

## ELABORAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A METAIS PESADOS

Tâmara São Paulo Vidal<sup>1</sup>  
Luzimar Gonzaga Fernandez<sup>2</sup>  
Juan Carlos Rossi Alva<sup>3</sup>

**RESUMO:** *A Lagoa de Praia do Flamengo – SSA/BA vem sofrendo diversos problemas ambientais devido ao crescimento urbano e às atividades turísticas. A diversidade existente nesta região possibilita isolar e identificar bactérias que demonstram uma adaptação à vida nesses ambientes. Com a finalidade de isolar bactérias capazes de crescer na presença de Chumbo (Pb), Zinco (Zn) e Cádmio (Cd), foram coletadas amostras de sedimento na Lagoa de Praia do Flamengo, em cinco pontos de amostragem com diferentes graus de impactos antropogênicos. As amostras coletadas foram enriquecidas em meio líquido YPD e posteriormente semeadas em meios de cultura seletivos, contendo Pb e Zn. Após o crescimento microbiano a 30°C por no mínimo 48 horas, as colônias obtidas foram semeadas em meio YPDA para a obtenção dos isolados de bactérias puras. Desta forma, foram obtidos três isolados bacterianos. Cada isolado mostrou diferente capacidade de crescimento aeróbico na presença de Pb, Zn e Cd em concentrações de até 10mM.*

**Palavras – chave:** Bactérias; Metais pesados; Lagoa de Praia do Flamengo.

### INTRODUÇÃO

A Constituição da República Federativa do Brasil, no Capítulo VI - Art. 225°, diz que todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencialmente à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações. A luta para a reversão do quadro de degradação ambiental e para a preservação do meio ambiente constitui o exercício da cidadania; também não se devem esperar resultados apenas do poder público (AMIL, 2005).

A Lagoa de Praia do Flamengo estende-se por quase 2.470 metros, com uma largura que varia entre 10 a 180 metros. Esta lagoa apresenta várias nascentes, tendo um único canal que desemboca no mar (ALVAREZ et al., 1978). A sua cobertura vegetal em muitos trechos é formada por arbustos e matas ciliares, tendo uma característica arbustiva e herbácea que serve de proteção para muitos animais presentes. A ocupação urbana ordenada ou desordenada tem afetado as nascentes da Lagoa de Praia do Flamengo e com isso a vegetação também vai desaparecendo gradualmente. No local, apesar de ainda existir focos de contaminação de esgotos domésticos, é possível identificar animais e diversas plantas (AMIL, 2005).

A região que circunda a Lagoa de Praia do Flamengo vem sofrendo, ao longo das últimas décadas, um crescente processo de degradação ambiental devido, principalmente, aos impactos gerados pela implantação dos empreendimentos imobiliários integrantes do Loteamento Praias do Flamengo, em Salvador, e dos Loteamentos Marisol I e II, situados no extremo norte da

<sup>1</sup> Licenciada em Ciências Biológicas - UCSAL – Pesquisadora Associada LEMA/UCSAL  
e-mail: tamarasaopaulo@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Dr<sup>a</sup> em Bioquímica-Biologia Molecular Estrutural - UPC/Espanha (LEMA/UCSAL/UFBA)

<sup>3</sup> Dr. em Bioquímica-UFRJ – Mestrado Profissional em Planejamento Ambiental e LEMA (UCSAL).

lagoa, já em Lauro de Freitas (PAIM, da SILVA, 2005). Basicamente, estes impactos ambientais negativos estão relacionados com a degradação e com a ocupação irregular das Áreas de Preservação Permanente – APP da lagoa, com o comprometimento da qualidade hídrica pelo aporte de esgoto doméstico e com o manejo inadequado do espelho de água deste manancial, além da ocupação de dunas e do aterro de diversas áreas úmidas em Lauro de Freitas, principalmente nas nascentes do Rio Sapato (PAIM; da SILVA, 2005).

