

## Efeito da Aplicação de Lamas Residuais Urbanas na Diversidade da População Rizobiana do Solo<sup>1</sup>

Paula Gonçalves\* e Isabel Videira e Castro\*\*

\* Aluna Estagiária

\*\* Investigador Auxiliar

Estação Florestal Nacional. Departamento de Ecologia, Recursos Naturais e Ambiente.  
Quinta do Marquês, Nova Oeiras, 2784-505 OEIRAS

---

**Sumário:** A aplicação de lamas residuais urbanas na agricultura é uma prática que é utilizada mundialmente, com efeitos benéficos ao nível da produtividade das culturas, da matéria orgânica do solo, da sua capacidade de troca catiónica e de retenção da água. Porém, as lamas residuais podem ser portadoras de altas quantidades de metais pesados e de outros poluentes, que podem causar sérios problemas ambientais afectando quer as plantas (ao reduzir o peso das raízes, o número de folhas e a parte aérea) quer os microrganismos do solo, designadamente as bactérias *Rhizobium* (fixadoras de azoto). Com a finalidade de se avaliar as potencialidades de uma lama residual da área urbana de Lisboa, como fertilizante de uma pastagem mista de trevo subterrâneo e de azevém, foi instalado um ensaio de campo nos terrenos da Quinta do Marquês (Oeiras). No presente trabalho pretendeu-se examinar as possíveis alterações na diversidade genética da população natural de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, existente nestes solos aos quais se adicionaram diferentes quantidades de lamas residuais (5, 10, 20 e 50 t ha<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos permitiram-nos verificar que ocorreu uma mudança na composição genética, a nível de DNA-plasmídico nos isolamentos de *Rhizobium* testados, principalmente nos tratamentos onde foram adicionadas as quantidades mais elevadas de lamas (20 e 50 t ha<sup>-1</sup>).

**Palavras-chave:** lamas residuais; *Rhizobium*; diversidade genética; perfis de plasmídeos

### Effects of Sewage Sludge Application in the Diversity of Rhizobial Population

**Abstract:** The use of sewage sludge in agriculture is being practised throughout the world with beneficial effects on the productivity of cultures, on the organic content of soils, and on their capacity of cation exchange and water retention. However, sewage sludge can contain high concentrations of heavy metals and other contaminants that may cause serious environmental problems, affecting both plants and soil microorganisms, especially *Rhizobium* bacteria (nitrogen fixers). To evaluate the potentialities of an urban sewage sludge from Lisbon as a fertiliser for underground clover and grass pastures, a field experiment was carried out in the

---

<sup>1</sup>O presente trabalho resume os aspectos essenciais do estágio profissional, com o mesmo título, apresentado à Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa, do Bacharelato em Biotecnologia.

<sup>2</sup> Autor E-mail: isabelvcastro@net.sapo.pt

grounds of Quinta do Marquês (Oeiras). The aim of this work was to monitor changes in the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* population in soils amended with different quantities of sewage sludge (5, 10, 20 and 50 t ha<sup>-1</sup>). The results of this study permitted us to verify that changes took place at the plasmid-DNA level in the genetic composition of the *Rhizobium* isolates tested, primarily where treatments had been amended with high quantities of sewage sludge (20 and 50 t ha<sup>-1</sup>).

