



Estudo da biotransformação de fosfogessos de diferentes origens usando bactérias sulfato-redutoras

André Lobato Marques Neto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação:
Doutora Maria Clara Costa

[2013]

Estudo da biotransformação de fosfogessos de diferentes origens usando bactérias sulfato-redutoras

Declaração de autoria de trabalho:

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

(André Lobato Marques Neto)

©Copyright: “A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Doutora Maria Clara Costa, por ter aceitado o convite de ser a minha orientadora. Pelo apoio, pela ajuda, pela paciência, pelo conhecimento e pelo interesse demonstrados ao longo deste tempo, um grande obrigado.

À Doutora Mónica Martins pelo conhecimento, disponibilidade, ensinamentos e conselhos dados ao longo do tempo passado no laboratório.

À Mestre Engenheira Ana Benedito pelo apoio incondicional, pelo esforço incansável e por todo o seu apoio durante a realização desta dissertação.

A todos os auxiliares de laboratório, que me ajudaram e me ensinaram algumas técnicas cruciais no desenvolvimento deste trabalho.

A todo o pessoal docente e não docente que me ajudaram ao longo destes anos na universidade e que resultaram num grande e profundo conhecimento, que me garante bases sólidas na área de engenharia biológica.

À Associação Académica da Universidade do Algarve, pelos dois anos de associativismo, do qual fiz parte, e que me ensinaram a desenvolver capacidades que eu desconhecia, e por me fazerem ver que o trabalho de voluntariado é muito importante para o desenvolvimento pessoal.

Ao grupo Nosolo Água, que ao longo destes anos, durante o verão, foi a empresa para a qual trabalhei, e a toda a equipa que me ajudou a conhecer o mundo do trabalho, não esquecendo a entreajuda e o companheirismo.

Aos meus ex-colegas da Residência, Lote E e Lote O nas Gambelas, e às suas respetivas funcionárias.

Aos meus grandes amigos, que estão sempre no meu coração, Diogo Luz, João Camponês, Ana Constantino, Bruno Varela, Hugo Duarte, Fábio Alexandre, Luís Fortes e Vítor Hugo.

Também gostaria de salientar todos os meus amigos que ao longo da minha vida me ajudaram a construir a pessoa que sou hoje, mas na impossibilidade de agradecer individualmente fica aqui um obrigado especial.

À Ana Paula Rita e à Vera Rita, por terem sido como duas mães adotivas, pelo carinho, paciência e compreensão que me deram nestes longos anos.

À Vanessa Sousa que durante estes últimos sete anos me deu muito amor e carinho, com quem eu aprendi muito, e que espero continuar a aprender e, sobretudo, pela lição de vida que me dá todos os dias.

À minha família, destacando a minha tia que me ajudou imenso na minha vida de estudante, pelo vosso apoio, ajuda e pelo incentivo que me deram.

Ao meu pai por todo o apoio, pelo incentivo e por toda a ajuda que me deu. Espero que tenha orgulho em mim. À minha mãe pelo carinho e pela força que me deu.

RESUMO

Os resíduos industriais são atualmente considerados um grave problema ambiental, devido ao grande volume gerado, à presença de materiais perigosos e à dificuldade crescente de se conseguir áreas para o seu armazenamento.

Na indústria de fertilizantes a reação do minério fosfatado com o ácido sulfúrico, resulta em ácido fosfórico (que é a base dos fertilizantes), e num subproduto: o fosfogesso. Este fosfogesso, constituído maioritariamente por sulfato de cálcio, é um pó cinzento, húmido, que ainda contém ácidos residuais, fluoretos, metais pesados (Cádmio, Zinco, Cobre, Chumbo, Crómio, Níquel, Manganês, Titânio, Estrôncio) e materiais radioativos (Urânio e Rádio).

Nas últimas décadas, o tamanho crescente das pilhas de fosfogessos em todo o mundo tem estimulado a pesquisa de novas tecnologias para o tratamento e valorização destes resíduos.

As bactérias sulfato-redutoras são um grupo grande de microrganismos anaeróbios que desempenham um papel importante em muitos processos bioquímicos. O nome provém da utilização de sulfato como aceitador final de eletrões na biotransformação de matéria orgânica. Para além da capacidade de reduzirem o sulfato, o sulfureto gerado tem a capacidade de reagir com metais pesados e formar precipitados insolúveis de sulfuretos metálicos.

No presente trabalho foram testados diferentes consórcios de bactérias sulfato-redutoras, provenientes do enriquecimento de diferentes amostras ambientais, com vista ao estudo da degradação de fosfogessos e conseqüente consumo de sulfato. Com as bactérias selecionadas variou-se ainda a origem dos fosfogessos e a fonte de carbono do meio.

De entre os consórcios estudados, o mais eficaz foi o proveniente das lamas da ETAR de Lagos, pois consegue reduzir uma maior quantidade de sulfato independentemente da fonte de fosfogessos. Relativamente ao estudo das fontes de carbono alternativas, o etanol apresentou-se como sendo a melhor alternativa ao lactato de sódio.

Palavras chave: Fosfogessos, Bactérias sulfato-redutoras, Biotransformação, Sulfato

ABSTRACT

Industrial wastes are currently considered a serious environmental problem due to the large volume generated, the presence of hazardous materials and the increasing difficulty of obtaining areas for storage.

In the fertilizer industry reaction of phosphoric rock with sulfuric acid results in phosphoric acid (which is the basis of fertilizers), and a by-product the phosphogypsum. The main component is gypsum (CaSO_4) that is a wet gray powder, that still contain impurities such as acids, fluorides, heavy metals (Cadmium, Zinc, Copper, Lead, Chromium, Nickel, Manganese, Titanium, Strontium) and radioactive materials (Uranium and Radio).

In recent decades, the increasing size of phosphogypsum piles all over the world has stimulated research on new technologies for the treatment of this waste.

Sulphate-reducing bacteria are a large group of anaerobic microorganisms which play an important role in many biochemical processes. The name comes from the use of sulphate as final electron acceptor in the biotransformation of organic matter, producing sulphide, which is capable of reacting with heavy metals to form insoluble precipitates.

In the present work we tested different sulphate-reducing bacterial consortia from the enrichment from different environmental samples, in order to study the phosphogypsum degradation and consequent consumption of sulphate. With the selected bacteria the origin of phosphogypsum as well as the carbon source of the medium was varied.

Among the consortia tested, the most effective were those from sludge of the wastewater treatment plant of Lagos, because they can effectively use sulphate regardless the source of phosphogypsum. Regarding alternative carbon sources, ethanol was the best alternative to sodium lactate.

Keywords: Phosphogypsum, Sulphate-reducing bacteria, Biotransformation, Sulphate

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL.....	1
1.1.1. BIOREMEDIAÇÃO	1
1.1.1.1. BIODEGRADABILIDADE	2
1.2. FOSFOGESSOS	2
1.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS	3
1.2.2. ELIMINAÇÃO/REUTILIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS	5
1.2.3. POTENCIAIS RISCOS E IMPACTO AMBIENTAL DOS FOSFOGESSOS	5
1.3. BACTÉRIAS SULFATO-REDUTORAS (BSR)	6
1.3.1. DISTRIBUIÇÃO E CRESCIMENTO	10
1.3.2. FONTE DE CARBONO	11
1.4. OBJECTIVOS.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. CULTURAS DE BSR, FOSFOGESSOS, MEIOS E REAGENTES	13
2.2. MÉTODOS	13
2.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS	13
2.2.2. MEIO DE CULTURA	14
2.2.3. INOCULAÇÃO DE BSR INICIAL	15
2.2.4. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS DIFERENTES BSR.....	17
2.2.4.1. FOSFOGESSOS DO BARREIRO	17
2.2.4.2. FOSFOGESSOS DA ESPANHA E TUNÍSIA	18

2.2.5. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS USANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS.....	22
3.2. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS DIFERENTES BSR	23
3.2.1. FOSFOGESSOS DO BARREIRO	23
3.2.2. FOSFOGESSOS DA ESPANHA E TUNÍSIA	27
3.3. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS BSR COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	31
4. CONCLUSÕES.....	37
5. BIBLIOGRAFIA.....	39
ANEXOS	42
ANEXO 1 - DADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS DO BARREIRO PELAS DIFERENTES BSR.....	42
ANEXO 2 - DADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS DE ESPANHA E TUNÍSIA PELAS DIFERENTES BSR	52
ANEXO 3 - DADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS BSR COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BSR	Bactérias sulfato-redutoras
BV	BSR provenientes de lamas da ETAR de Montenegro (Faro, Portugal) enriquecidas em resíduos vinícolas
D4	BSR provenientes de enriquecimento de fosfogessos do Barreiro
Eh	Potencial redox
EL	BSR provenientes de lamas da ETAR de Lagos (Portugal)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
UV	Radiação Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – A :Depósitos de fosfogesso na Lituânia; B: Depósito de fosfogessos na Quimiparque, Barreiro.....	3
Figura 1.2 - Ciclo do enxofre.	6
Figura 1.3 - Árvore filogenética baseada em sequências quase completas de RNA ribossomal das BSR.....	8
Figura 2.1 - Inóculos em <i>stock</i> de consórcios de BSR existentes no Laboratório de Tecnologias Ambientais do CCMAR.....	13
Figura 2.2 - Meio Postgate B modificado.	14
Figura 2.3 - Centrifugação dos inóculos (A); Recolha de amostras, efetuada na <i>hotte</i> (B).....	16
Figura 2.4 - Recolha das amostras.....	16
Figura 2.5 - Organização dos frascos de inoculação na biotransformação dos fosfogessos do Barreiro pelas diferentes BSR.....	17
Figura 2.6 - Biotransformação dos fosfogessos do Barreiro pelas diferentes BSR.	18
Figura 2.7 - Organização dos frascos de inoculação na biotransformação dos fosfogessos, de Espanha e Tunísia, pelas diferentes BSR.....	18
Figura 2.8 - Biotransformação dos fosfogessos, de Espanha e Tunísia, pelas BSR.	19
Figura 2.9 - Organização dos frascos de inoculação na biotransformação dos fosfogessos pelas BSR com diferentes fontes de carbono.....	20
Figura 2.10 - Biotransformação dos fosfogessos pelas BSR com diferentes fontes de carbono.	21
Figura 3.1 - Estudo da biotransformação dos fosfogessos do Barreiro com diferentes consórcios de BSR em que se acompanha a redução do sulfato ao longo de 30 dias. ...	23
Figura 3.2 - Estudo da biotransformação dos fosfogessos do Barreiro com diferentes consórcios de BSR em que se acompanha o potencial redox ao longo de 30 dias.....	25
Figura 3.3 - Estudo da biotransformação dos fosfogessos do Barreiro com diferentes consórcios de BSR em que se acompanha o pH ao longo de 30 dias.....	26

Figura 3.4 - Estudo da biotransformação de fosfogessos de Espanha e Tunísia por BSR ao longo de 30 dias.....	28
Figura 3.5 - Estudo da biotransformação de fosfogessos de Espanha e Tunísia por BSR com concentrações de 5 g/L de fosfogessos ao longo de 30 dias.....	29
Figura 3.6 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos com diferentes concentrações pelas BSR (EL) sem fonte de carbono presente no meio postgate B modificado sem sulfatos, em que se acompanha a redução dos sulfatos ao longo de 30 dias.....	31
Figura 3.7 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos com diferentes concentrações pelas BSR (EL) sem fonte de carbono presente no meio postgate B modificado sem sulfatos, em que se acompanha o potencial redox e o pH ao longo de 30 dias.....	32
Figura 3.8 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos com diferentes concentrações pelas BSR (EL) com diferentes fontes de carbono presente no meio postgate B modificado sem sulfatos, em que se acompanha a redução dos sulfatos ao longo de 30 dias.....	33
Figura 3.9 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos com diferentes concentrações pelas BSR (EL) com etanol como fonte de carbono ao longo de 30 dias.....	34
Figura 3.10 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos com diferentes concentrações pelas BSR (EL) com resíduos vinícolas como fonte de carbono ao longo de 30 dias.....	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais constituintes de fosfogessos com diferentes origens geográficas, em percentagem.....	4
Tabela 1.2 – Elementos vestigiais nos fosfogessos em ppm.	4
Tabela 1.3 - Reações de redução de sulfatos.	9
Tabela 1.4 - Vantagens e desvantagens das diferentes fontes de carbono presentes em meios de crescimento de BSR.	11
Tabela 2.1 - Composição do meio Postgate B original com concentrações g/L	14
Tabela 2.2 - Composição do meio Postgate B modificado com concentrações g/L.....	14
Tabela 3.1 - Dados de pH, Eh e condutividade ao fim de duas horas.	22

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

A biotecnologia ambiental emprega um conjunto diversificado de abordagens metodológicas para estudar e explorar a biodiversidade natural de microrganismos e as suas enormes capacidades metabólicas (Demain e Davies, 1999). Este campo inclui a aplicação de microrganismos para melhorar a qualidade ambiental e, a descoberta de novos microrganismos com potencial metabólico, que podem ser empregues em aplicações industriais e ambientais (Demain e Davies, 1999). A característica que distingue a biotecnologia ambiental dos outros campos da biotecnologia é a necessidade de alcançar funções microbiológicas em ambientes complexos que não estão sujeitos a um controlo experimental preciso, ao contrário do que acontece quando se usam bioreatores (Demain e Davies, 1999). A biotecnologia ambiental aplicada à descontaminação e degradação de contaminantes ambientais usando microrganismos – bioremediação - tem recebido uma atenção crescente nos últimos tempos. (Guo *et al.*, 2010)

1.1.1. BIOREMEDIAÇÃO

A natureza perigosa dos resíduos pode ser atenuada pela aplicação de métodos convencionais de descontaminação, como é o caso da incineração e do uso de aterros. No entanto, a aplicação destas técnicas, que envolve a remoção e transporte das zonas contaminadas, é economicamente dispendiosa, e nem sempre conduz à destruição e redução da toxicidade dos compostos (Jordening e Winter, 2005).