O lodo do esgoto, além de conter alto teor de matéria orgânica, que pode melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, possui quantidades apreciáveis de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Entretanto, juntamente com o material orgânico e com os nutrientes disponíveis às plantas, o emprego de determinados lodos pode ser limitado pela presença de poluentes como metais pesados, compostos orgânicos persistentes e microorganismos patogênicos ao homem (BETTIOL; FERNANDES, 2004). Quando à carga dos esgotos lançados, excede à capacidade de autodepuração do corpo de água, este rio fica sem oxigênio, provocando problemas estéticos e liberação de odor e impedindo a sobrevivência de seres aquáticos (CETESB, 1988), os peixes morrem não por toxicidade, mas por asfixia (VERNIER, 1994). Todos os organismos vivos dependem de uma forma ou de outra do oxigênio para manter os processos metabólicos de produção de energia e de reprodução (PORTO, 1991). A quantidade de alimento (contidos no esgoto ou outros despejos orgânicos assimiláveis) lançado ao corpo de água deve ser proporcional à vazão ou ao seu volume, isto é, à disponibilidade de oxigênio dissolvido (BRANCO, 1983).

Quando aplicado ao solo, o lodo de esgoto causa alterações na estrutura e no funcionamento do agroecossistema, sendo a comunidade microbiana um dos componentes mais sensíveis, podendo ser utilizada como indicador da qualidade dos solos (DICK, 1994; GILLER et al., 1998). A aplicação de lodo de esgoto pode tanto estimular, devido ao aumento de carbono e nutrientes disponíveis, como inibir, devido à presença de metais pesados e outros poluentes, a atividade microbiana do solo (BAATH, 1989; PONTES, 2002).

Os metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico superior a 5 g/cm<sup>3</sup>, compreendidos em 40 elementos, sendo considerados “elementos de traço” por serem naturalmente encontrados em poucas partes por milhão (ppm). Alguns, como ferro, em pequenas quantidades, são elementos essenciais ao crescimento tanto de organismos procariotes quanto de eucariotes (VALDMAN; LEITE, 2000). Eles representam um grupo de poluentes de grande importância ecológica e ambiental, visto que podem influenciar a comunidade microbiana, reduzindo a abundância e a diversidade das populações na comunidade, e conseqüentemente interferindo nos processos microbiológicos do solo, tais como: as transformações de compostos nitrogenados, principalmente reduzindo a taxa de nitrificação (HASSEN, et al., 1998; MUNN, et al., 2000) e as atividades enzimáticas no solo (BARDGETT et al., 1994; GIUSQUIANI et al., 1994). Um número ilimitado de estudos tem focalizado a influência de metais pesados em microorganismos em seu habitat natural, contudo o metal pode se depositar e acumular em diversos tipos de habitats microbianos (solos, oceanos, estuários, lagos e rios), e dessa forma entrar na base da cadeia alimentar (BABICH; STOKZY, 1978).

Alguns metais pesados são essenciais para o crescimento de plantas, animais e microorganismos como, por exemplo, zinco (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), cobalto (Co), cádmio (Cd) e cromo (Cr), mas requeridos em pequenas quantidades, enquanto mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) não apresentam funções biológicas (CHAUDRI et al., 1992). Entretanto, deve-se considerar que todos são potencialmente tóxicos em concentrações elevadas, provocando desnaturação de proteínas e bloqueios de sítios de ligação de enzimas (SIQUEIRA et al., 1994).

A presença dos metais pesados em corpos de água são decorrentes da decomposição de rejeitos urbanos ou industriais e de vazamentos ou derramamentos acidentais de poluentes, os

quais são muitas vezes recalcitrantes. Pela sua persistência e pelo seu potencial tóxico, os metais pesados são determinantes do equilíbrio biológico nos corpos d' água (KLEIN & THAYER, 1990; MARTENSSON, 1992). O comportamento da população microbiana depende da qualidade e quantidade dos resíduos adicionados ao solo, pois ela é influenciada pelo ambiente, podendo as populações ou os seus processos ser inibidos por diversos fatores estressantes (DOMSCH et al., 1983). Os microorganismos apresentam respostas diferenciadas à presença de metais pesados nos solos. Desta forma, tem-se observado que os procarióticos (bactérias e actinomicetes) são mais sensíveis do que os eucarióticos (fungos), e que as bactérias apresentam maior sensibilidade à poluição do solo causada pelos metais pesados do que os actinomicetes (DOELMAN et al., 1994).

