01-515 de *Azorhizobium*, quando expostos às concentrações mais elevadas de Cd e Zn. Maior percentagem de células viáveis de ambos os gêneros, após 96 h de incubação, foi verificada em soluções de Zn, enquanto Cu foi o metal mais tóxico a todas as estirpes e isolados. Assim, como ocorreu em meio YMA, a ordem de toxicidade foi Cu > Cd > Zn (Quadro 4).

Após 96 h de incubação em água deionizada sem metais, verificaram-se aumentos médios em pH de 0,2, para *Bradyrhizobium*, e 0,4, para *Azorhizobium*. Nas concentrações mais baixas dos metais, o pH foi mantido e, nas concentrações mais altas, principalmente de Zn, houve pequena diminuição, em média de 0,4 para a concentração de 1 mg L⁻¹ de Zn, para ambos os gêneros.

Como observado em meio YMA modificado, também em soluções de metais, os isolados de solos contaminados dos dois gêneros de rizóbio foram mais tolerantes a Cu, Cd e Zn, confirmando a diferença existente entre estirpes e isolados de origens diversas. Tal comportamento está provavelmente

relacionado com o desenvolvimento de mecanismos de adaptação ou tolerância à contaminação com metais, como já foi verificado por Ibekwe et al. (1998), para *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, cultivado em solução Hoagland et al. (1936) suplementado com Cd e Zn. Tal fato revela que os isolados de solo contaminado estudados desenvolveram mecanismos de adaptação e tolerância aos metais, especialmente ao Zn, que se encontra em concentrações elevadas no solo utilizado nas misturas de onde foram isolados (teor total ≥ 18.600 mg dm⁻³), concordando com Duxbury & Bicknell (1983), que verificaram um aumento do número de bactérias tolerantes cerca de 15 vezes nos solos contaminados comparados a solos não contaminados.

A maior tolerância de *Bradyrhizobium* em relação à *Azorhizobium* pode ser atribuída à sua densa cápsula polissacarídica, que adere os metais, impedindo que estes sejam absorvidos pelas células (Beveridge & Doyle, 1989, citados por Angle et al., 1993), além de causar também reação alcalina ao seu redor, reduzindo a solubilidade e atividade dos metais (Alexander, 1977). Por outro lado, *Azorhizobium*, apesar de apresentar menor produção de polissacarídeos extracelulares que *Bradyrhizobium*, promove maior alcalinização do meio, mas este mecanismo, isoladamente, parece não ter sido suficiente para proporcionar maior tolerância aos metais "in vitro".

Outro fato interessante, foi que o isolado de solo contaminado UFLA 01-515 de *Azorhizobium* apresentou menor produção de polissacarídeos extracelulares em YMA modificado, porém, em alguns tratamentos de soluções aquosas, apresentou maior porcentagem de células viáveis que as estirpes BR 4406, BR 3617 e que o isolado INPA 398 de *Bradyrhizobium*. Isso indica que a produção de polissacarídeos extracelulares em maior quantidade nem sempre corresponde ao maior número de células viáveis de rizóbio. Além disso, tais resultados possibilitaram inferir que, embora a produção de polissacarídeos extracelulares e alcalinização do meio pareçam ser características importantes na seleção de rizóbio tolerante a metais, a origem do isolado é um fator de grande relevância, considerando que habitats contaminados selecionam microrganismos tolerantes.

Contudo, a maior tolerância da estirpe BR 4406 em relação ao isolado de solo contaminado UFLA 01-457 às baixas concentrações Cu pode ser atribuída a uma característica genética, especialmente porque não existem registros sobre sua origem em sítio contaminado com metais pesados.

Comparação dos métodos de avaliação da tolerância de rizóbio a metais “*in vitro*”

Os resultados de tolerância a metais, obtidos da utilização do meio YMA modificado e de soluções de metais, possibilitaram verificar que, independentemente do gênero, os isolados de solos contaminados foram mais tolerantes que as estirpes e demais isolados estudados, tendo sido os de *Bradyrhizobium* mais tolerantes que os de *Azorhizobium* a todos os metais. A ordem de toxidez: Cu > Cd > Zn, para ambos os gêneros, concorda com os resultados de Angle et al. (1993), para isolados de *Bradyrhizobium japonicum*, e de Chaudri et al. (1992), para isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

O método da inoculação em placas com meio YMA contaminado com metais é de fácil execução, mas a avaliação visual, com atribuição de notas para os padrões de crescimento, embora tenha sido útil para diferenciar estirpes e isolados de mesmo gênero nas diferentes concentrações de metais, é subjetiva, pois o crescimento avaliado é resultante do somatório da multiplicação de células com a produção de goma. Além disso, a biodisponibilidade dos metais pode ser diminuída em YMA pela interação de seus componentes, principalmente ágar e extrato de levedura, que pode superestimar as concentrações toleradas (Babich & Stotzky, 1980; Gadd & Griffiths, 1987).

