



Avaliação da Atenuação Natural na Biorremediação de um Solo Contaminado por Metais Pesados

Felipe Bernardes Duarte Silva

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Prof. Selma Gomes Ferreira Leite, Dsc.

Pesquisadora Andréa Camardella de Lima Rizzo, Dsc.

Prof. Antonio Ballester Pérez, Dsc.

Julho de 2010

AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO NATURAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO POR METAIS PESADOS

Felipe Bernardes Duarte Silva

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Eliana Flávia C. Sérvulo, Dsc

Claudia Duarte da Cunha, Dsc

Luis Gonzaga Santos Sobral, Dsc

Orientado por:

Selma Gomes Ferreira Leite, Dsc

Andréa Camardella de Lima Rizzo, Dsc

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Julho de 2010

Duarte Silva, Felipe Bernardes.

Avaliação da atenuação natural na biorremediação de um solo contaminado por metais pesados / Felipe Bernardes Duarte Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

xii, 41 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.
Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Andréa Camardella de Lima Rizzo e Antonio Ballester Pérez.

1. Atenuação natural. 2. Metais pesados. 3. Biorremediação. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Selma Gomes Ferreira Leite e Andréa Camardella de Lima Rizzo e Antonio Ballester Pérez I. Título.

Aos meus pais, sempre presentes e entusiastas dessa caminhada; aos meus avós, sempre carinhosos e encorajadores; e aos amigos do peito, sempre companheiros.

“Se em algum momento você duvidar que pode alcançar o sucesso na vida a partir de um pequeno começo, lembre-se que até mesmo a mais alta e imponente árvore começou como uma semente abandonada no solo.”

Robert S. S. Baden Powell

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, Avós, Tios e Primos que sempre me incentivaram e dedicaram parte de suas vidas acreditando e apoiando todas as iniciativas que me levaram a chegar com muito êxito até esse momento.

Aos meus professores de toda a vida, em especial àqueles da Escola Técnica Federal de Química, que foram os principais responsáveis por despertar a paixão pela carreira que escolhi.

Ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), por ter me proporcionado um aprendizado enorme, em especial a Andrea Rizzo, Ronaldo Santos e Luis Sobral, que tiveram participação determinante ao abrirem as “portas do mundo” para mim.

A Universidad Complutense de Madrid (UCM), especialmente aos Professores Antonio Ballester e Jesús Muñoz, que me ofereceram todo o conhecimento, estrutura, atenção e carinho enquanto estive “longe de casa”.

A Escola de Química, minha casa durante todos esses anos, e a minha orientadora Professora Selma Gomes Ferreira Leite, paciente e atenciosa durante todos os momentos.

Aos amigos, Denner, Rodnei, Michel, Biato, Leandro, Thiago “Gaguinho”, Juliana, Rafinha, Raphael “Papagaio”, Tairi, Teco, Marcelo, Diogo, Marcos, Miguel, Maurício, Pedro, Santí, Dinora, Acácia, Bianca, Renata, Luiza, Anquizes, Augusto, Elza e Felipe, por serem sempre um ponto de apoio e um porto seguro nas horas difíceis. Em especial a Camila, companheira sempre presente ao longo de todos esses anos.

Finalmente, ao apoio financeiro do CNPQ e do Programa Alfa da União Européia, que colaboraram significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO NATURAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO POR METAIS PESADOS

Felipe Bernardes Duarte Silva
Julho, 2010

Orientadores: Prof. Selma Gomes Ferreira Leite, Dsc.
Andrea Camardella de Lima Rizzo, Dsc.
Antonio Ballester Pérez, Dsc.

O Distrito de Mineração de Cartagena, localizado na região de Murcia, Sul da Espanha, foi uma importante área de mineração durante mais de 2000 anos. O resultado dessa longa atividade mineradora foi a contaminação do solo local com metais pesados como Fe, Zn e Pb. O objetivo deste projeto foi estudar a atenuação natural em curso neste solo, com especial atenção aos processos de biolixiviação e a bioprecipitação causados respectivamente por populações de Bacterias Oxidantes (de Ferro e de Enxofre) e por Bacterias Redutoras de Sulfato. A metodologia de extração seqüencial foi utilizada para quantificar a mobilidade dos metais estudados ao longo de 6 diferentes frações do solo: intercambiável, orgânica, carbonatos, hidróxidos, sulfetos e residual, além da análise do percentual de metais em solução. Através dos resultados alcançados é possível concluir que os metais Fe e Pb estão imobilizado de forma estável no solo. Por outro lado, o Zn apresentou-se como o metal de maior interesse ambiental, tendo sido biolixiviado em até 42%. O estudo também concluiu que o pH do solo é determinante para a bioprecipitação dos metais e sua conseqüente imobilização na matriz do solo, uma vez que este parâmetro tem papel decisivo no metabolismo das bactérias redutoras de sulfato, responsáveis por este processo.

Abstract of a Final Project presented to Escola de Química/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Chemical Engineer.

NATURAL ATTENUATION ASSESSMENT IN THE BIOREMEDIATION OF A SOIL CONTAMINATED BY HEAVY METALS

Felipe Bernardes Duarte Silva
July, 2010

Supervisors: Prof. Selma Gomes Ferreira Leite, Dsc.
Andrea Camardella de Lima Rizzo, Dsc.
Antonio Ballester Pérez, Dsc

The Cartagena Mining District, located at Murcia region (south of Spain), was an important area of mining activity during more than 2000 years. The result of this long mining period was the contamination of the soil by heavy metals such as Fe, Zn and Pb. The objective of this project was assess the natural attenuation being carried on at this place, with special attention to the bioleaching and bioprecipitation processes, governed respectively by the populations of Oxidant Bacteria (Iron and Sulfur) and Sulfate Reducing Bacteria. A sequential extraction method was used to quantify the metal's mobility between 6 different soil fractions: exchangeable, organic, carbonates, hydroxides, sulfides and residual, besides the percentage analysis of dissolved metals in solution. According to the results, it is possible to conclude that the metals Fe and Pb are immobilized and stable at the soil. In the other hand, Zn was determined as having the major environmental interest, being bioleached in up to 42%. The assessment also concluded that the soil pH is determinant to the bioprecipitation of metals and the consequent immobilization at the soil matrix, once this parameter has a decisive role at the sulfate reducing bacteria metabolism, responsible by this process.

ÍNDICE

I. Introdução	1
II. Revisão Bibliográfica	2
<i>II.1 Contaminação ambiental por hidrocarbonetos e metais pesados</i>	2
<i>II.2 Remediação de solos contaminados com metais</i>	3
<i>II.3 Atividade microbiana na remediação de solos contaminados com metais</i>	4
<i>II.4 Métodos empregados na localização/disponibilidade dos metais nos solos</i>	6
IV. Objetivo	7
<i>IV.1 Geral</i>	7
<i>IV.2 Específico</i>	7
V. Materiais e Métodos	7
<i>V.1 Local de amostragem</i>	7
<i>V.2 Solo</i>	8
<i>V.3 Microorganismos</i>	8
V.3.1 Bactérias Oxidantes de Ferro (BOF)	8
V.3.2 Bactérias Oxidantes de Enxofre (BOS)	9
V.3.3 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	9
<i>V.4 Microcosmos</i>	10
V.4.1 Microcosmos Aeróbicos	10
V.4.2 Microcosmos Anaeróbicos	11
<i>V.5 Metodologia do Ensaio</i>	12
<i>V.6 Monitoramento e Análises</i>	13
V.6.1 Contagem de Microorganismos	13
V.6.2 pH e Potencial Redox	14
V.6.3 Concentração de Sulfato	14
V.6.4 Metodologia de Extração Seqüencial	15
V.6.5 Determinação da concentração de metais pesados	15
VI. Resultados e Discussão	15
<i>VI.1 Contagem de Microorganismos</i>	15
VI.1.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A	16
VI.1.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B	17
VI.1.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos	18
<i>VI.2 pH e Potencial Redox</i>	18
VI.2.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A	19
VI.2.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B	20
VI.2.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos	21
<i>VI.3 Concentração de Sulfato</i>	23

VI.3.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A	23
VI.3.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B	24
VI.3.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos	26
<i>VI.4 Extração Sequencial</i>	27
VI.4.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A	27
VI.4.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B	30
VI.4.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos.	32
<i>VI.4.3.1 Microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico.</i>	32
<i>VI.4.3.2 Microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.</i>	34
<i>VI.4.3.3 Microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico.</i>	36
VII. Conclusões	37
VIII. Referências Bibliográficas	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frasco de 100ml utilizado na confecção dos microcosmos anaeróbicos.	11
Figura 2. Câmara de Thoma	13
Figura 3. Típica Curva Padrão de SO_4^{2-} , obtida durante o projeto.	14
Figura 4. Contagem de Microorganismos em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	16
Figura 5. Contagem de Microorganismos em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	17
Figura 6. Contagem de Microorganismos em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.	18
Figura 7. Resultados de pH em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	19
Figura 8. Resultados de Potencial Redox em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	19
Figura 9. Resultados de pH em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.	20
Figura 10. Resultados de Potencial Redox em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.	21
Figura 11. Resultados de pH em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.	22
Figura 12. Resultados de Potencial Redox em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.	22
Figura 13. Concentração de Sulfato x Tempo em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	23
Figura 14. Concentração de Sulfato x Tempo em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.	25
Figura 15. Concentração de Sulfato x Tempo em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.	26
Figura 16. Distribuição de Fe, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	28
Figura 17. Distribuição de Zn, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.	28
Figura 18. Distribuição de Pb, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A	28
Figura 19. Distribuição de Fe, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B	30
Figura 20. Distribuição de Zn, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.	30
Figura 21. Distribuição de Pb, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B	31
Figura 22. Distribuição de Fe, em microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico	33

Figura 23. Distribuição de Zn, em microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico.	33
Figura 24. Distribuição de Pb, em microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico	33
Figura 25. Distribuição de Fe, em microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico	35
Figura 26. Distribuição de Zn, em microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.	35
Figura 27. Distribuição de Pb, em microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.	35
Figura 28. Distribuição de Fe, em microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico	36
Figura 29. Distribuição de Zn, em microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico	36
Figura 30. Distribuição de Pb, em microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico.	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização físico-química das amostras de solo	8
Tabela 2. Composição do Meio Nutriente OK modificado, utilizado no desenvolvimento de cultura mista de bactérias oxidantes de ferro (BOF)	9
Tabela 3. Composição do Meio Nutriente OK modificado, adicionado de enxofre elementar, utilizado no desenvolvimento de cultura mista de bactérias oxidantes de enxofre (BOS)	9
Tabela 4. Composição do Meio Nutriente Postgate C, utilizado no desenvolvimento de cultura mista de bactérias redutoras de sulfato (BRS)	10
Tabela 5. Microcosmos e condições estudados aerobicamente	11
Tabela 6. Microcosmos e condições estudados anaerobicamente	12
Tabela 7. Microcosmos e condições estudados anaerobicamente após serem estudados aerobicamente	13
Tabela 8. Metodologia de Extração Seqüencial.	15

I. Introdução

O debate e a preocupação em torno da questão ambiental são uma realidade no mundo moderno. O conhecimento e a conscientização da população mundial avançaram de tal forma que não é mais possível ignorar ou deixar de buscar novas soluções para a prevenção e a remediação de desastres ambientais, que são a cada dia de maiores proporções.

Além de olhar para o futuro, também se faz necessário buscar soluções para atividades, hábitos e passivos que já existem ou que já são conhecidos a muito tempo. A mineração, a exploração de petróleo, o uso de seus derivados, são alguns exemplos de atividades que geraram e continuam gerando grandes impactos ao ambiente.

O acúmulo de metais pesados surge como um ponto em comum a essas atividades, e se torna uma das principais preocupações visto seu alto potencial contaminante e as consequências que pode causar.

A busca por essas soluções enfrenta algumas barreiras que nem sempre são tecnológicas, mas muitas vezes econômicas.

É neste cenário que a utilização de tecnologias “bio” como por exemplo a aplicação de técnicas que utilizam a ação de microorganismos surge como uma interessante alternativa dada sua tendência a apresentar menores custos, além de representar o mecanismo usado pelo ambiente para sua auto recuperação.

Nesse estudo, avaliou-se a atenuação natural realizada através da população de microorganismos presentes em um solo contaminado por metais pesados, resultado de anos de atividade mineradora na região de Múrcia, na Espanha.

Parte da pesquisa foi desenvolvida na Universidad Complutense de Madrid, e a conclusão do trabalho, realizada em parceria entre o Centro de Tecnologia Mineral e a Universidade Federal do Rio de Janeiro.

II. Revisão Bibliográfica

II.1 Contaminação ambiental por hidrocarbonetos e metais pesados

O acelerado crescimento mundial tem proporcionado amplo desenvolvimento de diversas indústrias e atividades produtivas, as quais nem sempre tem a oportunidade de expandirem seus negócios de forma sustentável à saúde e ao meio ambiente, dada a velocidade de resposta exigida pelos dias atuais.

Um exemplo é a expansão da indústria de petróleo e do mercado de seus subprodutos, que resulta potencialmente na poluição do meio ambiente devido aos derrames / vazamentos de óleo provenientes de tanques, caminhões e resíduos. O efeito desta poluição no meio ambiente, afetando seres humanos, vida selvagem, vida aquática, colheitas e solo tem sido enormes. A exploração e o desenvolvimento petrolífero também podem gerar grandes quantidades de resíduos gasosos, líquidos e sólidos perigosos que causam fortes impactos ambientais. Os resíduos gerados na indústria do petróleo causam grande perigo a saúde humana e animal quando não são biodegradáveis, podendo por exemplo permanecer muitos anos no solo e poluir recursos hídricos (Gondal et al., 2006).

Operações de mineração e moagem, incluindo a trituração, concentração de minérios e eliminação dos rejeitos, bem como os efluentes de minas e usinas, são outro exemplo de fontes de contaminação para o ambiente (Adriano et al., 2001). Tanto no passado como nos dias atuais, as atividades mineradoras representam uma importante fonte de poluição uma vez que elementos traço são introduzidos nos sistemas atmosférico, terrestre e aquático (Moore e Luoma, 1990).

Altas concentrações de metal, sulfato e outros sais, estão frequentemente presentes em efluentes gerados pela indústria petroquímica, processamento de metais e operações de mineração (Jong et al., 2006).

Em operações de mineração, Ramos et al. 2002 e Álvarez-Rogel et al. 2004, registraram alta contaminação de solos por Pb, Cu e Zn, como consequência da disposição inadequada de rejeitos (Ramos et al., 2002; Álvarez-Rogel et al., 2004).

Na indústria petroquímica, elementos traço ocorrem em óleo cru parcialmente como compostos organometálicos, de maneira que V, Ni, Cu, e Zn já foram

identificados. A contaminação de Fe causada por óleo também já foi descrita anteriormente (Gondal et al., 2006).

Obiajunwa et al. 2002, registraram o enriquecimento do solo e sedimentos com metais pesados como Pb e Fe, como resultado de exploração também de óleo cru.

Além disso, serviços automotivos criam um ambiente com forte potencial para acúmulo de metais pesados. Homady et al. 2002, encontraram aumentos significativos na quantidade de Fe, Cu, Pb, Zn, entre outros, em estudos realizados no solo de unidades que atuam em alguns serviços automotivos como: mecânica, troca de óleo, borracheiro, e lava-jatos. Segundo o estudo, a principal causa da presença desses elementos é a corrosão de componentes dos veículos e os resíduos de produtos do petróleo.