Nos solos, os teores de metais pesados e a resistência dos microorganismos nem sempre estão correlacionados, visto que em pH mais elevados a toxidez destes metais é reduzida (DEAN-ROSS; MILLS, 1989). Além disso, deve-se considerar que os teores de Cu, Cr e Arsênio (As) decrescem com o aumento da profundidade do solo (YATES et al., 1994).

Vários métodos biológicos têm sido utilizados para avaliar o impacto da contaminação dos metais pesados no ambiente. A utilização de microorganismos para monitorar a poluição do solo com metais pesados e para a biorremediação tem se destacado entre os vários métodos utilizados, visto que estes organismos são funcionais na reciclagem dos elementos, apresentam pequenas dimensões, além de serem abundantes. Desta forma, os microorganismos são o primeiro grupo de organismos que são afetados pela poluição do solo (DOELMAN et al., 1994).

A biorremediação faz parte das tecnologias inativas de tratamento e consiste na utilização de microorganismos (fungos, bactérias e leveduras) na eliminação de resíduos tóxicos para a recuperação de áreas degradadas. O objetivo principal da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade bacteriana (CRAPEZ et al., 2002). O processo de biorremediação acontece de modo natural, quando os fungos e bactérias utilizam a substância tóxica como fonte de alimentação (fonte de carbono), produzindo resíduos menos tóxicos ou sem nenhuma toxicidade, em que os produtos oriundos desta degradação são tipicamente gás carbono e água (FERNANDES et al., 2003).

Diversos fatores químicos e físicos do ambiente interferem na biorremediação. Alguns afetam o substrato: dispersão, absorção, radiação solar, fotooxidação e evaporação. Outros fatores interferem diretamente na atividade microbiana: pressão osmótica, temperatura, pH, oxigênio, nutrientes, elementos tóxicos e fonte de carbono. Em uma degradação de resíduos poluentes no solo, por exemplo, a temperatura da água subterrânea pode afetar significativamente as taxas de crescimento microbiano e os períodos necessários para a biorremediação, mesmo se todas as outras necessidades microbianas ( $O_2$  e nutrientes) forem satisfeitos (CORSEUIL, 1994).

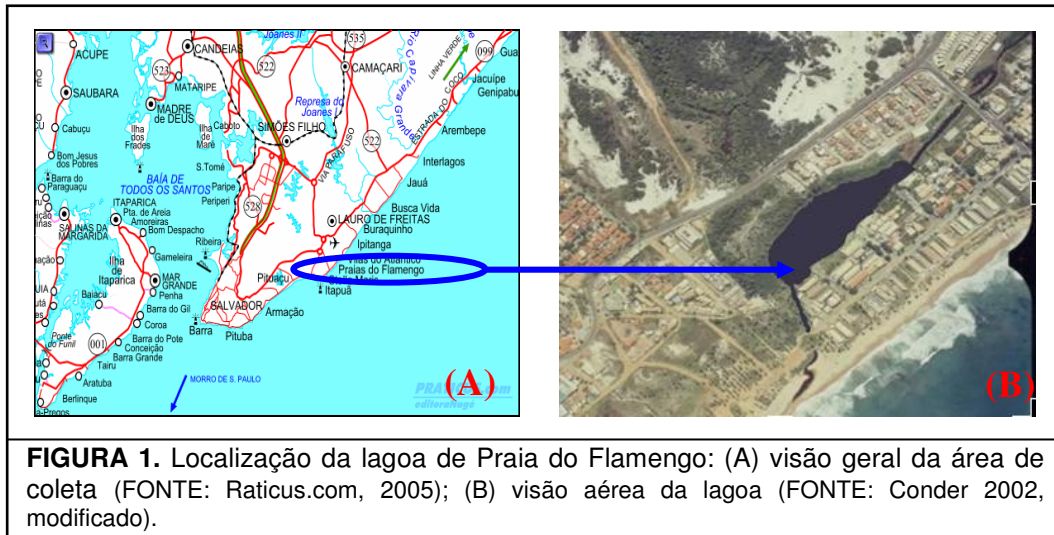
A Lagoa de Praia do Flamengo é uma Área de Preservação Permanente –APP pouco estudada, que apresenta indícios de contaminação por ações antrópicas (esgoto doméstico, construção de pontes, lixo, etc). Estas condições podem ser ideais para isolar microorganismos com capacidade de sobreviver nestes tipos de ambientes extremos, possibilitando assim uma variedade de estudos bioquímicos, fisiológicos e biotecnológicos.