**Key-words:** sewage sludge; *Rhizobium*; genetic diversity; plasmid profile

#### **Effets de la Application de Boues d'Épuration Dans la Diversité de la Population Rizobienne du Sol**

**Résumé:** L'application de boues d'épuration urbaines dans l'agriculture est un procédé utilisé mondialement. Ce procédé apporte des bénéfices au niveau de la productivité, des matières organiques, de la capacité d'échange cationique et de la rétention d'eau. Toutefois, les boues d'épuration peuvent apporter de grandes quantités de métaux lourds et d'autres polluants qui peuvent originer de sérieux problèmes environnementaux qui affectent les plantes, ainsi que les microorganismes du sol, comme les bactéries *Rhizobium* (fixatrices d'azote). Pour évaluer les potentialités d'une boue d'épuration urbaine de Lisbonne comme fertilisant pour un pâturage de trèfle souterrain et grasse, une recherche a été effectuée sur le sol de la "Quinta do Marquês" (Oeiras). Cette recherche a permis d'examiner les modifications dans la diversité génétique de la population naturelle du *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* existant dans le sol additionné de différentes quantités de boues d'épuration (5, 10, 20 et 50 t ha<sup>-1</sup>). Les résultats obtenus ont permis de remarquer un changement dans la composition génétique, au niveau du DNA-plasmidique des isolaments de *Rhizobium* testés, surtout dans les traitements où de plus grandes quantités de boues (20 et 50 t ha<sup>-1</sup>) avaient été ajoutées.

**Mots clés:** boues d'épuration; *Rhizobium*; diversité génétique; profils de plasmides

## **Introdução**

### *Lamas residuais*

A reciclagem, em solos agrícolas, das lamas residuais urbanas, também designadas por bio-sólidos por alguns autores, pode melhorar as suas características físicas e químicas, proporcionando às plantas nutrientes essenciais que podem acelerar o seu crescimento, originando plantas mais verdes, mais vigorosas e mais produtivas (FERREIRA *et al.*, 2001).

A aplicação de lamas residuais urbanas na agricultura é uma prática que é utilizada mundialmente com efeitos benéficos ao nível da produtividade. Os altos níveis de fósforo, azoto e matéria orgânica podem melhorar de forma significativa a fertilidade do solo. Porém,

as lamas residuais podem ser portadoras de altas quantidades de metais pesados e de outros poluentes que podem causar sérios problemas ambientais afectando quer as plantas, reduzindo o peso da raiz, número de folhas e a parte aérea, quer os microrganismos do solo, designadamente as bactérias *Rhizobium* (fixadoras de azoto).

A existência de microrganismos patogénicos é também um dos problemas associados à utilização das lamas residuais, o qual pode ser minimizado através de irradiação (HILMY *et al.*, 1997; LESSEL 1997; FERREIRA e CASTRO, 2002).

A União Europeia (CEC, 1986) fixou os valores máximos permissíveis para as concentrações dos metais nos solos agrícolas após a aplicação de lamas residuais (Quadro 1).

**Quadro 1** - Concentrações máximas (mg kg<sup>-1</sup> de solo) de metais pesados permitidas nos solos agrícolas tratados com lamas residuais (DR, 2<sup>a</sup>, 230, 1996/Portaria nº176/96)

Parâmetros	pH ≤ 5,5	5,5 < pH ≤ 7,0	pH > 7,0
Cd	1	3	4
Cu	50	100	200
Ni	30	75	110
Pb	50	300	450
Zn	150	300	450
Hg	1	1,5	2
Cr	50	200	300

No entanto, estes limites, tais como os introduzidos na década de 70 em muitos países europeus, visam apenas a protecção contra os efeitos negativos, nas culturas e nos animais de pastoreio, nos solos aos quais foram adicionadas lamas residuais, e ainda a protecção do homem em relação à exposição aos metais pesados através da cadeia alimentar. Só recentemente, os efeitos de elevadas concentrações de metais pesados nos microrganismos do solo estão a ser tomados em consideração (BROOKES e MCGRATH, 1984; GILLER *et al.*, 1989; GILLER *et al.*, 1993).

#### *Simbiose Rhizobium-leguminosa*

Os microrganismos do solo desempenham um papel importante na manutenção da fertilidade do solo em relação à nutrição da planta. Um dos contributos é dado pelas associações simbióticas, que envolvem a troca directa dos nutrientes inorgânicos para carboidratos fotossintéticos (GIMÉNEZ, 1992).

