

Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo

Paulo Ademar Avelar Ferreira⁽¹⁾, Cleide Aparecida Bomfeti⁽²⁾, Romildo da Silva Júnior⁽¹⁾, Bruno Lima Soares⁽¹⁾, Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares⁽³⁾ e Fatima Maria de Souza Moreira⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3.037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: avelarufla@gmail.com, romildojr@gmail.com, brunolsoares@gmail.com, fmoreira@dcs.ufla.br ⁽²⁾Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia do Mucuri, Rua do Cruzeiro, nº 01, Jardim São Paulo, CEP 39803-371 Teófilo Otoni, MG. E-mail: clebomfeti@hotmail.com ⁽³⁾Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Trindade, CEP 88040-970 Florianópolis, SC. E-mail: crfsoares@gmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de estirpes de *Cupriavidus necator* a zinco, cádmio, cobre e chumbo, além de determinar a eficiência simbiótica das estirpes mais tolerantes em associação a espécies leguminosas com potencial para revegetação. A tolerância foi testada em meio LB, suplementado com 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15 mmol L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, CdSO₄.8H₂O, CuSO₄.5H₂O e PbCl₂, respectivamente, em comparação ao controle sem adição de metal. Determinou-se a eficiência simbiótica das quatro estirpes de *C. necator* mais tolerantes aos metais avaliados (UFLA02-71, UFLA02-73, UFLA01-659 e UFLA01-663), as quais foram inoculadas nas espécies: *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpinifolia*, *M. pudica*, *M. pigra* e *M. acutistipula*. Em vasos com solos, avaliaram-se *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpinifolia* e as estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71, selecionadas na avaliação de eficiência simbiótica. A estirpe UFLA02-71 proporcionou incrementos de matéria seca da parte aérea de 870% em *M. caesalpinifolia*, enquanto que UFLA01-659 proporcionou 885% em *M. pudica* e 924% em *L. leucocephala*. As estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71, além da alta tolerância a metais pesados, apresentaram eficiência em fixar nitrogênio, em simbiose com essas leguminosas, em solos com rizóbios nativos capazes de nodulá-las, e devem ser avaliadas quanto ao seu potencial de utilização em programas de recuperação de áreas degradadas.

Termos para indexação: áreas degradadas, β-proteobactéria, fixação biológica de nitrogênio, metais pesados, revegetação.

Symbiotic efficiency of *Cupriavidus necator* strains tolerant to zinc, cadmium, copper and lead

Abstract – The objective of this work was to evaluate the tolerance of *Cupriavidus necator* strains to zinc, cadmium, copper and lead, as well as to determine the symbiotic efficiency of the most tolerant ones in legume species suited for use in revegetation. Tolerance was evaluated in LB medium supplemented with 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 and 15 mmol L⁻¹ of ZnSO₄.7H₂O, CdSO₄.8H₂O, CuSO₄.5H₂O and PbCl₂, respectively, in comparison to a control without metal. The symbiotic efficiency of the four *C. necator* most metal-tolerant strains (UFLA02-71, UFLA02-73, UFLA01-659 and UFLA01-663) was determined, and these strains were inoculated in the species: *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpinifolia*, *M. pudica*, *M. pigra* and *M. acutistipula*. *Leucaena leucocephala*, *M. pudica* and *M. caesalpinifolia* and the strains UFLA02-71 and UFLA01-659, which presented the high symbiotic efficiency, were evaluated in pots with soil. UFLA02-71 provided increments of 870% in shoot dry matter of *M. caesalpinifolia*, and UFLA01-659 provided 885% in *M. pudica* and 924% in *L. leucocephala*. These strains should be assessed for potential use in programs to restore degraded areas, since they showed high efficiency in nitrogen fixation and were competitive with indigenous rhizobia populations, besides being highly tolerant to heavy metals.

Index terms: degraded areas, β-proteobacteria, biological nitrogen fixation, heavy metals, revegetation.

Introdução

A recuperação das áreas degradadas pela atividade de mineração deve ser realizada para acelerar a

sucessão natural. Com este propósito, a revegetação tem sido a principal prática para recompor e proteger o solo, evitar a poluição das águas e promover o retorno da biota edáfica. Para implantar a revegetação,

é necessário selecionar espécies vegetais tolerantes a metais pesados e capazes de produzir grande quantidade de matéria orgânica (Marques et al., 2000). Espécies de leguminosas Fabaceae Lindl. (syn. Leguminosae Adanson), como as dos gêneros *Acacia*, *Mimosa*, *Leucena* e *Enterolobium*, têm sido descritas como promissoras para a revegetação de solos degradados e a aceleração do processo de sucessão ecológica (Costa et al., 2004; Freire et al., 2010; Chaer et al., 2011).

A revegetação com leguminosas arbóreas, em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂), tem-se mostrado uma técnica viável para a recuperação desses solos. Tais associações favorecem o estabelecimento da cobertura vegetal, pois funcionam como catalisadoras de importantes funções ecológicas (Costa et al., 2004).

Diversos gêneros de bactérias são capazes de crescer em solos com altas concentrações de metais (Uzel & Ozdemir, 2009), das quais o gênero *Cupriavidus* tem recebido destaque quanto à capacidade de tolerar diferentes metais pesados. Um sistema de biossorção de metal, que consistiu na combinação simbiótica entre uma estirpe de *C. taiwanensis*, tolerante a chumbo, cádmio e cobre, e a planta hospedeira *Mimosa pudica* foi recentemente avaliado para a remoção de metais poluentes (Chen et al., 2008). As plantas de *M. pudica* aumentaram consideravelmente sua capacidade de absorção de Cu, Cd e Pb, quando em simbiose com a estirpe *C. taiwanensis* TJ208 (Chen et al., 2008).

Estirpes de *C. necator* são capazes de formar nódulos efetivos em leguminosas da subfamília Faboideae (syn. Papilionoideae) e Mimosoideae (Florentino et al., 2009; Silva, 2009), e também têm a capacidade de tolerar altas concentrações de metais pesados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de estirpes de *Cupriavidus necator* a zinco, cádmio, cobre e chumbo, além de determinar a eficiência simbiótica das estirpes mais tolerantes em associação a espécies leguminosas com potencial para revegetação de áreas contaminadas.