As estratégias baseadas no uso de microrganismos são consideradas uma potencial alternativa economicamente atrativa, oferecendo várias vantagens quando comparadas com as técnicas tradicionais, nomeadamente os baixos custos de operação e alta eficiência na utilização de resíduos (Valls e de Lorenzo, 2002).

A bioremediação é uma tecnologia que usa processos metabólicos para degradar ou transformar contaminantes, de modo a que estes não permaneçam numa forma nociva (Jordening e Winter, 2005). No entanto ainda não é a solução para todos os problemas de poluição ambiental. Como outras tecnologias, está limitada pelos resíduos que pode tratar, pelas condições do local do tratamento e por cinéticas habitualmente

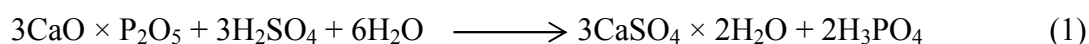
desfavoráveis (Demain e Davies, 1999). A base subjacente da bioremediação é o processo natural de biodegradação.

1.1.1.1. BIODEGRADABILIDADE

A biodegradação consegue reduzir a concentração de poluentes através da oxidação dos poluentes orgânicos. O ião sulfato é reduzido a sulfureto, em resultado da atividade metabólica das bactérias. Os microrganismos são especialmente úteis para a bioremediação devido à sua diversidade metabólica (Demain e Davies, 1999).

1.2. FOSFOGESSOS

O fosfogesso é um resíduo ácido produzido em grandes quantidades pela indústria de fertilizantes, durante o processo húmido do ácido fosfórico. (Attar *et al.*, 2011). Neste processo, lama concentrada de rocha fosfórica reage com ácido sulfúrico e produz ácido fosfórico e fosfogesso segundo a equação (1):



Este processo é económico, mas gera uma grande quantidade de fosfogessos. Por cada tonelada de ácido fosfórico obtida, são produzidas 5 toneladas deste resíduo. (Wolicka e Borkowski, 2009). Estima-se que a produção deste subproduto em todo o mundo seja entre 100 a 280 milhões de toneladas por ano, sendo que os principais produtores são os EUA, a ex-URSS, a China, a África e o Médio Oriente (Yang *et al.*, 2009). Os fosfogessos existentes em Portugal encontram-se no Barreiro, na Quimiparque, e consiste numa pilha com cerca de 1 milhão de toneladas (Estudo de Impacto Ambiental da ETAR Barreiro/Moita) (Figura 1.1-B).



Figura 1.1 – **A:** Depósitos de fosfogesso na Lituânia (<http://www.pbase.com/image/64948271>); **B:** Depósito de fosfogessos na Quimiparque, Barreiro.

1.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS

A composição química do fosfogesso (Tabela 1.1) está dependente da rocha fosfórica usada no processo de produção de ácido fosfórico, do tipo de processo húmido usado, da eficiência da operação, da idade, da localização e da profundidade do aterro ou da pilha em que este é armazenado. O fosfogesso é um pó cinzento que tem pouca ou nenhuma elasticidade. Por conter resíduos de ácidos fosfórico e sulfúrico é considerado um subproduto ácido ($\text{pH} < 3$). A solubilidade é dependente do pH e é elevada em água salgada ($\approx 4,1 \text{ g/l}$) (Tayibi *et al.*, 2009).

Tabela 1.1 - Principais constituintes de fosfogessos com diferentes origens geográficas, em percentagem, adaptado de Tayibi *et al.*, 2009.

Componente	CaSO ₄	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MgO	SO ₃	Na ₂ O	P ₂ S ₅	F ⁻
Argélia	31,18	0,88	0,1	0,03	0,06	40,9	1,32	0,87	1,2
Egito	32,13	8,78	0,29	0,35	0,09	37,6		1,82	0,8
Índia	31,09	0,29	0,54		1,31	43,21	0,29	0,47	0,86
Turquia	32,04	3,44	0,88	0,32		44,67	0,13	0,5	0,79
China	30,79	1,88	2,1		0,8	42,56			
Marrocos	30,5	9,5	2,8	0,9	0,3	42,9		0,5	0,15
Tunísia	31-32		0,1	0,1	0,4	46	0,3	1,2	1,2
EUA	25-31	3-18	0,1-0,3	0,2		55-58		0,5-4,0	

O fosfogesso é maioritariamente constituído por sulfato de cálcio di-hidratado (CaSO₄.2H₂O) mas contém vários tipos de impurezas tais como ácidos resíduais, fluoretos, metais (Arsénio, Prata, Bário, Cádmio, Crómio, Chumbo, Estrôncio, Molibdénio, Níquel, Antimónio Mercúrio, Cobre e o Zinco), elementos radioativos (Urânio, Tório e Rádio) e matéria orgânica como aminas e cetonas, que se encontram normalmente adsorvidas à superfície dos cristais de gesso (Rutherford *et al.*, 1996; Lottermoser, 2007). A Tabela 1.2 mostra algumas dessas impurezas e a sua quantidade, em fosfogessos de origens diversas.

Tabela 1.2 – Elementos vestígiais nos fosfogessos em ppm. Adaptado de Lottermoser, 2007.

Elementos	Fonte de rocha Fosfórica					
	Florida	Idaho	Tunísia	África do Sul	Marrocos	Senegal
Cobre	8	10-42	6	103	< 6	9
Chumbo	3-7	3-7			< 18	< 11
Zinco	9	18-112	315	6	18	6
Cádmio	7		40			
Molibdénio	16	1-2	5			
Níquel	2	3-15	15	13	13	13
Crómio		10-70				
Mercúrio			14	< 0,05		
Arsénio	40	1-2			< 5	< 6
Antimónio	100	0,3-0,8				
Selénio			4-67			
Urânio		6-13				

Quando os fosfogessos entram em contacto com algum líquido, alguns dos seus componentes são dissolvidos sofrendo assim um processo de lixiviação. Testes de lixiviação são frequentemente projetados para simular uma situação de exposição no campo. Há uma série de fatores (físicos, químicos e biológicos) que podem influenciar a taxa a que os componentes são dissolvidos a partir da matriz do material, podendo também gerar efeitos no pH ou no desenvolvimento de condições redutoras (Van der Sloot *et al.* 1998).

1.2.2. ELIMINAÇÃO/REUTILIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS

Existem essencialmente quatro métodos para eliminar este subproduto: descarregar em água, despejar em aterros, armazenar em pilhas ou utilizar como matéria-prima.

A descarga no mar pode provocar aumento de fosfato e cádmio nos sedimentos e na costa litoral, sendo prejudicial para o ambiente. Para criar aterros para este resíduo, devido à acidez do mesmo, é preciso misturá-lo com outros materiais de modo a neutralizar a acidez. Para além disso é necessário forrar o aterro com materiais impermeáveis como a argila, de modo a garantir que os metais pesados ou os metalóides não contaminem as águas subterrâneas. O modo mais utilizado consiste em armazenar os fosfogessos em pilhas perto da fábrica, sendo necessário medidas de prevenção da contaminação desses mesmos locais (Lottermoser, 2007).

O uso de fosfogessos como matéria-prima, nomeadamente na agricultura para o melhoramento de solos, em terraplanagem e na construção civil como material de construção é recente (Lottermoser, 2007).

1.2.3. POTENCIAIS RISCOS E IMPACTO AMBIENTAL DOS FOSFOGESSOS

Frequentemente, os fosfogessos encontram-se acumulados em pilhas nas instalações das fábricas. A acumulação indevida dos fosfogessos, a falta de cuidado ou de manutenção das pilhas é a principal causa do impacto ambiental dos fosfogessos. Os principais perigos são: a derrocada dessas pilhas, que por sua vez vão dar a cursos de água e resultam em danos nos ecossistemas; as emissões atmosféricas que as pilhas de fosfogessos libertam, como por exemplo o rádon gasoso ou compostos de flúor, em quantidades consideráveis e, a libertação de radioatividade, devido às grandes concentrações de urânio e tório na rocha fosfórica (Lottermoser, 2007).

Nas décadas mais recentes, o crescimento exponencial de pilhas de fosfogessos tem levado a uma procura crescente de novas tecnologias para o tratamento dos mesmos. A aplicação de bactérias sulfato-redutoras na biodegradação de fosfogessos, como fonte rica em sulfato, tem mostrado ser uma solução muito promissora (Rzeczycka e Baszczyk, 2005; Azabou *et al.*, 2005; Azabou *et al.*, 2006a; Wolicka, 2007; Wolicka e Borkowski, 2009).

1.3. BACTÉRIAS SULFATO-REDUTORAS (BSR)

Durante muitos milhões de anos existiu enxofre na superfície do planeta, predominantemente na sua forma oxidada, como sulfato em solos, rochas, rios e mares. Para mobilizar o enxofre de forma a ser biologicamente usado, este necessita ser reduzido, como acontece com a fixação biológica do azoto ou a produção biológica de oxigénio. Então o ciclo do enxofre (Figura 1.2) tornou-se reconhecido como um processo crítico e importante do qual a vida no planeta depende (Postgate, 1984).

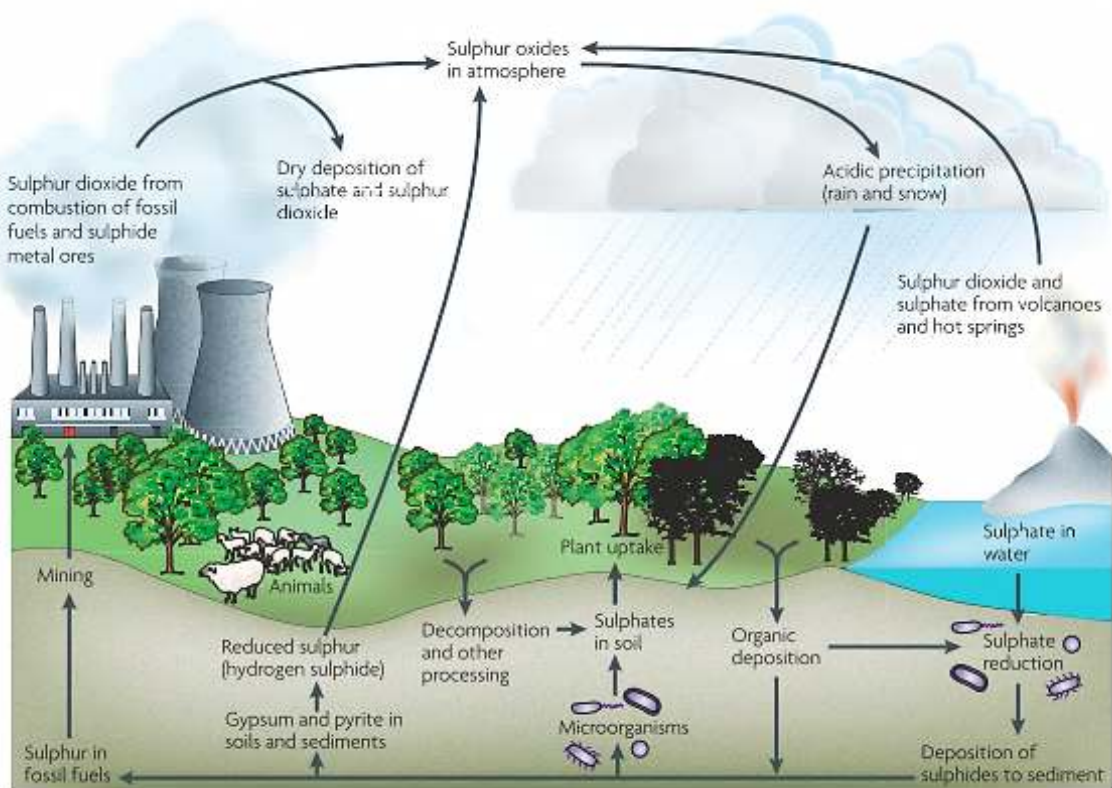


Figura 1.2 - Ciclo do enxofre (Muyzer e Stams, 2008).

