

Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio⁽¹⁾

Alexandre Matsuda⁽²⁾, Fátima Maria de Souza Moreira⁽³⁾ e José Oswaldo Siqueira⁽³⁾

Resumo – Sessenta estirpes/isolados dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*, procedentes de diferentes locais (Mata Atlântica, Amazônia, culturas agrícolas e experimentos com metais pesados) e de espécies hospedeiras pertencentes às subfamílias Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae, foram avaliadas quanto à tolerância a Zn, Cu e Cd em meio YMA modificado pela adição de tampões biológicos (HEPES e MES) e suplementados com Cu (0 a 60 mg L⁻¹), Cd (0 a 60 mg L⁻¹) e Zn (0 a 1.000 mg L⁻¹). Mediante padrões de crescimento atribuídos às culturas nas diferentes concentrações dos metais, avaliaram-se as concentrações máximas toleradas e as doses tóxicas destes metais para redução de crescimento em 25% (DT₂₅) e 50% (DT₅₀). Não houve influência da procedência na concentração máxima de metal tolerada. A ordem de sensibilidade aos metais, considerando-se as concentrações máximas toleradas, foi *Azorhizobium* > *Rhizobium* = *Mesorhizobium* = *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*. A DT₂₅ e a DT₅₀ foram úteis para diferenciarem estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd. A ordem de toxicidade dos metais estudados foi Cu > Cd > Zn.

Termos para indexação: simbioses, toxicidade, metais pesados, crescimento.

Tolerance of rhizobia genera from different origins to zinc, copper and cadmium

Abstract – Sixty strains/isolates of the genera *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Azorhizobium*, isolated from different hosts (legume subfamilies: Papilionoideae, Mimosoideae and Caesalpinoideae) and location (Atlantic Forest, Amazon region, crop plantings and heavy metal experiments), were evaluated for Zn, Cu and Cd tolerance in YMA medium modified by the addition of biological buffers (HEPES and MES) and supplemented with Cu (0 to 60 mg L⁻¹), Cd (0 to 60 mg L⁻¹), and Zn (0 to 1,000 mg L⁻¹) sulphates. Growth standards were applied to evaluate rhizobia cultures growth at different metal concentrations, allowing evaluation of highest tolerated concentrations of Zn, Cu, and Cd and the toxic doses (concentrations) of these metals, which reduce the growth standard in 25% (DT₂₅) and 50% (DT₅₀). It was verified that there was no influence of the origin (host and location) on the highest tolerated concentration of each metal; the order of sensitivity to heavy metals, considering the highest tolerable concentrations, was *Azorhizobium* > *Rhizobium* = *Mesorhizobium* = *Sinorhizobium* > *Bradyrhizobium*. The DT₂₅ and the DT₅₀ were useful to differentiate strain/isolates of the same genus, which reached the same highest tolerated concentration to Zn, Cu, and Cd; and the order of toxicity was Cu > Cd > Zn.

Index terms: symbionts, toxicity, heavy metals, growth.

Introdução

A poluição ambiental por resíduos industriais contendo metais pesados tem gerado graves problemas

ao ambiente, comprometendo ecossistemas (Doelman & Haanstra, 1984). As leguminosas capazes de formarem simbiose eficiente com rizóbio são espécies promissoras em programas de revegetação de solos degradados (Franco et al., 1992). A diversidade de rizóbios e de espécies de leguminosas no Brasil (Moreira et al., 1993) representam importantes fontes de recursos genéticos para programas de seleção de genótipos adaptados a diversas condições. O desenvolvimento de trabalhos de revegetação com leguminosas em solos contami-

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 2 de junho de 2001.

Trabalho financiado pelo convênio Faepe/CMM e Fapemig.

⁽²⁾ Universidade Federal de Lavras (Ufla), Dep. de Ciência do Solo, Caixa Postal 37, CEP 372000-000 Lavras, MG Bolsista da Capes.

⁽³⁾ Ufla, Dep. de Ciência do Solo, Caixa Postal 37, CEP 372000-000 Lavras, MG Bolsista do CNPq. E-mail: fmoreira@ufla.br, siqueira@ufla.br

nados requer, entre outros fatores, a obtenção de rizóbios tolerantes a níveis tóxicos de metais pesados.

Os efeitos dos metais pesados sobre os rizóbios têm sido investigados através da adição de sais de metais em concentrações crescentes aos meios nutritivos (Duxbury & Bicknell, 1983; Kinkle et al., 1987; Rózycki, 1992; Angle et al., 1993), sendo as avaliações feitas por meio de contagens em placa, ou pela estimativa da tolerância, através de valores atribuídos aos padrões de crescimento (Martensson, 1992). Uma limitação do uso de métodos *in vitro* é que as concentrações dos íons metálicos livres e, conseqüentemente, suas atividades reais não são conhecidas (Angle & Chaney, 1989). Além disso, alguns metais, como Cu, Pb e Ni, são, geralmente, menos tóxicos quando complexados com compostos orgânicos do que em forma livre (Babich & Stotzky, 1980, 1983), e, conseqüentemente, pode se superestimar as concentrações de metais toleradas. Além disso, estas podem não estar relacionadas às concentrações metálicas reais encontradas nos habitats dos quais o rizóbio foi isolado (Chaudri et al., 1993a, 1993b). Apesar disso, os dados de tolerância *in vitro*, por serem qualitativos, permitem comparar um grande número de microrganismos, e o teste em meio sólido, por ser um método mais rápido e acessível, tem sido empregado em estudos de tolerância de rizóbio a metais (Kinkle et al., 1987; Martensson, 1992; Angle et al., 1993; Trannin et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a tolerância de 60 estirpes/isolados de rizóbio (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), de diferentes procedências de hospedeiro e de local, a cobre, cádmio e zinco.

Material e Métodos

Sessenta estirpes/isolados de bactérias diazotróficas que formam simbiose com leguminosas, aqui coletivamente chamadas de rizóbios, num total de 20 simbiontes de cada subfamília (Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae), e provenientes de diferentes locais (Tabelas 1, 2 e 3), foram estudados quanto à tolerância a Zn, Cu e Cd em meio YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970) modificado. Cada estirpe ou isolado cresceu em 30 mL de meio YM (Yeast Mannitol) (Vincent, 1970) com