Este trabalho teve como objetivo elaborar protocolos para o isolamento e o crescimento de bactérias aeróbias a partir de amostras de sedimentos de corpos de água para a avaliação do potencial biotecnológico na biorremediação de locais impactados com metais pesados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Área de estudo

A coleta foi realizada na Lagoa de Praia do Flamengo, localizada no bairro de Praia do Flamengo, Salvador, Bahia, “Figura 1”, onde foram eleitos de forma aleatória estratificada cinco pontos de amostragem devido a diferentes graus de contaminação: Primeira ponte, Praia de Artur, Palmas da Lagoa, San Marino e Barragem, em que se procede a uma divisão regular da área, distribuindo-se os pontos de forma aleatória em cada uma delas. Para realização da coleta de sedimento foram medidos os parâmetros físico-químicos da água e as estações foram localizadas com auxílio do GPS usando o equipamento Magellan (GPS 315).



### Coleta da amostra

A coleta do sedimento foi realizada na Lagoa de Praia do Flamengo com a utilização de uma balsa e auxílio de uma draga modelo Petersen de aço inoxidável “Figura 2A”. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos previamente esterelizados e identificados.

Foram verificadas as condições físico-químicas da água “Figura 2B” da lagoa nos cinco pontos de coleta, utilizando-se os seguintes equipamentos: pHmetro (WTW pH 330), Disco Secchi Policontrol, Oxímetro (WTW Oxi 330) e Condutivímetro (WTW LF 330), avaliando assim as suas características distribuídas ao longo da Lagoa de Praia do Flamengo.



**FIGURA 2.** Coleta na lagoa de Praia do Flamengo: (A) coleta do sedimento com auxílio da draga; (B) análise físico-química da água.

### Preparo de meios de cultura

Basicamente, os meios de cultura foram preparados seguindo diferentes protocolos, os reagentes foram pesados, colocando-os em beakers de volume adequado e adicionada água Milli-Q até atingir o do volume final. Foi homogeneizado e transferido para erlenmeyers (com uma capacidade no mínimo 25% maior que o volume final), os quais foram fechados com rolhas de gaze e algodão e envolvidos com papel alumínio. Após essa etapa os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 minutos (ROSSI-ALVA, 2003).

No caso de meios sólidos, após a autoclavagem foram vertidos em placas de Petri ou em tubos de ensaio, onde se retirou 20% do total e se incubou na estufa à 37°C por 24h para o teste de esterilização, onde se verifica ou não a presença de contaminações dos meios (MARRAY et al., 2002; JAWET, 1992).

O meio YPD, meio primário ou de enriquecimento que estimula o crescimento dos microorganismos existentes no sedimento, foi preparado com a seguinte composição (g/L): Extrato de Levedura (2,0), Peptona de carne (5,0), Glicose (5,0).

O meio líquido metais modificado (MM), meio seletivo, cuja composição é (g/L): Extrato de Levedura (2,0), Peptona de Carne (5,0), Glicose (5,0),  $PbCl_2$  (2,8) e  $ZnCl_2$  (1,5).

O meio YPDA, meio sólido usado para a manutenção e propagação inicial de microrganismos, tem a seguinte composição (g/L): Extrato de Levedura (2,0), Peptona de Carne (5,0), Glicose (5,0) e Ágar (15,0).