Os maiores reservatórios de enxofre no planeta são sulfuretos de ferro (pirite) e gesso (CaSO_4) presentes em sedimentos, rochas, e sais de sulfatos presentes na água do mar. O enxofre é então usado por microrganismos e plantas, e em seguida por animais. A decomposição de organismos, mortos na ausência de oxigênio, liberta enxofre de novo na forma de sulfureto de hidrogênio. A combustão de combustíveis fósseis e a emissão de gases pelos vulcões libertam para a atmosfera dióxido de enxofre, reagindo com a água e formando ácido sulfúrico, resultando em chuvas ácidas. Os microrganismos desempenham um papel importante na reciclagem destes compostos de enxofre (Muyzer e Stams, 2008).

As BSR constituem um grupo diverso de procariotas filogeneticamente e metabolicamente versáteis, que contribuem para uma variedade de funções essenciais em muitos ambientes anaeróbios. Para além da importância óbvia no ciclo do enxofre, são ainda importantes reguladores de uma variedade de processos em solos pantanosos. Com base na análise das sequências do gene 16S rRNA, as BSR conhecidas podem ser agrupadas em sete grupos filogenéticos: cinco pertencentes às bactérias e dois pertencentes às *archaea* (Figura 1.3) (Muyzer e Stams, 2008).

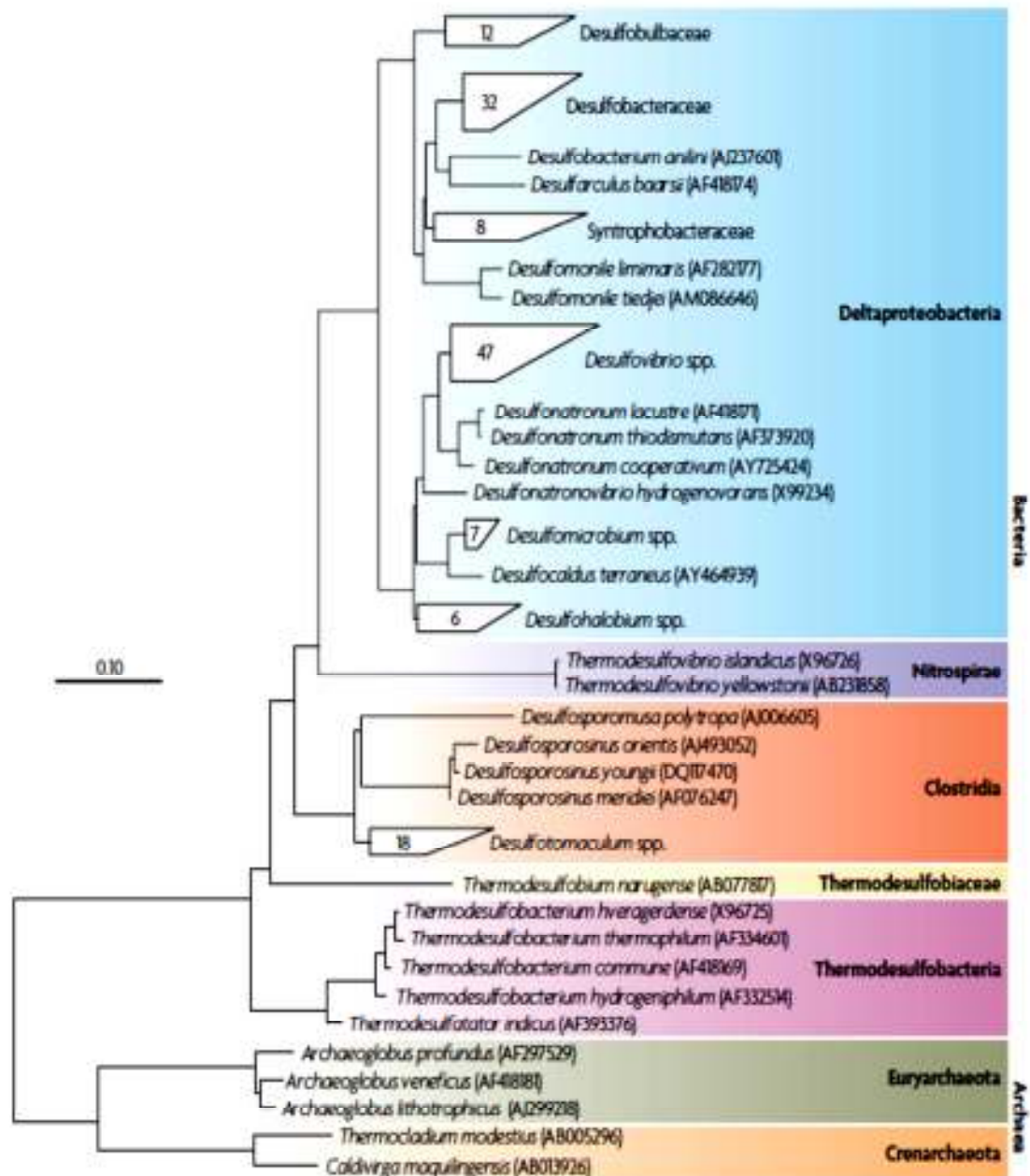


Figura 1.3 - Árvore filogenética, baseada em sequências quase completas de RNA ribossomal das BSR (Muyzer e Stams, 2008).

Todos estes grupos de BSR são caracterizados por usarem o sulfato como aceitador final de electrões na respiração anaeróbia, mas podem dividir-se em quatro grupos: mesofílicas gram-negativas (*Deltaproteobacteria*); as formadoras de esporos gram-positivas (*Clostridia*); as bactérias termofílicas (*Thermodesulfobacteria*, *Nitrospirae* e *Thermodesulfobiaceae*) e as archaea termofílicas (*Archaeoglobus*, *Thermocodium* e *Calditerrivita*) (Castro *et al.*, 2000).

Vários organismos são capazes de reduzir sulfatos em pequenas quantidades, pois estes são necessários para a síntese de compostos orgânicos. O processo requer energia química na forma de ATP e é conhecido como a via assimilatória de redução de sulfato (Ibanez *et al.*, 2007).

O nome “bactérias sulfato-redutoras” é dado à classe dos microrganismos que conduzem à redução do sulfato em larga escala por uma via dissimilatória. Nesta redução, os microrganismos usam o sulfato como aceitador externo de electrões na oxidação de substratos orgânicos, resultando na produção de sulfureto, sendo este processo também chamado de respiração de sulfato (Barton e Fauque, 2009).

Todas as bactérias sulfato-redutoras são estritamente anaeróbias, sendo que nenhuma pode crescer usando o oxigénio como aceitador de electrões, e na presença de oxigénio o seu crescimento também é inibido (Postgate, 1984).

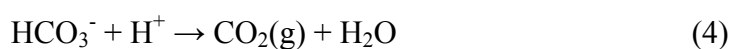
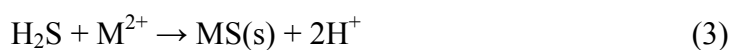
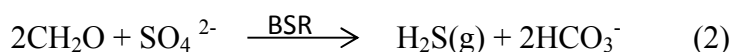
Algumas das principais reacções de redução de sulfatos estão demonstradas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Reacções de redução de sulfatos adaptado (Muyzer e Stams, 2008).

Reacções de Redução de sulfatos
$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$
$\text{Acetato}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$
$\text{Lactato} + 0,5 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 0,5 \text{HS}^-$

Na respiração do sulfato, o sulfureto produzido, normalmente na sua forma hidrolisada de sulfureto de hidrogénio (H_2S), tem a capacidade de rapidamente reagir com metais presentes em solução e formar precipitados insolúveis.

O processo de transformação biológica é descrito através das equações (2), (3) e (4) onde o formaldeído (CH_2O) representa o dador de electrões e o M^{2+} representa os metais pesados (Qiu *et al.*, 2009).



A concentração de sulfureto é dependente do pH. Num pH ácido só os sulfuretos de metais que possuam uma baixa solubilidade é que podem ser precipitados, por exemplo o sulfureto de mercúrio (HgS), o trissulfureto de arsénio (As₂S₃), o sulfureto de cádmio (CdS), o sulfureto de cobre (CuS) e o sulfureto de chumbo (PbS). Em pH alcalino formam-se precipitados de metais com alta solubilidade como o sulfureto de zinco (ZnS), o sulfureto de ferro (FeS) e o sulfureto de níquel (NiS) (Jordening e Winter, 2005). Este processo biológico é muito eficaz a remover metais em pequenas concentrações. Assim as BSR têm um papel importante na bioremediação de materiais contaminados com metais, tanto naturalmente, como na escala laboratorial (Azabou *et al.*, 2006b).

A aplicação de BSR na biotransformação de fosfogessos como um resíduo sólido industrial, rico em sulfatos, tem sido estudada. Esses estudos realizados mostraram que as BSR têm a capacidade de reduzirem o sulfato dos fosfogessos em S²⁻, se ao meio de crescimento for adicionada uma fonte de carbono e de azoto (Azabou *et al.*, 2006a).

1.3.1. DISTRIBUIÇÃO E CRESCIMENTO

Consórcios de BSR desenvolvem-se em diferentes ambientes. Podem ser encontrados em sedimentos marinhos, águas termais, depósitos de enxofre, bolsas de gás natural, lamas de estuários, reservatórios de água salgada, lamas de tratamento de efluentes, no trato alimentar de animais e humanos, resíduos industriais ricos em sulfatos (indústria química, metalúrgica e do papel) e em ambientes com valores de pH extremos, como águas de mina, com valores próximos de 2 (Rzeczycka *et al.* 2003; Muyzer e Stams, 2008).

Tal como demonstrado por Azabou *et al.* 2005, Postgate 1984, Wolicka 2007 e Cohen 2006, as condições ótimas de desenvolvimento das BSR em laboratório, na presença de fosfogessos, verificam-se com temperatura de 30°C e pH a rondar os 7, sendo a melhor fonte de carbono o lactato e a melhor fonte de azoto, o extracto de levedura. O meio mais utilizado para o crescimento é o Postgate.

1.3.2. FONTE DE CARBONO

Considerando que a redução do sulfato é um processo que requer muita energia, a escolha de uma fonte de carbono tem um efeito importante na eficiência e na viabilidade econômica da tecnologia de bioremediação, baseada no uso destas bactérias.

As BSR são conhecidas por utilizar hidrogênio e um grande número de compostos orgânicos simples como os ácidos carboxílicos (o lactato e o acetato) ou álcoois (etanol e o metanol) como fontes de energia (Liamleam e Annachatre, 2007). Na Tabela 1.4, apresentam-se as vantagens e as desvantagens de cada fonte de energia.

Várias fontes naturais de materiais orgânicos usadas como fontes de carbono já foram investigadas: o melão (Annachatre e Suktrakoolvait, 2001), o soro de leite e resíduos vinícolas (Martins *et al.*, 2009), o iogurte (Wolicka, 2007), aparas de madeira, restos de folhas e fezes de galinha (Zagury *et al.*, 2006). A escolha da fonte de carbono depende, em grande medida, da degradabilidade do substrato orgânico.

Tabela 1.4 - Vantagens e desvantagens das diferentes fontes de carbono presentes em meios de crescimento de BSR, adaptado de Kaksonen e Puhakka, 2007.

Fonte de carbono ou energia	Vantagens (+) e desvantagens (-)
H₂	+ Respiração de sulfato termodinamicamente mais favorável - Exigências de segurança rigorosas devido à sua natureza explosiva, o que torna muito dispendioso
Lactato	+ Fonte de carbono mais usada pelas BSR + Promove uma elevada produção de biomassa - Muito dispendioso a nível económico
Acetato	+ Intermediário chave na degradação de substâncias orgânicas em processos anaeróbios - Poucas BSR são capazes de o oxidar - Baixa produção de biomassa
Metanol	+ Facilmente disponível + Baixo custo - Crescimento Lento - Apenas algumas BSR são capazes de o utilizar
Etanol	+ Facilmente oxidável pelas BSR + Baixo custo - Oxidação não é completa o que impede o meio de se tornar alcalino levando a um acumular de acetato - Nem todas as BSR o utilizam

1.4. OBJETIVOS

Esta dissertação teve como objetivo o estudo de diferentes consórcios de bactérias sulfato-redutoras, com vista à bioremediação de fosfogessos. Assim, foi realizado um estudo sistemático utilizando três consórcios de BSR, com diferentes origens e diferentes concentrações de fosfogessos. Posteriormente estudou-se a utilização de diferentes fontes de carbono alternativas. De acordo com os objetivos do trabalho, este foi desenvolvido nas seguintes fases:

I. Numa primeira fase, testou-se a atividade de consórcios de BSR provenientes de amostras ambientais, recolhidos em Portugal (inóculos existentes no laboratório de Tecnologias Ambientais – CCMAR/UALG), na transformação de fosfogessos provenientes do parque industrial do Barreiro.

II. Na segunda parte do trabalho, após a seleção dos melhores consórcios de BSR e das melhores concentrações de fosfogessos, realizou-se um estudo com fosfogessos provenientes de Espanha e da Tunísia.