Material e Métodos

Para a determinação da tolerância a Zn, Cd, Cu e Pb, foram selecionadas 35 estirpes de *C. necator* capazes de formar nódulos efetivos em espécies da família Fabaceae, subfamílias Faboideae e Mimosoideae (Florentino et al., 2009; Silva, 2009).

Na avaliação in vitro da tolerância das estirpes a altas concentrações de metais pesados, cada estirpe cresceu em 30 mL de meio LB (5 g L⁻¹ NaCl, 5 g L⁻¹ extrato de levedura, 10 g L⁻¹ triptona) com pH 6,8, em agitação orbital de 100 rpm a 28°C. Após 24 horas de crescimento (1x10⁸ células mL⁻¹), uma alíquota de 20 µL de suspensões de células lavadas foi inoculada e estriada com alça de platina, em placas com meio LB suplementado com diferentes concentrações de cada metal, testadas individualmente conforme Trannin et al. (2001). As concentrações de ZnSO₄.7H₂O, CdSO₄.8H₂O, CuSO₄.5H₂O e PbCl₂, aplicadas ao meio de cultura, foram de 2,5, 5,0, 7,5, 10, 12,5 e 15 mmol L⁻¹, além de um tratamento controle sem a adição de metais. Após a adição dos metais, o pH dos meios foi ajustado para 6,0 com solução de KOH ou HCl 0,5 mol L⁻¹. Para avaliar a suscetibilidade dos isolados aos metais, determinou-se a concentração mínima inibitória (MIC), definida como a menor concentração em que não ocorreu a formação de unidades formadoras de colônias (UFC) visíveis, após três dias de incubação a 28°C, a partir de três repetições.

Foram realizados dois experimentos para avaliar a eficiência simbiótica das estirpes de *C. necator* em associação às leguminosas. O primeiro foi feito em vasos de Leonard com areia e vermiculita estéril, e o segundo em vasos com solo não estéril. O primeiro experimento foi conduzido de junho a setembro de 2009, em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 7x6, com três repetições. Os tratamentos constituíram-se de sete espécies de leguminosas – *Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit, *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Acacia mangium* (Wild.), *Mimosa caesalpinifolia*, *M. pudica* L., *M. pigra* L. e *M. acutistipula* (Marth.) Benth. – e quatro estirpes de *C. necator* tolerantes às mais altas concentrações de Zn, Cd, Cu e Pb, testadas anteriormente in vitro – UFLA02-71, UFLA02-73, UFLA01-659 e UFLA01-663–, além de dois controles não inoculados, um com N mineral a 210 mg de N L⁻¹ de solução, e outro com baixa concentração de N mineral, a 21 mg de N L⁻¹ de solução.

As plantas foram cultivadas em vasos de Leonard, em que a parte superior do vaso continha uma mistura 1:2 de areia (150 cm³) e vermiculita (300 cm³), e a inferior com solução nutritiva de Hoagland & Arnon

(1950) diluída quatro vezes. Após o preparo, os vasos e a solução nutritiva foram autoclavados por uma hora, a 121°C. As sementes foram submetidas a tratamento químico para quebra de dormência, conforme recomendações de Vieira & Fernandes (1997), lavadas com água destilada esterilizada e semeadas, no total de quatro sementes por vaso. Posteriormente, foi realizada a inoculação das estirpes de *C. necator* cultivadas em meio LB líquido por dois dias, em agitação constante a 28°C. Cada semente recebeu 1 mL de inóculo (1×10^9 células). A solução nutritiva dos vasos foi repostada de 15 em 15 dias com solução autoclavada, e seu volume foi completado durante esse período com água destilada esterilizada. Dez dias após a germinação, realizou-se o desbaste, tendo-se deixado somente duas plantas por vaso.

O segundo experimento foi realizado para a avaliação da capacidade competitiva das estirpes selecionadas com os rizóbios nativos do solo por sítios de infecção, de outubro a dezembro de 2010. Utilizaram-se vasos de plástico, com capacidade de 2 dm³, com solo arenoso (Neossolo Quartzarênico) com baixo teor de matéria orgânica, coletado em Itutinga, MG, de uma área com plantio de braquiária. O solo coletado na camada arável (0 a 20 cm), seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado na peneira de 4 mm de malha, possuía as seguintes características químicas: pH_{H₂O}, 5,5; P, 1,0 mg dm⁻³ (Mehlich I); K, 44 mg dm⁻³; Ca, 0,2 cmol_c dm⁻³; Mg, 0,1 cmol_c dm⁻³; Al, 0,3 cmol_c dm⁻³; H+Al, 2,1 cmol_c dm⁻³; SB, 0,4 cmol_c dm⁻³; T, 2,5 cmol_c dm⁻³; V, 16,6%; e MO, 1,6 dag kg⁻¹. Para a correção deste solo, foi realizada a calagem, de modo a elevar a saturação por bases para 40%. Em todas as parcelas, foi efetuada uma adubação básica com solução nutritiva com 200, 100, 40, 0,8, 1,5, 3,6, 5,0 e 0,15 mg dm⁻³ de K, P, S, B, Cu, Mn, Zn e Mo, respectivamente, e a adubação potássica foi parcelada em duas vezes.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x4, com três repetições. Os tratamentos constituíram-se de três espécies de leguminosas (*L. leucocephala*, *M. caesalpinifolia*, *M. pudica*) e duas estirpes de *C. necator* (UFLA01-659 e UFLA02-71) selecionadas do experimento em vaso Leonard, além de dois controles sem inoculação, um sem nitrogênio e outro com nitrogênio mineral, com duas adubações de 100 mg dm⁻³ de N aplicado aos vasos na forma de

solução, a primeira no plantio e a segunda 30 dias após a emergência das plantas.

As sementes foram submetidas a tratamento químico para quebra de dormência, conforme descrito anteriormente e, em seguida, foram lavadas com água destilada esterilizada e semeadas no total de quatro sementes por vaso. Imediatamente após a semeadura, 1 mL de inóculo (1×10^9 células) foi adicionado a cada semente. Após dez dias de germinação, foi realizado o desbaste, tendo-se deixado somente duas plantas por vaso.