A extensão e o grau de contaminação por metais pesados no solo nas proximidades de minas pode variar em função de características geoquímicas, da mineralização dos rejeitos (Jung et al., 2001), de condições físico-químicas (Blowes e Jambor, 1990; Johnson et al., 2000) e do processo utilizado para extração dos metais.

Com todos esses fatores, a ausência de gerenciamento dos resíduos ou a incompleta remoção de metais pesados nas estações de tratamento favorece o retorno desses metais para o meio ambiente aonde eles podem não ser biodegradados, seguindo diferentes rotas, como: entrar no curso de rios e lagos, lixiviar através da superfície e lençóis freáticos ou até ser absorvido por componentes do solo (Mulligan et al., 2001).

II.2 Remediação de solos contaminados com metais

Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para a descontaminação e remediação de solos contaminados por metais, que se baseiam em processos *In-Situ* e/ou *Ex-Situ* (Lavagem de Solos, Separação Física, Fitorremediação, Lixiviação, etc) e que muitas vezes envolvem processos para imobilização dos contaminantes afim de minimizar sua liberação ao ambiente.

A escolha da técnica a ser utilizada varia em função do uso previsto para a área a ser remediada (uso industrial ou público), e também em função de considerações técnicas, econômicas e até relacionadas a legislação vigente no local (Ciccu et al., 2002).

Em particular aonde a descontaminação se prove economicamente inviável devido a natureza do material ou até mesmo da quantidade de material a ser remediado, técnicas de imobilização tornam-se atrativas.

Técnicas de remediação *In-Situ* vêm sendo desenvolvidas para solos contaminados por metais que consistem na adição de compostos químicos ao solo com o objetivo de reduzir a solubilidade dos metais através de adsorção e/ou precipitação e conseqüentemente sua mobilidade, evitando assim, que atinjam lençóis freáticos (McGowen et al., 2001).

Metais podem estar presentes em diferentes formas no meio ambiente, onde podem se transformar de uma forma para outra, ou ainda existir em formas distintas simultaneamente. A forma ou “especiação química” dos metais varia amplamente dependendo das condições ambientais. Essas diferenças na especiação química afetam a biodisponibilidade e o risco que esses metais oferecem ao ambiente. O conhecimento da especiação dos metais colabora na avaliação de mobilidade, isto é, na avaliação de retenção desses metais ao solo e o quão fácil é para que eles se solubilizem (Martínez-Sánchez et al., 2008).

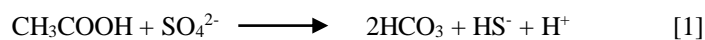
O solo da crosta terrestre contém muitos tipos diferentes de microorganismos incluindo bactérias autotróficas e heterotróficas, fungos e outros responsáveis por diversas reações bioquímicas e geoquímicas como oxidação-redução, complexação e precipitação. A geração de ácidos inorgânicos e orgânicos por esses microorganismos possibilita a dissolução de íons metálicos e conseqüentemente seu transporte até os lençóis freáticos (Kuyucak, 2002; Natarajan et al., 2006). Por esse motivo, a atenuação natural do solo pode representar um risco dada essas transformações que ocorrem naturalmente.

II.3 Atividade microbiana na remediação de solos contaminados com metais

II.3.1 Bactérias Sulfato-Redutoras

Bactérias sulfato-redutoras (BRS), são consideradas um tipo importante de microorganismo em sistemas de biorremediação (Kolmert et al., 2000). As BRS utilizam íons sulfato como aceptores de elétrons no metabolismo de substratos orgânicos (Utgikar et al., 2002) e inorgânicos (Van Houten et al., 1994), produzindo

íons sulfeto que por sua vez reagem rapidamente com a maioria dos metais dissolvidos, precipitando assim sulfetos metálicos como descrito nas seguintes reações:



Por essa razão, esse tipo de bactéria é amplamente utilizado no tratamento de locais contaminados com metais e sulfatos (Jong and Parry, 2006). Além disso, a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em condições redutoras de sulfato e de ferro, já foi reportada na literatura (Boopathy, 2003).

II.3.2 Bactérias Oxidantes de Enxofre

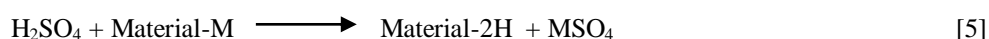
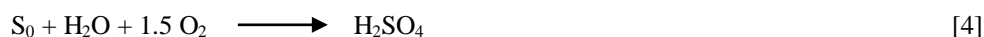
Bactérias Oxidantes de Enxofre (BOS), podem suportar condições extremas que existem em soluções concentradas de metais pesados. Podem catalizar a oxidação de enxofre elementar ou de compostos de enxofre reduzido, produzindo ácido sulfúrico, obtendo energia do processo de oxidação. Esse processo causa a acidificação do meio e a consequente solubilização dos metais pesados (Rulkens et al., 1995).

As atividades de oxidação e de produção ácida das BOS, são o primeiro estágio na solubilização de metais pesados no processo de biolixiviação. O mecanismo de biolixiviação das BOS pode ser direto ou indireto, conforme as reações descritas a seguir (Rulkens et al., 1995):

Mecanismo direto:



Mecanismo indireto:

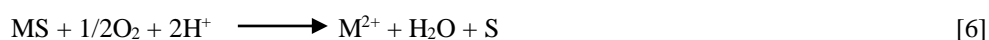


II.3.3 Bactérias Oxidantes de Ferro

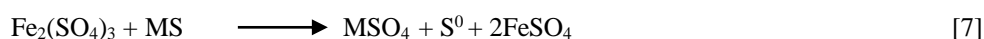
Enquanto isso, Bactérias Oxidantes de Ferro (BOF) obtêm energia da oxidação de íons ferrosos, sulfetos metálicos, outros compostos contendo enxofre reduzido ou outras substâncias inorgânicas (Lilova et al., 2005).

Tal como para as BOS, existem 2 mecanismos principais utilizados para explicar o processo de oxidação de sulfetos metálicos por BOF, o direto e o indireto (Sand et al., 2001):

Mecanismo direto:



Mecanismo indireto:



II.4 Métodos empregados na localização/disponibilidade dos metais nos solos

A toxicidade dos metais depende de sua especiação no solo (Zhang et al., 2001). Extrações feitas no solo com água, soluções diluídas de sais ou agentes quelantes podem, de forma aproximada, prever em quais frações do solo os metais estão disponíveis para captação por vegetais (Ernst, 1996). As extrações podem ser classificadas como simples ou sequenciais (Rauret, 1998).

Extrações simples consistem em uma técnica com o objetivo de solubilizar determinados componentes através de uma única etapa de solubilização. Por outro lado, extrações sequenciais consistem numa série de etapas nas quais substâncias extratoras com potencial de solubilização cada vez maiores são aplicadas sucessivamente para avaliar que proporção de cada metal está associada a determinado componente do solo (Tessier et al., 1979; Zeien e Brümmer, 1989).

Além disso, essas metodologias podem revelar informações a respeito da natureza dos compostos formados durante a bioprecipitação in-situ, assim como sobre as principais ligações metálicas presentes, a estabilidade das ligações entre metal e partículas do solo e a distribuição de elementos traço nas diferentes frações do solo. Esse é um meio de aumentar o conhecimento de processos geoquímicos que governam a imobilização de metais pesados durante a bioprecipitação in-situ (Van Roy et al., 2006).

Diversos autores aplicaram técnicas de extração sequencial em solos altamente contaminados por metais pesados (Gómez-Ariza et al, 1999; Fanfani et al., 1997).

III. Justificativa

O Distrito de Mineração de Cartagena-La Union foi uma importante área de mineração durante mais de 2000 anos até que as atividades foram encerradas em 1991. Os metais foram extraídos de sulfetos minerais e até pouco tempo mais de 40 pilhas de rejeitos cobriam aproximadamente 160 ha neste local (Martínez-Orozco et al., 1993).

Portanto, pelas razões expostas anteriormente dos riscos ambientais causados pela presença de metais, neste projeto foi estudada a avaliação da possibilidade de atenuação deste solo por atividade microbiana.

IV. Objetivo

IV.1 Geral

Avaliar o processo de atenuação natural de um solo contaminado por metais pesados, através das transformações causadas pela microbiota nativa, em especial BOF, BOS e BRS.

IV.2 Específico

Avaliar de que maneira essas populações de microorganismos atuam na distribuição dos metais pesados Fe, Zn e Pb ao longo das diferentes frações (intercambiável, orgânica, carbonatos, hidróxidos, sulfetos e residual) deste solo, em diferentes condições ambientais e sob distintas condições de bioestímulo.

V. Materiais e Métodos

V.1 Local de amostragem

O Distrito de Mineração de Cartagena – La Union fica localizado na região de Murcia, Sul da Espanha. A área do Distrito é de aproximadamente 50 km² e inclui 5 cidades com uma população total de 20.000 habitantes. O clima é tipicamente mediterrâneo com uma média de precipitações de 250-300 mm/ano, concentrados na primavera e outono. A média anual de temperatura é de 18 °C. A topografia e o clima

semi-árido resulta numa hidrologia caracterizada por curtos rios (< 20km de extensão), de fluxo intermitente e rápida vazão o que facilita a erosão (Conesa et al, 2008).

V.2 Solo

As duas amostras de solo utilizadas neste estudo foram coletadas em diferentes pontos do Distrito de Mineração de Cartagena, de maneira que enquanto a amostra A apresenta destacada contaminação por Fe e SO_4^- , além do pH ácido, a amostra B apresenta maiores teores de Zn e Pb, e pH básico.

A caracterização físico-química dessas amostras, realizada por extração sequencial está descrita na Tabela 1. Esses dados se referem ao somatório do teor total dos metais em cada fração do solo extraída, com exceção da quantidade retida no resíduo resultante do último ataque (fração residual). Por essa razão, esses valores são menores do que os que seriam obtidos por análise química.

Tabela 1. Caracterização físico-química das amostras de solo

Solo	pH	Fe (%)	Zn (%)	Pb (%)	SO_4^- (g/g solo)
Solo A	3.34	13.85	0.29	0.11	0.065
Solo B	8.00	4.78	0.57	0.38	0.008

V.3 Microorganismos

Para a condução dos ensaios em microcosmos procedeu-se a etapa preliminar de extração de microorganismos presentes no próprio solo contaminado com metais. Em função de apresentar as características mais críticas como contaminação e pH, o Solo A foi escolhido para esse procedimento.

V.3.1 Bactérias Oxidantes de Ferro (BOF)

A cultura mista de BOF foi incubada por 10 dias em agitador orbital Selecta Autotester-E a 30 °C, utilizando erlenmeyers contendo 10g de amostra de Solo A (solo com alto teor de Fe) em 90 ml de meio nutriente OK modificado (Livre de Fe) (Núñez e Touchaleaume, 2006), conforme pode ser visto na Tabela 2:

Tabela 2. Composição do Meio Nutriente OK modificado, utilizado no desenvolvimento de cultura mista de bactérias oxidantes de ferro (BOF)

Componente	Concentração (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00
K_2HPO_4	0.50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50

V.3.2 Bactérias Oxidantes de Enxofre (BOS)

Assim como as BOF, a cultura mista de BOS foi incubada por 10 dias em agitador orbital Selecta Autotester-E a 30 °C, utilizando erlenmeyers contendo 10g de amostra de Solo A em 90 ml do mesmo meio nutriente utilizados para as BOF (Tabela 3), porém com a adição de 10 g/L de enxofre elementar (Núñez e Touchaleaume, 2006).

Tabela 3. Composição do Meio Nutriente OK modificado, adicionado de enxofre elementar, utilizado no desenvolvimento de cultura mista de bactérias oxidantes de enxofre (BOS)

Componente	Concentração (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00
K_2HPO_4	0.50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50
S elementar	10.00

V.3.3 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

A cultura mista de BRS foi obtida por incubação de 10g de amostra de solo A em 90 ml do meio nutriente Postgate C (ASTM D 4412-84), conforme pode ser visto na Tabela 4. Os frascos foram incubados sob condições estritamente anaeróbicas, durante 1 semana.

Tabela 4. Composição do Meio Nutriente Postgate C, utilizado no desenvolvimento de cultura mista de bactérias redutoras de sulfato (BRS)

Componente	Concentração (g/L)
K_2HPO_4	0.50
NH_4Cl	1.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.06
Lactato de Sódio 70%	3.50
Extrato de leveduras	1.00
$CaSO_4$	1.00
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01
Na_2SO_4	4.50
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.06
Citrato de sódio	0.30

Antes do início dos testes, todos os cultivos foram observados utilizando um microscópio óptico Olympus BX 40, afim de observar a presença da população bacteriana.

V.4 Microcosmos

Os testes foram conduzidos através de microcosmos confeccionados de acordo com as especificidades de cada população microbiana.

V.4.1 Microcosmos Aeróbicos

Os ensaios com microcosmos aeróbicos foram conduzidos em erlenmeyers de 250ml com tampas de algodão, e utilizou-se água deionizada como meio, em substituição ao meio nutriente no qual a cultura de BOF e/ou BOS foi desenvolvida, além da adição de solo, equivalente a 10% p/v. Neste teste, somente o Solo A foi utilizado e não foi esterilizado afim de manter a microbiota nativa do solo ativa.

Os microcosmos foram incubados em agitador orbital Selecta Autotester-E, a 150 rpm e 30 °C durante 31 dias, e sempre em duplicada.

Foram estudadas três condições diferentes em relação ao inóculo:

- Inóculo de BOF
- Inóculo de BOS
- Inóculo misto de BOF e BOS

Em todos os casos, o inóculo (bioaument) representou 10% do volume total no microcosmo.

A tabela abaixo mostra a relação dos microcosmos aeróbicos confeccionados e estudados:

Tabela 5. Microcosmos e condições estudados aerobicamente

Microcosmo	Solo	BOF	BOS
BOF 1	A	+	-
BOF 2	A	+	-
BOS 1	A	-	+
BOS 2	A	-	+
BOF/BOS 1	A	+	+
BOF/BOS 2	A	+	+

V.4.2 Microcosmos Anaeróbicos

Para manutenção da condição estritamente anaeróbica, necessária para o desenvolvimento da população de BRS, os ensaios com microcosmos anaeróbicos foram conduzidos em frascos de 100 ml com tampas de plástico que contam com uma membrana de silicone para tomada de amostras, conforme Figura 1:



Figura 1. Frasco de 100ml utilizado na confecção dos microcosmos anaeróbicos.

Para essa série de ensaios, foi utilizado 100ml do meio nutriente Postgate C, previamente esterilizado, relação entre solo/líquido de 10% p/v e o inóculo (bioaument), quando realizado, representou 10% do volume total no microcosmo. As amostras de solo não foram esterilizadas afim de manter a microbiota nativa do solo ativa.

Em alguns microcosmos, o solo teve sua acidez previamente neutralizada, através da “lavagem” do solo com água deionizada a pH 7. Após esse procedimento, o solo foi filtrado e seco a temperatura ambiente.

Ainda, em 1 dos microcosmos confeccionados foi adicionado 0,02 g/L de ácido ascórbico, como uma forma de testar a capacidade que essa substância tem de manter as condições anaeróbicas no sistema de forma mais eficiente (Postgate J.R., 1951).