III. A terceira parte deste trabalho, teve como objetivo a investigação da utilização de duas fontes de diferentes de carbono (etanol e resíduos vinícolas) da utilizada até então (lactato) e verificar se se conseguiam desempenhos iguais ou melhores do que o lactato na atividade de redução dos sulfatos, presentes nos fosfogessos, por parte das BSR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CULTURAS DE BSR, FOSFOGESSOS, MEIOS E REAGENTES

As culturas de bactérias sulfato-redutoras utilizadas foram previamente obtidas de inóculos em *stock*, existentes no Laboratório de Tecnologias Ambientais do CCMAR/UALG, resultantes do enriquecimento de amostras ambientais de fosfogessos do Barreiro, de lamas da ETAR de Montenegro (Faro) enriquecidas em resíduos vinícolas e lamas provenientes da ETAR de Lagos designadas respetivamente de (D4), (BV) e (EL).



Figura 2.1 - Inóculos em *stock*, de consórcios de BSR, existentes no Laboratório de Tecnologias Ambientais do CCMAR.

Os fosfogessos utilizados foram provenientes do parque industrial da Quimigal (Barreiro), da Tunísia (Sfax) e de Espanha (Huelva).

Todos os meios utilizados são modificações do meio Postgate B (Postgate, 1984). O *kit* para medição de sulfato foi adquirido à VWR. Os restantes reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. Todo o protocolo experimental teve como base estudos anteriores (Costa *et al.* 2009 e Martins *et al.*, 2009).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS

Para a caracterização dos fosfogessos foi determinado o seu pH, o potencial redox (Eh) e a condutividade.

Procedimento Experimental

Foram colocadas 10 g de fosfogessos num copo com 25 mL de água destilada, ficando a lixiviar durante uma hora. Ao fim desse tempo foi medido o pH e o potencial

redox. Nesse mesmo copo foram colocados mais 25 mL de água destilada e após mais uma hora de lixiviação foi medida a condutividade e o pH (protocolo utilizado no Laboratório de Solos).

2.2.2. MEIO DE CULTURA

Ao longo do trabalho, o meio base utilizado foi o Postgate B (Tabela 5) sofrendo algumas modificações para o trabalho experimental.

Tabela 2.1 - Composição do meio Postgate B original, com concentrações g/L (Postgate, 1984).

K₃PO₄	0,5
NH₄Cl	1,0
CaSO₄	1,0
MgSO₄.7H₂O	2
Lactato de Sódio	3,5
Extracto de levedura	1,0
Ácido Ascórbico	0,1
Ácido Tioglicólico	0,1
FeSO₄.7H₂O	0,5

As alterações efetuadas deveram-se à natureza do trabalho realizado, o qual obrigou à alteração de alguns reagentes (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Composição do meio Postgate B modificado com concentrações g/L.

Grupo A	
K ₃ PO ₄ .H ₂ O	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,0 g
Extracto de levedura	1,0 g
Grupo B	
Ácido Ascórbico	0,1 g
Ácido Tioglicólico	75,4 µl
Sulfito de Sódio	0,5 g
Resazurina	0,03 g
Grupo C	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Grupo D	
Lactato de Sódio	7,75 g
Mg.Cl ₂ .6H ₂ O	2,0 g
Na ₂ SO ₄	1,0 g



Figura 2.2 - Meio Postgate B modificado.

As principais alterações efectuadas, ao meio original, foram a introdução de resazurina (corante indicando a presença de oxigénio), o sulfito de sódio e o Na_2SO_4 (fonte de sulfatos).

De modo a evitar problemas de precipitação/solubilidade, os diferentes reagentes foram agrupados de uma forma específica. Os grupos de reagentes foram adicionados por esta ordem: B e C, seguindo-se o grupo A e no final o grupo D. Para preparar este meio foi usada água da torneira. Por fim, o pH do meio foi acertado (7,0 a 7,5) através da adição de NaOH, para de seguida ser autoclavado. Todos os reagentes utilizados na realização dos ensaios laboratoriais foram pesados numa balança analítica (Shimadzu, AW220).

2.2.3. INOCULAÇÃO DE BSR INICIAL

Para obter os três diferentes consórcios de bactérias “ativos”, como referido anteriormente, foi realizado uma re-inoculação das amostras D4, BV e EL a partir de inóculos em *stock*.

Procedimento Experimental

Foram centrifugados (Hettich Zentrifugen, Alemanha) 20 mL de solução proveniente de cada cultura de BSR, amostra esta que foi recolhida através de uma seringa, a 4000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2 mL de meio Postgate B modificado com 1 g/L de sulfatos (Tabela 2.2) sendo de seguida colocado 1 mL em frascos de inoculação, onde previamente foram adicionados 100 mL do mesmo meio usado na ressuspensão. De forma a criar um ambiente anaeróbio, o frasco foi submetido a uma purga com azoto durante, aproximadamente, 5 minutos. Por fim, de modo a formar uma camada com cerca de 1 cm de espessura, foram adicionados 10 mL de parafina líquida (de forma a evitar trocas gasosas na superfície do meio). Os frascos foram fechados com tampas de borracha e selados com uma tampa de alumínio, usando um encapsulador (Supelco, EUA) e guardados no laboratório à temperatura ambiente. Este ensaio foi realizado três vezes, pois foram utilizados três consórcios diferentes de culturas de BSR (D₄, BV e EL), em duplicado. Paralelamente foi feito um controlo negativo (meio sem inóculo).

Após inoculação os frascos foram incubados à temperatura ambiente durante 4 semanas. Todo o material usado foi previamente esterilizado através da autoclave

(esterilização por calor húmido 15 min \approx 121°C), e todo o protocolo experimental ocorreu dentro da *hotte* (Figura 2.3 – B).



Figura 2.3 – A: Centrifugação dos inóculos, B: Recolha de amostras efectuada na *hotte*.

As amostras foram recolhidas semanalmente (Figura 2.4) de modo a serem analisados os seguintes parâmetros: pH, potencial redox e sulfato. Para tal, com uma seringa e agulha estéreis foi recolhida cerca de 5 mL de amostra para tubos Falcon de 15 mL previamente lavados com HNO₃ e passados por água destilada. Após a recolha, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm



Figura 2.4 - Recolha das amostras

durante 10 min. O sobrenadante foi recuperado para outro tubo de Falcon e foram analisados de imediato o Eh, o pH e o sulfato. O pH e o Eh foram medidos através de um medidor de pH/potencial (Crison GLP 21, Espanha) e o sulfato através do espectrofotómetro de UV/Visível (Hach-Lange DR2800 EUA).

Para obter a concentração de sulfato, primeiramente foi realizada uma leitura com água destilada (branco), sendo depois a amostra diluída de acordo com o limite superior (70 mg/L) e inferior do espectrofotómetro, e com a adição do reagente (SULFAVER 4 VWR). Após homogeneização da mistura e terminado o período de reação (5 minutos) foi analisado o sulfato, a um comprimento de onda de 450 nm.

2.2.4. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS DIFERENTES BSR

2.2.4.1. FOSFOGESSOS DO BARREIRO

Foram utilizados os três consórcios de BSR (D4, BV e EL), em diferentes condições:

- Diferentes concentrações de fosfogessos (2 g/l, 5 g/l e 10 g/l);
- Um controlo positivo, contendo as bactérias e o meio de cultura;

Foi ainda efectuado um ensaio da lixiviação, usando apenas o meio de cultura com as diferentes concentrações de fosfogessos, e paralelamente um controlo negativo (sem a amostra). Todos os ensaios foram realizados em duplicado (Figura 2.5).

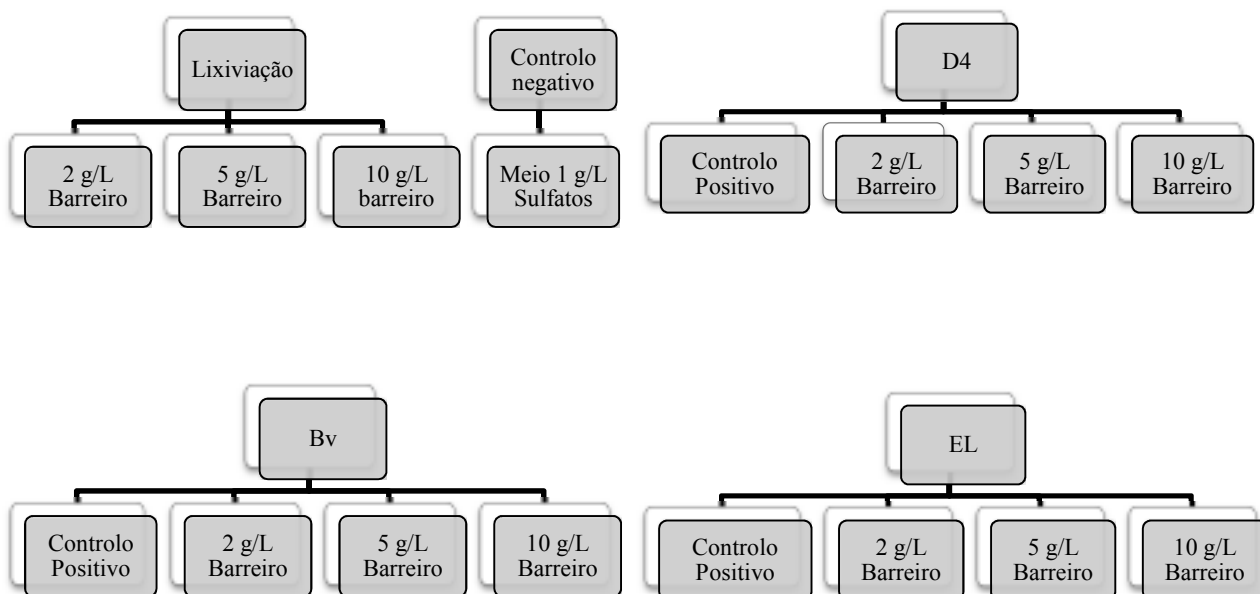


Figura 2.5 - Organização dos frascos de inoculação na biotransformação dos fosfogessos do Barreiro pelas diferentes BSR.

Para os frascos que não continham os fosfogessos, foi preparado meio Postgate B modificado com 1 g/L de sulfato (Tabela 2.2) e para os que continham fosfogessos, usou-se o mesmo meio, sendo retirada a fonte de sulfatos (Na_2SO_4).

Depois de colocada a quantidade de fosfogessos em cada frasco, estes foram autoclavados, assim como todo o material utilizado nos ensaios.

O procedimento de inoculação usado foi igual ao descrito em 2.2.3, recolhendo-se amostras semanalmente.



Figura 2.6 - Biotransformação dos fosfogessos do Barreiro, pelas diferentes BSR.

2.2.4.2. FOSFOGESSOS DA ESPANHA E TUNÍSIA

Para este estudo, e tendo em conta os resultados da experiência anterior **2.2.4.1**, foram utilizadas dois consórcios de BSR (BV e EL), e duas concentrações de fosfogessos (5g/l, e 10 g/l) (Figura 2.7).

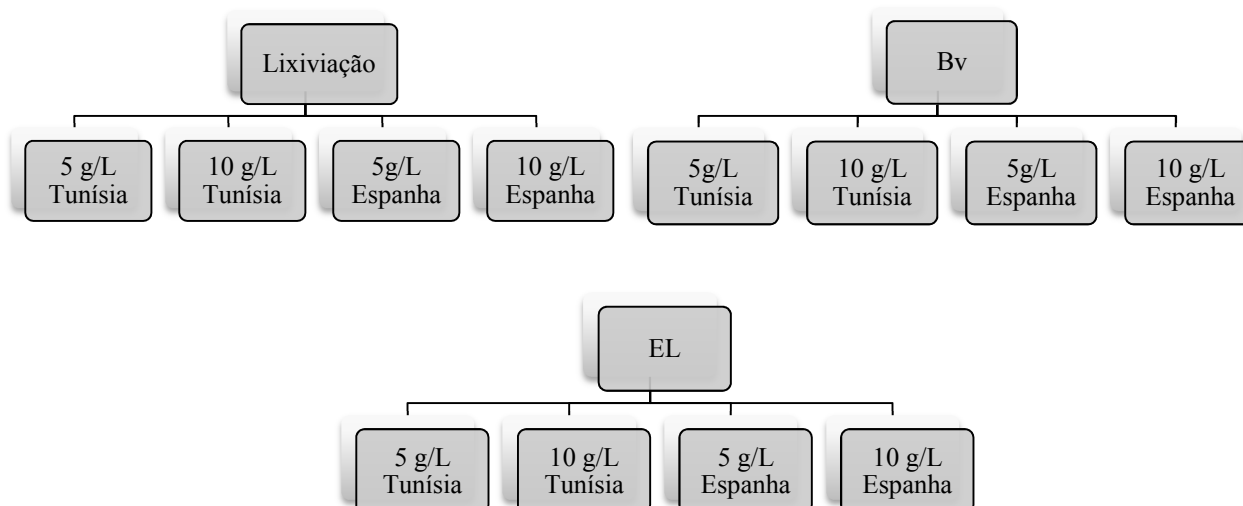


Figura 2.7 - Organização dos frascos de inoculação na biotransformação dos fosfogessos da Espanha e Tunísia pelas diferentes BSR.



Figura 2.8- Biotransformação dos fosfogessos da Espanha e Tunísia pelas BSR.