Um terceiro experimento foi conduzido para determinação do número mais provável (NMP) de células da comunidade nativa de rizóbios. Esse experimento foi conduzido de outubro a dezembro de 2010, em tubetes de 375 mL com mistura de vermiculita e areia à proporção de 2:1. Utilizaram-se três amostras do solo de Itutinga, MG (também utilizado no segundo experimento em vaso com solo), submetidas a posteriores diluições seriadas decimais. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x9, com três repetições. Os tratamentos constituíram-se de três espécies de leguminosas (*L. leucocephala*, *M. caesalpinifolia* e *M. pudica*), sete diluições decimais seriadas em solução salina (8,5 g L⁻¹ de NaCl) de 10⁻¹ a 10⁻⁷, e dois controles sem inoculação. Os controles consistiram de um tratamento com nitrogênio mineral com 210 mg de N L⁻¹ e outro com baixa concentração de nitrogênio a 21 mg de N L⁻¹, em soluções diluídas quatro vezes. Os tratamentos com inoculação receberam 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas obtidas. A solução nutritiva foi aplicada a cada sete dias depois de autoclavada.

As plantas do experimento em vaso Leonard foram colhidas depois de 90 dias, e os experimentos em vaso com solo e tubetes foram colhidos 60 dias após a semeadura. Nos experimentos em vasos de Leonard e vasos com solo, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos (NN); massa de matéria seca de nódulos (MSN); massa de matéria seca da parte aérea (MSPA); e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). O N acumulado na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação da massa de matéria seca da parte aérea pelo teor de N. No experimento em tubetes, avaliou-se a presença ou ausência de nódulos nas raízes, para estimar o número mais provável (NMP) de células de rizóbio, tendo-se designado sinal positivo,

para presença, e negativo, para ausência de nódulos, em cada diluição, com o uso do programa "most probable number estimate" (MPNES) (Woomer et al., 1990).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, pelo Sisvar, versão 4.0 (Ferreira, 2008). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis número de nódulos (NN) e massa de matéria seca de nódulos (MSN) foram previamente transformados pela fórmula $(x+0,5)^{0,5}$ (Soares et al., 2006).

Resultados e Discussão

No ensaio para determinar a tolerância a Zn, Cd, Cu e Pb, 91% das estirpes cresceram em até 2,5 mmol L⁻¹ de todos os metais; apenas cinco estirpes foram capazes de crescer à concentração de 10 mmol L⁻¹ de Zn e Cu, e uma estirpe até a concentração de 7,5 mmol L⁻¹ de Pb. Nenhum dos isolados cresceu em concentrações superiores a 2,5 mmol L⁻¹ de Cd. Portanto, a toxidez dos metais para as estirpes foi decrescente nesta ordem: Cd, Pb, Cu, Zn (Figura 1).

Em um estudo sobre a tolerância a metais pesados de estirpes de *C. taiwanensis*, isoladas de nódulos de *Mimosa* sp. de ambientes não contaminados, observou-se que o Pb foi o metal mais tolerado pelas estirpes dessa espécie, seguido de Zn, Cu e Cd (Chen et al., 2008), que é uma ordem de toxidez diferente da relatada no presente trabalho. Em outro trabalho (Vullo et al., 2008), uma estirpe de *C. taiwanensis* isolada de ambiente contaminado com metais pesados, em Buenos Aires, apresentou toxidez decrescente de Cu, Cd, Zn. Estirpes de rizóbio de diferentes gêneros (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), isoladas de solos tropicais, apresentam maior resistência ao Zn, Cd e Cu nesta ordem (Trannin et al., 2001; Matsuda et al., 2002). Diferenças na resistência a metais pesados podem estar ligadas à procedência dos isolados, mesmo quando pertencentes ao mesmo gênero ou, até, à mesma espécie. No presente trabalho, as estirpes não eram provenientes de áreas contaminadas, e a tolerância observada é inerente à espécie.

Apesar de todas as estirpes serem tolerantes a um ou mais metais nas concentrações avaliadas, as estirpes UFLA01-663, UFLA01-659, UFLA02-73 e UFLA01-71 destacaram-se das demais quanto à

tolerância a Zn, Cu, Cd e Pb, com concentrações de 10, 10, 2,5 e 5 mmol L⁻¹, respectivamente.

No experimento em vaso de Leonard, as estirpes UFLA01-663, UFLA01-659, UFLA02-73 e UFLA02-71 exerceram efeitos significativos e diferenciados na produção de matéria seca da parte aérea das espécies vegetais, aos 90 dias após o plantio (Figura 2). Nas espécies *L. leucocephala* e *M. pudica*, a estirpe UFLA01-659 teve efeito na produção de matéria seca da parte aérea, com incrementos relativos de 924 e 885%, em comparação ao tratamento sem nitrogênio, respectivamente. A espécie *M. acutistipula* respondeu positivamente à inoculação com a estirpe UFLA02-73, e a produção de matéria seca da parte aérea foi similar àquela do tratamento que recebeu nitrogênio mineral. As espécies *M. caesalpinifolia* e *M. pigra* beneficiaram-se da inoculação com a estirpe UFLA02-71, tendo apresentado produção de matéria seca de 2,23 e 4,17 g por vaso, enquanto no tratamento sem inoculação a produção foi de apenas 0,23 e 1,21 g por vaso. *Enterolobium contortisiliquum* apresentou resposta similar com as quatro estirpes avaliadas: produção de matéria seca significativamente menor do que o tratamento com adição de nitrogênio mineral, e maior do que o tratamento sem nitrogênio. Na espécie *A. mangium*, verificou-se efeito positivo da estirpe UFLA01-663, em comparação ao tratamento sem nitrogênio. O efeito dos tratamentos inoculação das estirpes, foi estatisticamente inferior ao do tratamento nitrogenado, para a maioria das espécies, exceto *M. acutistipula*.

A inoculação com *C. necator* proporcionou benefícios para as leguminosas avaliadas, principalmente quando foram usadas as estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71 nas leguminosas *M. pudica*, *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia*, o que indica eficiência dessas estirpes em fixar nitrogênio atmosférico. *Enterolobium contortisiliquum*, *A. mangium*, *M. pigra*, e *M. acutistipula* apresentaram menor incremento de matéria seca da parte aérea, em comparação às espécies *M. pudica*, *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia*.

Elliott et al. (2007) observaram que plantas de *M. pudica* que receberam inoculação das estirpes LMG19424 de *C. taiwanensis* e STM815 de *Burkholderia phymatum*, em solução nutritiva, apresentaram incremento de 530 e 461%, respectivamente, na produção de matéria seca após três

semanas de cultivo, em comparação ao tratamento sem nitrogênio.