Diante disso, o meio de cultura sem ágar é mais indicado para avaliar a tolerância de bactérias a metais pesados, embora a formação de precipitados que reduzem a disponibilidade dos metais também possa ocorrer em meios líquidos. O manitol, componente do meio YMA, é uma fonte de carbono mais bem aproveitada por *Bradyrhizobium* que por *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), o que favoreceu

o crescimento deste primeiro gênero neste meio. Embora apresente estas limitações, a utilização do meio YMA mostrou-se eficiente como método para avaliar a “tolerância relativa” de rizóbio de diferentes gêneros e procedências. No entanto, enquanto em YMA todas as estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* foram mais tolerantes que os de *Azorhizobium*, em soluções aquosas isto só foi verificado quando se comparou a tolerância entre os isolados de solos contaminados, entre os isolados de solos não contaminados e entre as estirpes destes gêneros.

A utilização de soluções de metais e de suas diluições para contagem diária de UFC, apesar de ser mais trabalhosa e requerer maiores cuidados com contaminações, considerando o intenso manuseio, foi mais discriminatória e possibilitou uma avaliação mais minuciosa da “tolerância relativa” de rizóbio aos metais, detectando, por exemplo, diferença entre o isolado UFLA 01-457 e a estirpe BR 4406, o que não ocorreu em meio sólido. Outro fato importante é que, em soluções de metais, as contagens das UFC permitem quantificar as diferenças de crescimento entre estirpes e isolados, relacionadas apenas com a multiplicação das células e não com a produção de polissacarídeos extracelulares, facilitando a comparação inter e intragêneros.

Para avaliar a “tolerância relativa” de rizóbio aos metais pesados “*in vitro*”, os dois métodos devem ser empregados. O meio YMA, para avaliar um número mais elevado de estirpes e isolados de diferentes origens, enquanto a solução aquosa, que é mais discriminatória, para avaliar os organismos tolerantes selecionados a partir deste método.

CONCLUSÕES

1. O meio YMA modificado e o uso de soluções aquosas foram eficientes para avaliar a tolerância relativa de rizóbio a metais pesados, mas as soluções aquosas de metais foram mais discriminatórias.

2. Em soluções aquosas de metais, *Bradyrhizobium* foi mais tolerante aos metais que *Azorhizobium*, quando a comparação foi feita entre estirpes, entre isolados de solos contaminados e entre isolados de solos não contaminados.

3. Para ambos os gêneros de rizóbio, os isolados de solos contaminados foram mais tolerantes a metais que as estirpes inoculantes e demais isolados de solos não contaminados.

4. O isolado de solo contaminado UFLA 01-457 de *Bradyrhizobium* foi o mais tolerante e a estirpe BR 5401, de *Azorhizobium*, a mais sensível a todos os metais que as demais estirpes e isolados de ambos os gêneros.

5. As estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* foram mais sensíveis a toxidez de Cu, seguindo-se a de Cd e Zn.

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. New York, John Wiley, 1977. 467p.
- ANGLE, J.S. & CHANEY, R.L. Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. Appl. Environ. Microbiol., 55:2101-2104, 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 Biol. Biochem., 25:575-580, 1993.
- BABICH, H. & STOTZKY, G. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. Crit. Rev. Microbiol., 8:99-145, 1980.
- BORGES, A. & WOLLUM, A. Effect of cadmium on symbiotic soybean plants. J. Environ. Qual., 10:216-221, 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 Biol. Biochem., 24:83-88, 1992.
- COLE, M.A. & ELKAN, G.H. Transmissible resistance to penicillin G, Neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. Antimic. Agents Chemother., 4:248-253, 1973.
- 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.
- 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*. Intern. J. System. Bacteriol., 38:89-98, 1988.
- DUXBURY, T. & BICKNELL, B. Metal tolerant bacterial population from natural and metal-polluted soils. Soil Biol. Biochem., 15:243-250, 1983.
- 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)
- GADD, G. & GRIFFITHS, A. Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecol., 4:303-317, 1987
- HOAGLAND, D.R.; CHANDLER, W.H. & HIBBARD, P.L. Little leaf of rosette of fruit trees. V. Effect of zinc on the growth of plants of various types in control soil and water culture experiments. Am. Soc. Hort. Sci. Proc. 33:131-141, 1936.
- 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.
- JOHNSON, A.C. & WOOD, M. Deionized distilled water as a medium for aluminium toxicity studies of *Rhizobium*. Letters Appl. Microbiol., 4:137-139, 1987.
- KINKLE, B.K.; ANGLE, J.S. & KEYSER, H.H. Long-term effects of metal rich sewage sludge applications on soil populations of *Bradhyrhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol., 55:315-319, 1987.
- MARQUES, T.C. Crescimento e absorção mineral de mudas de espécies arbóreas em material de solo contaminado com metais pesados. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1996. 116p. (Tese de Mestrado)
- MARTENSSON, A.M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. Soil Biol. Biochem., 24:435-445, 1992.
- MOSTASSO, F.L. Crescimento e nodulação de leguminosas em solo contaminado com metais pesados. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1997. 50p. (Tese de Mestrado)
- RÓZYCKI, H. A rapid agar-diffusion test for quantifying the toxic effects of copper on microorganisms. Acta Microbiol. Polonica, 41:57-64, 1992.
- URENHA, L.C.; PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S. & BONOMI, A. Produção de Biomassa Celular de Rizóbio. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S., eds. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. p.95-138.
- VINCENT, J.M. A Manual for the practical study of the root-nodule bacteria. London, JBP, 1970. 164p. (Handbook,15)
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. & SILVEIRA Jr., P. Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1984. 151p.