O meio utilizado foi o Postgate B modificado (Tabela 2.2), mas sem fonte de sulfatos (Na_2SO_4).

Depois de colocada a quantidade de fosfogessos em cada frasco estes foram autoclavados, assim como todo o material usado. Todos os ensaios foram realizados em duplicado. O procedimento de inoculação usado foi igual ao descrito em 2.2.3, sendo recolhidas amostras semanalmente.

2.2.5. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS USANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Para este estudo, e tendo em conta as experiências anteriores, a cultura de BSR usada foi a EL submetida a duas concentrações de fosfogessos (5g/L e 10 g/L), com meio Postgate B modificado (Tabela 2.2) sem fonte de sulfatos (Na_2SO_4) e em que a fonte de carbono foi alterada.

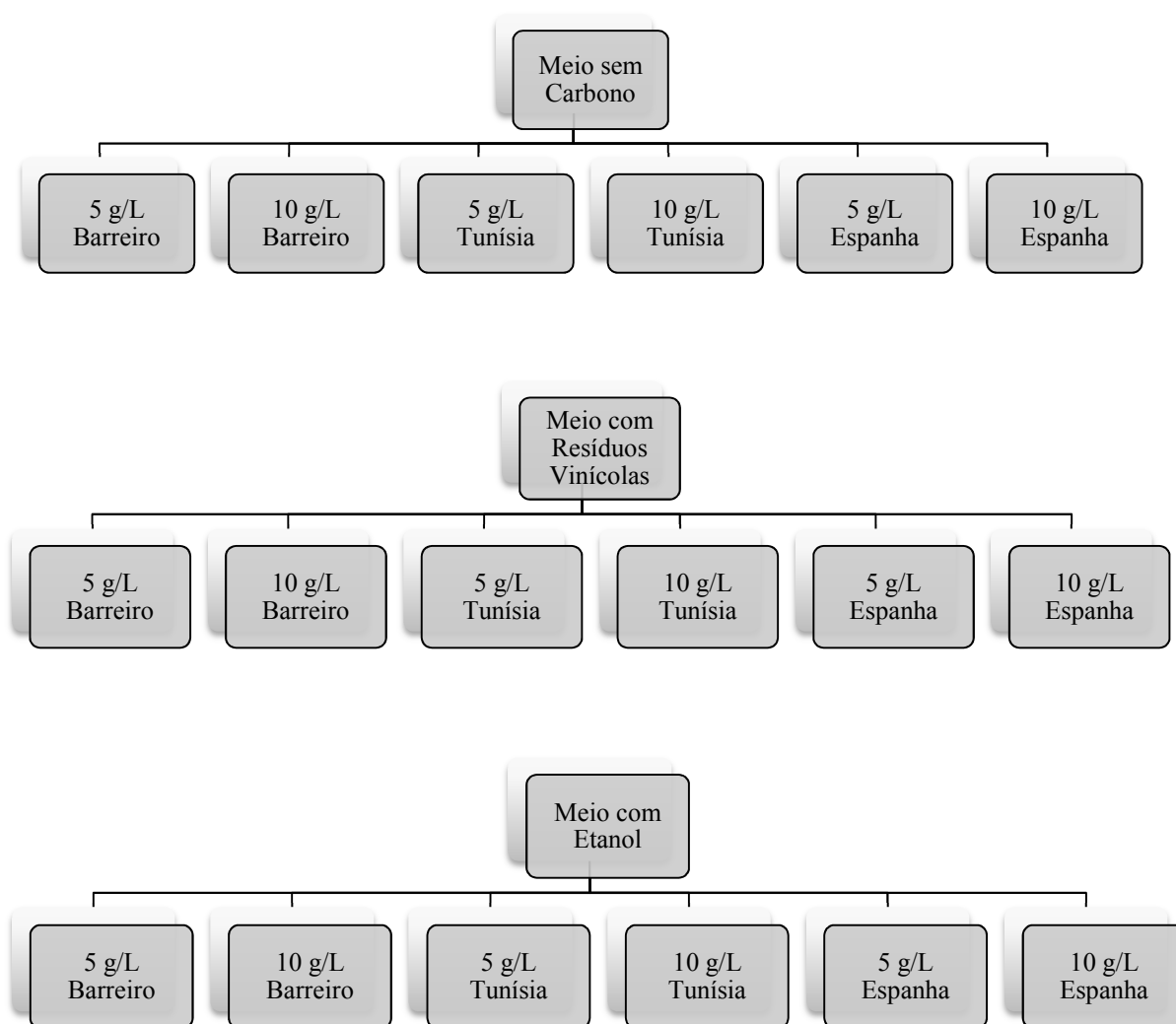


Figura 2.9 - Organização dos frascos de inoculação, na biotransformação dos fosfogessos pelas BSR, com diferentes fontes de carbono.

Foram utilizados diferentes meios Postgate B modificados. Para os frascos de inoculação sem fonte de carbono, foi apenas retirado do meio o lactato de sódio. Nos frascos de inoculação, em que a fonte de carbono foi o etanol, foi substituído o lactato de sódio por 11,55 mL de etanol a 96%, e os frascos de inoculação cuja fonte de carbono foram os resíduos vinícolas, foi substituído o lactato de sódio por 168 mL de resíduos vinícolas, sempre de modo a fazer os 6 g/L de fonte de carbono.

Depois de colocada a quantidade de fosfogessos em cada frasco estes foram autoclavados. Foram adicionados 2 g de lamas de mármore aos frascos, onde posteriormente foi utilizado os resíduos vinícolas como fonte de carbono de modo a neutralizar o pH. O procedimento de inoculação usado foi igual ao descrito em 2.2.3, sendo recolhidas amostras semanalmente.



Figura 2.10 - Biotransformação dos fosfogessos pelas BSR com diferentes fontes de carbono.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFOGESSOS

Sendo os fosfogessos a base do estudo elaborado, foram realizados testes com o objetivo de conhecer certas características dos mesmos. Deste modo foi estudado o pH, o potencial redox e a condutividade, conforme representado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Dados de pH, Eh e condutividade ao fim de duas horas.

Tipo de fosfogesso	Após 1 hora		Após 2 horas	
	pH	Eh (mV)	pH	Condutividade (mS)
Portugal	5,29	142	5,43	2,4
Espanha	5,05	213	5,25	4,44
Tunísia	2,76	228	2,85	5,41

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.1, os fosfogessos registaram um pH ácido, independentemente da sua origem. Segundo Tayibi *et al.* (2009) este facto deve-se à existência de vestígios residuais de ácido sulfúrico e ácido fluorídrico na sua composição (Tayibi *et al.*, 2009), sendo os fosfogessos provenientes da Tunísia os que apresentam valores de pH mais baixos (≈ 3). Estes valores estão de acordo com os reportados por Azabou *et al.*, 2005. Os valores de potencial rondam os 200 mV, como também reportado por Azabou *et al.*, 2006a.

A condutividade registou valores mais elevados nos fosfogessos provenientes da Tunísia, indicando assim, que estes contaminam o meio aquoso envolvente mais rapidamente pois, quanto maior a condutividade, maior será a lixiviação dos compostos neles contidos.

3.2. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS DIFERENTES BSR

3.2.1. FOSFOGESSOS DO BARREIRO

Este estudo teve como objetivo testar a capacidade das BSR de utilizarem o SO_4^{2-} dos fosfogessos como aceitador de electrões transformando-o em sulfureto. Para o efeito, foram usadas diferentes concentrações de fosfogessos, ou seja, diferentes razões sólido/líquido. Os resultados estão apresentados na Figura 3.1.

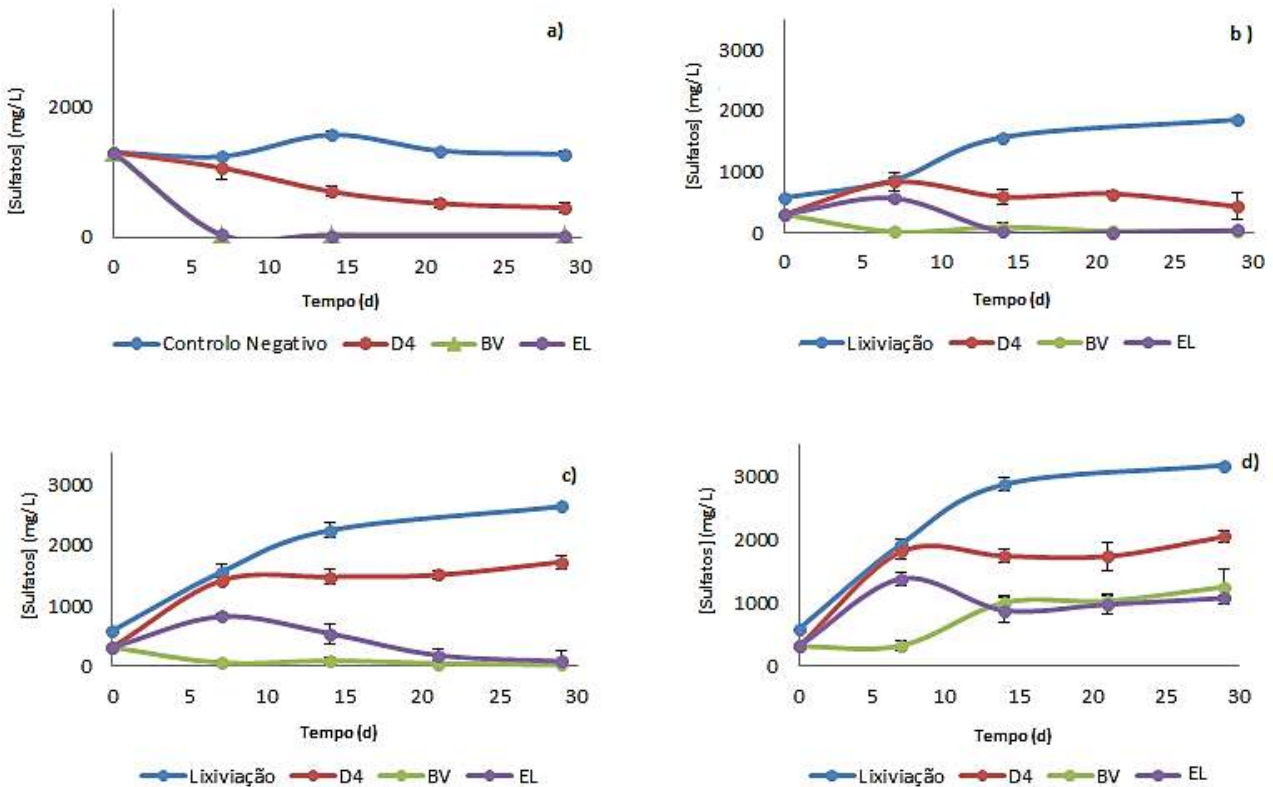


Figura 3.1 - Estudo da biotransformação dos fosfogessos do Barreiro, com diferentes consórcios de BSR, em que se acompanha a redução do sulfato ao longo de 30 dias: **a)** Inóculos e meio sem fosfogessos; **b)** Fosfogessos (2g/L), meio lixiviado e inóculos; **c)** Fosfogessos (5g/L), meio lixiviado e inóculos; **d)** Fosfogessos (10g/L), meio lixiviado e inóculos. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Segundo os gráficos apresentados, e analisando a lixiviação, ocorre a solubilização de sulfatos dos fosfogessos para o meio. À medida que se aumenta a quantidade de fosfogessos nos frascos de inoculação, maior é a concentração máxima de sulfatos no meio, sendo que, em todos os casos, ao longo do tempo a concentração dos mesmos vai estabilizando num valor máximo, chegando a ≈ 1900 , ≈ 2600 e ≈ 3100 mg/L de sulfatos em b), c) e d), respetivamente. O ensaio a) foi o controlo positivo, tendo as condições ideais para a manutenção de cultura, para confirmar que as bactérias estavam ativas,

servindo o controlo negativo para mostrar que sem bactérias, a concentração de sulfatos no meio se mantém ao longo do tempo.

Também conseguimos desde já seleccionar quer os consórcios de BSR com melhores resultados na redução de sulfato, quer as concentrações de fosfogessos em que as BSR têm a melhor *performance*. A quantidade de sulfato reduzida pelas bactérias foi estimada, pela diferença entre os valores obtidos com as bactérias e o verificado com a lixiviação. Esta redução é constante para todos os casos, sendo que existe um equilíbrio entre a lixiviação e a redução deste sulfato pois estes fenómenos ocorrem simultaneamente.

Quanto aos diferentes consórcios de BSR, observou-se que a D4 só consegue usar cerca de 34,7% (912 mg/L) de sulfatos na concentração de 5g/L de fosfogessos, além disso, demora muito tempo a começar a reduzir esse mesmo sulfato. Uma possível explicação para o mau desempenho da D4 é a sua proveniência, ou seja, o consórcio D4 provém de um enriquecimento prévio de BSR a partir de fosfogessos do Barreiro, pelo que a diversidade destas bactérias pode ser menor comparativamente aos outros dois consórcios que provém de duas ETARs, podendo estes últimos consórcios ter mais variabilidade em termos bacterianos (tanto de BSR, como de outras bactérias). Outra possível explicação pode dever-se à toxicidade dos fosfogessos para com as bactérias, devido a todos as impurezas que os fosfogessos contêm (metais pesados, elementos radioativos, etc.) podem ser tóxicos para alguns consórcios, isto porque a presença de uma maior quantidade de metais nestas amostras não é favorável ao crescimento bacteriano.