Em relação ao teor de nitrogênio (TN) na parte aérea, em todos os tratamentos testados, os valores variaram de 14 a 34 g kg⁻¹ em *E. contortisiliquum*, 10 a 25 g kg⁻¹ em *M. pigra*, e de 12 a 27 g kg⁻¹ em *M. acutistipula*, enquanto nas espécies selecionadas, *L. leucocephala*, *M. caesalpiniiifolia* e *M. pudica*, os valores variaram de 10 a 34 g kg⁻¹, 11 a 36,5 g kg⁻¹ e de 10 a 30 g kg⁻¹, respectivamente. A estirpe UFLA01-659 aumentou em 20 g kg⁻¹ os teores de N em *M. pudica*, e 24 g kg⁻¹ em *L. leucocephala*, e a estirpe UFLA02-71 proporcionou aumentos nos teores em *M. caesalpiniiifolia* de 26,5 g kg⁻¹, em comparação à testemunha sem nitrogênio mineral.

O acúmulo de N na parte aérea das sete espécies de leguminosas também foi influenciado pela inoculação das estirpes testadas (Figura 3). Para *M. caesalpiniiifolia* e *M. pigra*, a estirpe UFLA02-71 proporcionou maior acúmulo de N na parte aérea em comparação às demais. O acúmulo de N em *E. contortisiliquum*, *M. pudica* e *L. leucocephala* foi maior quando estas espécies receberam inoculação da estirpe UFLA01-659, o que está relacionado à maior produção de matéria seca da parte aérea favorecida por essa estirpe (Figura 2). *Mimosa acutistipula* e *A. mangium* apresentaram os menores acúmulos de N, independentemente do tratamento. Em *A. mangium*, não houve diferença significativa quanto ao acúmulo de N proporcionado pela inoculação com nenhuma das

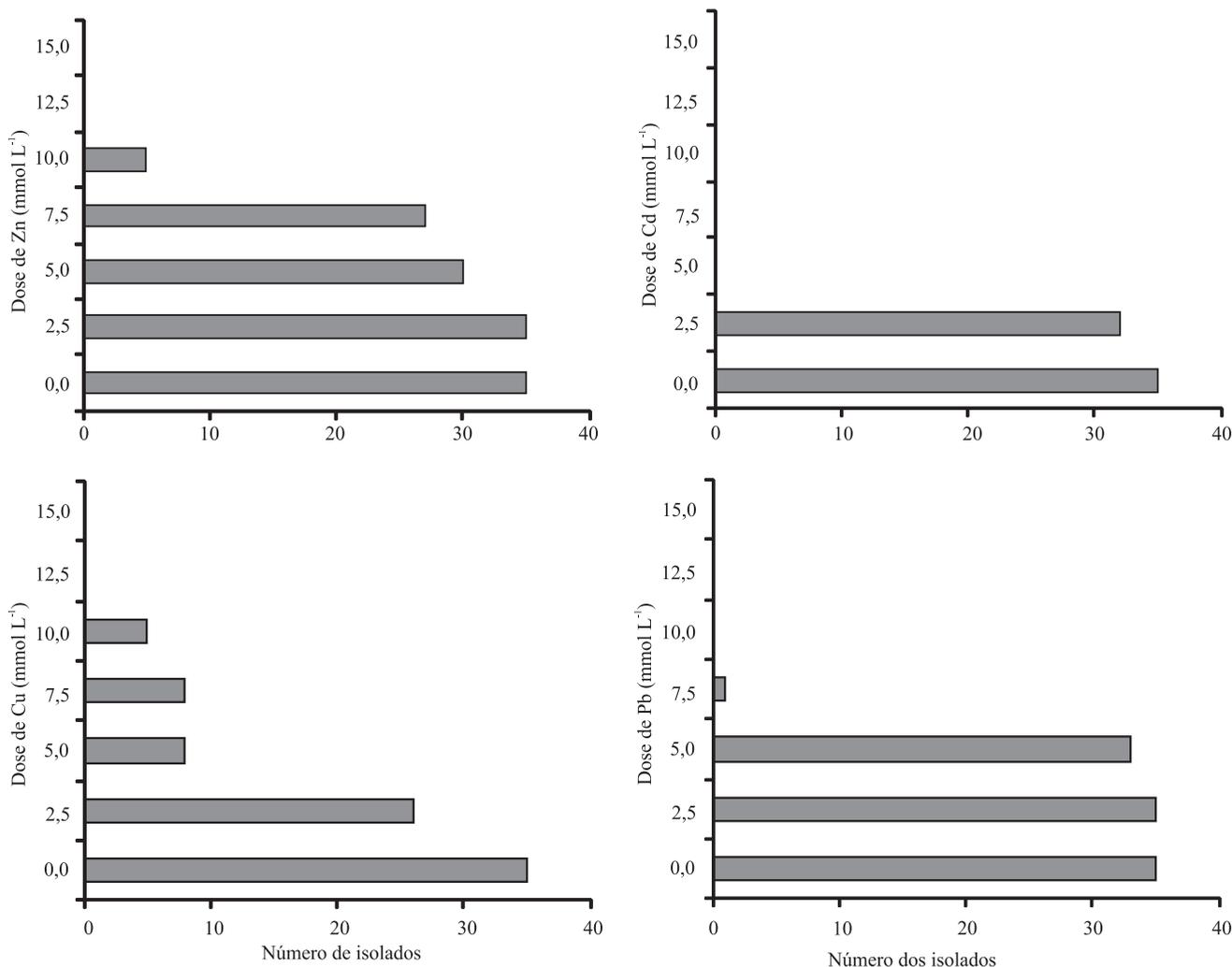


Figura 1. Número de isolados que apresentaram crescimento em meio LB sólido, acrescido de ZnSO₄.7H₂O, CdSO₄.8H₂O, CuSO₄.5H₂O e PbCl₂, a diferentes concentrações, após três dias de incubação.