Dessa forma, as seguintes variáveis foram testadas:

- Solo (A ou B)
- Neutralização da acidez do solo (Realizada ou não)
- Inocúlo (bioaumento) de BRS (Realizado ou não)
- Adição de Ácido Ascórbico (Realizada ou não)

Os microcosmos foram incubados e mantidos em agitador orbital Selecta Autotester-E, a 150 rpm e 30 °C durante 31 dias.

A tabela abaixo mostra a relação dos microcosmos anaeróbicos confeccionados e estudados:

Tabela 6. Microcosmos e condições estudados anaerobicamente

Microcosmo	Solo	Neutralização	Inocúlo	Ácido Ascórbico
BRS A 1	A	+	-	-
BRS A 2	A	+	+	-
BRS A 2*	A	+	+	+
BRS A 3	A	-	+	-
BRS B 1	B	+	-	-
BRS B 2	B	+	+	-
BRS B 3	B	-	+	-

* Microcosmo idêntico ao BRS A2, porém com adição de ácido ascórbico

V.5 Metodologia do Ensaio

Após os períodos de incubação dos microcosmos aeróbicos e anaeróbicos, foi realizada, com auxílio de papel de filtro, uma separação sólido/líquido por gravidade, e o líquido filtrado foi analisado por Absorção Atômica. O solo foi seco a temperatura ambiente no próprio papel de filtro e então analisado seguindo o procedimento de extração sequencial descrito a seguir.

A exceção é em relação as duplicadas identificadas com o número “2” de cada microcosmo aeróbico confeccionado, que após o período de incubação e após a separação descrita acima, tiveram o solo encaminhado para um novo microcosmo, dessa

vez anaeróbico, seguindo todos os padrões detalhados anteriormente para essas condições.

Dessa forma, além dos microcosmos já apresentados anteriormente, tem-se (Tabela 7) também a seguinte configuração para essa nova série de ensaios:

Tabela 7. Microcosmos e condições estudados anaerobicamente após serem estudados aerobicamente

Microcosmo	Solo	Neutralização	Inóculo	Ácido Ascórbico
BOF 2	A	-	+	-
BOS 2	A	-	+	-
BOF/BOS 2	A	-	+	-

V.6 Monitoramento e Análises

V.6.1 Contagem de Microorganismos

Em função das condições para o desenvolvimento da população bacteriana serem mais críticas, a contagem de microorganismos foi realizada apenas nos microcosmos anaeróbicos, utilizando a metodologia da câmara de Thoma (Figura 2).

Essa metodologia consiste na contagem de células através de uma observação direta em microscópio. Para isso, retira-se o microcosmo da agitação por 15 minutos, afim de sedimentar os sólidos presentes no meio, e toma-se uma alíquota de 0,5 ml que é colocada na câmara para observação ao microscópio. A contagem é feita com base na observação de pequenos quadros que compõe a câmara.

Para os microcosmos aeróbicos, os meios foram observados em microscópio a cada 10 dias, apenas para verificar a presença das bactérias, uma vez que já se conhecia seu comportamento nessas condições (Núñez e Touchaleaume, 2006)

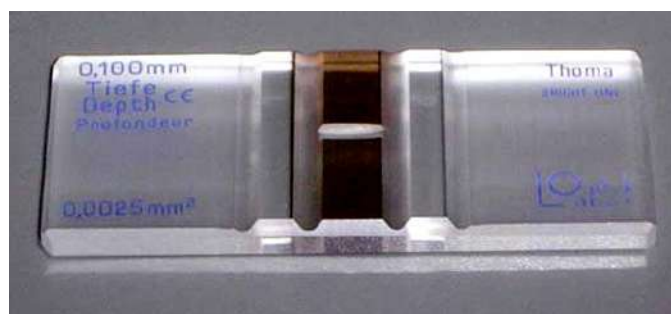


Figura 2. Câmara de Thoma

V.6.2 pH e Potencial Redox

Em função das BRS apresentarem maior sensibilidade ao pH, o acompanhamento do pH e o do potencial redox, importante parâmetro para acompanhamento da redução de sulfato, foi realizado apenas nos microcosmos anaeróbicos. Amostras de 5mL foram retiradas desses microcosmos com auxílio de uma seringa, e um pHmetro CRISON modelo Basic 20, equipado com um eletrodo Ag/AgCl foi utilizado.

V.6.3 Concentração de Sulfato

A concentração de sulfato nos microcosmos anaeróbicos foi monitorada através de dois métodos diferentes: gravimétrico e turbidimétrico.

Para cada microcosmo, a concentração inicial e final de sulfato foi determinada gravimetricamente (García, 1998), metodologia mais sensível e exata.

Além disso, o acompanhamento da concentração de sulfato durante o ensaio, foi realizado turbidimetricamente (Kolmert et al., 2000), através da mistura, durante 30 segundos, de 1mL de amostra do microcosmo, 1mL de uma solução condicionante (150 g NaCl, 100 mL glicerol, 60 mL HCl concentrado e 200 mL etanol 95%, avolumando com água deionizada até 1 L) e aproximadamente 60 mg de BaCl₂. Feito isso, a mistura é colocada em uma cubeta e a absorbância é medida em 420 nm. A concentração é determinada através de uma curva padrão obtida utilizando Na₂SO₄ como padrão de sulfato. A Figura 3, apresenta uma típica curva padrão obtida durante o projeto.

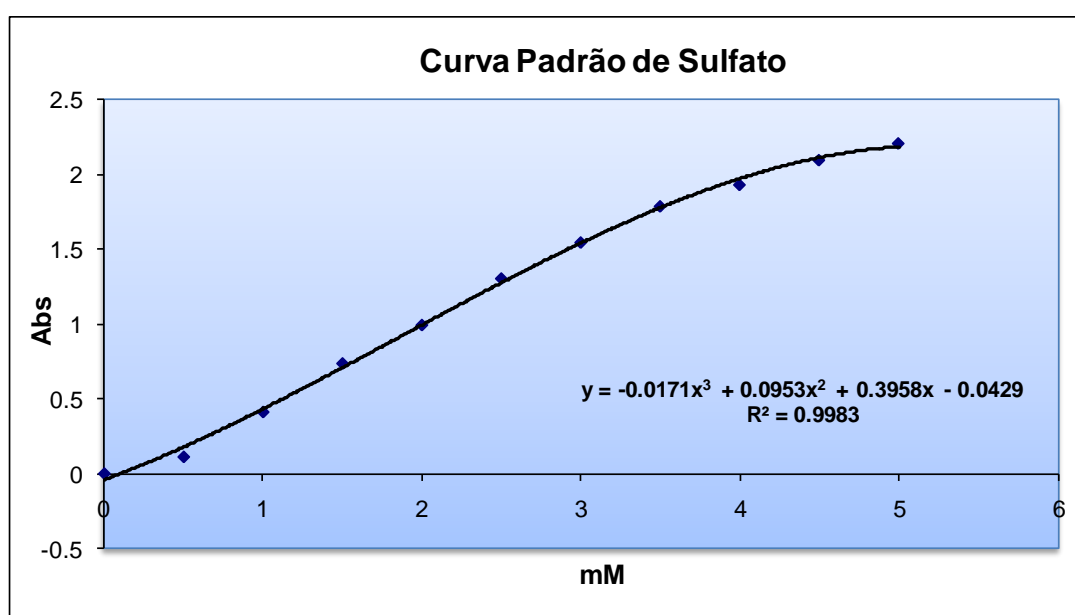


Figura 3. Típica Curva Padrão de SO₄⁼, obtida durante o projeto.

V.6.4 Metodologia de Extração Sequencial

A distribuição dos metais pesados foi avaliada em todas as amostras de solo, utilizado a metodologia de extração sequencial proposta pela USEPA (*United States Environmental Protection Agency*), modificada apenas para a extração da fração residual, que foi feita com uma solução de Água Régia e Ácido Fluorídrico (HF) (Sánchez et al., 1994).

A metodologia de extração sequencial consiste basicamente em “digerir” a amostra de solo com diferentes soluções, por determinados períodos de tempo e sob diferentes condições de temperatura, seguindo um passo em seqüência do outro, no total de 6, conforme detalhado na Tabela 8 :

Tabela 8. Metodologia de Extração Sequencial.

Fração	Reagente	Duração do Ataque	Temperatura
Intercambiável	MgCl ₂ 1M	1 hora	ambiente
Orgânica	NaOCl 5%	1 hora	ambiente
Carbonatos	NaOAc 1M em HOAc 25%	2 horas	ambiente
Hidróxidos	(NH ₃ OH)Cl 0,1M em HNO ₃	1 hora	ambiente
Sulfetos	HNO ₃ 4M	1 hora	95 °C
Residual	HNO ₃ -HCl-HF	24 horas	ambiente

A cada digestão realizada, a amostra de solo é filtrada e seca a temperatura ambiente e a solução filtrada contém os metais pesados na fração correspondente a etapa realizada. Após esse procedimento o solo passa para a etapa seguinte.

V.6.5 Determinação da concentração de metais pesados

Como cada etapa da extração sequencial gera uma solução correspondente, cada microcosmo estudado produz um total de 6 soluções diferentes, uma correspondente a cada fração do solo.

A concentração de Fe, Zn e Pb, para cada uma dessas soluções foi então determinada por absorção atômica, utilizado um equipamento Perkin-Elmer 1100 B.

VI. Resultados e Discussão

VI.1 Contagem de Microorganismos

A contagem de microorganismos nos microcosmos anaeróbicos foi realizada 4 vezes durante os 31 dias de estudo.

Os resultados estão apresentados por grupos de ensaio:

VI.1.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A

Os resultados da contagem de microorganismos nos microcosmos anaeróbicos confeccionados com amostras do Solo A estão apresentados na Figura 4:

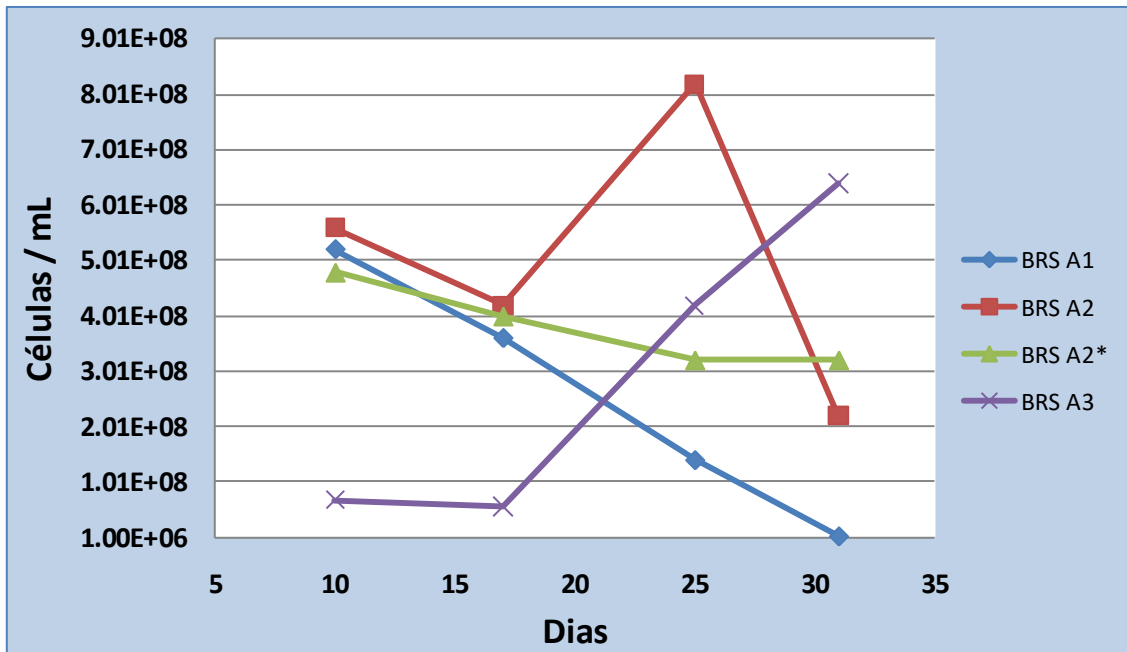


Figura 4. Contagem de Microorganismos em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

As BRS produzem ácido sulfídrico enquanto reduzem sulfato como parte de seu metabolismo. Essa produção de ácido sulfídrico, quando confinada como o que acontece nos microcosmos confeccionados, acaba resultando tóxica às próprias células, a medida que a concentração deste ácido aumenta.

Devido a isto, no 17º dia, todos os microcosmos foram reinoculados com 5 mL de BRS provenientes do cultivo desenvolvido previamente ao ensaio.

O microcosmo BRS A1, que não havia sido inoculado no início do teste, também recebeu este bioaumento de maneira a estimular o crescimento da população de interesse, porém essa estratégia não apresentou resultado, como pode ser visto pela contínua tendência de queda da população neste caso.

O microcosmo BRS A3, desenvolveu-se mais tardiamente provavelmente pela dificuldade dos microorganismos em reverter a condição ácida de pH que existia nesse ensaio, uma vez que este microcosmo não recebeu o tratamento de neutralização prévio.

A adição de ácido ascórbico no microcosmo BRS A2* não demonstrou ser efetiva, uma vez que quando comparado ao microcosmo BRS A2, sua população

microbiana não apresentou a mesma reação positiva ao bioaumentado realizado durante o ensaio.

VI.1.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B

Os resultados da contagem de microorganismos nos microcosmos anaeróbicos confeccionados com amostras do Solo B estão apresentados na Figura 5:

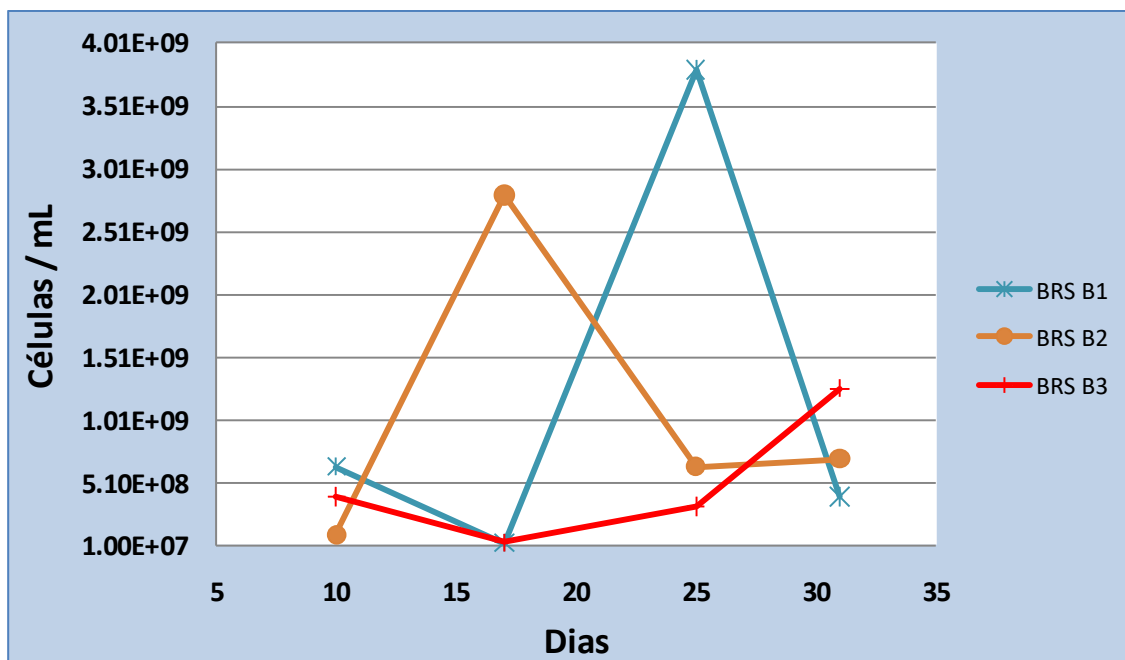


Figura 5. Contagem de Microorganismos em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

Nesta série de ensaios, os microcosmos também foram reinoculados no 17º dia, nas mesmas condições da série anterior, inclusive o microcosmo BRS B1 que não havia sido inoculado no início do teste.