Os consórcios de BSR, BV e EL, conseguem reduzir todo o sulfato presente no meio, no caso das duas concentrações de fosfogessos mais baixas. Para a concentração de 10 g/L, verifica-se apenas uma redução de 60,5 % (1914 mg/L) para BV e 66,1 % (2091 mg/L) para EL. A diferença entre os dois consórcios ocorre ao nível do tempo de atuação, ou seja, o consórcio EL começa a reduzir grande quantidade de sulfatos apenas sete dias após a inoculação, possivelmente devido a uma maior fase lag no seu crescimento bacteriano.

Estes resultados, quando comparados com resultados de outros estudos, nomeadamente de Wolicka e Borkowski, 2009, Rzczycka *et al.* 2003 e Rzczycka e Baszczyk., 2005, em que os valores de redução de sulfatos foram de 1460, 1197 e 1690

mg/L respectivamente, mostram reduções de cerca 2000 mg/L, o que indica uma maior concentração de sulfatos reduzida, ou seja uma melhor *performance* de biotransformação destes consórcios relativamente aos referidos nestes artigos.

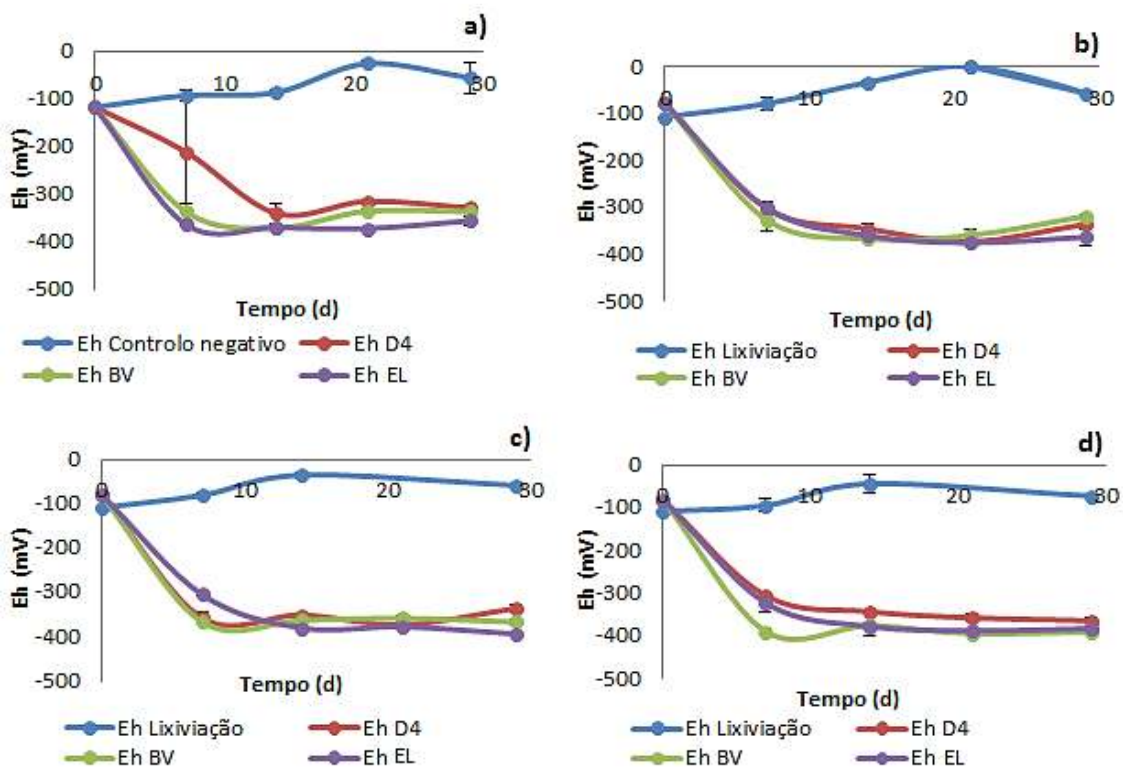


Figura 3.2 - Estudo da biotransformação dos fosfogessos do Barreiro com diferentes consórcios de BSR em que se acompanha o potencial redox ao longo de 30 dias: **a)** Inóculos e meio sem fosfogessos; **b)** Fosfogessos (2g/L), meio lixiviado e inóculos; **c)** Fosfogessos (5g/L), meio lixiviado e inóculos e **d)** Fosfogessos (10g/L), meio lixiviado e inóculos. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Paralelamente foi estudada a evolução do potencial redox (Eh) (Figura 3.2), dado que este parâmetro ao relacionar-se com a razão entre o sulfato e o sulfureto permite acompanhar a atividade bacteriana.

As quatro diferentes concentrações têm inicialmente o valor de -118 de mV, perto dos -100 mV ideais para o início da atividade bacteriana (Postgate, 1984), e ao longo do tempo alcançaram-se valores cada vez menores até ao valor mínimo de -350 mV. Esta diminuição no valor de Eh significa que ocorrem reações de redução, e aliada à diminuição da concentração de sulfatos, vem reforçar que a principal reação nos frascos de inoculação é a redução de sulfato a sulfureto. Nos controlos negativos, ou seja nos

ensaios de lixiviação sem BSR a diferença de potencial foi insignificante, o que é explicado pela ausência de atividade bacteriana e consequentemente pela inexistência de redução de sulfato pelas BSR.

Foi também acompanhado o pH ao longo do estudo (Figura 3.3). No início, foi observada uma diminuição do pH devido à acidez gerada pela lixiviação dos fosfogessos, sendo que depois essa diminuição é contrariada pela atividade bacteriana. Quando as bactérias começam a reduzir o sulfato, os valores de pH sobem até valores próximos de 7, ideais para o seu crescimento. Assim, a atividade bacteriana estabiliza o pH no meio, não sendo necessário adicionar nenhum reagente alcalino ao longo da experiência.

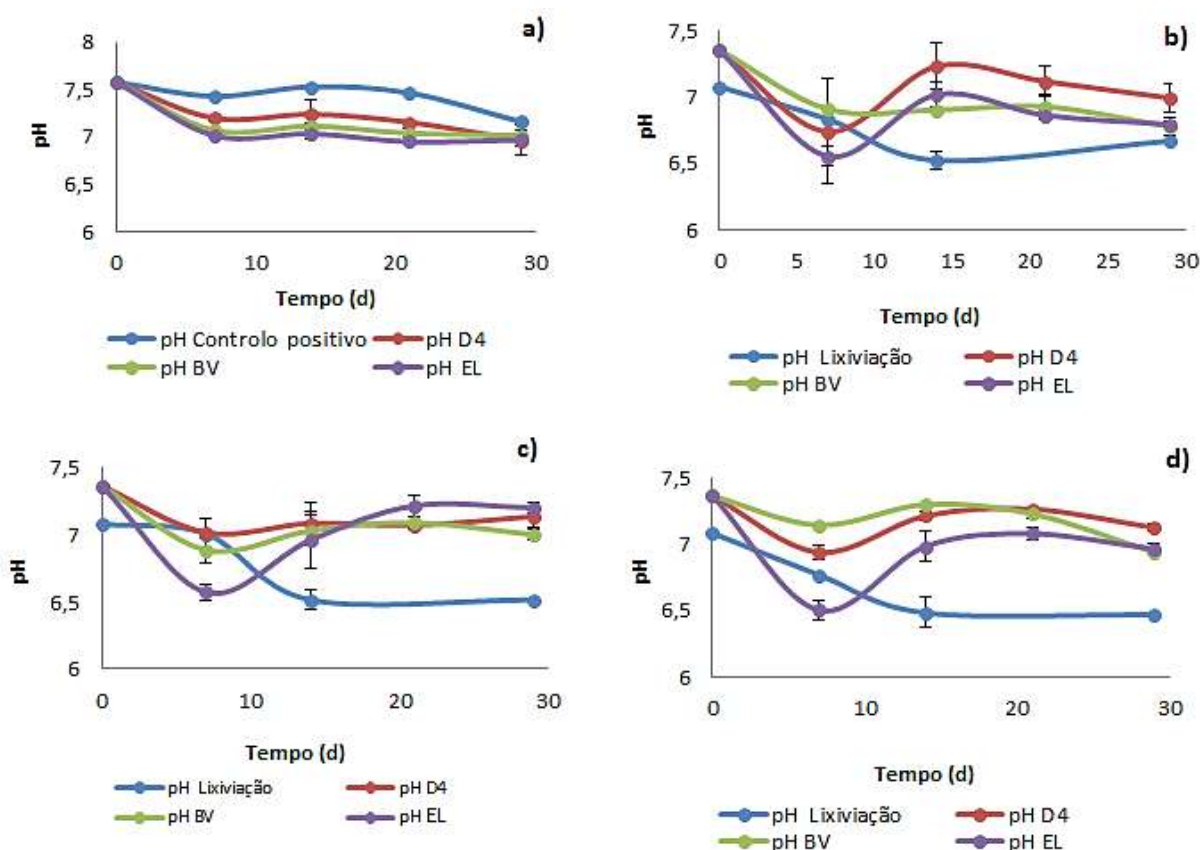


Figura 1.3 - Estudo da biotransformação dos fosfogessos do Barreiro com diferentes consórcios de BSR em que se acompanha o pH ao longo de 30 dias: **a)** Inóculos e meio sem fosfogessos; **b)** Fosfogessos (2g/L), meio lixiviado e inóculos; **c)** Fosfogessos (5g/L), meio lixiviado e inóculos e **d)** Fosfogessos (10g/L), meio lixiviado e inóculos. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Relativamente ao pH registado nos ensaios de lixiviação, foram observadas poucas alterações ao longo do tempo, sendo que os valores variaram entre 7,5 (valores iniciais) e 6,5 (valores finais), nunca alcançando valores críticos para a atividade das BSR (pH < 5). Assim, a atividade bacteriana resulta numa diminuição menos acentuada do pH do meio.

Ao fim de três dias, a coloração de todos frascos alterou-se, excetuando os relativos ao estudo da lixiviação, tendo-se observado a formação de um precipitado preto e ficando todo o meio envolvente com uma tonalidade escura. Após sete dias, todo o interior do frasco se encontrava completamente preto, contrastando com a cor branca acinzentada, apresentada no início pelos fosfogessos. Esta mudança de coloração é indicativa da presença de BSR e da sua atividade, pois a cor preta provém da reação de sulfureto com o ferro que estava presente no meio (Wolicka, 2007). Na recolha de amostras, sempre que se perfurou o frasco com a seringa, ocorreu a libertação de um cheiro intenso, característico do sulfureto, comprovando assim, a sua produção através da atividade bacteriana.

As BSR, de um modo geral, conseguiram utilizar o fosfogesso como aceitador final de electrões, efetuando assim uma boa biotransformação dos mesmos. Tal permite antever a possibilidade de bioremediar este subproduto, com base na sua transformação bacteriana, passando assim de uma matriz de sulfato mais solúvel, a uma matriz de sulfureto muito insolúvel, com constantes de solubilidade muito inferiores às dos respetivos sulfatos metálicos (Skoog *et al.*, 2006).

3.2.2. FOSFOGESSOS DA ESPANHA E TUNÍSIA

Uma vez estudado o desempenho dos consórcios de BSR com fosfogessos de Portugal, decidiu-se então usar as melhores BSR (BV e EL) para a bioremediação de fosfogessos de origens diferentes (Espanha e Tunísia). Para o efeito foram utilizadas duas concentrações diferentes de fosfogessos (5g/L e 10g/L), pois foram estas em que se verificou uma melhor atividade bacteriana. A Figura 3.4 apresenta os resultados obtidos.