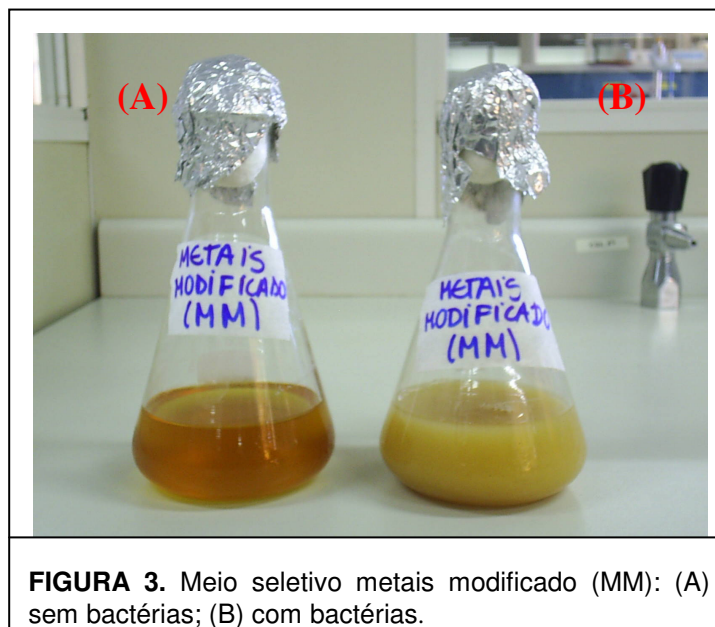
Os meios seletivos líquidos, meios que favorecem o desenvolvimento de um tipo ou grupo de organismos, *metais 1* (contendo Pb), com a seguinte composição (g/L): Extrato de Levedura (5,0), Peptona de Carne (10), Glicose (5,0),  $PbCl_2$  (27,0), *metais 2* (contendo Zn), cuja composição é (g/L) : Extrato de Levedura (5,0), Peptona de Carne (10,0), Glicose (5,0),  $ZnCl_2$  (13,0), e *metais 3* (contendo Cd), cuja composição (g/L) é: Extrato de Levedura (5,0), Peptona de Carne (10,0), Glicose (5,0),  $CdCl_2$  (20,0),

### Enriquecimento das amostras

Após a chegada do sedimento ao LEMA/UCSal, este foi devidamente acondicionado a 4°C. Posteriormente foram pesados 10g de sedimento de cada estação de amostragem para serem inoculados em cinco erlenmeyers de 100mL, contendo 40 mL de meio YPD e incubados no shaker à 30°C, sob agitação de 150 rpm por 24 horas.

### Seleção e isolamento de microorganismos

Após esse processo foi inoculado 18 mL do meio YPD em erlenmeyers de 100mL, contendo o meio líquido metais modificados (MM) em pH  $6,0 \pm 0,5$  “Figura 3” e incubados em shaker à 30°C, sob agitação de 150 rpm por 48 horas.



O seguinte passo foi o isolamento das bactérias em placas de petri descartáveis, de 80 mm de diâmetro, devidamente esterilizadas contendo meio YPDA. O meio de cultura (YPDA) foi autoclavado em um erlenmeyer de 500mL à 121°C por 15 minutos. Posteriormente, este foi vertido em cinco placas de petri descartáveis (20 mL cada), onde passou por um teste de esterilização ficando na estufa à 37°C entre 18-20 horas, observando após esse período a presença de contaminantes no material (MARRAY et al., 2002; JAWET, et al., 1992).

Inoculou-se 0,1 mL do meio metais modificado (MM) em placas com meio YPDA e com auxílio da alça de platina foram feitas estrias por esgotamento, depois incubadas em estufa à 30°C por 18-20 horas. Segundo Oplustil e colaboradores (2000), a leitura é feita pela presença ou ausência de crescimento de colônias na superfície do meio.

### Purificação das amostras

Após o crescimento das colônias, verificou-se macroscopicamente as diferenças entre as mesmas, sendo então purificadas utilizando placas de petri descartáveis com meio YPDA, pelo

método de estrias por esgotamento e posteriormente incubadas em estufa à 30°C por 18-20 horas (OPLUSTIL, 2000; MURRAY, 2002).

Depois da purificação das colônias foram realizadas identificações morfológicas com posterior confirmação da integridade e da pureza das mesmas, realizando a coloração de Gram (OPLUSTIL, 2000); através desta coloração, obteve-se maiores informações sobre a morfologia dos isolados microbianos.