Neste ensaio, a amostra de solo utilizada foi o Solo B que apresenta valor 8,00 para o pH. Essa condição é mais favorável ao desenvolvimento de BRS, e assim é possível observar que praticamente durante todo o ensaio a contagem de microorganismos ficou na casa de 10^9 , maior que no ensaio com o Solo A, onde ficou em 10^8 cel/ml.

Apesar disso, o pH ótimo para o desenvolvimento de BRS é o pH 7,00 e isso pode ser uma explicação para o desenvolvimento tardio do microcosmo BRS B3, que não teve seu solo neutralizado.

O elevado crescimento nos microcosmos BRS B1 e BRS B2, e conseqüentemente a maior produção de ácido sulfídrico, culminou também em elevado

decréscimo da população microbiana em determinada fase do ensaio, devido a toxicidade deste ácido que fica acumulado no microcosmo.

VI.1.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos

As amostras de Solo A utilizadas nos microcosmos BOF 2, BOS 2 e BOF/BOS 2, após passarem pelo ensaio aeróbico, foram então utilizadas em condições anaeróbicas, e os resultados da contagem de microorganismos nesses microcosmos anaeróbicos estão apresentados na Figura 6:

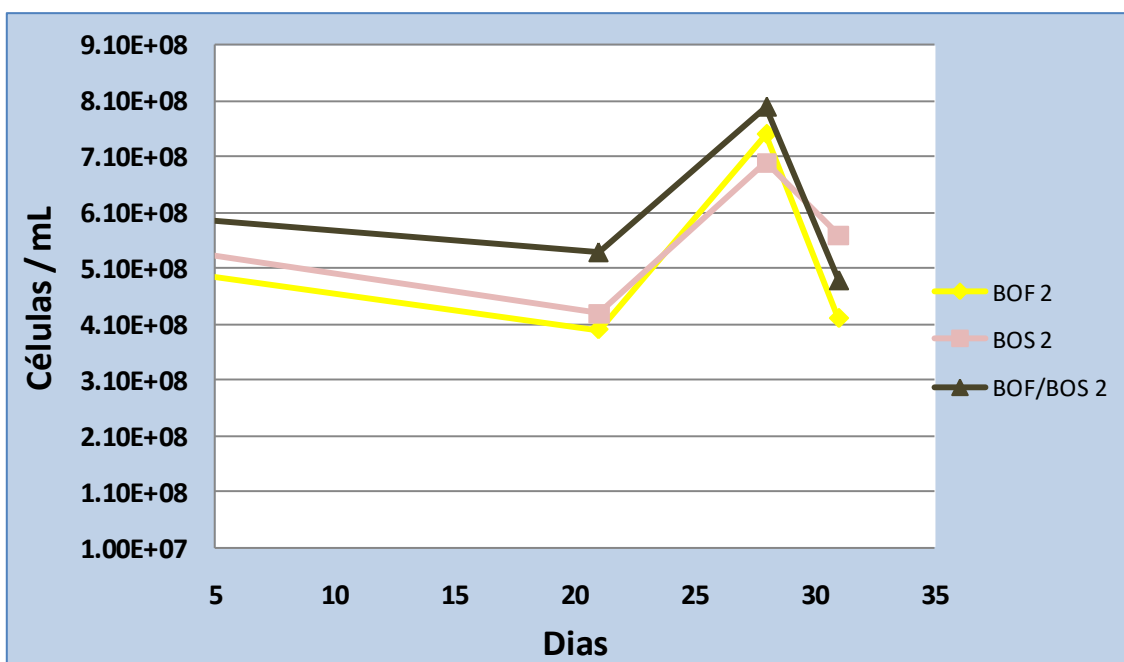


Figura 6. Contagem de Microorganismos em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.

Nenhum desses microcosmos necessitou ser neutralizado uma vez que o solo proveniente do ensaio aeróbico já vinha com sua acidez neutralizada. Todos os microcosmos foram inoculados no início e no 21º dia, de forma similar ao descrito nas séries de ensaio anaeróbicos anteriores.

Pode-se notar o comportamento praticamente similar em todos os ensaios, no que diz respeito ao crescimento da população de BRS, que se manteve em 10^8 cel/ml.

VI.2 pH e Potencial Redox

Assim como a contagem de microorganismos, o pH e o Potencial Redox também foram determinados 4 vezes durante os 31 dias.

Os resultados estão apresentados em grupos de ensaio:

VI.2.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A

Os resultados de pH e Potencial Redox nos microcosmos anaeróbicos confeccionados com amostras do Solo A estão apresentados nas Figuras 7 e 8 respectivamente:

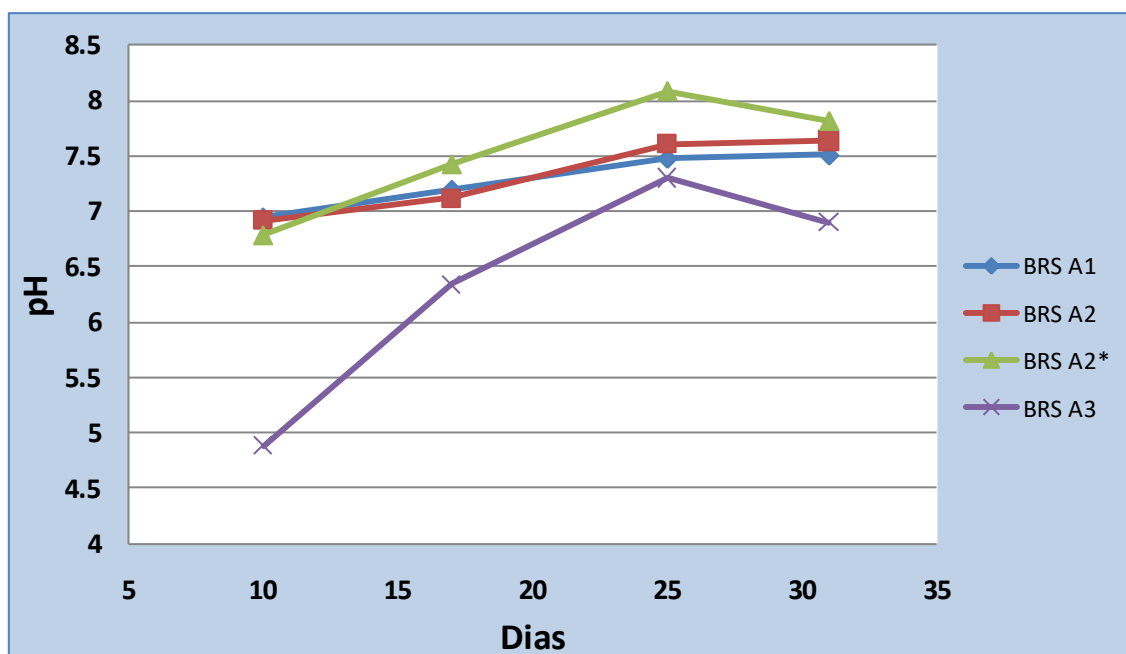


Figura 7. Resultados de pH em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

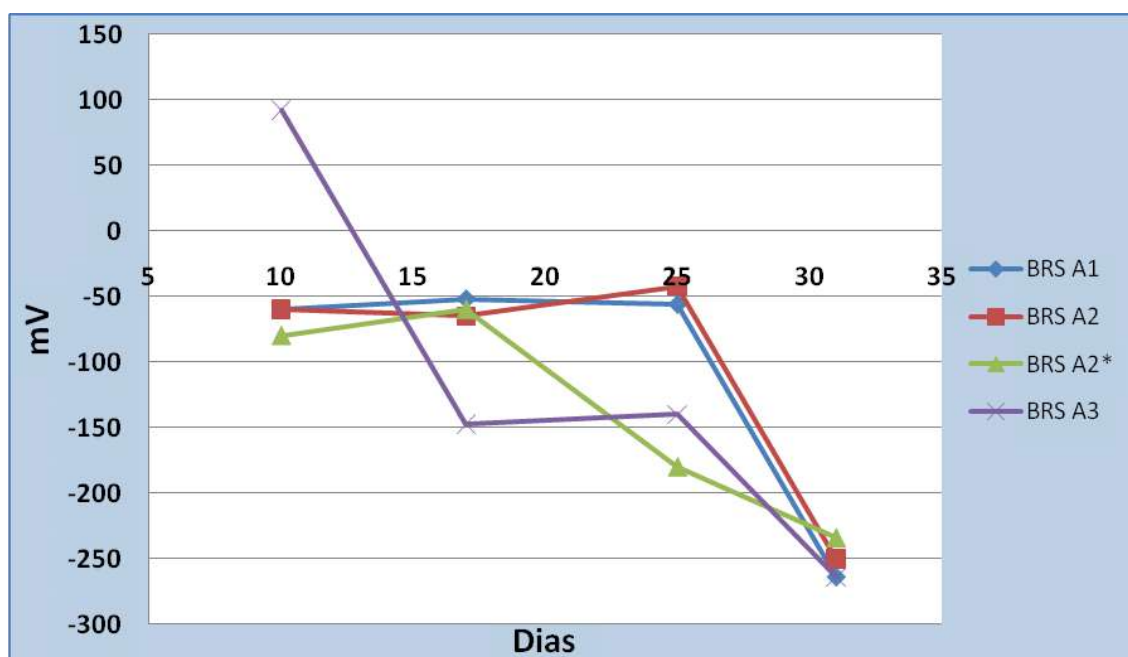


Figura 8. Resultados de Potencial Redox em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

É possível observar claramente que o microcosmo BRS A3, único a não ter sua acidez neutralizada previamente ao ensaio, apresentou pH fortemente ácido durante praticamente metade do ensaio, somente atingindo a faixa de pH neutro próximo do final do teste.

Enquanto isso, os microcosmos previamente neutralizados evoluíram de forma muito similar, sempre próximo a faixa de pH neutro, ideal para o crescimento da população de BRS.

O efeito do pH pode ser confirmado no resultado de Potencial Redox. O microcosmo BRS A3 só passou a apresentar um ambiente redutor próximo a metade do ensaio (15 dias). Por outro lado, os microcosmos que tiveram sua acidez neutralizada apresentaram potencial redutor durante todo o ensaio.

VI.2.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B

Os resultados de pH e Potencial Redox nos microcosmos anaeróbicos confeccionados com amostras do Solo B estão apresentados nas Figuras 9 e 10 respectivamente:

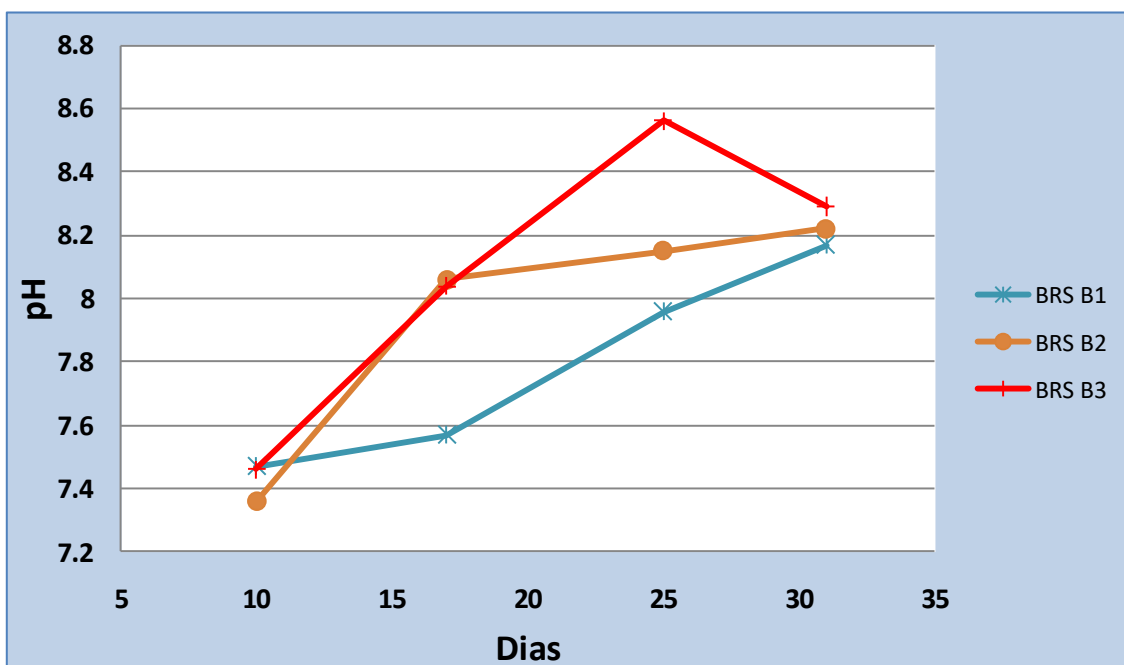


Figura 9. Resultados de pH em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.

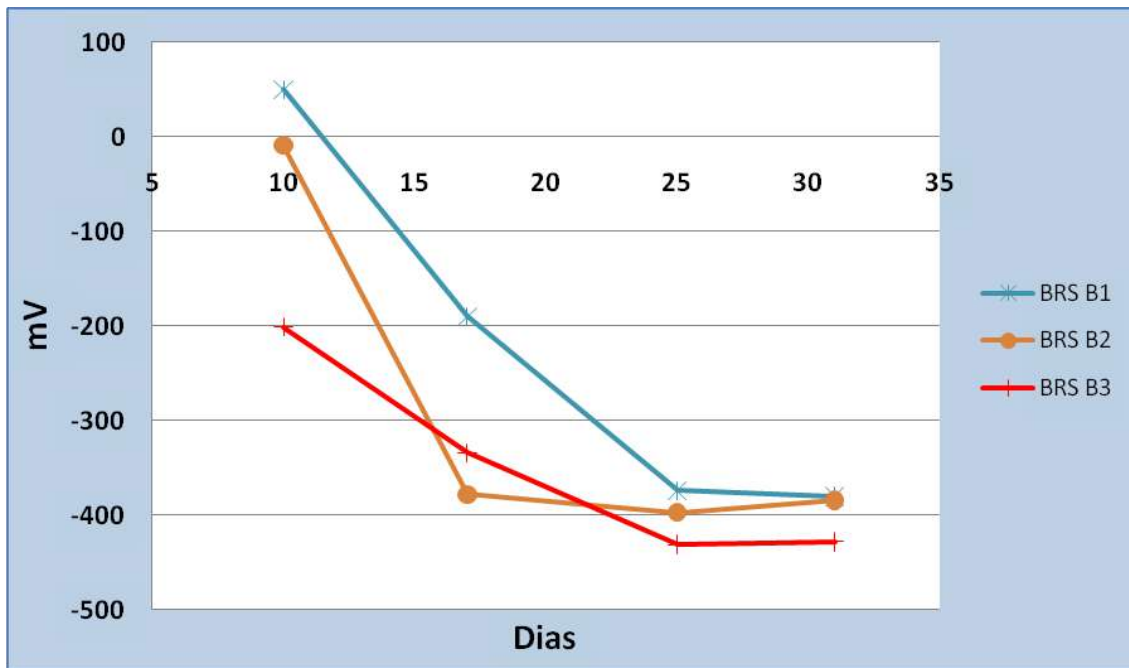


Figura 10. Resultados de Potencial Redox em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.