A associação simbiótica entre leguminosas e bactérias do género *Rhizobium* culmina na formação de órgãos especializados (nódulos) nos quais as bactérias são capazes de converter o N<sub>2</sub> atmosférico em amoníaco, que é usado pela planta como fonte de azoto. Entre os vários factores ambientais que podem

afectar negativamente a capacidade de nodulação e a fixação de N<sub>2</sub> das populações indígenas de *Rhizobium* nos solos, podem citar-se: pH, humidade, temperatura, factores biológicos, salinidade, nitratos, pesticidas, herbicidas e metais pesados (CASTRO, 2000).

Vários autores têm centrado as suas investigações nas respostas da comunidade microbiana, nomeadamente da população rizobiana, ao "stress" imposto pelos metais pesados presentes nos solos pela adição de lamas residuais e/ou resíduos industriais, (HIRSCH *et al.*, 1993; TURNER *et al.*, 1995, CASTRO *et al.*, 1997, CASTRO *et al.*, 2003) embora nem sempre tenham chegado aos mesmos resultados. HIRSCH *et al.*, (1993) encontraram mudanças radicais na população de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, após a exposição, durante longo tempo, à contaminação com metais pesados como resultado da aplicação de lamas residuais durante 20 anos. Estes autores verificaram a predominância de isolamentos com perfis de plasmídeos idênticos, indicando estes resultados que apenas um genótipo de *Rhizobium* tinha sobrevivido nos talhões contaminados com metais. Resultados idênticos foram encontrados por CASTRO *et al.*, (1997) ao examinarem a população rizobiana, mas em solos poluídos industrialmente.

### Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos genéticos autónomos e têm a capacidade de se replicarem e perpetuarem em linhagens separadas das do cromossoma. Os plasmídeos podem codificar características que conferem vantagens fenotípicas às bactérias que os contêm nomeadamente a resistência a metais pesados (CASTRO *et al.*, 2003) e a agentes antimicrobianos e a degradação de compostos orgânicos. Podem ter ainda outras funções ligadas, por exemplo, à assimilação de nutrientes e ao metabolismo de fixação de azoto. Promovem também a transferência de informação genética de uma célula para outra (MERCADO-BLANCO e TORO, 1996; STANSFIELD *et al.*, 1998).

As adaptações às mudanças no meio ambiente podem, por conseguinte, acontecer por selecção de estirpes com plasmídeos ou por difusão dos plasmídeos através da população existente (REANNEY, 1978).

À semelhança do que acontece com muitas bactérias, a maior parte das espécies do género *Rhizobium* possuem grandes quantidades de DNA plasmídico, variando o número de plasmídeos entre 1 e 10, tanto intra como inter-espécies. Têm geralmente um peso molecular elevado, podendo variar entre 50 e 600 kb, nas estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (HARRISON *et al.*, 1978).

Na maior parte das espécies investigadas do género *Rhizobium*, os genes que controlam a nodulação e a fixação de N<sub>2</sub>, têm sido localizados num único plasmídeo, o plasmídeo simbiótico. Além deste plasmídeo estão também presentes outros plasmídeos, designados por "crípticos", representando o DNA plasmí-

dico entre 25 a 50% do genoma total (MARTINEZ-ROMERO e ROSENBLUETH, 1990).

### Objectivos

Com a finalidade de avaliar as potencialidades de uma lama residual da área urbana de Lisboa, como fertilizante de uma pastagem mista de trevo subterrâneo e de azevém foi instalado um ensaio de campo nos terrenos da Quinta do Marquês (Oeiras), ao abrigo dum projecto financiado pela Agência Internacional de Energia Atómica.

A avaliação da diversidade genética e das relações genéticas entre as estirpes de bactérias das populações naturais pode fornecer informações valiosas acerca dos génotipos que estão bem adaptados a certos meios ambientes, sendo por isso crucial determinar a resposta da população às condições de mudança (YOUNG, 1994). Com o presente trabalho, pretende-se examinar as possíveis alterações na diversidade genética da população natural de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, presente nestes solos. A análise dos perfis de DNA plasmídico foi o método eleito para se examinar a diversidade da população rizobiana. Esta técnica tem revelado a existência duma grande variabilidade entre os isolamentos de *Rhizobium*, fornecendo um adequado "fingerprint" para a sua caracterização.