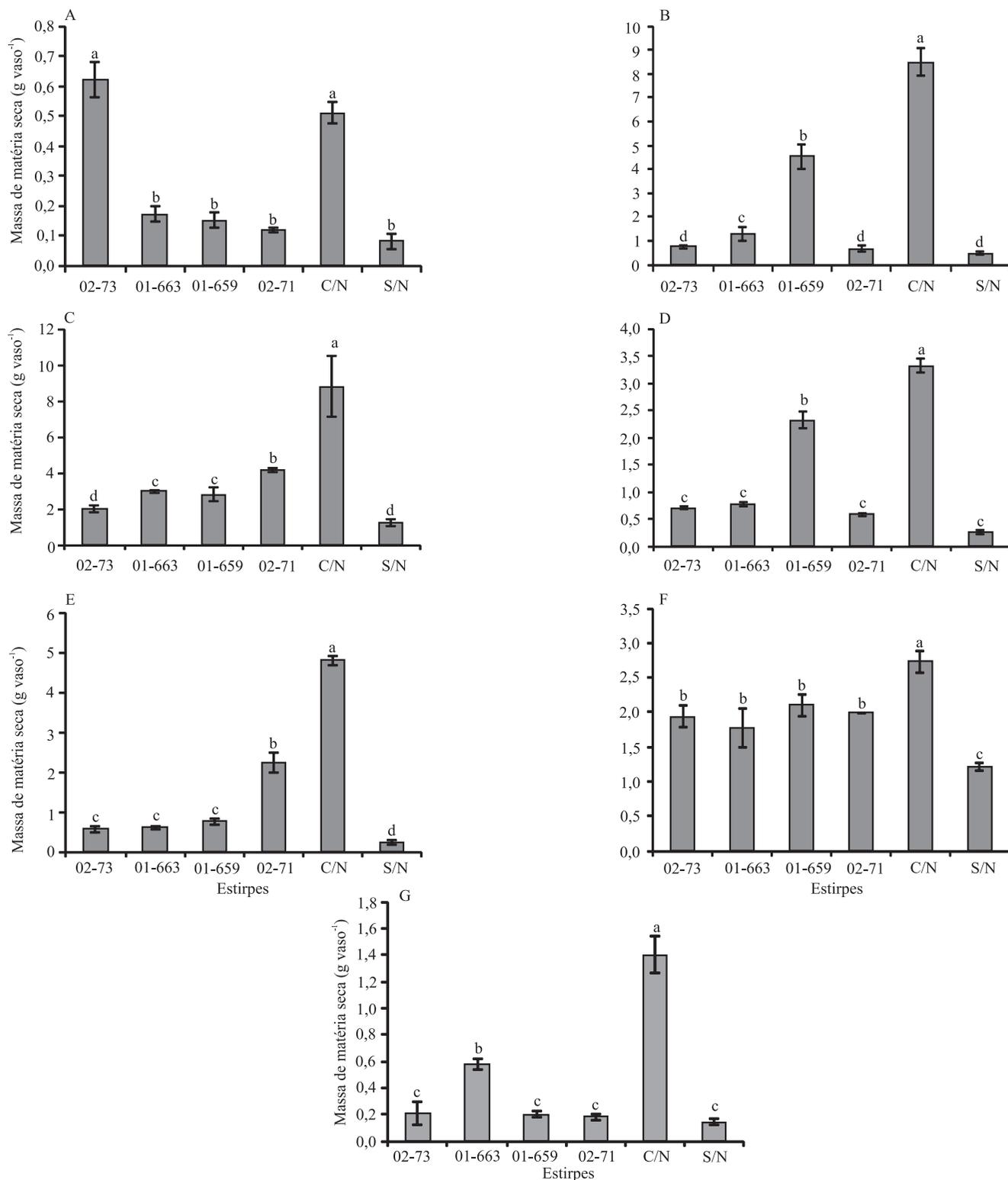


Figura 2. Massa de matéria seca da parte aérea de *Mimosa acutistipula* (A), *M. pudica* (B), *M. pigra* (C), *Leucaena leucocephala* (D), *M. caesalpiniiifolia* (E), *Enterolobium contortisiliquum* (F) e *Acacia mangium* (G), com inoculação de estirpes (UFLA02-73, UFLA01-663, UFLA01-659 e UFLA02-71) de *Cupriavidus necator* e com dois controles – C/N, com adição de nitrogênio mineral; e S/N, sem adição de nitrogênio mineral –, 90 dias após a semeadura em vaso de Leonard. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