Nesta série de ensaios, como era esperado devido ao pH inicial da amostra de solo B, os valores de pH apresentaram evolução similar e próxima a faixa neutra, com ligeira evolução básica durante o teste, independentemente de terem passado ou não pelo processo de neutralização.

Com relação aos valores de potencial redox, o potencial se apresentou dentro da faixa redutora a partir da metade do ensaio, comprovando a ação das BRS. O microcosmo BRS B1, devido a não ter recebido inoculo como bioaumento, foi o último a apresentar essa evolução.

VI.2.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos

Os resultados de pH e Potencial Redox, para este grupo de ensaio anaeróbico realizado após terem passado pelo ensaio aeróbico, estão apresentados nas Figuras 11 e 12:

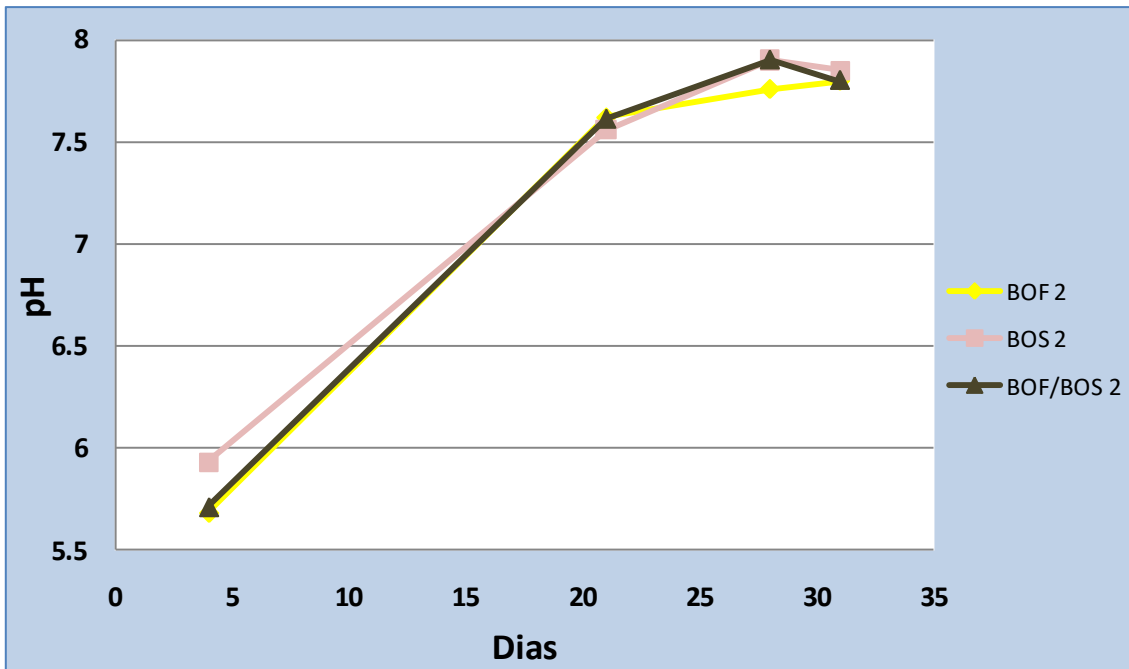


Figura 11. Resultados de pH em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.

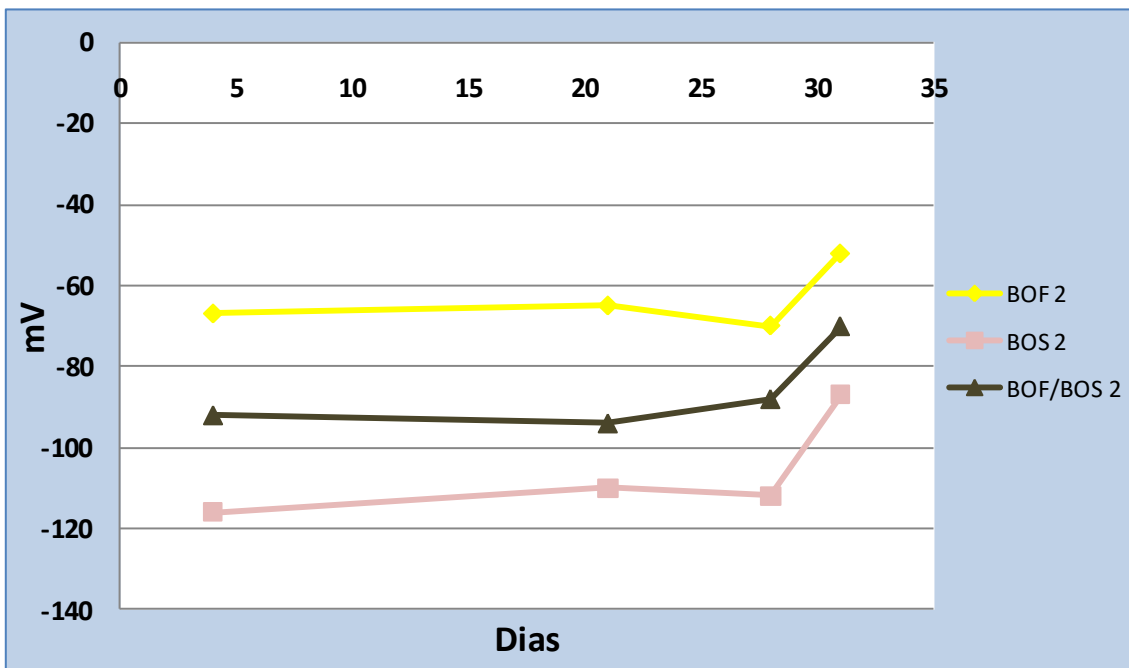


Figura 12. Resultados de Potencial Redox em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.

Para este grupo de ensaios, as amostras de solo utilizadas já estavam previamente neutralizadas uma vez que haviam passado pelo ensaio realizado aerobicamente.

Por isso, é possível observar a evolução do pH sempre próximo a faixa neutra, bem como a evolução do potencial redox sempre na faixa redutora, apesar de não apresentarem valores tão baixos como o esperado.

VI.3 Concentração de Sulfato

Conforme detalhado anteriormente, a concentração de sulfato foi determinada por 2 diferentes métodos: gravimétrico e turbidimétrico. O primeiro, mais sensível, foi utilizado para determinar a concentração inicial e final nos microcosmos, enquanto o segundo, mais rápido e prático de ser realizado, foi utilizado para acompanhamento da concentração durante os ensaios. Os resultados estão apresentados a seguir:

VI.3.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A

Os resultados da concentração de sulfato ao longo do ensaio com amostra de solo A, está apresentado na Figura 13:

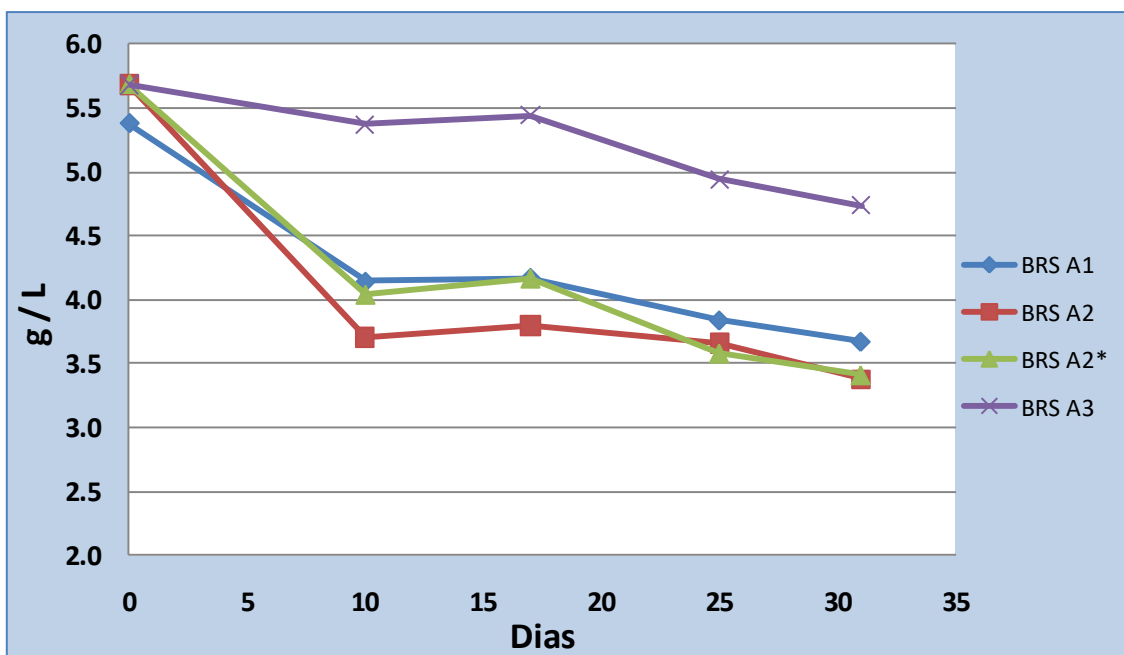


Figura 13. Concentração de Sulfato x Tempo em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

O microcosmo BRS A1 apresentou bom desempenho na redução de sulfatos, totalizando 32% de redução.

Os microcosmos BRS A2 e BRS A2* comprovam os resultados de contagem de microorganismos, quando estes tiveram o melhor desempenho quanto ao crescimento de células e também, o maior percentual de redução de sulfato (41% e 40% respectivamente). Com esses resultados, percebe-se que a adição de ácido ascórbico no microcosmo BRS A2* não apresentou vantagens significativas em relação ao microcosmo similar BRS A2.

Nota-se que o microcosmo BRS A3, não previamente neutralizado, que apresentou pH ácido durante boa parte do ensaio, e também, potencial redox acima da faixa redutora, apresentou menor percentual de redução da concentração de sulfato (17%), evidenciando a dificuldade das BRS em se desenvolver neste ambiente ácido.

Essa dificuldade fica clara quando comparamos este resultado aos valores encontrados na contagem de microorganismos quando este microcosmo teve o crescimento de células detectado tardiamente durante o ensaio.

Também é possível perceber o momento em que as bactérias perdem sua atividade, aproximadamente na metade do teste, e como já explicado anteriormente, um novo inóculo é realizado nos microcosmos, retomando a redução de sulfato após o 17º dia.

VI.3.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B

Os resultados da concentração de sulfato ao longo do ensaio com amostra de solo B, está apresentado na Figura 14:

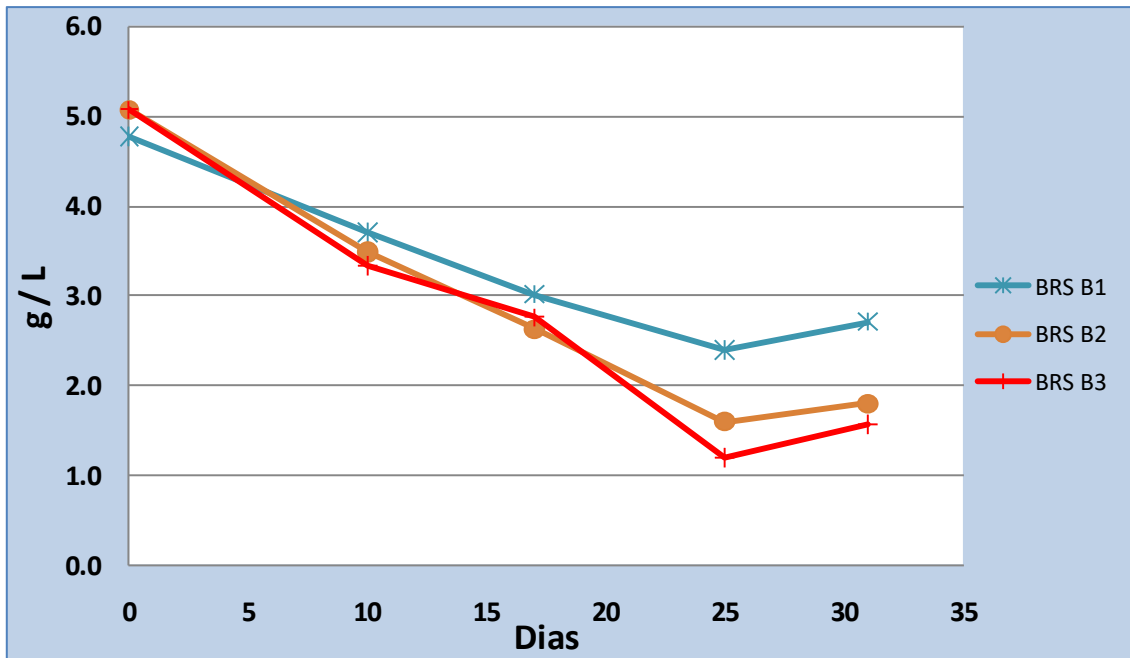


Figura 14. Concentração de Sulfato x Tempo em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.

No caso do solo B, com características diferentes do solo A, principalmente no que diz respeito a acidez, o pré-tratamento de neutralização não apresenta os mesmos resultados.

O microcosmo BRS B1 finalizou o ensaio com o percentual de 43% de redução de sulfato, porém os outros microcosmos deste grupo apresentaram resultados ainda melhores.

O microcosmo BRS B2, que teve o melhor desempenho no crescimento de microorganismos, conseqüentemente também demonstrou excelente percentual de redução de sulfato (65%).

Já o microcosmo BRS B3 apresentou percentual de redução de sulfato de 69%, o melhor da série, bem como potencial redutor mais destacado, apesar de ter demonstrado crescimento de células tardiamente.

Para esse grupo de ensaio, a diferença de sensibilidade entre os métodos gravimétrico e turbidimétrico ficou evidenciada ao final do teste, quando a metodologia gravimétrica (30º dia) apontou valores maiores de concentração de sulfato do que o que havia sido determinado na última análise turbidimétrica (25º dia). Como já explicado, essa diferença é explicada pela sensibilidade da análise gravimétrica, maior do que a turbidimétrica.