pH 6,8, sob agitação orbital a 105 rpm a 28°C. Passados dois dias de crescimento de *Meso/Sino/Rhizobium* ($1,3 \times 10^{10}$ cel mL⁻¹), quatro dias de crescimento de *Azorhizobium* (10^9 cel mL⁻¹) e seis dias de crescimento do *Bradyrhizobium* ($1,2 \times 10^{10}$ cel mL⁻¹), sendo estes os tempos necessários para que as culturas de cada gênero atingissem a fase log, uma alíquota de 1 mL de cultura de cada estirpe ou isolado foi transferida para tubos eppendorf de 1,5 mL esterilizados, e centrifugada a 8.000 rpm, a 25°C, por quatro minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células, ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 5,5 g L⁻¹) e centrifugadas novamente, repetindo o processo de lavagem em solução salina, por três vezes. Posteriormente, alíquotas de 0,1 mL de suspensões de células lavadas de rizóbio foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalsky em placas contendo meio YMA modificado por adição de tampões biológicos HEPES (1,3 mg L⁻¹ de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) e MES [1,1 mg L⁻¹ de 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid] (Cole & Elkan, 1973), suplementado com diferentes concentrações de cada metal, testados individualmente. As concentrações de Zn (ZnSO₄.7H₂O) utilizadas foram: 0, 200, 400, 500, 600, 800 e 1.000 mg L⁻¹ para os cinco gêneros, estabelecidas com base em estudos já realizados neste laboratório (Trannin et al., 2001). Após a adição das soluções de ZnSO₄.7H₂O, o pH dos meios foi ajustado para 6,8 com solução de KOH 0,5 N esterilizada. O Cd e o Cu foram adicionados em concentrações superiores às utilizadas por Trannin et al. (2001), já que a estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado (UFLA-01-456, UFLA-01-457 e UFLA-01-469), pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, cresceram na maior concentração testada pelos autores, o que indica que poderiam tolerar concentrações maiores; assim Cd e Cu foram adicionados nas formas de CdSO₄.8H₂O e CuSO₄.5H₂O, nas concentrações: 0, 5,0, 10, 20, 30, 40 e 60 mg L⁻¹, e 0, 2,5, 5,0, 10, 20, 40 e 60 mg L⁻¹, respectivamente, também para os cinco gêneros. Para auxiliar a visualização de alterações em pH do meio durante a avaliação, tratamentos controles, sem inoculação, foram mantidos para cada nível de contaminação com metal. Após inoculação, as placas foram incubadas a 28°C durante 10 dias. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

O comportamento de rizóbio nas diferentes concentrações de metais foi avaliado atribuindo-se valores aos diferentes padrões de crescimento (PC) observados: 0 = sem crescimento; 1 = sem colônias visíveis, mas com alcalinização (*Bradyrhizobium/Azorhizobium*) ou acidificação/ausência de alteração da cor do meio (dependendo da estirpe ou isolado do *Meso/Sino/Rhizobium*) e

Tabela 1. Estirpes e isolados de rizóbio de diferentes espécies da subfamília Caesalpinoideae, com seus respectivos gêneros, hospedeiros, tempo de crescimento, alteração de pH ocasionada no meio YMA (Yeast Mannitol Agar), produção de goma e local de origem.

Estirpe/isolado ⁽¹⁾	Gênero	Hospedeiro	Tempo de crescimento ⁽²⁾	Reação do pH do meio	Produção de goma pelas colônias ⁽³⁾	Local de origem
BR-3901 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Melanoxylon</i> sp.	Lento	Alcaliniza	1/2	Mata Atlântica
BR-5004 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-5005 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
INPA-68A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-101A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-145A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-147A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-155A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Campsiandra laurifolia</i>	Muito lento	Alcaliniza	1	A Amazônia
INPA-170B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Campsiandra comosa</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-173A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Tachigali paniculata</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-179A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Campsiandra comosa</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-191A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-547B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Tachigali paniculata</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
INPA-553A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Tachigali paniculata</i>	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
UFLA-01-11	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	A Amazônia
FL-27	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia falcata</i>	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-3804 ⁽⁴⁾	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Chamaecrista ensiformis</i>	Rápido	Acidifica	3	Mata Atlântica
BR-5001	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Dimorphandra mollis</i>	Rápido	Acidifica	2/3	Mata Atlântica
INPA-353B ⁽⁵⁾	<i>Rhizobium</i>	<i>Vouacapoua pallidior</i>	Rápido	Neutro	2	A Amazônia
UFLA-01-10 ⁽⁵⁾	<i>Rhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i> sp.	Rápido	Acidifica	3	A Amazônia

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

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

Estirpe/isolado ⁽¹⁾	Gênero	Hospedeiro	Tempo de crescimento ⁽²⁾	Reação do pH do meio	Produção de goma pelas colônias ⁽³⁾	Local de origem
BR-3617 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia mangium</i>	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-4406 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Enterolobium ellipticum</i>	Lento	Alcaliniza	2/3	Mata Atlântica
BR-5610 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-5611 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Paraserianthes falcata</i>	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
INPA-10A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pithecellobium</i> sp. cf. <i>saman</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-54B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Inga</i> sp.	Lento	Alcaliniza	1/2	Amazônia
INPA-72A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia lebbek</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-75B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia lebbek</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-104A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Calliandra surinamensis</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-183B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pentaclethra</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-223A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pentaclethra macroloba</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
UFLA-01-457	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Lento	Alcaliniza	2	CMM-MG ⁽⁶⁾
UFLA-01-473	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Enterolobium timbouva</i>	Lento	Alcaliniza	2	CMM-MG ⁽⁶⁾
BR-817	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Rápido	Neutro	3	Mata Atlântica
BR-3452 ^{(4), (5)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Mimosa</i> sp.	Rápido	Acidifica	2	Mata Atlântica
BR-3460 ^{(4), (5)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Mimosa</i> sp.	Rápido	Neutro	3	Mata Atlântica
BR-3614 ^{(4), (5)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Acacia</i> sp.	Rápido	Neutro	3	Mata Atlântica
BR-4301 ^{(4), (5)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Calliandra</i> sp.	Rápido	Acidifica	3	Mata Atlântica
BR-4302 ^{(4), (5)}	<i>Rhizobium</i>	<i>Calliandra</i> sp.	Rápido	Acidifica	3	Mata Atlântica
BR-6806	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Pithecellobium dulce</i>	Rápido	Neutro	3	Mata Atlântica

⁽¹⁾BR: estirpes/isolados da coleção da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ; INPA: estirpes da coleção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; Ufla: estirpes da coleção da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. ⁽²⁾Tempo para o aparecimento de colônias isoladas (dias): crescimento rápido, 1-3; crescimento intermediário, 4-5; crescimento lento, 6-10.

⁽³⁾Produção de goma pelas colônias (avaliação visual comparativa): 1, pouca; 2, média; 3, abundante; 1/2 e 2/3, intermediários (Moreira, 1991). ⁽⁴⁾Estirpes recomendadas para produção de inoculante comercial. ⁽⁵⁾Estirpes/isolados classificados provisoriamente, de acordo com suas características (tempo de crescimento, reação do pH do meio e produção de goma pelas colônias), como *Rhizobium*; somente testes genéticos mostrarão a que gênero realmente pertencem (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Rhizobium*).