As bactérias isoladas foram semeadas em tubos com meio YPDA em plano inclinado pelo método de semeadura em espiral. Nestes tubos foram feitas estrias de forma helicoidal utilizando a alça de platina em toda a superfície do meio, visando obter um maior crescimento desses isolados, sendo posteriormente incubados em estufa à 30°C por 24 horas.

### Crescimento bacteriano

Para avaliar o crescimento bacteriano na presença de metais pesados numa concentração de 10mM foram utilizados três meios seletivos: *metal 1* (contendo Pb), *metal 2* (contendo Zn) e *metal 3* (contendo Cd), os isolados foram inoculados em erlenmeyers de 100mL (em duplicata) contendo 40mL de meio seletivo líquido, M1, M2 e M3, respectivamente, nos quais promovem o crescimento de determinado microorganismo em detrimento de outros, com pH 6,0 ± 0,5 incubados no shaker à 30°C, 150 rpm por 48 horas.

Após o crescimento, os isolados foram inoculados em erlenmeyers de 100mL (em duplicata) contendo 40mL de meio seletivo líquido, M1, M2 e M3, respectivamente, nos quais promovem o crescimento de determinado microorganismo em detrimento de outros, com pH 6,0 ± 0,5 incubados no shaker à 30°C, 150 rpm por 48 horas.

### Leitura e interpretação

Foi quantificado o crescimento bacteriano na presença dos metais pesados através do espectrofotômetro modelo Varian Cary 50 Proble “Figura 4”. Para este fim, foram colhidas alíquotas de 4mL por duplicata de cada erlenmeyer e transferida para uma cubeta, onde se realizou a leitura de cada isolado na absorbância de 550nm (ROSSI-ALVA, 2003).



**FIGURA 4.** Quantificação do crescimento bacteriano no espectrofotômetro.

## CONCLUSÃO

O protocolo proposto neste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA / UCSal), com o objetivo de isolar e selecionar bactérias capazes de crescer em meios com concentrações de até 10mM de metais pesados. Este protocolo mostrou-se eficiente para isolar e determinar o crescimento bacteriano em diferentes meios contendo metais pesados. Desta forma, este protocolo pode ser utilizado para pesquisas posteriores que envolvam o isolamento e a seleção de microorganismos com capacidade de crescer em diferentes concentrações de metais para ser usados com fins biotecnológicos, como na biorremediação de locais impactados por esses metais, assim como em estudos de enzimas e mecanismos de captação desses metais.

No presente trabalho foram isoladas e caracterizadas macroscópica e microscopicamente 03 linhagens bacterianas de bacilos Gram-negativos crescidos em três meios que contêm metais pesados (Pb, Zn e Cd). A heterogeneidade dos três isolados em relação ao crescimento foi bastante evidente quando analisada a sua tolerância para cada meio seletivo. Cada um mostrou diferentes graus de tolerância em cada metal testado, sendo que o **isolado 1** apresentou capacidade de crescimento maior no meio contendo Pb. Já o **isolado 3** foi capaz de crescer em meios com Zn e Cd, ressaltando ainda que o **isolado 2** foi o menos tolerante aos meios testados.

Faz-se necessária a continuidade do trabalho para avaliação de novas concentrações, utilizando também outros métodos para medir a capacidade de acumulação e/ou remoção desses metais pesados e o sistema de fixação dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ. Planta de situação do Loteamento de Praias do Flamengo. **PROJETO ALVAREZ E PONTUAL ARQUITETOS LTDA**. 1978. Escala 1:5000.
- AMIL Lagoas. 2005. Disponível em: <<http://www.amillagoas.com.br/>> Acesso em 05/05/05.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 14724**: informações e documentos: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.
- BAATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial process and population (a review). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 47, p. 335-379, 1989.
- BABICH, H.; STOTZY, G. Effects of cadmium on the biota: influence of environmental factors. **Adv. Appl. Microbiol**, San Diego, v. 23, p. 54-117, 1978.
- BARDGETT, R.D. et al. Impact of pasture contamination by copper, chromium, and arsenic timber preservative on soil microbial properties and nematodes. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v. 18, p.71-79, 1994.
- BETITOL, W.; FERNANDES, S. A. P. Efeito do lodo de esgoto na comunidade microbiana e atributos químicos do solo. **Embrapa**, Jaguariúna, nº. 24, p.1-6. 2004.
- BRANCO, S. M. **Poluição**: a morte de nossos rios, 2 ed. São Paulo: Ascetesp. 1983. 166p.