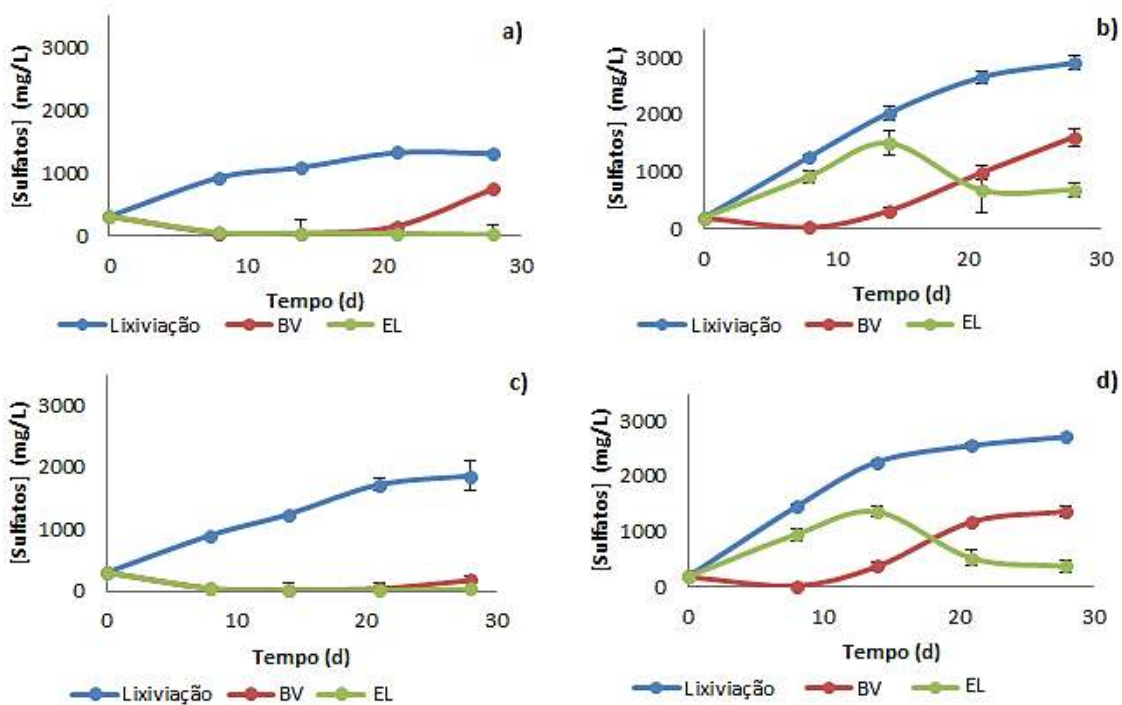


Figura 3.4 - Estudo da biotransformação de fosfogessos de Espanha e Tunísia por BSR ao longo de 30 dias: **a)** Concentração de 5 g/L de fosfogessos de Espanha; **b)** Concentração de 10 g/L de fosfogessos de Espanha; **c)** Concentração de 5 g/L de fosfogessos da Tunísia e **d)** Concentração de 10 g/L de fosfogessos da Tunísia. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Analisando os resultados, notou-se uma diferença para a concentração mais baixa de fosfogessos (5 g/L), na qual a concentração máxima de sulfatos lixiviados foi de ≈ 1400 mg/L e ≈ 2000 mg/L, para os fosfogessos de Espanha e Tunísia, respetivamente. Estes valores são mais baixos do que os registados com os fosfogessos de Portugal para a mesma concentração (2600 mg/L de sulfatos lixiviado). Ainda com base nos resultados apresentados verificou-se que, comparativamente aos fosfogessos de Portugal, no caso da concentração de fosfogessos de 10 g/L, os valores máximos de lixiviação dos sulfatos foram ligeiramente menores, aproximadamente 3000 mg/L.

Os consórcios de BSR inicialmente apresentaram atividades análogas às verificadas com os fosfogessos de Portugal, com ambos os consórcios reduzindo inicialmente quase 100% do sulfato lixiviado dos fosfogessos presentes, apesar do consórcio EL apresentar uma redução mais tardia na concentração de 10 g/L. A grande diferença é que ao longo do tempo, em vez da redução ser constante, o consórcio BV não consegue reduzir completamente o sulfato lixiviado. A explicação para este fato poderá estar na composição dos fosfogessos, sendo os fosfogessos de locais diferentes, a sua

composição também varia podendo conter diferentes concentrações de metais pesados. Derivado desse fato, as BSR do consórcio BV apresentam uma diferente sensibilidade quando comparadas com as BSR do consórcio EL, o que levou a um decréscimo da sua atividade, possivelmente derivado à perda de bactérias vivas devido a uma menor resistência à toxicidade do fosfogesso. Ainda de salientar, a alteração de cor nos frascos de incubação, igual à ocorrida com os fosfogessos do Barreiro, ou seja o aparecimento de uma tonalidade escura em todo o seu conteúdo, assim como a libertação de sulfureto gasoso, na altura da recolha das amostras.

Quanto ao Eh e ao pH (Figura 3.5) os resultados foram semelhantes ao demonstrado no estudo anterior, ou seja, em ambas as concentrações e com ambos os consórcios, o Eh começa em valores próximos de - 100 mV e termina cerca dos - 350 mV. O pH, ao longo do estudo, apresenta constantemente valores próximos de 7, para os fosfogessos de Espanha. Para o fosfogesso da Tunísia, os resultados de pH não são afetados pela maior acidez do fosfogesso, mantendo-se também nos valores próximos de 7.

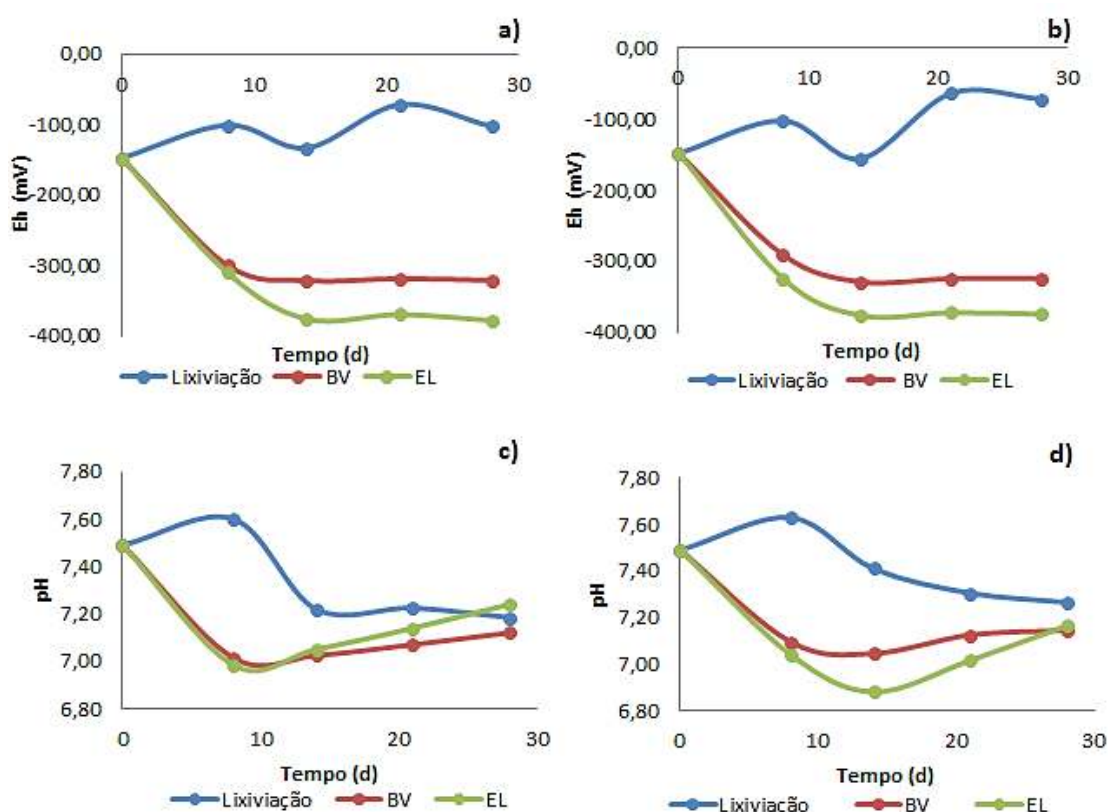


Figura 3.5 - Estudo da biotransformação de fosfogessos de Espanha e Tunísia por BSR com concentrações de 5 g/L de fosfogessos ao longo de 30 dias: **a)** Gráfico do potencial redox com fosfogessos de Espanha; **b)** Gráfico do potencial redox com fosfogessos da Tunísia; **c)** Gráfico do pH com fosfogessos de Espanha e **d)** Gráfico do pH com fosfogessos de Tunísia. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

No geral, estes dois consórcios de BSR cresceram com sucesso, ocorrendo a consequente redução de sulfato, apesar da mudança de origem dos fosfogessos. No entanto, o melhor desempenho foi obtido com o consórcio EL, pois este consórcio teve uma atividade constante ao longo do tempo, ao contrário do que aconteceu com o consórcio BV que foi perdendo atividade.

3.3. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS BSR COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Os estudos anteriores obtiveram bons resultados com os diferentes tipos de fosfogessos, usando o lactato como fonte de carbono presente no meio. Este, como anteriormente referido, tem um custo elevado, tornando difícil a sua utilização em larga escala. Assim, foram realizados ensaios para testar a capacidade das BSR usarem alguma fonte de carbono existente nos próprios fosfogessos, ou seja, foram realizados ensaios com ausência de fonte externa de carbono adicionado ao meio (Figura 3.6). Paralelamente, foram também testadas duas fontes de carbono alternativas ao lactato, de modo a aferir o rendimento das BSR nessas condições. As fontes de carbono usadas foram o etanol e os resíduos vinícolas.

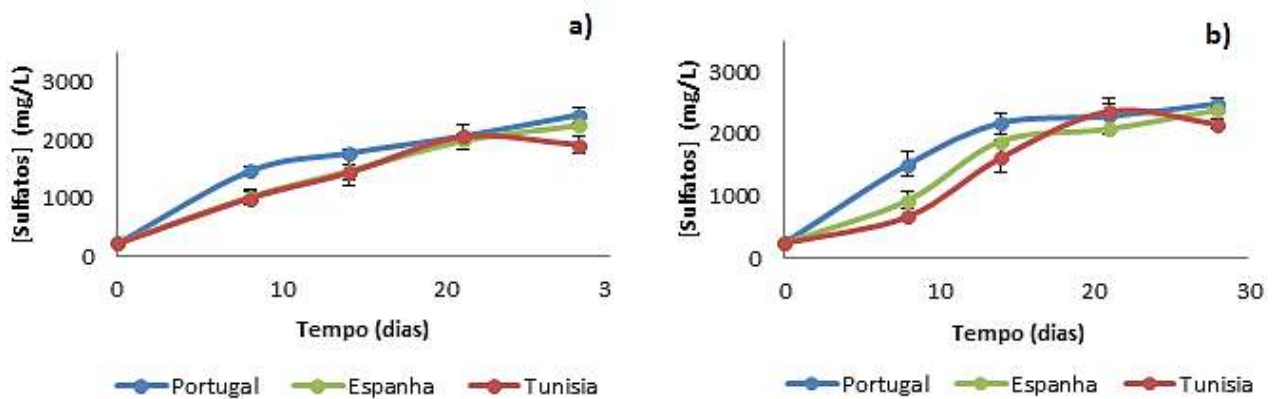


Figura 3.6 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos, com diferentes concentrações, pelas BSR (EL) sem fonte de carbono presente no meio postgate B modificado sem sulfatos, em que se acompanha a redução dos sulfatos ao longo de 30 dias: **a)** concentrações de fosfogessos de 5 g/L; **b)** concentrações de fosfogessos de 10 g/L. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Retirando o lactato do meio, verificou-se um comportamento semelhante ao registado na lixiviação (sem a presença de BSR) nos estudos anteriores, havendo sempre um aumento na concentração de sulfatos no meio, não se registando qualquer diminuição do valor, até ao final dos 30 dias de experiência. Os valores máximos alcançados também são análogos aos valores da lixiviação, indicando a falta de atividade do consórcio bacteriano por falta de fonte de carbono. A cor do conteúdo dos frascos também se manteve inalterada, permanecendo a coloração cinza, característica

dos fosfogessos. Verificou-se também a ausência de cheiro na recolha de amostras, evidenciando a não produção de sulfureto.

Quanto aos valores do potencial (Figura 3.7), estes não foram semelhantes aos registados com a lixiviação (≈ 0). Neste caso, e independentemente das três proveniências de fosfogessos, o valor de potencial decresceu atingindo valores entre os -200 e -250 mV, valores estes menores que o registado com o lactato. Tal poderá indicar alguma atividade bacteriana, que contudo não é suficiente para fazer decrescer a concentração de sulfato lixiviado para o meio. Os valores de pH mostraram-se sempre estáveis, e perto do ideal, para o crescimento das BSR ao longo da experiência (≈ 7) o que não justifica os resultados no que respeita à redução de sulfato.