### Material e métodos

#### Material biológico

As bactérias *Rhizobium* foram isoladas dos nódulos das raízes de plantas de trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*, L.) provenientes de um

ensaio de campo em blocos casualizados com 4 repetições, instalado nos terrenos adjacentes à Estação Agronómica Nacional, em Oeiras. Utilizou-se como fertilizante diferentes quantidades de lamas (provenientes da ETAR de Frielas, Lisboa) nas doses de 5, 10, 20 e 50 t ha<sup>-1</sup> e uma adubação PK. Como controlo (PN) para o nosso estudo, utilizaram-se isolamentos provenientes de plantas crescidas sem qualquer tratamento.

Foram feitos 40 isolamentos de *Rhizobium* de cada tratamento (10/repetição) incluindo o controlo (PN), o que fez um total de 240 isolamentos analisados.

#### *Características físicas e químicas do solo e da lama.*

No quadro seguinte encontram-se as análises efectuadas ao solo e à lama.

**Quadro 2** – Algumas características físicas e químicas do solo e da lama

	Solo	Lama
pH(CaCl <sub>2</sub> )	7,2	6,25
M. O.(%)	1,6	47,9
N Total (g kg <sup>-1</sup> )	1,1	26,7
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	384,5	81295
*Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0,2	1,8
*Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	11	302
*Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	39	64
*Fe (g kg <sup>-1</sup> )	24,7	106,6
*K (g kg <sup>-1</sup> )	2,2	1
*Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	59,5	1780
*Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	150	110
*Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	25,5	132
*Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	17,5	36

\*concentrações totais determinadas por digestão em água régia

#### *Manutenção das estirpes de Rhizobium*

As estirpes de *Rhizobium* utilizadas

neste trabalho foram mantidas a 4°C em meio de agar de manitol-levedura (AML) (VINCENT, 1970).

#### *Análise de DNA-plasmídico*

A análise dos perfis de DNA plasmídico dos isolamentos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* realizou-se com base no método descrito por ECKHARDT (1978), posteriormente modificado por PLAZINSKI *et al.*, (1985) e por HIRSCH e SKINNER (1992), após adaptação às nossas condições (CASTRO, 1999). Esta técnica de análise de DNA plasmídico tem a particularidade de envolver a lise *in situ* das células das bactérias através do tratamento com lisozima e com um detergente aniónico, o SDS, evitando a propensão que os plasmídeos têm para se quebrarem durante o processo de extracção e permitindo que as formas superenroladas (ccc) das moléculas de DNA plasmídico sejam libertadas.

#### Preparação das amostras para a electroforese

As culturas de *Rhizobium*, mantidas a 4 °C em meio AML, foram repicadas para placas contendo meio de triptona (TY) com a seguinte composição: 5 g de triptona, 3 g de extracto de levedura, 0,8807 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e 15 g de agar, num litro de H<sub>2</sub>O (BERINGER *et al.*, 1984). As placas foram mantidas durante 3 dias a 28°C, ao fim dos quais se retirou uma ansada de cada uma delas e se inocularam tubos contendo 5 ml de meio líquido TY. Os tubos foram incubados a 28°C, com agitação a 200 rpm, até à fase exponencial de crescimento das bactérias, que foi determinada por leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm, correspondendo 1 DO 600 = 10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup>

células ml<sup>-1</sup>. Transferiu-se 1 ml de cada cultura para tubos "eppendorf", sendo as células recolhidas após centrifugação a 8000g, durante 5 minutos, a 4°C. Em seguida, fizeram-se duas lavagens, a primeira em tampão T.E. (pH 8,00), com a composição: Tris-HCl - 50 mM, EDTA - 20 mM e sarcosil - 0,1% (v/v) e a segunda em tampão T.E., sem sarcosil. O sarcosil facilita o acesso da lisozima às paredes das células de *Rhizobium* aumentando, por isso, a eficiência da lise. Por fim, células foram ressuspensas em 50 µl de mistura de lise e colocadas nos poços do gel de agarose previamente solidificado. A composição da mistura de lise é a seguinte: 25% (p/v) de sacarose em 25 mM Tris-HCl (pH 8,00), adicionada de lisozima e Rnase, para as concentrações finais de 1 mg ml<sup>-1</sup> e 1 unidade ml<sup>-1</sup>, respectivamente, e uma gota de xilenocianol.