VI.3.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos

Os resultados da concentração de sulfato para este grupo de ensaio anaeróbico realizado após os microcosmos terem passado pelo ensaio aeróbico, está apresentado na Figura 15:

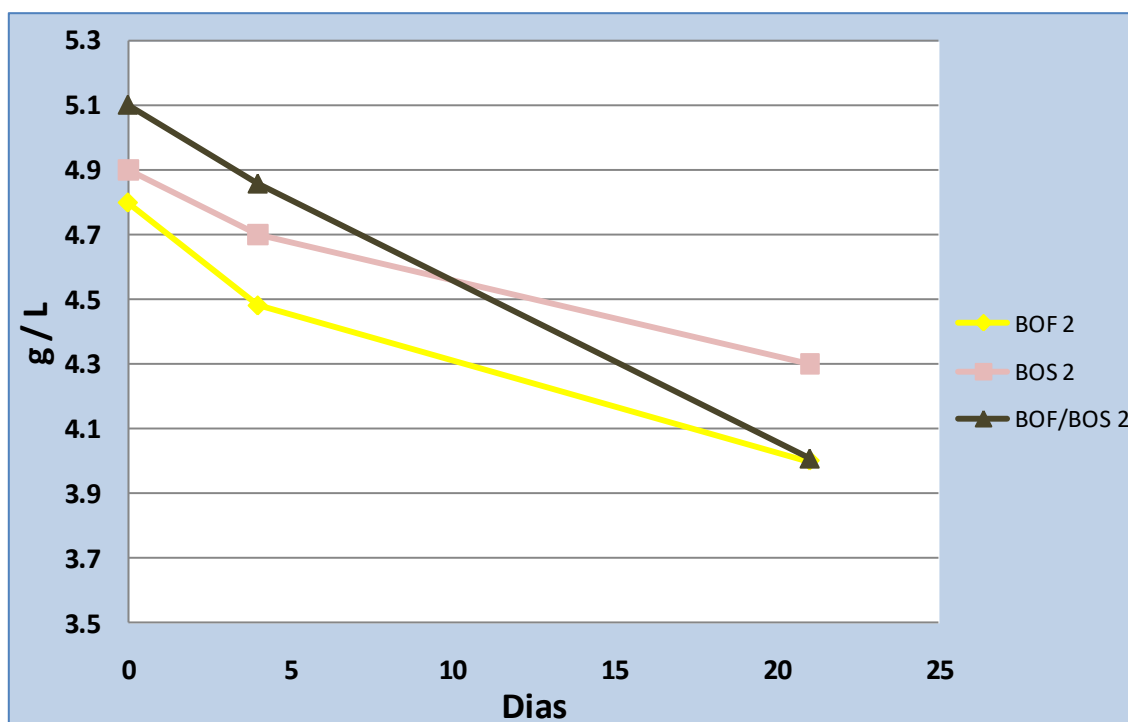


Figura 15. Concentração de Sulfato x Tempo em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B, previamente ensaiadas em microcosmos aeróbicos.

O percentual de redução de sulfato neste grupo de ensaio ficou abaixo do esperado para todos os microcosmos testados. No entanto, esse resultado confirma o resultado de potencial redox encontrado, quando os valores não corresponderam a um ambiente suficientemente redutor.

Apesar disso, a redução de 21% para o microcosmo BOF 2, de 16% para o microcosmo BOS 2 e de 25% para o microcosmo BOF/BOS 2 é satisfatória para o estudo.

VI.4 Extração Sequencial

Seguindo a metodologia proposta para o estudo, após o término do período de incubação dos microcosmos foi realizada uma separação sólido-líquido, e posteriormente procedeu-se a metodologia de extração sequencial no sólido.

Ao final, cada fração extraída, bem como a parte líquida obtida da separação, foram analisadas por absorção atômica afim de determinar o percentual de cada metal (Fe, Zn e Pb) contido em cada uma delas.

Os resultados estão apresentados por grupo de ensaio e também divididos por metal, conforme pode ser visto a seguir:

VI.4.1 Microcosmos anaeróbicos com Solo A

Os resultados para este grupo de ensaio estão apresentados nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

Em cada um dos gráficos, a primeira coluna corresponde a amostra de solo original antes do ensaio, de maneira que se possa fazer uma comparação visual direta.

Ainda, os percentuais de cada fração estão descritos no próprio gráfico, na tabela que fica localizada em sua parte inferior.

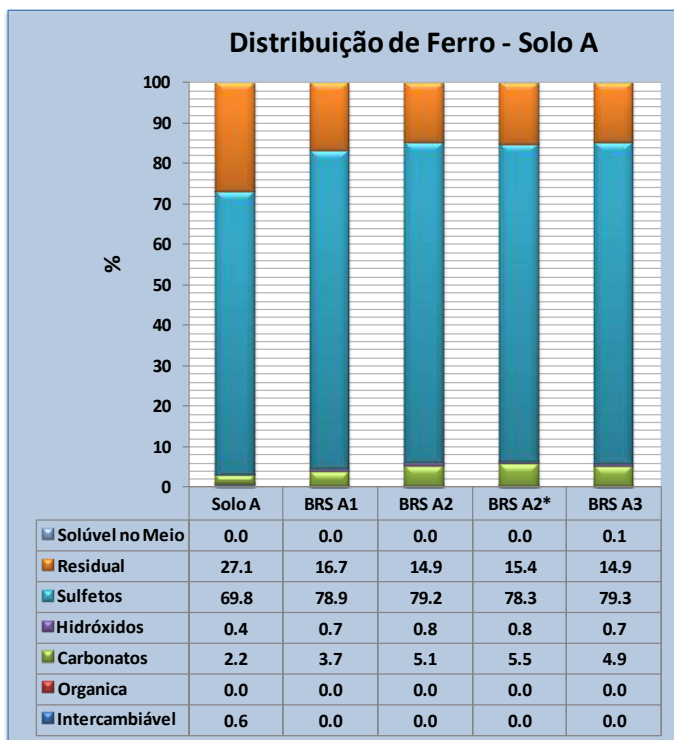


Figura 16. Distribuição de Fe, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

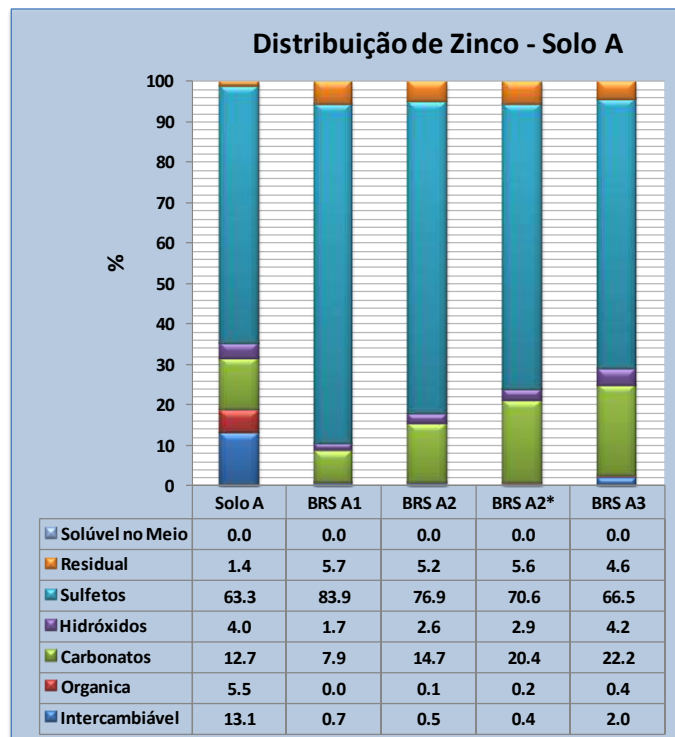


Figura 17. Distribuição de Zn, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A.

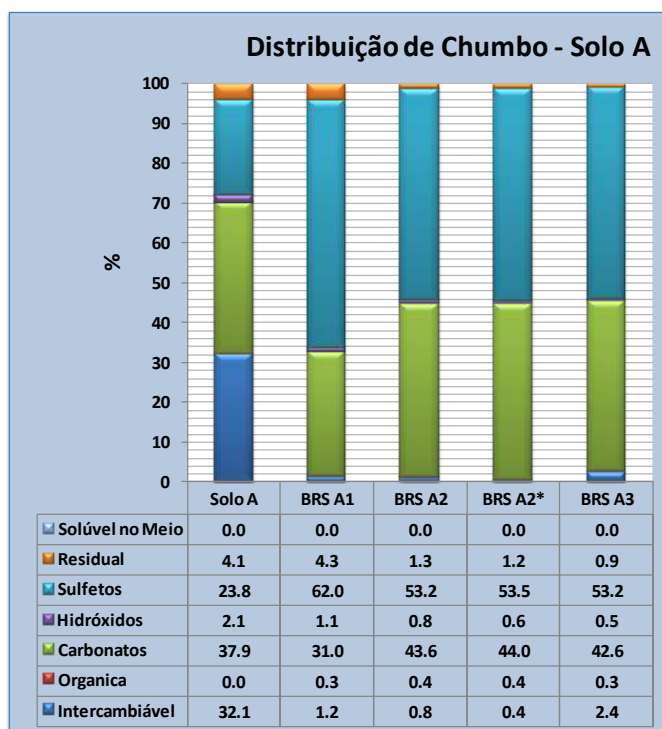


Figura 18. Distribuição de Pb, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo A

Em função do metabolismo das BRS, a tendência esperada para os resultados de toda a série de ensaios anaeróbios é um aumento na quantidade de metais presentes na fração de sulfetos do solo. Além disso, devido a formação de HCO_3^- como reação intermediária deste metabolismo, também é esperado um aumento na quantidade de metais presentes na fração de carbonatos do solo. Em geral, a tendência é que essa transferência de metais seja das frações de menor estabilidade para aquelas onde a ligação entre o metal e as partículas do solo é maior, considerando que a fração intercambiável é a de menor e a residual a de maior estabilidade.

Os resultados da extração seqüencial dos microcosmos anaeróbios com solo A, seguem essa tendência. Comparando a primeira coluna que representa o solo original com as colunas representantes do estado final do solo, é possível observar que em todos os casos, em maior ou menor proporção, ocorreu um aumento na quantidade de metais presentes na fração de sulfetos, bem como na fração de carbonatos. Também é possível observar que essa transferência de metais ocorreu principalmente a partir das frações orgânica e intercambiável, esta última, mais destacada no estudo do metal Pb.

No estudo do metal Fe, todos os microcosmos apresentaram um desempenho muito semelhante, sem grande destaque para nenhum microcosmo. Em média, a fração de sulfeto aumentou em 13,1 %, na fração de sulfetos, em relação ao solo original.

Com relação ao metal Zn, enquanto o microcosmos BRS A1 apresentou um aumento de 32,6% em sua fração de sulfetos e uma diminuição em sua fração de carbonatos, o microcosmos BRA A3 apresentou apenas 13,7% de aumento na fração de sulfetos, porém um aumento de 74% na fração de carbonatos foi observado.

Essa diferença de comportamento pode ser explicada pela evolução do pH dos microcosmos. O equilíbrio das reações do metabolismo das BRS envolve a concentração de íons H^+ . No microcosmo BRS A1, o pH se manteve próximo a faixa neutra, favorecendo a reação completa do metabolismo bacteriano. Por outro lado, o pH ácido durante boa parte do ensaio do microcosmo BRS A3, impediu o metabolismo completo, favorecendo a bio-precipitação dos metais em forma de carbonatos.

Finalmente, de maneira geral pode-se observar uma transferência de metais entre as frações de sulfetos e residual. Essa variação pode ser atribuída ao fato de ambas serem as frações de maior estabilidade, o que devido a metodologia de extração e em função das características do solo, pode eventualmente fazer com que se contabilize

parte dos sulfetos metálicos como sendo fração residual e até mesmo fazer com que parte da fração residual seja digerida como sulfetos, visto a digestão ácida a 95° C realizada nesta etapa.

VI.4.2 Microcosmos anaeróbicos com Solo B

Os resultados de Fe, Zn e Pb para este grupo de ensaio estão apresentados nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

Em cada um dos gráficos, a primeira coluna corresponde a amostra de solo original antes do ensaio, de maneira que se possa fazer uma comparação visual direta.

Ainda, os percentuais de cada fração estão descritos no próprio gráfico, na tabela que fica localizada em sua parte inferior.

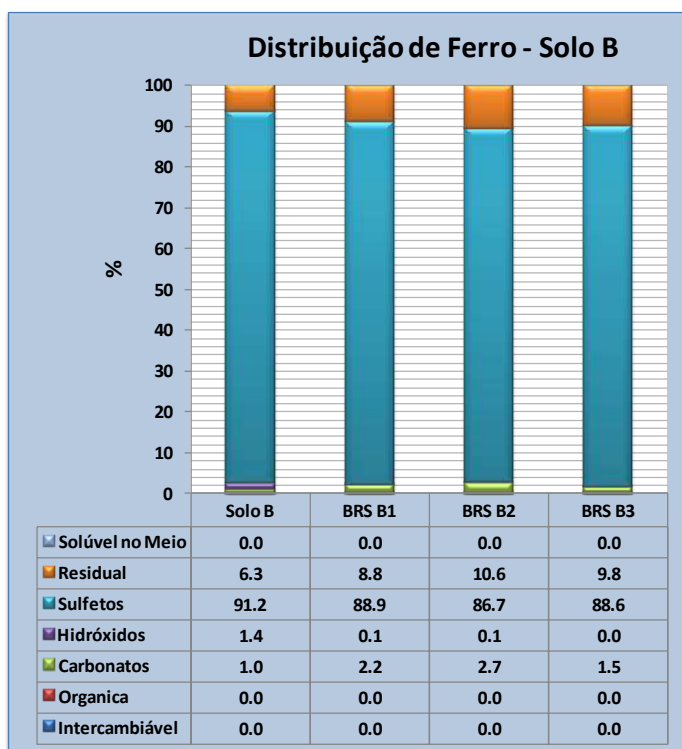


Figura 19. Distribuição de Fe, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B

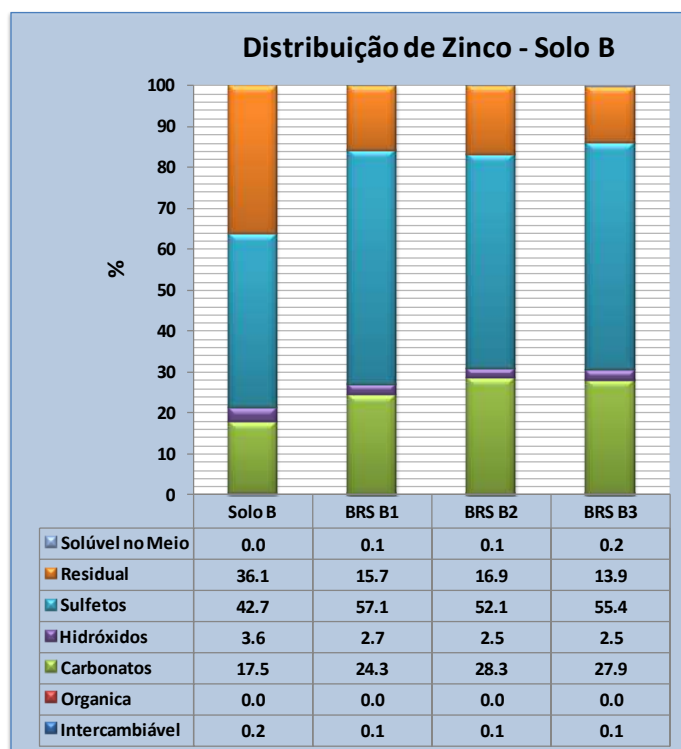


Figura 20. Distribuição de Zn, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B.

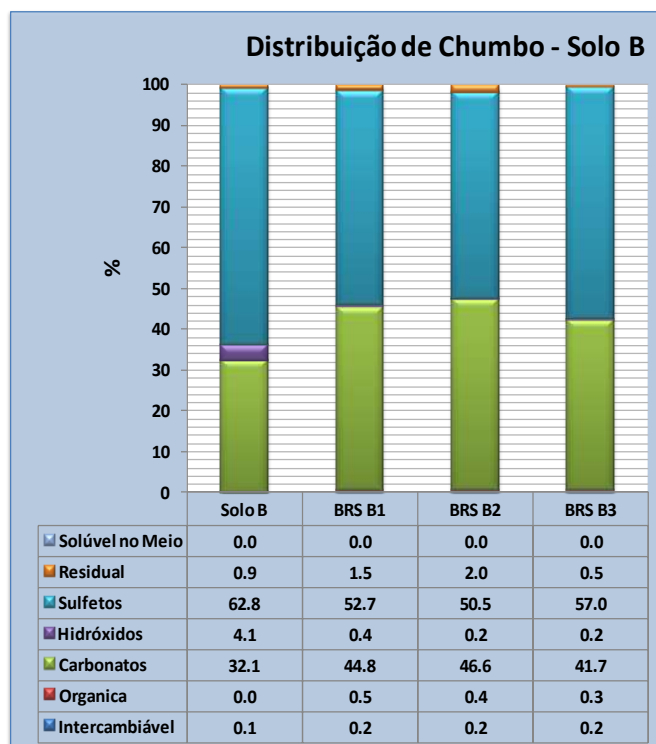


Figura 21. Distribuição de Pb, em microcosmos anaeróbicos com amostras de Solo B

Neste grupo de ensaio foi utilizada a amostra de Solo B. As diferenças na distribuição de metais com relação ao Solo A são visíveis já no estudo do metal Fe.