⁽⁶⁾Isolado de mistura de solos contendo 40% de solo contaminado diluído em Latossolo Vermelho escuro (LE); solo contaminado proveniente da Companhia Mineira de Metais (CMM), Três Marias, MG.

Tabela 3. Estirpes e isolados de rizóbio de diferentes espécies da subfamília Papilionoideae, com seus respectivos gêneros, hospedeiros, tempo de crescimento, alteração de pH ocasionada no meio YMA (Yeast Mannitol Agar), produção de goma e local de origem.

Estirpe/isolado ⁽¹⁾	Gênero	Hospedeiro	Tempo de crescimento ⁽²⁾	Reação do pH do meio	Produção de goma pelas colônias ⁽³⁾	Local de origem
BR-29 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Glycine max</i>	Lento	Alcaliniza	2	Cultura agrícola
SEMA 587 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Glycine max</i>	Lento	Alcaliniza	2	Cultura agrícola
BR-2001 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	Lento	Alcaliniza	2	Cultura agrícola
BR-2613	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pueraria phaseoloides</i>	Lento	Alcaliniza	2	Cultura agrícola
BR-2405 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Neonotonia wightii</i>	Lento	Alcaliniza	2	Cultura agrícola
BR-2801 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Indigofera hirsuta</i>	Lento	Alcaliniza	2	Cultura agrícola
BR-6009 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Deguelia</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-8402 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dalbergia</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
BR-8404 ⁽⁴⁾	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Dalbergia nigra</i>	Lento	Alcaliniza	2	Mata Atlântica
INPA-33A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Derris amazônica</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-80A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Ormosia discolor</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-237B	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Pterocarpus</i> sp.	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
INPA-514A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Machaerium quinata</i>	Lento	Alcaliniza	2	Amazônia
UFLA-01-486	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Intermediário	Alcaliniza	1	CMM-MG ⁽⁶⁾
UFLA-01-510	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Intermediário	Alcaliniza	1	CMM-MG ⁽⁶⁾
CIA T 899 ⁽⁴⁾	<i>Rhizobium</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rápido	Acidifica	3	Cultura agrícola
BR-6401 ⁽⁵⁾	<i>Rhizobium</i>	<i>Centrobium</i> sp.	Rápido	Acidifica	3	Mata Atlântica
INPA-523B	<i>Rhizobium</i>	<i>Swartzia polyphylla</i>	Rápido	Acidifica	3	Amazônia
UFLA-04-708 ⁽⁵⁾	<i>Rhizobium</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Rápido	Neutro	3	Solo - Amazônia
UFLA-04-709 ⁽⁵⁾	<i>Rhizobium</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Rápido	Neutro	3	Solo - Amazônia

⁽¹⁾BR: estirpes/isolados da coleção da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ; INPA: estirpes da coleção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; Ufla: estirpes da coleção da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG ⁽²⁾Tempo para o aparecimento de colônias isoladas (dias): crescimento rápido: 1-3; crescimento intermediário: 4-5; crescimento lento: 6-10.

⁽³⁾Produção de goma pelas colônias (avaliação visual comparativa): 1-pouca; 2-média; 3-abundante (Moreira, 1991). ⁽⁴⁾Estirpes recomendadas para produção de inoculante comercial. ⁽⁵⁾Estirpes/isolados classificados provisoriamente, de acordo com suas características (tempo de crescimento, reação do pH do meio e produção de goma pelas colônias), como *Rhizobium*; somente testes genéticos mostrarão a que gênero realmente pertencem (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Rhizobium*). ⁽⁶⁾Isolado de mistura de solos contendo 10% de solo contaminado diluído em Latossolo Vermelho escuro (LE); solo contaminado proveniente da Companhia Mineira de Metais (CMM), Três Marias, MG.

crescimento positivo após repicagem para meio sem metal; 2 = pouco; 3 = médio; 4 = abundante, com distribuição heterogênea na placa; 5 = máximo, com distribuição uniforme por toda a placa, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação. A concentração máxima tolerada (CMT) correspondeu à maior concentração de metal que apresentou $PC \geq 1$.

Através dos valores atribuídos aos diferentes PC para avaliação do comportamento do rizóbio nas diferentes concentrações de Zn, Cu e Cd, foram obtidas equações de regressão (programa Table Curve 2D for Windows v. 2.03 – Jandel Corporation), e a partir destas, foram calculadas as doses tóxicas dos metais que reduzem o PC em 25% (DT_{25}) e 50% (DT_{50}).

Resultados e Discussão

Considerando a CMT de Zn, a estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e oriundos de Mimosoideae, foram os mais tolerantes (Tabela 4). Dos outros representantes desse gênero nas três subfamílias (SF), nove tiveram PC 2, e o restante, PC 1, na mesma CMT. Todos os representantes da SF Caesalpinoideae tiveram PC 1 na CMT de Zn, e os da subfamília Mimosoideae, que tiveram PC 2 nessa concentração, são de hospedeiros nativos da Amazônia. A CMT de 800 mg L⁻¹ também foi verificada por Trannin et al. (2001) em relação às estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* mais tolerantes a zinco. Angle et al. (1993) constataram que a espécie de *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium japonicum*) mais tolerante a Zn apresentou CMT de 500 mg L⁻¹, sendo esta a maior concentração testada por esses autores. A CMT a Zn por todos representantes de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* foi menor que a CMT por *Bradyrhizobium* (Tabela 4). Na CMT, todas estirpes/isolados de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* oriundos de Caesalpinoideae tiveram o maior PC (2), enquanto os representantes oriundos de Papilionoideae e Mimosoideae tiveram PC 1; *Mesorhizobium* obteve PC 2 na CMT a zinco. Como *Mesorhizobium* teve apenas uma representante, a estirpe BR-3804 (Caesalpinoideae) não pode ser comparada com outras de mesmo gênero que tivessem sido isoladas de espécies de outras subfamílias. Já os isolados de *Rhizobium* testados por Angle et al.

(1993) também mostraram ser menos tolerantes a Zn que *Bradyrhizobium*, apresentando CMT de 100 mg L⁻¹. A maior tolerância de estirpes oriundas da subfamília Caesalpinoideae a estresses também foi verificada por Silva & Franco (1984), que constataram que das 211 estirpes de *Rhizobium* sp. testadas em meio de cultura sob condições de acidez, 85,7%, 48,8% e 28,0% isoladas, respectivamente, das subfamílias Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae, cresceram em meio de cultura com pH 4,6 com e sem 50 μM Al³⁺, e que uma estirpe cresceu na ausência, mas não na presença de Al³⁺. Para os dois isolados de *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510), a concentração máxima tolerada (CMT) a Zn foi menor que para os outros gêneros, diferindo, entretanto, nos PCs, na concentração de 200 mg L⁻¹ (Tabela 4). Como *Azorhizobium* é restrito a hospedeiros do gênero *Sesbania*, não foi possível a comparação entre subfamílias. A CMT de 400 mg L⁻¹ também foi encontrada pelas estirpes e isolados de *Azorhizobium* mais tolerantes a Zn estudados por Trannin et al. (2001).

A estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, os três pertencentes a *Bradyrhizobium* e oriundos de Mimosoideae, também foram os mais tolerantes a Cu, considerando a CMT, porém os dois isolados tiveram PC 2 nesta concentração, e a BR-4406 PC 1 (Tabela 5). Com relação aos outros representantes de *Bradyrhizobium* houve variação com relação a CMT. Já no estudo de Trannin et al. (2001), a CMT obtida para Cu pela estirpe e isolados de *Bradyrhizobium* mais tolerantes foi 40 mg L⁻¹, e portanto menor que a dos mais tolerantes obtidos neste estudo, porém esta foi a maior concentração testada pelos autores. Angle et al. (1993) obtiveram, em relação ao Cu, a CMT de apenas 5,0 mg L⁻¹ pelo *Bradyrhizobium* mais tolerante. Por outro lado, as estirpes/isolados de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* toleraram o Cu duas vezes mais que os isolados de *Azorhizobium* (Tabela 5). Todas as estirpes/isolados de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* oriundos das subfamílias Caesalpinoideae e Papilionoideae tiveram PC 2 na CMT, e os de Mimosoideae, PC 1; *Mesorhizobium* também obteve PC 2 na CMT a cobre. No trabalho de Angle et al. (1993) a CMT pelo isolado de

Tabela 4. Padrões de crescimento de rizóbio expostos a concentrações de zinco (mg L^{-1}) em meio YMA modificado e equações de regressão para determinação das doses críticas de toxidez (mg L^{-1}) para inibição de 25% (DT_{25}) e 50% (DT_{50}) do padrão de crescimento.

Subfamília/gênero	Zinco (mg L^{-1})							Regressão	R^2	DT_{25}	DT_{50}
	0	200	400	500	600	800	1.000				
Caesalpinoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
INPA-179A	4	4	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,63 - 1,53e - 07x^{2,5}$	0,97 ^{***}	336	467
INPA-170B	4	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 102,92 - 3,16x^{0,5}$	0,90 ^{***}	78	280
INPA-101A	4	4	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,62 - 8,27e - 09x^3$	0,97 ^{***}	331	440
INPA-145A	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98 ^{***}	222	387
INPA-191A	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98 ^{***}	222	387
INPA-553A	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98 ^{***}	222	387
BR-3901	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98 ^{***}	222	387
INPA-173A	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 101,04 - 3,24x^{0,5}$	0,95 ^{***}	64,4	247
INPA-68A	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 101,04 - 3,24x^{0,5}$	0,95 ^{***}	64,4	247
FL-27	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93 ^{***}	244	447
BR-5004	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93 ^{***}	244	447
BR-5005	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93 ^{***}	244	447
UFLA-01-11	4	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -5,37 + 103,62 \exp(-x/364,58)$	0,97 ^{***}	92,6	228
INPA-147A	3	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -32,90 + 132,47 \exp(-x/686,73)$	0,96 ^{***}	141	322
INPA-155A	3	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -32,90 + 132,47 \exp(-x/686,73)$	0,96 ^{***}	141	322
INPA-547B	3	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -32,90 + 132,47 \exp(-x/686,73)$	0,96 ^{***}	141	322
<i>Sino(S)/Meso(M)/Rhizobium(R)</i>											
UFLA-01-10(R)	4	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{0,5} = 9,76 - 0,00028x^{1,5}$	0,87 ^{***}	249	452
INPA-353B(R)	4	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y = 100,1 \exp(-x/377,8)$	0,83 ^{***}	109	262
BR-5001(S)	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,60 - 3,83e - 09x^3$	0,82 ^{***}	421	565
BR-3804(M)	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y = -261,89 + 362,54 \exp(-x/2775,87)$	0,80 ^{***}	204	418
Papilionoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
BR-8402	5	4	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,77 - 0,00029x^{1,5}$	0,94 ^{***}	245	440
INPA-80A	4	4	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,77 - 1,0097e - 05x^2$	0,92 ^{***}	360	536
SEMA 587	3	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,83 - 2,44e - 07x^{2,5}$	0,88 ^{***}	471	663
BR-2405	4	2	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 98,62 - 0,43x^{0,5} \ln x$	0,85 ^{***}	126	361
INPA-514A	5	4	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,59 - 5,29e - 06x^2$	0,99 ^{***}	229	359
INPA-33A	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,88 - 0,00037x^{1,5}$	0,98 ^{***}	222	387
BR-6009	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,62 - 6,14e - 09x^3$	0,97 ^{***}	365	486
BR-29	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 101,04 - 3,24x^{0,5}$	0,95 ^{***}	64,4	247
BR-2801	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,73 - 0,00028x^{1,5}$	0,93 ^{***}	244	447
BR-2001	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 10,29 - 3,73e - 07x^{2,5}$	0,93 ^{***}	453	595
BR-2613	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 10,29 - 3,73e - 07x^{2,5}$	0,93 ^{***}	453	595
BR-8404	5	4	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,59 - 5,62e - 06x^2$	0,95 ^{***}	222	348
INPA-237B	4	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -5,37 + 103,62 \exp(-x/364,58)$	0,97 ^{***}	92,6	228
<i>Rhizobium</i>											
INPA-523B	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,64 - 7,93e - 09x^3$	0,97 ^{***}	345	452
CIAT 899	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,64 - 7,93e - 09x^3$	0,97 ^{***}	345	452
BR-6401	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,64 - 7,93e - 09x^3$	0,97 ^{***}	345	452
UFLA-04-708	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,64 - 7,93e - 09x^3$	0,97 ^{***}	345	452
UFLA-04-709	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,64 - 7,93e - 09x^3$	0,97 ^{***}	345	452
<i>Azorhizobium</i>											
UFLA-01-486	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	0	$\ln Y = 4,60 - 0,00014x^{1,5}$	0,93 ^{***}	161	291
UFLA-01-510	3	1	1 ⁽¹⁾	0	0	0	0	$\ln Y = 4,58 - 0,0032x$	0,88 ^{***}	62,3	207
Mimosoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
UFLA-01-457	5	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -38,36 + 141,23 \exp(-x/791,07)$	0,97 ^{***}	174	371
UFLA-01-473	4	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -95,91 + 191,63 \exp(-x/1465,27)$	0,97 ^{***}	198	430
BR-4406	5	4	1	1	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -7,20 + 111,96 \exp(-x/415,58)$	0,91 ^{***}	128	279
INPA-72A	5	4	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,77 - 0,00029x^{1,5}$	0,94 ^{***}	245	440
INPA-54B	5	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 104,10 - 3,18x^{0,5}$	0,93 ^{***}	83,5	289
INPA-10A	4	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 102,61 - 0,72x/\ln x$	0,93 ^{***}	202	443
INPA-75B	4	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 102,61 - 0,72x/\ln x$	0,93 ^{***}	202	443

Continua...