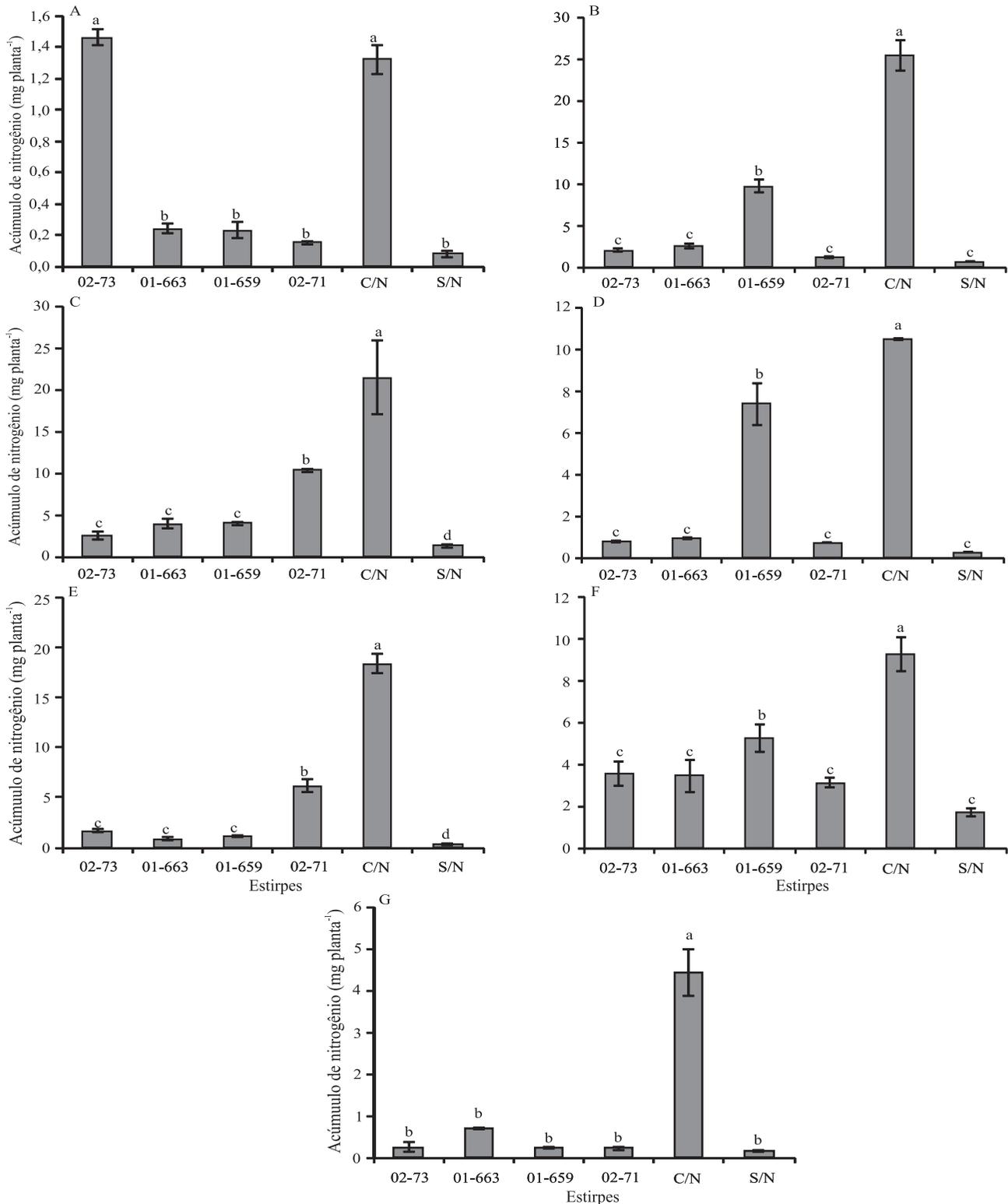


Figura 3. Acúmulo de nitrogênio na parte aérea de *Mimosa acutistipula* (A), *M. pudica* (B), *M. pigra* (C), *Leucaena leucocephala* (D), *M. caesalpiniiifolia* (E), *Enterolobium contortisiliquum* (F) e *Acacia mangium* (G), com a inoculação de estirpes (UFLA02-73, UFLA01-663, UFLA01-659 e UFLA02-71) de *Cupriavidus necator* e com dois controles – C/N, com adição de nitrogênio mineral; e S/N, sem adição de nitrogênio mineral –, 90 dias após a semeadura em vaso de Leonard. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

estirpes avaliadas. A estirpe UFLA01-659, inoculada em *E. contortisiliquum*, proporcionou aumento significativo no acúmulo de N superior ao das demais estirpes e ao da testemunha sem nitrogênio. O acúmulo de N com o uso das estirpes, em comparação com o tratamento nitrogenado, foi estatisticamente inferior para a maioria das espécies, exceto *M. acutistipula*.

Alguns autores utilizaram o teste de redução de acetileno para avaliar a fixação de nitrogênio por rizóbios nas espécies *M. pudica* (Chen et al., 2005; Barrett & Parker, 2006; Elliott et al., 2007), *M. pigra* (Barrett & Parker, 2006; Elliott et al., 2007) e *M. acutistipula* e *M. caesalpinifolia* (Elliott et al., 2007). No entanto, o acúmulo de N na parte aérea é um método mais preciso, uma vez que avalia a fixação de N₂ durante todo o período de desenvolvimento da planta, enquanto a atividade de redução de acetileno avalia a atividade da enzima no momento da avaliação e em relação a outro substrato.

Em relação ao número de nódulos, os tratamentos com e sem N, em vasos de Leonard, não apresentaram nódulos no sistema radicular. As espécies *A. mangium* e *E. contortisiliquum* não nodularam com nenhuma estirpe analisada. Apesar de estas duas espécies não terem nodulado com as estirpes avaliadas de *C. necator*, todas as estirpes, com *E. contortisiliquum*, e a UFLA01-663, com *A. mangium*, foram capazes de

induzir o crescimento das plantas, em comparação ao controle sem adição nitrogênio mineral. Uma provável explicação seria a possibilidade de essas estirpes atuarem como promotoras de crescimento dessas espécies leguminosas, uma vez que o gênero *Cupriavidus* foi segregado do antigo gênero *Burkholderia* (Sprent, 2008), e alguns autores já demonstraram a eficiência de *Burkholderia* como promotoras do crescimento em leguminosas (Garau et al., 2009; Linu et al., 2009).

Na espécie *M. pigra*, não houve diferença significativa entre as estirpes, quanto ao número de nódulos (Figura 4). A espécie *M. caesalpinifolia*, com a estirpe UFLA02-71, e *M. acutistipula* e *M. pudica*, com a UFLA01-659, formaram maior número de nódulos em comparação aos demais tratamentos. A espécie *L. leucocephala* desenvolveu maior número de nódulos com as estirpes UFLA02-73 e UFLA01-663.

A quantificação do número de nódulos para diferentes leguminosas varia muito nos trabalhos encontrados, até mesmo quando se avalia uma mesma estirpe. Isto ocorre principalmente em razão do método utilizado para o cultivo das plantas e das condições ambientais nas quais os experimentos são conduzidos, bem como em razão do tempo experimental empregado. Um exemplo é a estirpe de *C. taiwanensis* LMG19424 que, quando inoculada em *M. pudica* e *M. pigra*, proporciona uma