Neste caso, 91,2% de todo o Fe já está precipitado em forma de sulfetos. Destaca-se então a redução de Fe presente como hidróxidos e o ligeiro aumento na fração de carbonatos.

No entanto, é interessante observar que parte da fração de sulfetos diminui, aumentando a fração mais estável do solo, residual. Ao final do ensaio, o Fe presente encontra-se igualmente ou ainda mais imobilizado no solo. Na amostra de solo original, o percentual de Fe presente nas frações sulfetos e residual é 97,5%, enquanto o total nos microcosmos BRS B1, BRS B2 e BRS B3 é de 97,8%, 98,4% e 97,3% respectivamente.

No estudo do metal Zn, o comportamento dos microcosmos ocorre dentro do esperado, ou seja, há aumento nas frações de sulfetos e carbonatos, que como já explicado, ocorre devido ao metabolismo das BRS.

Já para o metal Pb, é interessante notar que a fração de carbonatos aumenta em 45,1% no microcosmo BRS B2, 39,5 % no BRS B1 e 30,0% no BRS B3. Esse resultado mostra uma diminuição na estabilidade da imobilização do Pb neste solo, apesar de ser observado um pequeno aumento na fração residual do mesmo.

VI.4.3 Microcosmos anaeróbicos com Solo A, proveniente de microcosmos aeróbicos.

Conforme a metodologia proposta, este grupo de ensaio passou por microcosmos aeróbicos primeiramente em duplicatas, e posteriormente, uma das duplicatas foi encaminhada para microcosmos anaeróbicos.

Por isso serão apresentados resultados de extração seqüencial para a duplicata que passou apenas pelo ensaio aeróbico, e também o resultado da extração seqüencial realizada no solo final da duplicata que seguiu para o ensaio anaeróbico.

Desta forma será possível comparar diretamente as ações das BOF e BOS com a ação em seqüência das BRS.

Neste caso os resultados da extração seqüencial estão divididos também por tipo de inóculo utilizado no microcosmo aeróbico (BOS, BOF e BOS+BOF).

Da mesma forma que nos resultados anteriores, em cada um dos gráficos, a primeira coluna corresponde a amostra de solo original antes do ensaio, de maneira que se possa fazer uma comparação visual direta.

Ainda, os percentuais de cada fração estão descritos no próprio gráfico, na tabela que fica localizada em sua parte inferior.

VI.4.3.1 Microcosmos com inóculo de BOS durante ensaio aeróbico.

Os resultados de Fe, Zn e Pb estão apresentados nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente:

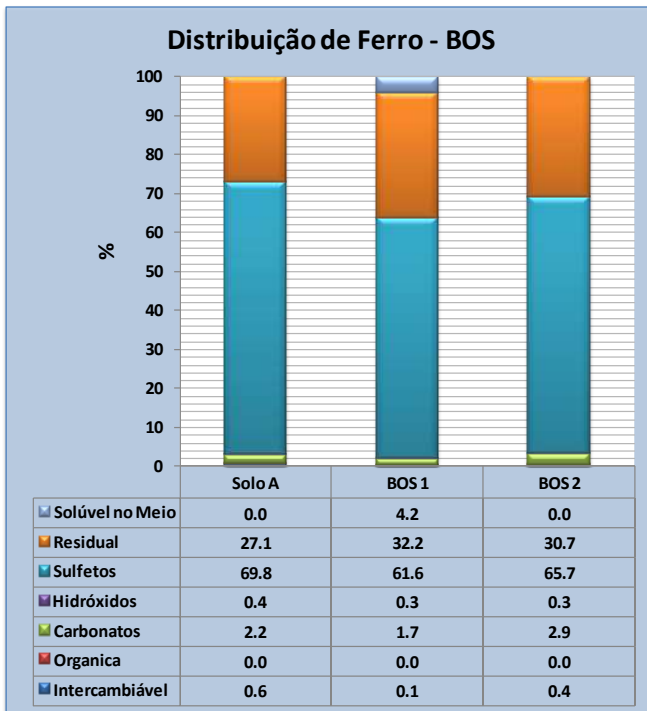


Figura 22. Distribuição de Fe, em microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico.

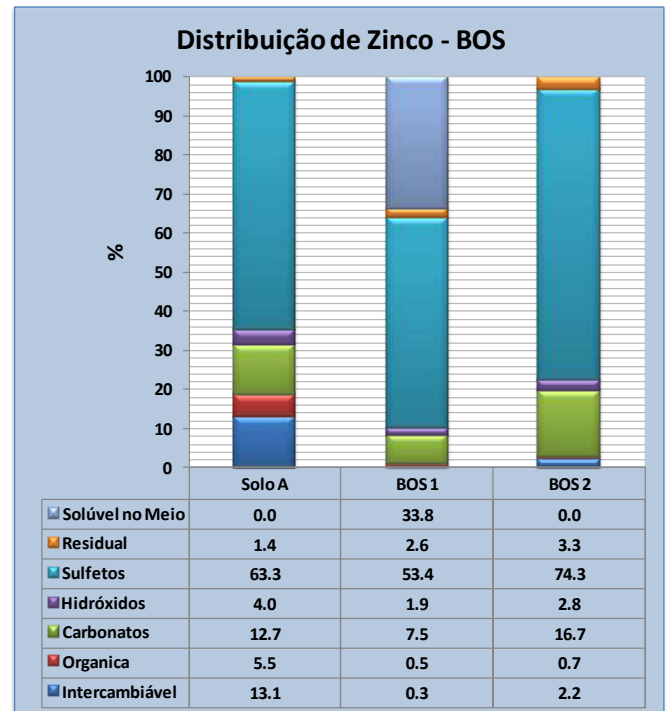


Figura 23. Distribuição de Zn, em microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico.

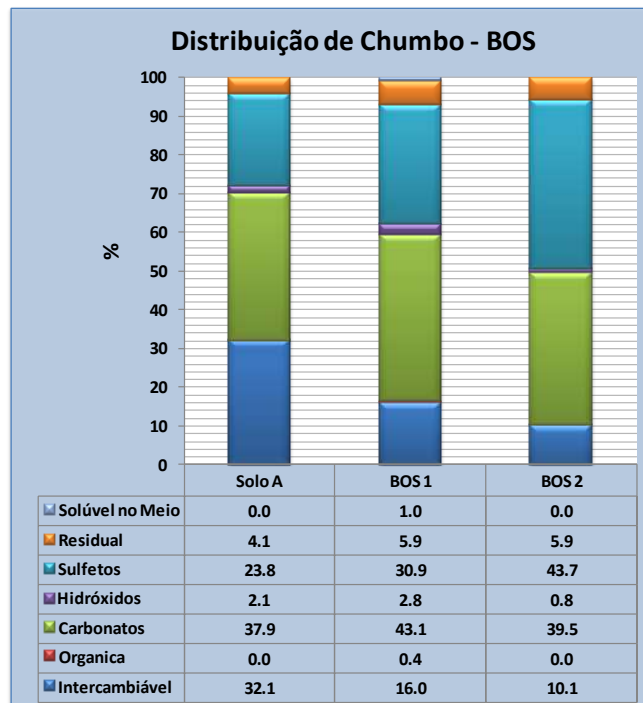


Figura 24. Distribuição de Pb, em microcosmos com inoculo de BOS durante ensaio aeróbico

Nesta série de ensaios, o resultado esperado é que enquanto a população bacteriana oxidante (BOS e/ou BOF) atue no sentido de solubilizar os metais, transferindo-os das frações mais estáveis, como sulfetos, para o meio líquido, as BRS ajam no sentido contrário, revertendo essa solubilização e tornando a imobilizar os metais nas frações mais estáveis.

Tanto a população de BOS como a de BOF, promovem a formação de sulfatos metálicos ou a liberação dos metais livres em solução apesar de utilizarem mecanismos diferentes em seu metabolismo.

Na bateria de ensaios com inoculo exclusivo de BOS, podemos observar bem esse comportamento. Pode-se observar que os sulfatos metálicos de Fe e Zn aparecem solubilizados ao final da etapa aeróbica.

Essa solubilização foi menor para o Fe, 4,2%, o que pode ser atribuído ao fato de que na amostra de solo original a maior parte deste Fe estava presente na fração estável de sulfetos, dificultando mais sua solubilização. Por outro lado, o Zn, presente em significativa quantidade nas frações menos estáveis do solo como a intercambiável, orgânica e carbonatos, aparece solubilizado em maior quantidade ao final da etapa aeróbica, 33,8%.

No caso do metal Pb, não é possível observar grande solubilização no meio, fato atribuído a baixa solubilidade do $PbSO_4$ que tem K_{ps} igual a $1,6 \times 10^{-8}$. O crescimento da fração de sulfetos ao final da etapa aeróbica foi atribuído a esta insolubilidade do sulfato de chumbo, tendo sido possivelmente extraído junto com outras frações do solo durante as etapas de digestão.

Em todos os casos é possível observar que ao entrar em contato com as BRS, os metais voltam a serem imobilizados principalmente na fração de sulfetos, como esperado devido ao metabolismo desta população microbiana.

VI.4.3.2 Microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.

Os resultados de Fe, Zn e Pb estão apresentados nas Figuras 25, 26 e 27, respectivamente:

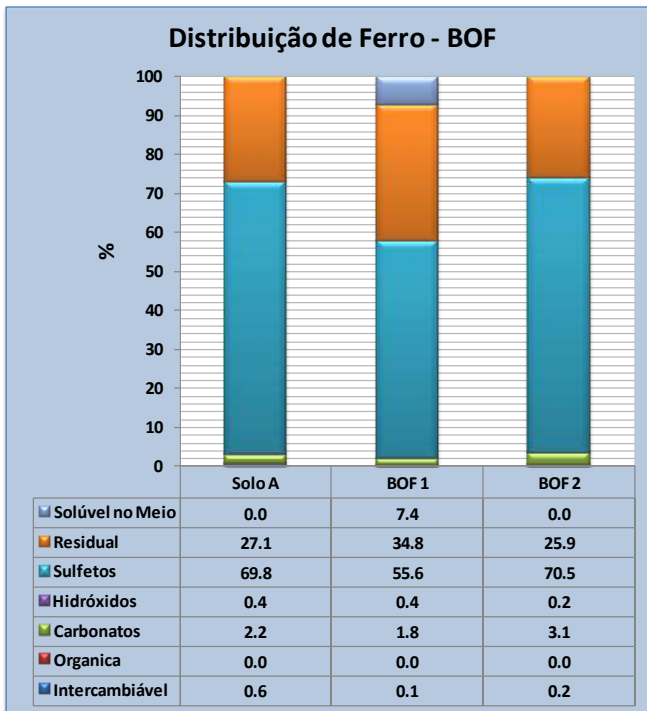


Figura 25. Distribuição de Fe, em microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.

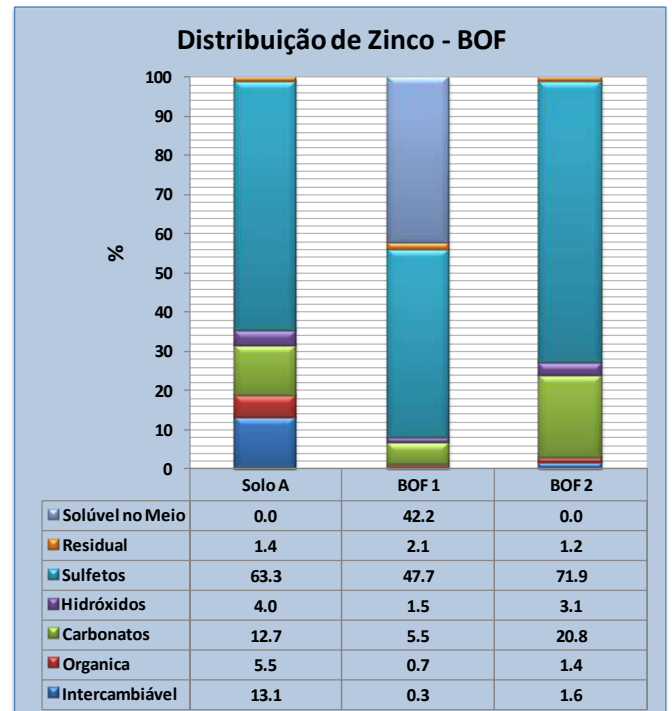


Figura 26. Distribuição de Zn, em microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.

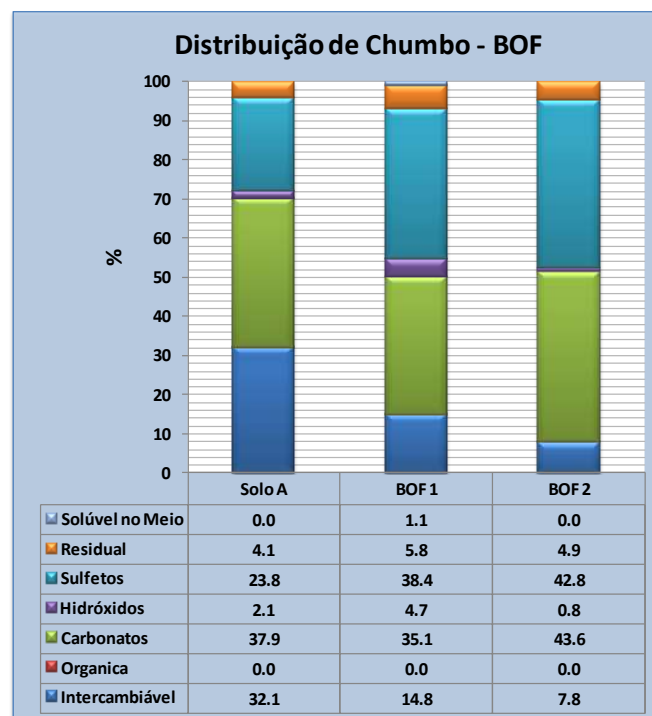


Figura 27. Distribuição de Pb, em microcosmos com inoculo de BOF durante ensaio aeróbico.

Os microcosmos que receberam inoculo de BOF durante a etapa aeróbica apresentaram resultados muito parecidos que os encontrados nos ensaios realizados com inoculo de BOS.

É possível observar a solubilização do Fe e do Zn, este último em destacada quantidade, durante a etapa aeróbica. A consideração de que a não solubilização do Pb nesta etapa se deve a baixa solubilidade do $PbSO_4$ é valida também neste caso.

Ainda, nota-se a imobilização dos metais durante o contato com as BRS.

VI.4.3.3 Microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico.