#### Electroforese

Recorreu-se a uma electroforese horizontal em gel de agarose a 0,6%, em TBE. A concentração da agarose usada forma uma malha molecular com uma determinada dimensão de poros, a necessária para que os plasmídeos superenrolados e os fragmentos de DNA mais pequenos migrem através do gel, enquanto que o DNA cromossomal e as formas circulares (oc) dos plasmídeos grandes, com pesos moleculares maiores, são retidos nos poços.

Esta electroforese tem a particularidade de utilizar um duplo pente. O primeiro constituído por um único poço que ocupa a largura de todo o gel e que depois de removido foi preenchido com uma mistura de agarose a 0,4% (p/v) em TBE, contendo 2% de SDS e uma gota de azul de bromofenol. O segundo pente,

distanciado de 1 cm do primeiro, era constituído por 11 poços onde se colocaram as amostras de *Rhizobium* a analisar, preparadas como se indicou no ponto anterior. O tampão TBE foi colocado na tina antes das amostras e a electroforese decorreu durante 16-18 horas a 10°C, à tensão constante de 20 V durante as primeiras 3-4 horas e de 120 V nas seguintes.

Após a electroforese, os géis foram corados por imersão numa solução com brometo de etídio (na concentração de 1,0 µg ml<sup>-1</sup>) durante 30 minutos.

Os resultados foram registados fotograficamente em computador e as imagens de electroforese foram tratadas utilizando o programa Bio-Profil versão 6,0 (BIO-1D).

#### Estimativa das massas moleculares dos plasmídeos dos isolamentos de *Rhizobium*.

As massas moleculares dos plasmídeos dos vários isolamentos foram estimadas por comparação com as massas moleculares da estirpe de referência 32TSIA (CASTRO, 1999) (Quadro 3). Para o efeito utilizou-se o programa atrás mencionado (Bio-Profil) também adequado ao cálculo automático de massas moleculares.

**Quadro 3** - Massas moleculares dos plasmídeos da estirpe 32 TSIA

Nº de bandas	Massas moleculares (kb)
1	460
2	430
3	350
4	260
5	220
6	63

## Resultados

### Perfis de DNA-plasmídico de isolamentos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Os 240 isolamentos de *Rhizobium* testados foram classificados em diferentes grupos, de acordo com a dimensão e número de plasmídeos. Foram encontradas 10 bandas diferentes, que originaram 20 grupos de plasmídeos diferentes (Grupos de A a T) (Quadro 4).

**Quadro 4** - Massas moleculares, aproximadas, dos plasmídeos existentes nos diferentes grupos

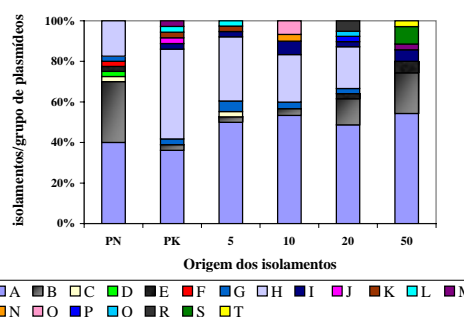
Grupos	Massas moleculares (kb)
A	350, 220
B	> 460, 350, 220
C	> 460, 350, 240, 220,
D	350, 240, 220, 170
E	420, 350, 220
F	> 460, 420, 220
G	220, 150
H	220
I	350, 240, 220
J	170
K	220, 98
L	220, 63
M	350, 220, 150
N	350, 220, 170
O	350, 220, 98
P	460, 350, 220
Q	350, 63
R	220, 170
S	> 460, 460, 350, 220
T	> 460, 350, 220, 150

A análise dos resultados dos perfis de plasmídeos obtidos permitiu verificar que os isolamentos possuíam 1, 2, 3 ou 4 plasmídeos, na maioria dos quais se observou a presença do plasmídeo de 220 kb. Aliás este plasmídeo e o de 350 kb foram os encontrados em percen-

tagens mais elevadas, respectivamente 90 % e 65%. No entanto, a presença dum plasmídeo com uma massa molecular > 460 só pode ser observado nos isolamentos correspondentes ao controlo e ao tratamento com 50 toneladas.