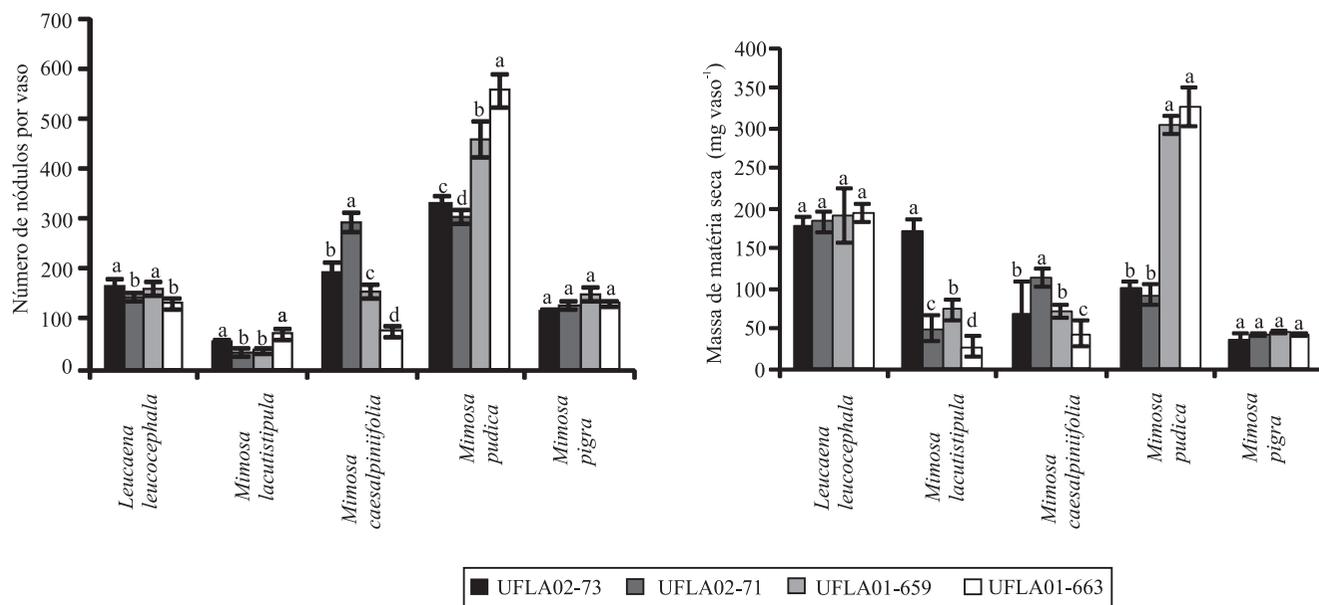


Figura 4. Número e massa de matéria seca de nódulos de leguminosas com a inoculação de estirpes de *Cupriavidus necator*, 90 dias após a semeadura em vaso de Leonard. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

variação no número de nódulos por planta de 12 a 235 e de 5 a 40, respectivamente (Chen et al., 2005; Elliott et al., 2007).

Mimosa caesalpinifolia, *M. acutistipula* e *M. pudica*, com inoculação das estirpes UFLA02-71, UFLA02-73 e UFLA01-659, respectivamente, apresentaram maior produção de matéria seca de nódulos. (Figura 4) As leguminosas *L. leucocephala* e *M. pigra* não apresentaram diferença significativa na produção de matéria seca com as quatro estirpes avaliadas (Figura 4).

Nem sempre as estirpes que induziram a formação de maior número de nódulos contribuíram para maior produção de matéria seca destes. No entanto, a maior produção de matéria seca de nódulos proporcionou o aumento na produção de matéria seca da parte aérea. Para as cinco espécies de plantas que nodularam com *C. necator*, a massa de matéria seca de nódulos correlacionou-se positivamente com a massa de matéria seca da parte aérea ($r = 0,72$; $p \leq 0,05$), e o número de nódulos negativamente ($r = -0,32$; $p \leq 0,05$). Assim, a massa de matéria seca de nódulos, no presente trabalho, foi o melhor parâmetro para a seleção de estirpes quanto ao número de nódulos. Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e a quantidade de N fixado biologicamente já haviam sido relatadas por Döbereiner et al. (1966).

Em razão de *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpinifolia*, com a inoculação das estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71, terem apresentado os maiores incrementos de matéria seca da parte aérea, no experimento em vaso de Leonard, elas foram selecionadas para o experimento em vaso com solo. No experimento em vaso com solo, *L. leucocephala* e *M. pudica*, com inoculação da estirpe UFLA01-659, apresentaram incrementos na matéria seca da parte aérea de 121 e 277%, respectivamente (Tabela 1). Em *M. caesalpinifolia* com inoculação da estirpe UFLA02-71, o aumento na produção de matéria seca foi de 245% em comparação à testemunha sem nitrogênio mineral. O tratamento nitrogenado proporcionou maior produção de matéria seca nas três espécies estudadas. O incremento na matéria seca da parte aérea de *M. pudica* com a inoculação, no presente trabalho (277%), é superior aos encontrados por outros autores, que avaliaram a simbiose da espécie com *Burkholderia* sp. (100%), *Cupriavidus* sp. (164%) e *Rhizobium* (9%), após 41 dias de cultivo em vaso com

solo (Barrett & Parker, 2006). *Mimosa caesalpinifolia*, cultivada em vasos com Latossolo Vermelho-Amarelo com a estirpe Semia 6167 (*Burkholderia*), apresentou aumento de matéria seca de parte aérea de 20%, em comparação ao tratamento sem inoculação (Burity et al., 2000).

Assim como observado para a produção de matéria seca, os maiores valores de acúmulo de N, nas espécies *L. leucocephala* e *M. pudica*, foram obtidos com a inoculação da estirpe UFLA01-659. A estirpe UFLA02-71, inoculada em *M. caesalpinifolia*, proporcionou maior incremento no acúmulo de N na parte aérea, em comparação à estirpe UFLA01-659 e à testemunha sem nitrogênio (Tabela 1).

Quanto ao número e à massa de matéria seca de nódulos, os tratamentos com e sem nitrogênio mineral apresentaram baixos valores, em comparação aos tratamentos com inoculação (Tabela 1). Para *M. caesalpinifolia*, a inoculação com as estirpes UFLA02-71 e UFLA01-659 não influenciou o número e a produção de massa de nódulos. Nas espécies *L. leucocephala* e *M. pudica*, a inoculação com a estirpe UFLA01-659 foi a que proporcionou maior número e produção de matéria seca de nódulos, em comparação aos demais tratamentos.

Tabela 1. Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) das três espécies vegetais, submetidas a diferentes tratamentos, 60 dias após a semeadura em um Neossolo Quartzarênico⁽¹⁾.