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB) **Qualidade das águas no Estado de São Paulo:** águas e energia elétrica, São Paulo, n. 14, p.11-22. 1988.

CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. M tolerance of isolates os *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolli* from soil contaminated by past applications of sewage sludge. **Soil Biololy and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p.83-88, 1992.

CONDER, Foto aérea da Lagoa de Praia do Flamengo. 2002. 1 fot., color. Fx14B. Escala 1:8000.

CORSEUIL, H. X. Limitações da biomassa autóctone na degradação de compostos tóxicos em subsolos. **Revista Bio**, v. 3, n. 2, p. 46-56, 1994.

CRAPEZ, M.A.C.; et al. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro v. 30, n. 179, 2002.

DEAN-ROSS, D.; MILLS, A.L. Bacterial community structure and functions along a heavy metal gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p.2002-2009, 1989.

DICK, R.P. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.L.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable enviroment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Soil Science Society of America Special Publication, 35).

DOELMAN, P.; et al. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p.177-184, 1994.

DOMSCH, K.H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, T.H. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Residue Reviews**, Berlin, v. 86, p.65-105, 1983.

FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G.Z. **Soil Bioremediation-state of the art**, p.09, 2003.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; McGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1389-1414, 1998.

GIUSQUIANI, P.L.; GICLIOTTI, BUSINELLI, D. Long-term effects of heavy metals from composted municipal waste on some enzyme activities in a cultivated soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p.257-262, 1994.

HASSEN, A.; et al. Mineralization of nitrogen in a clayey loamy soil amended with organic wastes enriched with Zn, Cu and Cd. **Bioresource Technology**, v. 64, p.39-45, 1998.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia Médica**. 14ed. México: Manual Moderna, 1992. 700p.

KLEIN, D.A.; THAYER, J.S. Interactions between soil microbial communities and organometallic compounds. In: BOLLAG, J.M.; STOTSKY, G. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.131-481 (Books in Soils, Plants, and the Environment, 6).

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, p.435-445, 1992.

MUNN, K. J.; EVANS, J.; CHALK, P. M. Mineralization of soil and legume nitrogen in soils treated with metal-contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p.2031-2043, 2000.

MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia Médica**. Espanha: Elsevier Science, 2002. 810p.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000. 165-181p.

PAIM, M. C.; da SILVA, M. M. Termo de Referência para a Recuperação Ambiental e para a futura Manutenção da Lagoa e de seu entorno – Lagoa de Praias do Flamengo. **CRA - Centro de Recursos Ambientais**. Disponível em <<http://www.portaldestella.com.br>>: Acesso em 28/05/05. 2005.

PONTES, W.L. **Mineralização de um biossólido industrial no solo e efeito desse na biomassa e atividade microbiana**. 2002. 73p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PORTO, R. La L. (org). Hidrologia ambiental. **Coleção ABRH de recursos Hídricos**, São Paulo, v. 3, p. 411. 1991.

PRATICUS.COM. **Mapa regional de Praia do Flamengo**. Disponível em <<http://www.praticus.com>>: Acesso em 06/06/05. 2005.

ROSSI-ALVA, J.C. **Estudo comparativo da atividade invertásica, do metabolismo do glicogênio e de proteínas de estresse em células de levedura livres e aprisionadas submetidas a estresse prolongado**. Tese de Doutorado em Bioquímica – UFRJ, (2003). 110p.

SIQUEIRA, J.O.; et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo; perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 142p. (EMBRAPA-CNPAF).

VERNIER, J. **O meio ambiente**. Campinas: Papius. 1994. p.132.

YATES, G.W.; et al. Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic timber preservative on soil biological activity. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 18, p.200-208, 1994.