Os resultados de Fe, Zn e Pb estão apresentados nas Figuras 28, 29 e 30, respectivamente:

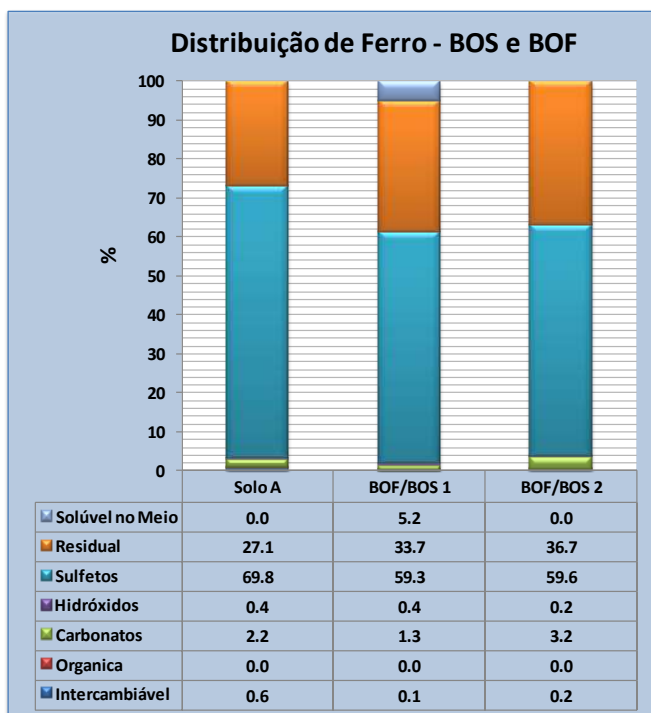


Figura 28. Distribuição de Fe, em microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico

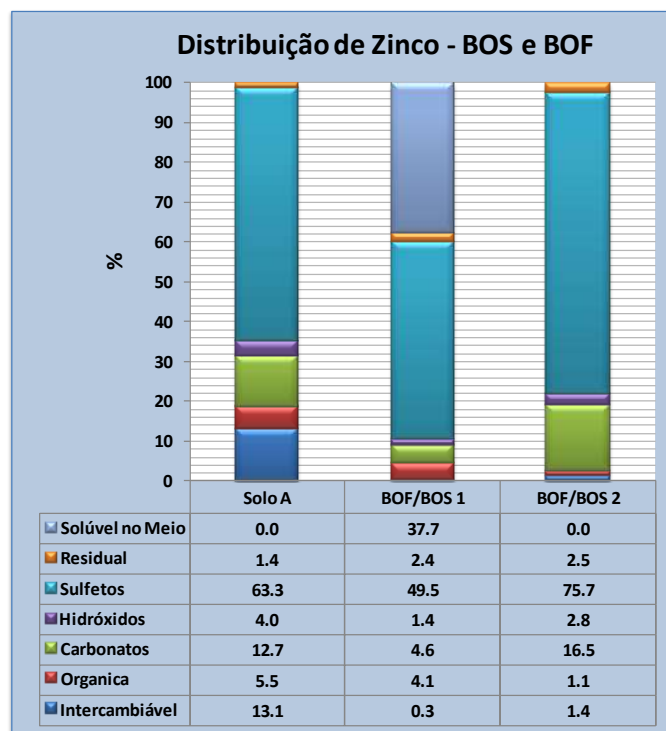


Figura 29. Distribuição de Zn, em microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico

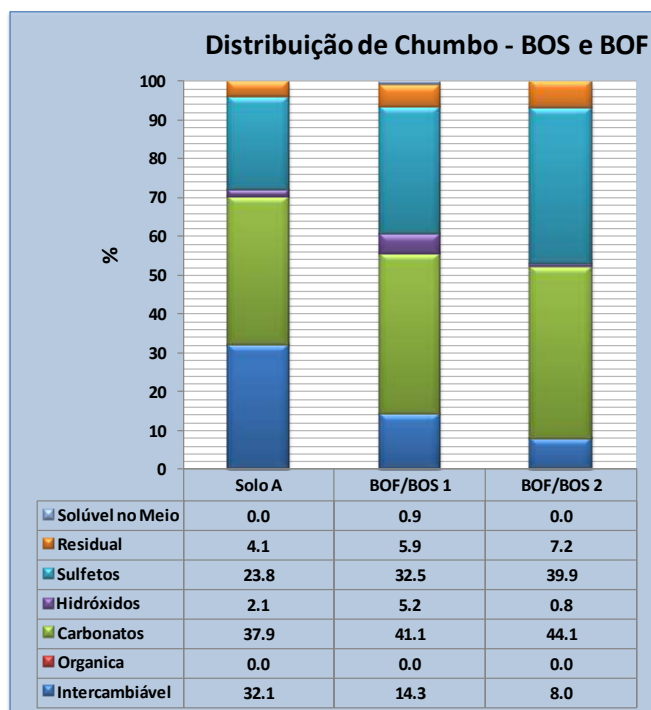


Figura 30. Distribuição de Pb, em microcosmos com inoculo de BOS e BOF durante ensaio aeróbico.

Todos os resultados de monitoramento realizados ao longo dos testes com os microcosmos que passaram tanto pela etapa aeróbica quanto pela anaeróbica mostraram muita similaridade.

Por esse motivo, a similaridade no perfil do solo ao final de cada um dos ensaios era esperada.

As observações sobre a solubilização do Fe, Zn e Pb e a imobilização dos mesmos após o contato com as BRS, são igualmente válidas nesta série de microcosmos onde se utilizou um cultivo misto de BOS e BOF.

VII. Conclusões

Os resultados alcançados neste projeto permitiram observar o comportamento antagônico de duas populações diferentes de microorganismos nativos do solo contaminado estudado.

Enquanto a população de bactérias oxidantes favorece a biolixiviação dos metais através do solo, a população de bactérias redutoras de sulfato utiliza o sulfato contido no solo para bioprecipitar os metais em forma de sulfetos, imobilizando-os na matriz do solo, porém esse etapa do estudo não permite determinar quem prevalece.

O pH do solo é um importante fator para o desenvolvimento da população de BRS, para o seu metabolismo e conseqüentemente para a imobilização dos metais. No

ensaio iniciado com pH ácido (ver “BRS A3”), o crescimento bacteriano foi tardio, a redução de sulfato pequena e a bioprecipitação de sulfetos menor do que nos outros microcosmos. Neste caso, pode se concluir que a produção ácida causada pelo metabolismo da população de bactérias oxidantes pode desfavorecer significativamente a ação metabólica das BRS.

O metal Zn apresentou maior solubilidade e mobilidade durante o estudo, permitindo a conclusão de que para o solo estudado, ele é o metal de maior interesse e preocupação ambiental.

O metal Fe, presente em altas concentrações, demonstrou baixa solubilidade e baixa mobilidade, demonstrando que está estavelmente imobilizado na matriz do solo.

O metal Pb, devido a característica de formar o composto de baixa solubilidade $PbSO_4$ durante a ação biolixiviadora, também demonstrou estabilidade em sua imobilização no solo estudado.

A avaliação dessa ação antagônica, utilizando outra metodologia, é recomendada como próximo passo de estudo. A utilização de colunas preenchidas com o solo contaminado, onde sejam desenvolvidos os dois tipos de população, em diferentes profundidades, permitirá definir qual dos processos, entre biolixiviação e bioprecipitação, é o processo dominante nesse caso.

VIII. Referências Bibliográficas

ADRIANO, D.C. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry. **Bioavailability and Risks of Metals, 2nd edition**. Springer-Verlag, 2001. p. 866.

ÁLVAREZ-ROGEL, J., RAMOS, M.J., DELGADO, M.J., ARNALDOS, R. Metals in soils and above-ground biomass of plants from a salt marsh polluted by mine wastes in the coast of the Mar Menor lagoon, SE. **Fresen. Environ. Bull.**, Espanha, v.13, p. 274–278, 2004.

ASTM, Standard test methods for sulfate-reducing bacteria in water and water-formed deposits. ASTM D 4412-84, **American Society for Testing and Materials**, Philadelphia.

BLOWES, D.W., JAMBOR, J.L. The pore-water geochemistry and mineralogy of the vadose zone of the Waite Amulet mine tailings impoundment. **Appl. Geochem. Noranda**, Quebec, v.5, p. 327–346, 1990.

BOOPATHY, R. Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.161-166, 2003.

CICCU, R., GHIANI, M., SERCI, A., FADDA, S., PERETTI, R., ZUCCA, A. Heavy metal immobilization in the mining-contaminated soils using various industrial wastes. **Minerals Engineering**, v.16, p.187-192, 2003.

ERNST, W.H.O. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants. **Appl. Geochem.**, v.11, p.163-167, 1996.

FANFANI, L., ZUDDAS, P., CHESSA, A. Heavy metals speciation analysis as a tool for studying mine tailings weathering. **J. Geochem. Explor.**, v.58, p.241-248, 1997.

GARCÍA, C. Estudio del mecanismo de generación de drenajes ácidos en una presa de estériles piríticos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España, p.269, 1998.

GÓMEZ-ARIZA, J.L., GIRÁLDEZ, I., SÁNCHEZ-RODAS, D., MORALES, E. Metal readsorption and redistribution during the analytical fractionation of trace elements in oxic estuarine sediments. **Anal. Chim. Acta**, v.399, p.295-307, 1999.

GONDAL, M.A., HUSSAIN, T., YAMANI, Z.H., BAIG, M.A. Detection of heavy metals in Arabian crude oil residue using laser induced breakdown spectroscopy. **Talanta**, v.69, p.1072-1078, 2006.

CONESA, H.M., ROBINSON, B. H., SCHULIN, R., NOWACK, B. Metal extractability in acidic and neutral mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain). **Applied Geochemistry**, v.23, p.1232-1240, 2008.

HOMADY, M., HUSSEIN, H., JIRIES, A., MAHASNEH, A., AL NASIR, F., KHLEIFAT, K. Survey of some heavy metals in sediments from vehicular service stations in Jordan and their effects on social aggression in prepubertal male mice. **Environmental Research**, Section A 89, p.43-49, 2002.

JOHNSON, R.H., BLOWES, D.W., ROBERTSON, W.D., JAMBOR, J.L. The hydrogeochemistry of the Nickel Rim mine tailings impoundment. **J. Contam. Hydrol.**, Sudbury, Ontario, v.41, p.49-80, 2000.

JONG, T.; PARRY, D.L. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Water Research**, v.40, p. 2561-2571, 2006.

JUNG, M.C. Heavy metal contamination of soils and waters in and around the Imcheon Au-Ag mine, Korea. **Appl. Geochem.**, v.16, p.1369-1375, 2001.

KOLMERT, A.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K.B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. **Journal of Microbiological Methods**, v.41, p.179-184, 2000.

KUYUCAK, N. Role of microorganisms in mining. **The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, v.2, p.179-196, 2002.

LILOVA, K., KARAMANEV, D. Direct oxidation of copper sulfide by a biofilm of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v.80, p.147–154, 2005.

MARTÍNEZ-OROZCO, J.M., VALERO-HUETE, F., GONZÁLEZ-ALONSO, S. Environmental problems and proposals to reclaim the areas affected by mining exploitations in the Cartagena mountains (Southeast Spain). **Landscape Urban Plan.**, v.23, p.195–207, 1993.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M.J., NAVARRO, M.C., PÉREZ-SIRVENT, C., MARIMÓN, J., VIDAL, J., GARCÍA-LORENZO, M.L., BECH, J. Assessment of the mobility of metals in a mining-impacted coastal area (Spain, Western Mediterranean). **Journal of Geochemical Exploration**, v.96, p.171–182, 2008.

MCGOWEN SL, BASTA NT, BROWN GO. Use of diammonium phosphate to reduce heavy metal solubility and transport in smelter-contaminated soil. **J. Environ. Qual.**, v.30(2), p.493–500, 2001.

MCLEAN, J.E.; BLEDSOE, B.E. Behavior of metals in soils. **EPA Ground water issue**. EPA/540/S-92/018. p.25, 1992.

MOORE J.N., LUOMA S.N. Hazardous wastes from large-scale metal extraction. **Environ. Sci. Technol.** v.24, p.1278–1285, 1990.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering Geology**, v.60, p.193–207, 2001.

NATARAJAN, K.A.; SUBRAMANIAN, S.; BRAUN, J. Environmental impact of metal mining – biotechnological aspects of water pollution and remediation – an Indian experience. **Journal of Geochemical Exploration**, v.88, p.45–48, 2006.

NÚÑEZ, A.; TOUCHALEAUME, F. Atenuación natural de la contaminación por metales pesados de muestras de suelo debido a la actividad minera. **Proyecto de Investigación – Universidad Complutense de Madrid**, 2006.

OBIAJUNWA, E.I., PELEMO, D.A., OWOLABI, S.A., FASASI, M.K., JOHNSON-FATOKUN, F.O. Characterization of heavy metal pollutants of soils and sediments around a crude-oil production terminal using EDXRF. **Nuclear Instrument and Methods in Physics Research B**, v.194, p.61–64, 2002.

POSTGATE, J.R. On the nutrition of *Desulphovibrio desulfuricans*. **J. Gen. Microbiol.**, v.5, p.714–724, 1951.

RAMOS, A., DELGADO, M.J., ÁLVAREZ-ROGEL, J. Distribución de la vegetación y movilización de metales pesados en suelos contaminados de un saladar costero de la Región de Murcia. Em: MÁRQUEZ, M. (Ed.), **Avances en Calidad Ambiental**. Universidad de Salamanca, Salamanca, p.493–498, 2002.

- RAURET, G. Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. **Talanta**, v.46, p.449–455, 1998.
- RULKENS, W.H., GROTENHUIS, J.T.C., TICHY, R. Em: SALOMONS, W., FORSTNER, U., MADER, P. (Eds.), **Heavy Metals**. Springer, Berlin, p. 151, 1995.
- SÁNCHEZ, J.; GARCIA R.; MILLÁN E. Ultrasonic bath digestion procedures for análisis of heavy metals in several reference materials. **Analisis**, v.22, p.222-225, 1994.
- SAND, W., GEHRKE, T., JOZSA, P.-G., SCHIPPERS, A., (Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v.59 (2–3), p.159– 175, 2001.
- TESSIER, A., CAMPBELL, P.G.C., BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace elements. **Anal. Chem.**, v.51, p.844–851, 1979.
- THOMAS, H. A. Bacterial densities from fermentation tube tests. **J. Am. Water Works Assoc.**, 1942.
- UTGIKAR, V.P.; HARMON, S.M.; CHAUDHARY, N.; TABAK, H.H.; GOVIND, R.; HAINES, J.R. Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. **Environ. Toxicol.**, v.17, p.40-48, 2002.
- VAN HOUTEN, R.T.; HULSHOFF-POL, L.W.; LETTING, G. Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. **Biotechnol. Bioeng.**, v.44, p.586-594, 1994.
- VAN ROY, S.; VANBROEKHOVEN, K.; DEJONGHE, W.; DILES, L. Immobilization of heavy metals in the saturated zone by sorption and in situ processes. **Hydrometallurgy**, v.83, p.195-203, 2006.
- ZEIEN, H., BRUMMER, G. Chemische Extraktionen zur Bestimmung von Schwermetallbindungsformen in Boden. **Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.**, v.59/I, p.505–510, 1989.
- Zhang, H., Zhao, F.-J., Sun, B., Davison, W., McGrath, S.P. A new method to measure effective soil solution concentration predicts Cu availability to plants. **Environ. Sci. Technol.**, v.35, p.2602–2607, 2001.