Tratamentos	NN	MSN (mg vaso ⁻¹)	MSPA (g vaso ⁻¹)	ANPA (mg planta ⁻¹)
<i>Leucaena leucocephala</i>				
UFLA01-659	81,00a	86,67a	1,15b	3,64b
UFLA02-71	50,33b	60,00b	0,83c	1,02c
Sem N	15,00c	26,67c	0,52d	0,53c
Com N	4,33d	12,00d	1,65a	5,23a
<i>Mimosa pudica</i>				
UFLA01-659	89,00a	100,00a	0,83b	2,48b
UFLA02-71	45,33b	63,33b	0,45c	0,49c
Sem N	15,33c	20,00c	0,22d	0,30c
Com N	6,00d	11,00c	1,10a	3,30a
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>				
UFLA01-659	53,33a	73,33a	0,49c	0,58c
UFLA02-71	65,00a	76,67a	1,38b	4,28b
Sem N	9,00b	13,33b	0,40c	0,40c
Com N	3,33b	10,00b	1,94a	6,91a

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na avaliação do NMP de células da comunidade nativa de rizóbio, somente as plantas com suspensão de solo até à diluição 10^{-3} apresentaram nódulos em seu sistema radicular. As inoculações de suspensão de solo até a diluição de 10^{-3} promoveram aumento na produção de matéria seca da parte aérea das três espécies estudadas, em comparação às testemunhas que não receberam nitrogênio. A população de rizóbios, calculada pelo método das diluições sucessivas, variou de: $9,1 \times 10^1$ a $1,90 \times 10^3$ rizóbios g^{-1} de solo com *L. leucocephala*; $1,96 \times 10^2$ a $4,3 \times 10^3$ rizóbios g^{-1} com *M. pudica*; e $1,58 \times 10^2$ a $3,5 \times 10^3$ rizóbios g^{-1} com *M. caesalpinifolia*; estas populações podem ser consideradas altas. As populações nativas apresentaram um grande número de células e foram eficientes em fixar N atmosférico e em aumentar a produção de matéria seca da parte aérea, nas três espécies.

A habilidade de interação simbiótica com leguminosas, no processo de fixação biológica de N era, até 2001, descrita como pertencente apenas aos gêneros bacterianos da classe das α -proteobactérias. No entanto, com a descrição de duas estirpes nodulíferas do gênero *Burkholderia*, pertencentes à classe β -proteobactéria, os rizóbios passaram a ser incluídos em duas linhagens filogenéticas distintas (Moulin et al., 2001). Outra espécie, *Cupriavidus taiwanensis*, também pertencente ao grupo das β -proteobactérias, foi descrita como simbiote dominante de *M. pudica* e *M. diplotricha* em Taiwan (Chen et al., 2003), o que mostra a necessidade de mais estudos para a caracterização da diversidade de rizóbios em diferentes populações de leguminosas hospedeiras.

Conclusões

1. As estirpes UFLA01-663, UFLA01-659, UFLA02-73 e UFLA01-71 apresentam alta tolerância a Zn, Cu, Pb e Cd, em meio de cultivo sólido.

2. A estirpe UFLA01-659 proporciona aumentos na produção de matéria seca da parte aérea em *Mimosa pudica* e *Leucaena leucocephala*, e a estirpe UFLA01-71 nas espécies *M. caesalpinifolia* e *M. pigra*, em vaso de Leonard.

3. A estirpe UFLA02-71 é eficiente na fixação de nitrogênio em *M. caesalpinifolia*, e a estirpe UFLA01-659 em *M. pudica* e *L. leucocephala*, em vaso com solo.

4. As estirpes UFLA02-71 e UFLA01-659 são altamente competitivas com os rizóbios nativos do solo e favorecem o crescimento de *M. caesalpinifolia*, *M. pudica* e *L. leucocephala*.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento do projeto e concessão de bolsas; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por concessão de bolsas.

Referências

- BARRETT, C.F.; PARKER, M.A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1198-1206, 2006.
- BURITY, H.A.; LYRA, M. do C.C.P. de; SOUZA, E.S. de; MARGULHÃO, A.C. do E.S.; SILVA, M.L.R.B. da. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.801-807, 2000.
- CHAER, G.M.; RESENDE, A.S.; CAMPELLO, E.F.C.; FARIA, S.M. de; BODDEY, R.M.; SCHIMIDT, S. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v.31, p.139-149, 2011.
- CHEN, W.M.; FARIA, S.M. de; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMOES-ARAUJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7461-7471, 2005.
- CHEN, W.-M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.7266-7272, 2003.
- CHEN, W.-M.; WU, C.H.; JAMES E.K.; CHANG, J.S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, v.151, p.364-371, 2008.
- COSTA, G.S.; FRANCO, A.A.; DAMASCENO, R.N.; FARIA, S.M. de. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.919-927, 2004.
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. de; PENTEADO, A. de F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso de nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, p.233-237, 1966.

- ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.-M.; CHOU, J.-H.; WANG, H.C.; SHEU, S.Y.; PERIN, L. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v.173, p.168-180, 2007.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.
- FLORENTINO, L.A.; GUIMARÃES, A.P.; RUFINI, M.; SILVA, K. da; MOREIRA, F.M. de S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, v.66, p.667-676, 2009.
- FREIRE, A.L.O.; RODRIGUES, T.J.D.; MIRANDA, J.R.P. Fixação biológica do nitrogênio e crescimento de plantas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.) sob salinidade. **Revista Caatinga**, v.23, p.90-96, 2010.
- GARAU, G.; YATES, R.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.125-134, 2009.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p.
- LINU, M.S.; STEPHEN, J.; JISHA, M.S. Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. and their potential interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **International Journal of Agricultural Research**, v.4, p.79-87, 2009.
- MARQUES, T.C.L.L. de S. e M.; MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.121-132, 2000.
- MATSUDA, A.; MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.343-355, 2002.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, p.948-950, 2001.
- SILVA, K. da. **Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from Brazilian soils**. 2009. 124p. Thesis (Doctor) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SOARES, A.L. de L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; VALE, H.M.M. do; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. de; MOREIRA, F.M. de S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – Feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.803-811, 2006.
- SPRENT, J.I. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.1081-1084, 2008.
- TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.305-316, 2001.
- UZEL, A.; OZDEMIR, G. Metal biosorption capacity of the organic solvent tolerant *Pseudomonas fluorescens* TEM08. **Bioresource Technology**, v.100, p.542-548, 2009.
- VIEIRA, I.G.; FERNADES, G.D. **Métodos de quebra de dormência de sementes**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1997. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/dormencia.asp>>. Acesso em: 4 jul. 2010.
- VULLO, D.L.; CERETTI, H.M.; DANIEL, M.A.; RAMÍREZ, S.A.M.; ZALTS, A. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. **Bioresource Technology**, v.99, p.5574-5581, 2008.
- WOOMER, P.; BENNET, J.; YOST, R. Overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures. **Agronomy Journal**, v.82, p.349-353, 1990.

Recebido em 15 de setembro de 2011 e aprovado em 16 de dezembro de 2011