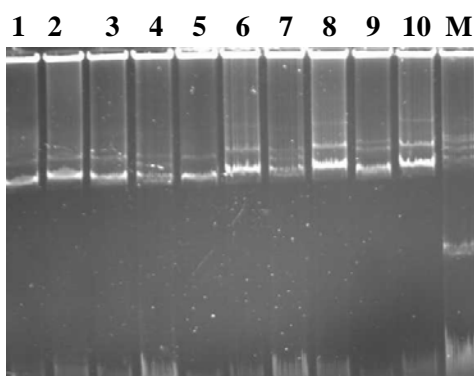
### Diversidade genética da população rizobiana

Os resultados obtidos, da análise dos 240 isolamentos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* testados, permitiram-nos avaliar a diversidade da população rizobiana na população natural (PN) e nos vários tratamentos, isto é, PK e sujeitos à aplicação de lamas (5, 10, 20 e 50 t ha<sup>-1</sup>) (Figura 1), tendo-se verificado:



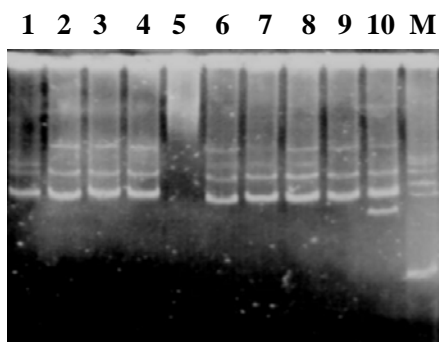
**Figura 1** - Diversidade genética da população rizobiana. Isolamentos de *Rhizobium* obtidos dos nódulos de plantas que cresceram fora do ensaio, isto é, população natural (PN), e nos talhões sujeitos aos diferentes tratamentos: adubação PK e adição de lamas nas doses de 5, 10, 20 e 50 t ha<sup>-1</sup>

- A presença em percentagens elevadas (32 a 48%), tanto na população natural (PN) como em todos os tratamentos, de um grupo de isolamentos dominante (grupo A) caracterizado por possuir 2 plasmídeos, respectivamente de massas moleculares 350 e 220 kb (Figura 2).



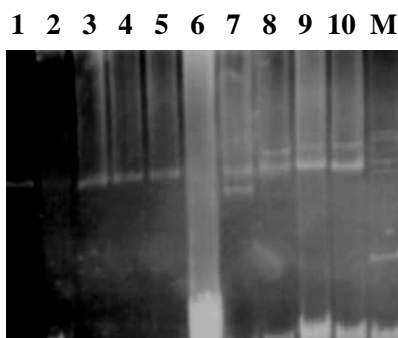
**Figura 2** - DNA-plasmídico de isolamentos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* da população natural (PN). O grupo A (grupo dominante) está representado nas "lanes" 1, 2, 3 e 5. M, representa a estirpe usada como marcador

- A presença em percentagens relativamente baixas (3 a 8%), de isolamentos de *Rhizobium* pertencentes a outros grupos diferentes dos existentes na população natural, nomeadamente P, Q, R, S e T, particularmente nos tratamentos sujeitos às doses mais elevadas de lamas, isto é, 20 e 50 t ha<sup>-1</sup> (Figura 3).