Tabela 4. Continuação

Subfamília/gênero	Zinco (mg L ⁻¹)						Regressão	R ²	DT ₂₅	DT ₅₀	
	0	200	400	500	600	800					1.000
Mimosoideae (continuação)											
INPA-183B	4	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	Y=102,61-0,72x/lnx	0,93 ^{**}	202	443
BR-3617	5	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	Y=103,89-3,31x ^{0,5}	0,97 ^{**}	75,9	264
INPA-223 A	5	4	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	ln Y=4,59-5,29e-06x ²	0,99 ^{**}	229	359
INPA-104 A	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	Y ^{0,5} =9,88-0,00037x ^{1,5}	0,98 ^{**}	222	387
BR-5611	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	Y=-5,37+103,62exp(-x/364,58)	0,97 ^{**}	64,4	247
BR-5610	4	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	0	Y=101,04-3,24x ^{0,5}	0,95 ^{**}	92,6	228
<i>Sino(S)/Rhizobium(R)</i>											
BR-4302(R)	4	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	Y=-20,09+118,76exp(-x/487,99)	0,92 ^{**}	108	257
BR-3452(R)	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	Y ^{0,5} =9,76-0,00029x ^{1,5}	0,86 ^{**}	241	437
BR-3614(R)	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	Y ^{0,5} =9,76-0,00029x ^{1,5}	0,86 ^{**}	241	437
BR-4301(R)	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	Y ^{0,5} =9,76-0,00029x ^{1,5}	0,86 ^{**}	241	437
BR-3460(R)	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	ln Y=4,66-3,37e-09x ³	0,76 ^{**}	466	605
BR-817(S)	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	Y ^{0,5} =9,76-0,00029x ^{1,5}	0,86 ^{**}	241	437
BR-6806(S)	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	ln Y=4,66-3,37e-09x ³	0,76 ^{**}	466	605

⁽¹⁾Padrão de crescimento do rizóbio na concentração máxima tolerada (CMT) a zinco.

Rhizobium mais tolerante a Cu foi bastante inferior (2,0 mg L⁻¹) à encontrada neste estudo. Os isolados de *Azorhizobium* foram os mais sensíveis ao Cu (Tabela 5), resultado também encontrado por Trannin et al. (2001) com relação às estirpes e isolados de *Azorhizobium* testados.

A estirpe e isolados de solo contaminado de *Bradyrhizobium* mais tolerantes a Zn e Cu também foram mais tolerantes a Cd (Tabela 6). No estudo de Trannin et al. (2001), a CMT a Cd pela estirpe e isolados de *Bradyrhizobium* mais tolerantes foi 40 mg L⁻¹; porém, como ocorreu com o Cu, esta foi a maior concentração testada pelos autores. Quanto ao Cd, Angle et al. (1993) obtiveram a CMTs de apenas 7,5 mg L⁻¹ pelo *Bradyrhizobium* mais tolerante. Borges & Wollum (1980, 1981), ao examinarem a tolerância a Cd de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* simbiontes de soja, verificaram que as CMTs variaram de 10 a 90 mg L⁻¹. Isto sugere que concentrações mais elevadas de Cd e Cu poderiam ser testadas para a estirpe e isolados mais tolerantes de *Bradyrhizobium* (BR-4406, UFLA-01-457 e UFLA-01-473) verificados neste estudo, que toleraram até 60 mg L⁻¹ de Cd e Cu, concentrações máximas estudadas. Todas as estirpes/isolados de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* atingiram menores CMT do que *Bradyrhizobium*, em relação a este metal, sendo que os do gênero *Rhizobium* oriundos de Papilionoideae tiveram o maior PC (2) na CMT (Tabela 6). No trabalho de Angle et al. (1993), como aconteceu com Zn e Cu, a CMT atin-

gida pelos isolados de *Rhizobium* mais tolerantes a Cd foi bastante inferior (2,5 mg L⁻¹) à obtida no presente estudo. Os dois isolados de *Azorhizobium* também foram os mais sensíveis a Cd (Tabela 6). Das dez estirpes/isolados de *Azorhizobium* utilizadas por Trannin et al. (2001), nove apresentaram a mesma CMT a Cd neste estudo, e uma atingiu CMT de 30 mg L⁻¹.

Apesar de a CMT de cada metal ter sido a mesma para todas as estirpes e isolados dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, os representantes da subfamília Mimosoideae mostraram ser mais sensíveis, obtendo PC 1 para Zn e Cu nesta concentração. Em relação ao Cd, as mais sensíveis foram Mimosoideae e Caesalpinoideae. A ausência de diferenças entre estirpes/isolados dentro dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* quanto à CMT aos metais pode ser atribuída ao fato de não terem sido testados isolados de solos contaminados, diminuindo, conseqüentemente, a possibilidade de serem encontradas diferenças quanto à tolerância a metais. No entanto, no caso de *Bradyrhizobium*, estirpes não procedentes de solos contaminados (e.g. BR-4406) também podem apresentar alta tolerância, e no caso de *Azorhizobium*, isolados de solos contaminados podem ser sensíveis (e.g. UFLA-01-486 e UFLA-01-510).

Quanto a *Bradyrhizobium*, que tinha maior diversidade de origens, não houve influência das SFs na tolerância aos metais. *Bradyrhizobium* apresentou

Tabela 5. Padrões de crescimento de rizóbio expostos a concentrações de cobre (mg L^{-1}) em meio YMA modificado e equações de regressão para determinação das doses críticas de toxidez (mg L^{-1}) para inibição de 25% (DT_{25}) e 50% (DT_{50}) do padrão de crescimento.