**Figura 3** - DNA-plasmídico de isolamentos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do tratamento com 50 t ha<sup>-1</sup> de lamas residuais urbanas. O grupo B, está representado nas "lanes" 2, 3, 4 e 9. O grupo S está representado nas "lanes" 6, 7 e 8. O grupo T está representado na lane 10. M, representa a estirpe usada como marcador

- A presença, em percentagens que variaram entre os 18% na população natural (PN) e um máximo de 40% nos diferentes tratamentos (excepto na dose correspondente a 50 t ha<sup>-1</sup> de lama) de isolamentos pertencentes ao grupo H, caracterizado por possuir apenas um plasmídeo com massa molecular de 220 kb (Figura 4).



**Figura 4** - DNA-plasmídico de isolamentos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do tratamento com adubação PK. O grupo H está representado nas "lanes" 1, 2, 3 e 5. Nas "lanes" 8, 9 e 10 está representado o grupo A. M, representa a estirpe usada como marcador

### Conclusões

O estudo da diversidade genética da população rizobiana, permitiu observar uma mudança na composição genética, a nível de DNA plasmídico nos isolamentos de *Rhizobium* testados, nos vários tratamentos sujeitos à aplicação de lamas, não se tendo verificado, porém, uma diminuição deste parâmetro como muitas vezes tem sido referido (HIRSCH *et al.*, 1993; CASTRO., *et al.*, 1997).

Os resultados aqui apresentados permitem-nos concluir que, embora se tenha verificado nos isolamentos obtidos dos nódulos das plantas, que cresceram nos talhões tratados com lamas, a presença, em percentagens elevadas, de



um grupo dominante com um perfil de plasmídeos idêntico ao da população natural (Grupo A), a presença de outros grupos em percentagens mais baixas, poderá estar relacionada com a adaptação destas bactérias face ao "stress" imposto pela alteração de algumas das características do solo, nomeadamente do conteúdo em metais pesados.

Por outro lado, a ausência de isolamentos do grupo H, nos solos onde foram aplicadas 50 t ha<sup>-1</sup> de lamas poderá estar relacionada com o facto destes isolamentos serem mais sensíveis aos metais pesados ou a outros contaminantes e por isso a sua sobrevivência ter sido afectada.

Os resultados deste estudo permitem realçar os efeitos, embora subtis, que os metais pesados podem ter na diversidade dos microrganismos, após a adição ao solo de lamas residuais urbanas. Por isso, o estudo da composição genética das bactérias *Rhizobium* isoladas das plantas de trevo subterrâneo crescidas nestes solos bem como o papel de grupos de isolamentos com perfis de plasmídeos diferentes dos existentes na população natural deverão continuar a ser investigados, pois estes efeitos são muitas vezes detectados apenas ao fim de alguns anos após a aplicação de lamas aos solos. Sob este ponto de vista, uma das consequências a longo prazo da aplicação das lamas aos solos, poderá ser a eventual ruptura na resposta da população microbiana em geral face a novos "stresses".

### Bibliografia

- BROOKES, P.C., McGRATH, S.P., 1984. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *Journal of Soil Science* **35**: 341-346.
- CASTRO, I.V., 1999. *Efeito da contaminação por metais pesados na simbiose Rhizobium-Leguminosa*. Tese de doutoramento. ISA/UTL.
- CASTRO, I.V., 2000. Efeitos ecotoxicológicos dos metais pesados na fixação biológica do azoto em solos contaminados industrialmente. *Silva Lusitana* **8** : 165-194.
- CASTRO, I.V., FERREIRA, E.M., McGRATH, S.P., 1997. Effectiveness and genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* isolates in portuguese soils polluted by industrial effluents. *Soil Biology & Biochemistry* **29** : 1209-1213.
- CASTRO, I.V., FERREIRA, E.M., McGRATH, S.P., 2003. Survival and plasmid stability of rhizobia introduced into a contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry* **35** : 49-54.
- CEC - Commission of the European Communities, 1986. Council directive on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official Journal of the European Communities* L181, Annex 1A, 10.
- DIÁRIO DA REPÚBLICA, 1996. II Série nº 230, de 3-10-1996, Portaria nº176/96, pp. 13789.
- ECHKARDT, T., 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1** : 584-588.
- FERREIRA, E.M., CASTRO, I.V., HENRIQUES, J.C., 2001. Produção de pastagem em solo adicionado de lamas residuais urbanas. *Programa e Resumos da XXII Reunião de Primavera da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens*. SPPF. pp. 41. Beja.
- FERREIRA, E.M., CASTRO, I.V., 2002. The use of sewage sludge as a fertilizer in pastures. In *Irradiated sewage sludge for application to cropland* pp. 161-169.
- GILLER, K.E., McGRATH, S.P., HIRSCH, P., 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biology & Biochemistry* **21**: 841-848.