Subfamília/gênero	Cobre (mg L^{-1})						Regressão	R^2	DT_{25}	DT_{50}	
	0	2,5	5	10	20	40					60
Caesalpinoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
INPA-173A	5	4	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$Y=98,61-12,15x^{0,5}$	0,94 ^{***}	3,8	16,0
INPA-191a	4	4	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$Y=99,52-3,05x^{0,5}\ln x$	0,94 ^{***}	11,1	25,2
INPA-68A	4	3	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y=4,43-1,87e-05x^3$	0,93 ^{***}	18,5	30,3
INPA-101A	4	3	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y=4,43-1,87e-05x^3$	0,93 ^{***}	18,5	30,3
INPA-145A	4	3	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y=4,43-1,87e-05x^3$	0,93 ^{***}	18,5	30,3
INPA-553a	4	4	4	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y=4,61-0,0019x^2$	0,99 ^{***}	12,5	19,3
BR-3901	4	4	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=10,02-0,15x$	0,96 ^{***}	9,1	19,7
BR-5004	5	4	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=-1,26+95,70\exp(-x/15,09)$	0,95 ^{***}	3,4	9,4
FL-27	3	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=9,95-0,023x^{1,5}$	0,94 ^{***}	14,5	24,8
BR-5005	3	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=-42,88+141,19\exp(-x/45,05)$	0,90 ^{***}	8,1	18,9
INPA-547B	3	2	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=99,41-12,90x^{0,5}$	0,86 ^{***}	3,6	14,7
INPA-147a	3	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{-1}=0,0099+4,12e-11e^x$	0,99 ^{***}	18,2	19,3
INPA-170B	4	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=10,05-1,07x^{0,5}$	0,97 ^{***}	1,7	7,8
UFLA-01-11	4	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=9,71-1,05x^{0,5}$	0,94 ^{***}	1,0	6,3
INPA-179a	5	4	3	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y=1,38+101,04\exp(-x/8,23)$	0,97 ^{***}	2,6	6,0
INPA-155A	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y=4,59-0,0020x^2$	0,91 ^{***}	11,8	18,6
<i>Sino(S)/Meso(M)/Rhizobium(R)</i>											
UFLA-01-10(R)	3	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1}=0,0099+2,27e-07e^x$	0,99 ^{***}	9,6	10,7
INPA-353B(R)	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1}=0,010+5,16e-06x^3$	0,92 ^{***}	8,4	12,3
BR-3804(M)	4	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y=102,28\exp(-x/10,94)$	0,95 ^{***}	3,4	7,8
BR-5001(S)	3	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1}=0,0099+2,27e-07e^x$	0,99 ^{***}	9,6	10,7
Papilionoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
INPA-80A	4	4	4	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5}=9,99-0,019x^{1,5}$	0,97 ^{***}	16,9	28,6
INPA-514a	5	3	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$Y=92,36-11,23x^{0,5}$	0,89 ^{***}	2,4	14,2
BR-8404	4	4	4	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y=4,61-0,0019x^2$	0,99 ^{***}	12,5	19,3
INPA-33A	4	4	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=10,02-0,15x$	0,96 ^{***}	9,1	19,7
BR-2613	4	3	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y=4,47-0,0014x^2$	0,95 ^{***}	10,1	19,6
SEMIA 587	4	3	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y=4,47-0,0014x^2$	0,95 ^{***}	10,1	19,6
INPA-237B	4	4	4	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y=4,59-0,0019x^2$	0,91 ^{***}	11,8	18,6
BR-2405	5	4	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=-1,26+95,70\exp(-x/15,09)$	0,95 ^{***}	3,4	9,4
BR-2801	4	4	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=9,93-0,17x$	0,94 ^{***}	7,3	16,6
BR-29	4	4	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=9,93-0,17x$	0,94 ^{***}	7,3	16,6
BR-8402	4	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=99,88-13,68x^{0,5}$	0,95 ^{***}	3,3	13,3
BR-6009	3	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5}=9,95-0,023x^{1,5}$	0,94 ^{***}	14,5	24,8
BR-2001	2	2	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=97,95-0,032x^2$	0,81 ^{***}	26,6	38,5
<i>Rhizobium</i>											
CIAT 899	4	4	3	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y=4,60-0,0074x^2$	0,99 ^{***}	6,2	9,7
UFLA-04-708	4	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y=-5,19+106,86\exp(-x/12,09)$	0,96 ^{***}	3,5	7,9
UFLA-04-709	4	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y=-5,19+106,86\exp(-x/12,09)$	0,96 ^{***}	3,5	7,0
BR-6401	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y=4,60-0,014x^{1,5}$	0,91 ^{***}	7,1	13,0
INPA-523B	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y=4,60-0,014x^{1,5}$	0,91 ^{***}	8,4	12,3
<i>Azorhizobium</i>											
UFLA-01-486	3	1	1 ⁽¹⁾	0	0	0	0	$Y^{-1}=0,010+0,0021x^{1,5}$	0,92 ^{***}	1,3	2,8
UFLA-01-510	3	1	1 ⁽¹⁾	0	0	0	0	$Y^{-1}=0,010+0,0021x^{1,5}$	0,92 ^{***}	1,3	2,8
Mimosoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
UFLA-01-457	5	4	4	4	3	3	2 ⁽¹⁾	$Y=96,61-6,91x^{0,5}$	0,93 ^{***}	9,8	45,5
UFLA-01-473	4	3	3	3	3	2	2 ⁽¹⁾	$\ln Y=4,56-0,084x^{0,5}$	0,86 ^{***}	8,5	60,0
BR-4406	5	4	4	3	3	2	1 ⁽¹⁾	$Y=98,37-9,74x^{0,5}$	0,97 ^{***}	5,7	24,7
INPA-104a	4	4	3	3	3	1 ⁽¹⁾	0	$Y=99,52-3,05x^{0,5}\ln x$	0,94 ^{***}	11,1	25,2
INPA-183B	3	3	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{-1}=0,0099+1,03e-11e^x$	0,99 ^{***}	19,6	20,7
INPA-75B	3	3	3	3	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{-1}=0,0099+1,03e-11e^x$	0,99 ^{***}	19,6	20,7
BR-5610	5	4	4	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y=-4,93+102,73\exp(-x/17,62)$	0,95 ^{***}	4,4	11,0

Continua...

Tabela 5. Continuação

Subfamília/gênero	Cobre (mg L ⁻¹)							Regressão	R ²	DT ₂₅	DT ₅₀
	0	2,5	5	10	20	40	60				
Mimosoideae (continuação)											
BR-5611	5	4	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -1,26 + 95,70 \exp(-x/15,09)$	0,95**	3,4	9,4
INPA-72a	3	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,95 - 0,023x^{1,5}$	0,94**	14,5	24,8
INPA-10a	3	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,95 - 0,023x^{1,5}$	0,94**	14,5	24,8
INPA-223a	2	2	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 97,95 - 0,032x^2$	0,81**	26,6	38,5
BR-3617	5	4	4	3	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -7,40 + 108,19 \exp(-x/17,31)$	0,98**	4,7	10,9
INPA-54B	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,62 - 0,0030x^2$	0,99**	10,1	15,3
<i>Sino(S)/Rhizobium(R)</i>											
BR-3452(R)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5
BR-3460(R)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5
BR-3614(R)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5
BR-4301(R)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5
BR-4302(R)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5
BR-817(S)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5
BR-6806(S)	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 2,36e-05x^3$	0,99**	5,2	7,5

⁽¹⁾ Padrão de crescimento do rizóbio na concentração máxima tolerada (CMT) a cobre.

maior variação de PC que *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, quando exposto aos metais; como o gênero *Mesorhizobium* teve apenas um representante, não foi possível avaliar a variação em seu PC.

A ordem de toxicidade dos metais a todas as estirpes e isolados estudados foi Cu>Cd>Zn, o que concorda com os resultados de Chaudri et al. (1992), Angle et al. (1993) e Trannin et al. (2001).

Algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd, apresentaram comportamento diferenciado, ou seja, DT₂₅ e DT₅₀ diferentes (Tabelas 4, 5 e 6). Os dois isolados de *Azorhizobium* (UFLA-01-486 e UFLA-01-510), por exemplo, que atingiram a mesma CMT a Zn (Tabela 4), apresentaram DT₂₅ e DT₅₀ diferentes. O isolado UFLA-01-510 mostrou-se mais sensível a Zn, já que a concentração necessária para redução do padrão de crescimento em 25% foi menor (Tabela 4).

As estirpes/isolados mais sensíveis (menores DT₂₅) e mais tolerantes (maiores DT₅₀) a Zn, Cu e Cd pertencem, predominantemente, a *Bradyrhizobium*; este gênero foi o que apresentou as maiores CMT a estes metais (Tabelas 4, 5 e 6). Nos estudos de Angle et al. (1993) e Trannin et al. (2001), *Bradyrhizobium* também foi mais tolerante a metais pesados que *Rhizobium* e *Azorhizobium*, respectivamente. *Azorhizobium* foi o gênero que apresentou as menores CMT aos três metais e também obteve as menores DT₅₀. Não houve influência

da origem (subfamílias e locais) na DT₂₅ e DT₅₀ a metais.

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

Tabela 6. Padrões de crescimento de rizóbio expostos a concentrações de cádmio (mg L^{-1}) em meio YMA modificado e equações de regressão para determinação das doses críticas de toxidez (mg L^{-1}) para inibição de 25% (DT_{25}) e 50% (DT_{50}) do padrão de crescimento.

Subfamília/gênero	Cádmio (mg L^{-1})							Regressão	R^2	DT_{25}	DT_{50}
	0	5	10	20	30	40	60				
Caesalpinoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
INPA-553 A	4	4	4	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,61 - 0,00014x^{2,5}$	0,99**	21,3	29,9
BR-5004	4	4	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 9,96 - 0,018x^{1,5}$	0,97**	17,1	29,1
BR-3901	4	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 3,41e+06 - 3,41e+06 \exp(x/2,16e+06)$	0,95**	12,2	28,1
INPA-147A	4	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 3,41e+06 - 3,41e+06 \exp(x/2,16e+06)$	0,95**	12,2	28,1
INPA-101A	3	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,64 - 1,61e-05x^3$	0,99**	27,1	35,6
INPA-170B	5	4	4	2	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -30,96 + 129,92 \exp(-x/42,70)$	0,97**	8,7	20,2
INPA-179a	5	4	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 103,01 - 12,95x^{0,5}$	0,98**	4,7	16,7
BR-5005	4	4	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 95,97 - 3,03x^{0,5} \ln x$	0,88**	9,5	23,2
FL-27	3	3	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 9,60 - 0,0022x^2$	0,90**	20,5	33,6
INPA-173a	5	4	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -4,77 + 104,22 \exp(-x/22,99)$	0,99**	6,1	14,8
INPA-547B	4	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -25,12 + 122,27 \exp(-x/39,28)$	0,97**	7,8	19,1
INPA-0191a	4	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 10,02 - 0,15x$	0,90**	9,3	20,1
INPA-145a	4	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 99,40 - 12,60x^{0,5}$	0,97**	3,7	15,4
INPA-68a	3	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -78,82 + 180,66 \exp(-x/74,16)$	0,95**	11,9	25,1
UFLA-01-11	4	3	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 8,53 + 91,15 \exp(-x/14,19)$	0,96**	4,5	11,2
INPA-155a	3	2	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 98,26 - 12,05x^{0,5}$	0,95**	3,7	16,0
<i>Sino(S)/Meso(M)/Rhizobium(R)</i>											
UFLA-01-10(R)	4	4	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$\ln Y = 4,60 - 0,0017x^2$	0,98**	12,9	20,3
INPA-353B(R)	2	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{-1} = 0,0099 + 9,36e-16e^x$	0,99**	28,9	30,0
BR-5001(S)	4	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,89 - 0,15x$	0,96**	8,1	18,6
BR-3804(M)	4	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{0,5} = 9,89 - 0,15x$	0,96**	8,1	18,6
Papilionoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
INPA-80A	4	4	4	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,61 - 0,00014x^{2,5}$	0,99**	21,3	29,9
INPA-514A	3	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,59 - 0,00014x^{2,5}$	0,95**	21,0	30,2
BR-8404	4	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 90,83 - 11,41x^{0,5}$	0,91**	1,9	12,8
INPA-33a	4	4	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 9,96 - 0,018x^{1,5}$	0,97**	17,1	29,1
SEMA 587	4	3	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 8,53 + 91,15 \exp(-x/14,19)$	0,96**	4,5	11,2
BR-2613	2	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 10,08 - 0,00034x^{2,5}$	0,94**	28,0	37,8
INPA-37B	4	4	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 9,96 - 0,018x^{1,5}$	0,97**	17,1	29,1
BR-2405	3	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,59 - 0,00014x^{2,5}$	0,95**	21,0	30,2
BR-2801	2	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y^{0,5} = 10,08 - 0,00034x^{2,5}$	0,94**	28,0	37,8
BR-29	5	4	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 4,85 + 94,04 \exp(-x/16,18)$	0,94**	4,7	11,9
BR-8402	4	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 99,40 - 12,60x^{0,5}$	0,97**	3,7	15,4
BR-6009	4	3	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = 99,40 - 12,60x^{0,5}$	0,97**	3,7	15,4
BR-2001	3	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,64 - 1,61e-05x^3$	0,99**	27,1	35,6
<i>Rhizobium</i>											
INPA-523B	4	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 101,55 - 13,11x^{0,5}$	0,88**	4,1	15,4
CIAT 899	4	3	2	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = 101,55 - 13,11x^{0,5}$	0,88**	4,1	15,4
BR-6401	3	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y^{-1} = 0,010 + 4,39e-16e^x$	0,92**	29,6	30,7
UFLA-04-708	4	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -60,33 + 156,87 \exp(-x/58,09)$	0,91**	8,6	20,4
UFLA-04-709	4	3	3	2	2 ⁽¹⁾	0	0	$Y = -60,33 + 156,87 \exp(-x/58,09)$	0,91**	8,6	20,4
<i>Azorhizobium</i>											
UFLA-01-486	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$Y^{-1} = 0,0096 + 1,12e-06x^3$	0,94**	14,9	21,0
UFLA-01-510	3	3	1	1 ⁽¹⁾	0	0	0	$\ln Y = 4,57 - 0,0011x^2$	0,84**	15,4	24,8
Mimosoideae											
<i>Bradyrhizobium</i>											
UFLA-01-457	5	4	4	3	3	3	2 ⁽¹⁾	$Y = 98,96 - 7,23x^{0,5}$	0,95**	10,9	45,8
UFLA-01-473	5	4	4	3	3	3	2 ⁽¹⁾	$Y = 98,96 - 7,23x^{0,5}$	0,95**	10,9	45,8
BR-4406	5	4	4	3	3	3	2 ⁽¹⁾	$Y = 98,96 - 7,23x^{0,5}$	0,95**	10,9	45,8
INPA-10a	4	4	4	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,61 - 0,00014x^{2,5}$	0,99**	21,3	29,9
INPA-75B	3	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,64 - 1,61e-05x^3$	0,99**	27,1	35,6
INPA-104A	3	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	$\ln Y = 4,64 - 1,61e-05x^3$	0,99**	27,1	35,6
INPA-183B	4	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	$Y = -25,12 + 122,27 \exp(-x/39,28)$	0,97**	7,8	19,1

Continua...