- GILLER, K.E., NUSSBAUM, R., CHAUDRI, A.M., McGRATH, S.P., 1993. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* biovar *trifolii* or *R. loti*. *Soil Biology & Biochemistry* **25** : 273-278.
- GIMÉNEZ, E.H., 1992. Interacción planta-microorganismo. In: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología Del Nitrogeno*, cap.1, eds. J. G. Lopez y Pla, C.L., pp. 13-23. Editorial Rueda, Madrid.
- HARRISON, S.P., JONES, D.G., SCHÜNMANN, P.H.D., FORSTER, J.W., YOUNG, P.W., 1988. Variation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* Sym plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. *Journal of General Microbiology* **134**: 2721-2730.
- HILMY, N., HARSOJO, SUWIRMA, S., MITROSUHARJO, M.M., 1997. Review of studies on irradiated sludge and chicken manure and their use in agriculture in Indonesia. In *Sewage sludge and wastewater for use in agriculture*, eds. International Atomic Energy Agency, pp. 95-107. Austria.
- HIRSCH, P.R., SKINNER, F.A., 1992. The identification and classification of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In: *Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology*, pp. 45-65. Society for Applied Bacteriology. London.
- HIRSCH, P.R., JONES, M.J., McGRATH, S.P., GILLER, K.E., 1993. Heavy metals from past applications of sewage-sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. *Soil Biology & Biochemistry* **25** : 1485-1490.
- LESSEL, T., 1997. Disinfection of sewage sludge by gamma radiation, electron beams and alternative methods. In *Sewage sludge and wastewater for use in agriculture*, eds. International Atomic Energy Agency, pp. 29-45. Vienna, Austria.
- MARTINEZ-ROMERO, E., ROSENBLUETH, M., 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **56** : 2384-2388.
- MERCADO-BLANCO, J., TORO, N., 1996. Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9** : 535-545.
- PLAZINSKY, J., CEN, Y.H., ROLFE, B.G., 1985. General method for the identification of plasmid species in fast-growing soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **48** : 1001-1003.
- REANNEY, D.C., 1978. Coupled evolution: adaptive interactions among genomes of plasmids, viruses and cells. *International Review of Cytology* (suppl.) **8** : 1-69.
- STANSFIELD, W.D., COLOMÉ, J.S., CANO, R.J., 1998. Genética das bactérias e dos seus vírus. In: *Biologia Molecular e Celular*, eds. W.D. Stansfield, J.S. Colomé and R.J. Cano, pp. 170-171. McGraw-Hill. Lisboa.
- TURNER, A.P., GILLER, K.E., CHAUDRI, A.M., McGRATH, S.P., 1995. Population sizes on diversity of *Rhizobium* are reduced by long term heavy metal contamination of soil. In: *Abstract of Third International Conference on the Biochemistry of Trace Elements*. Theme B (B1). Paris. França.
- VINCENT, J.M., 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*, IBP Handbook n° 15, ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Edinburgh.
- YOUNG, J.P.W., 1994. Sex and the single cell: the population ecology and genetics of microbes. In: *Beyond the Biomass. Compositional and Functional Analysis of Soil Microbial Communities*, eds. K. Ritz, J. Dighton and K. E. Giller, pp. 101-107. John Wiley. Chichester.

Entregue para publicação em Maio de 2002  
 Aceite para publicação em Julho de 2003