Tabela 6. Continuação

Subfamília/gênero	Cádmio (mg L ⁻¹)							Regressão	R ²	DT ₂₅	DT ₅₀
	0	5	10	20	30	40	60				
	Mimosoideae (continuação)										
INPA-72a	4	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	Y=-25,12+122,27exp(-x/39,28)	0,97**	7,8	19,1
BR-5611	4	2	2	2	1	1 ⁽¹⁾	0	Y=90,83-11,41x ^{0,5}	0,91**	1,9	12,8
BR-3617	5	2	2	1	1	1 ⁽¹⁾	0	Y ^{0,5} =9,65-1,0023x ^{0,5}	0,93**	0,9	6,6
BR-5610	4	3	1	1	1	1 ⁽¹⁾	0	Y ^{0,5} =10,02-0,93x ^{0,5}	0,86**	2,1	10,1
INPA-54B	4	3	1	1	1	1 ⁽¹⁾	0	Y ^{0,5} =10,02-0,93x ^{0,5}	0,86**	2,1	10,1
INPA-223a	2	1	1	1	1	1 ⁽¹⁾	0	Y=89,35-9,36x ^{0,5}	0,72**	2,3	17,7-
Sino(S)/Rhizobium(R)											
BR-4302(R)	4	4	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	Y ^{0,5} =10,17-0,17x	0,92**	8,8	17,9
BR-3452(R)	2	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	Y ⁻¹ =0,0099+9,36e-16e ^x	0,99**	28,9	30,0
BR-3614(R)	3	3	2	1	1 ⁽¹⁾	0	0	Y ^{0,5} =10,33-0,17x	0,95**	9,2	18,6
BR-4301(R)	3	3	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	Y ^{0,5} =9,92-0,024x ^{1,5}	0,94**	13,9	23,9
BR-3460(R)	2	2	2	2	1 ⁽¹⁾	0	0	Y ⁻¹ =0,0099+9,36e-16e ^x	0,99**	28,9	30,0
BR-817(S)	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	lnY=4,61-4,35e-05x ³	0,99**	18,9	25,3
BR-6806(S)	3	3	3	2	1 ⁽¹⁾	0	0	lnY=4,61-4,35e-05x ³	0,99**	18,9	25,3

⁽¹⁾Padrão de crescimento do rizóbio na concentração máxima tolerada (CMT) a cádmio.

alcalinização do meio por *Azorhizobium*. Já a maior tolerância de *Bradyrhizobium* que *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, pode ser atribuída à produção de EPS associada à sua capacidade de alcalinizar o meio.

Conclusões

1. A estirpe BR-4406 e os isolados de solo contaminado UFLA-01-457 e UFLA-01-473, pertencentes a *Bradyrhizobium*, e os isolados de hospedeiros de *Enterolobium* são os mais tolerantes a Zn, Cu e Cd.

2. Não há influência da subfamília e dos locais de origem na concentração máxima de metais tolerada (CMT) pelas estirpes estudadas; porém há influência nos padrões de crescimento nas CMTs.

3. A ordem de toxicidade dos metais para o rizóbio é Cu>Cd>Zn, e as concentrações máximas toleradas são de 60 mg L⁻¹, 60 mg L⁻¹ e 800 mg L⁻¹, respectivamente.

4. A ordem de tolerância aos metais pesados, considerando-se as concentrações máximas toleradas, é *Bradyrhizobium* > *Rhizobium* = *Mesorhizobium* = *Sinorhizobium* > *Azorhizobium*.

5. As doses tóxicas dos metais pesados para redução de crescimento em 25% (DT₂₅) e 50% (DT₅₀) são úteis para diferenciarem algumas estirpes/isolados de um mesmo gênero, que atingiram a mesma concentração máxima tolerada a Zn, Cu e Cd.

Referências

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: J. Wiley, 1977. 467 p.
- ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L. Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 8, p. 2101-2104, Sept. 1989.
- ANGLE, J. S.; McGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M.; CHANEY, R. L.; GILLER, K. E. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 575-580, May 1993.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 8, p. 99-145, 1980.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Nickel toxicity to estuarine marine fungi and amelioration by magnesium in sea water. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 193-202, 1983.
- BORGES, A.; WOLLUM, A. A field study of a soil-soybean plant-*Rhizobium* system amended with cadmium. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 9, n. 3, p. 420-423, 1980.
- BORGES, A.; WOLLUM, A. Effect of cadmium on symbiotic soybean plants. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 10, n. 2, p. 216-221, 1981.

- CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past application of sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 83-88, Feb. 1992.
- CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E.; ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L. Screening of isolates and strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for heavy metal resistance using buffered media. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 1643-1651, 1993a.
- CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E.; RIETZ, E.; SAUERBECK, D. R. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 301-309, Mar. 1993b.
- COLE, M. A.; ELKAN, G. H. Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 4, n. 2, p. 248-253, Sept. 1973.
- 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 and Soil**, Dordrecht, v. 79, n. 3, p. 317-327, 1984.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.
- DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal tolerant bacterial population from natural and metal-polluted soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 243-250, May/June 1983.
- FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. de. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1992. 11 p. (Comunicado Técnico, 9).
- KINKLE, B. K.; ANGLE, J. S.; KEYSER, H. H. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 315-319, Feb. 1987.
- MARTENSSON, A. M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 435-445, May 1992.
- MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isolados de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1991. 160 p. Tese de Doutorado.
- 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. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.
- RÓZYCKI, H. A. Rapid agar-diffusion test for quantifying the toxic effects of copper on microorganisms. **Acta Microbiologica Polonica**, Gagarina, v. 41, n. 1/2, p. 469-477, 1992.
- SILVA, G. G. da; FRANCO, A. A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais em meio de cultura tolerantes à acidez e à toxidez do Al. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, s/n, p. 169-173, jun. 1984.
- TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA J. O.; LIMA, A. S. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 25, p. 305-316, 2001.
- VINCENT, J. M. A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164 p. (Handbook, 15).