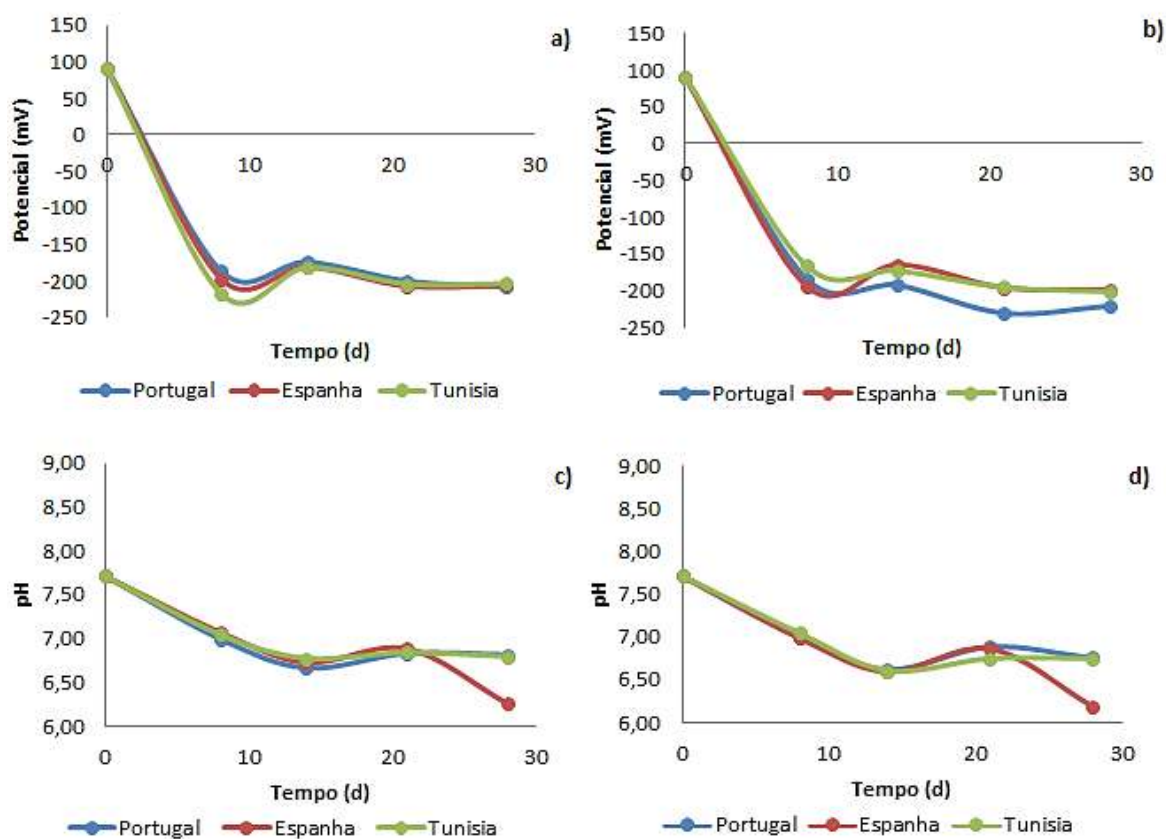


Figura 3.7 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos, com diferentes concentrações, pelas BSR (EL) sem fonte de carbono presente no meio postgate B modificado sem sulfatos, em que se acompanha o potencial redox e o pH ao longo de 30 dias: **a)** potencial redox para a concentração de fosfogesso de 5 g/L; **b)** potencial redox para a concentração de fosfogesso de 10 g/L; **c)** pH para a concentração de fosfogesso de 5 g/L e **d)** pH para a concentração de fosfogesso de 10 g/L. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Segundo a literatura (Nagpal *et al.* e Rzczycka e Baszczyk., 2005; Martins *et al.*, 2009; Costa *et al.* 2009) tanto o etanol, como os resíduos vinícolas, são boas fontes de carbono. Assim sendo, utilizou-se o melhor consórcio de BSR, o EL, e testou-se essas duas fontes de carbono (Figura 3.8).

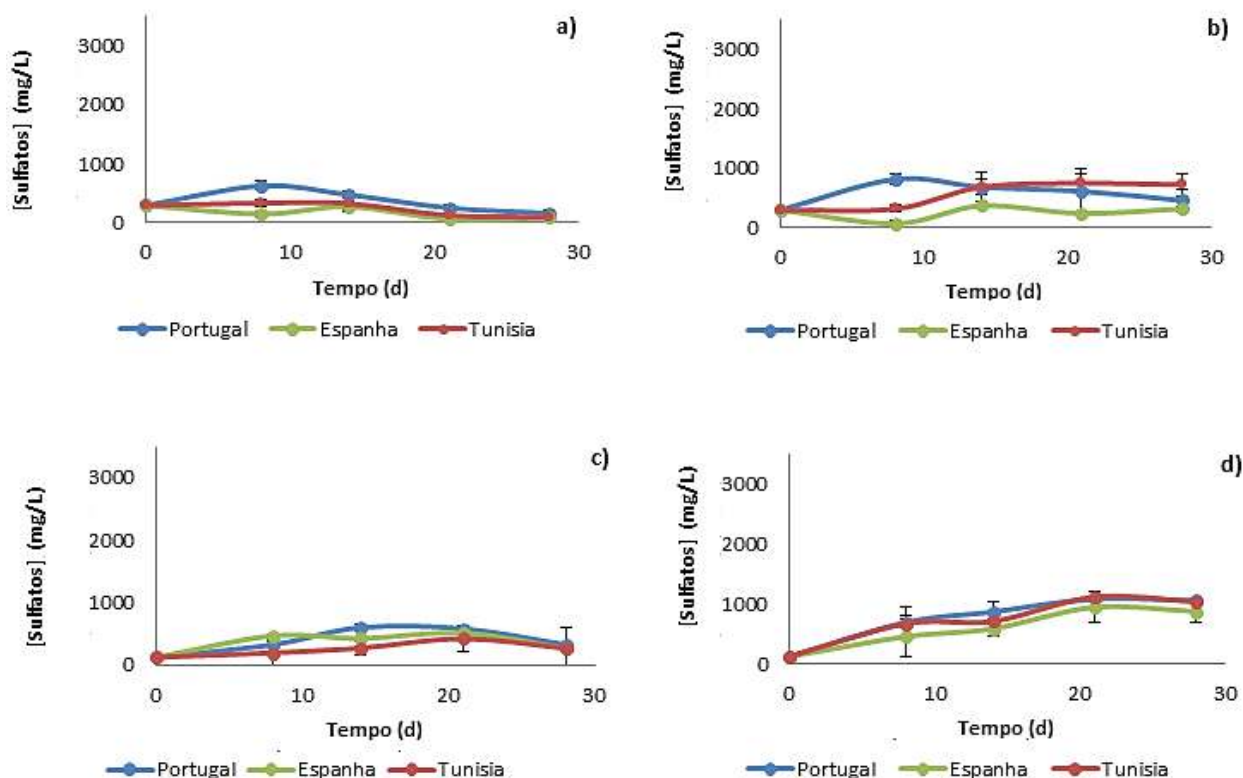


Figura 3.8 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos, com diferentes concentrações, pelas BSR (EL) com diferentes fontes de carbono presente no meio postgate B modificado sem sulfatos, em que se acompanha a redução dos sulfatos ao longo de 30 dias: **a)** concentrações de fosfogessos de 5 g/L com etanol; **b)** concentrações de fosfogessos de 10 g/L com etanol; **c)** concentrações de fosfogessos de 5 g/L com resíduos vinícolas e **d)** concentrações de fosfogessos de 10 g/L com resíduos vinícolas. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Utilizando como fonte de carbono alternativa o etanol e os resíduos vinícolas, os resultados foram bastante promissores. Com o etanol, o consórcio EL manteve a sua atividade, muito semelhante ao que aconteceu com o lactato com as três diferentes origens de fosfogessos com a concentração de 5g/L, reduzindo em quase 95% os sulfatos inicialmente presentes no meio. Com a concentração de 10 g/L de fosfogessos, os resultados foram melhores que os obtidos anteriormente, ou seja, com o etanol as BSR foram capazes de reduzir cerca de 85,7 % (2700 mg/L) de sulfatos comparado com

os valores da lixiviação apresentados em 3.2.1 e 3.2.2, valor esse maior que os 66 % obtidos com o lactato, demonstrando assim ser uma fonte de carbono bastante viável.

Comparativamente a outro estudo usando BSR a bioremediar os fosfogessos, tendo o etanol como fonte de carbono, Rzeczycka e Baszczyk., 2005, o valor de sulfatos reduzido foi de 1380 mg/L, quase 50% inferior ao valor obtido pelo consórcio EL neste ensaio.

Quanto ao potencial redox e ao pH (Figura 3.9) os resultados foram os esperados, tendo o potencial atingido, ao longo da experiência, um valor mínimo de -350 mV, sendo este valor constante e idêntico ao atingido na presença de lactato, estando associado à intensa atividade das BSR. O pH também rondou valores próximos de 7 ao longo de todo o ensaio.

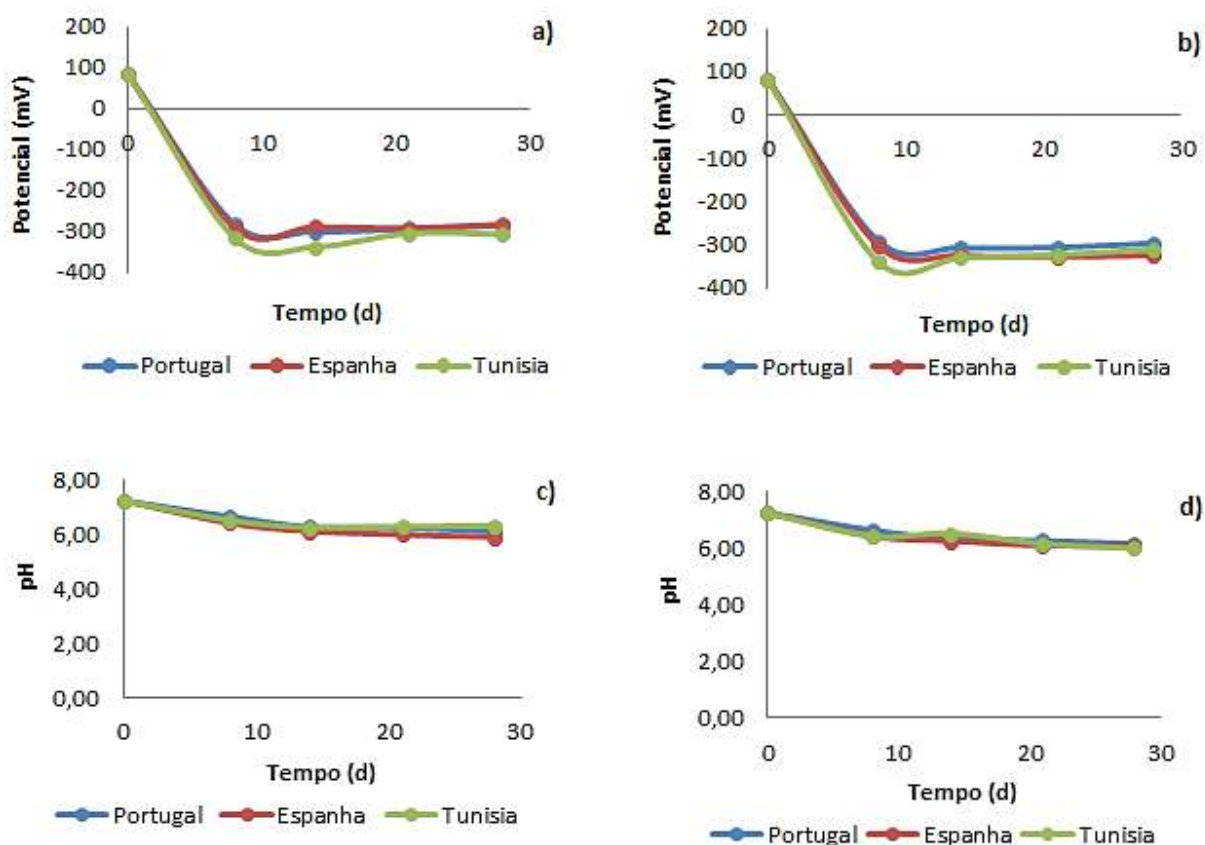


Figura 3.9 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos, com diferentes concentrações, pelas BSR (EL) com etanol como fonte de carbono ao longo de 30 dias: **a)** potencial redox para a concentração de fosfogesso de 5 g/L; **b)** potencial redox para a concentração de fosfogesso de 10 g/L; **c)** pH para a concentração de fosfogesso de 5 g/L e **d)** pH para a concentração de fosfogesso de 10 g/. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Utilizando os resíduos vinícolas como fonte de carbono, tendo em conta que estes possuem um pH muito baixo (≈ 3) e de modo a minimizar este problema, adicionou-se, juntamente aos fosfogessos nos frascos de incubação, 2 g de lama de mármore de modo a aumentar o pH para valores neutros, deixando de ser prejudicial para a atividade bacteriana. A utilização deste resíduo, quando os resíduos vinícolas são utilizados como fonte de carbono, foi previamente analisado por Martins *et al.*, 2009; Costa *et al.* 2009. Nesse estudo verificou-se que a lama de mármore impede que o pH do meio atinja valores baixos (cerca de 4), mantendo o meio a pH perto do neutro (cerca de 6).

Com os resíduos vinícolas na concentração de 5 g/L de fosfogessos, a redução obtida foi ligeiramente abaixo do alcançado pelo etanol, reduzindo cerca de 90 % dos sulfatos existentes no meio, comparando com os valores de lixiviação reportados em 3.2.1 e 3.2.2. Para a concentração de 10 g/L, a redução que ocorreu já foi semelhante à obtida pelo lactato, sendo a redução de cerca de 2000 mg/L.

Quanto ao potencial redox (Figura 3.10) os resultados foram os esperados. Ao longo do estudo, o potencial atingiu um mínimo de -350 mV, sendo este valor constante. O pH registou um valor ligeiramente mais baixo, cerca de 6,2.

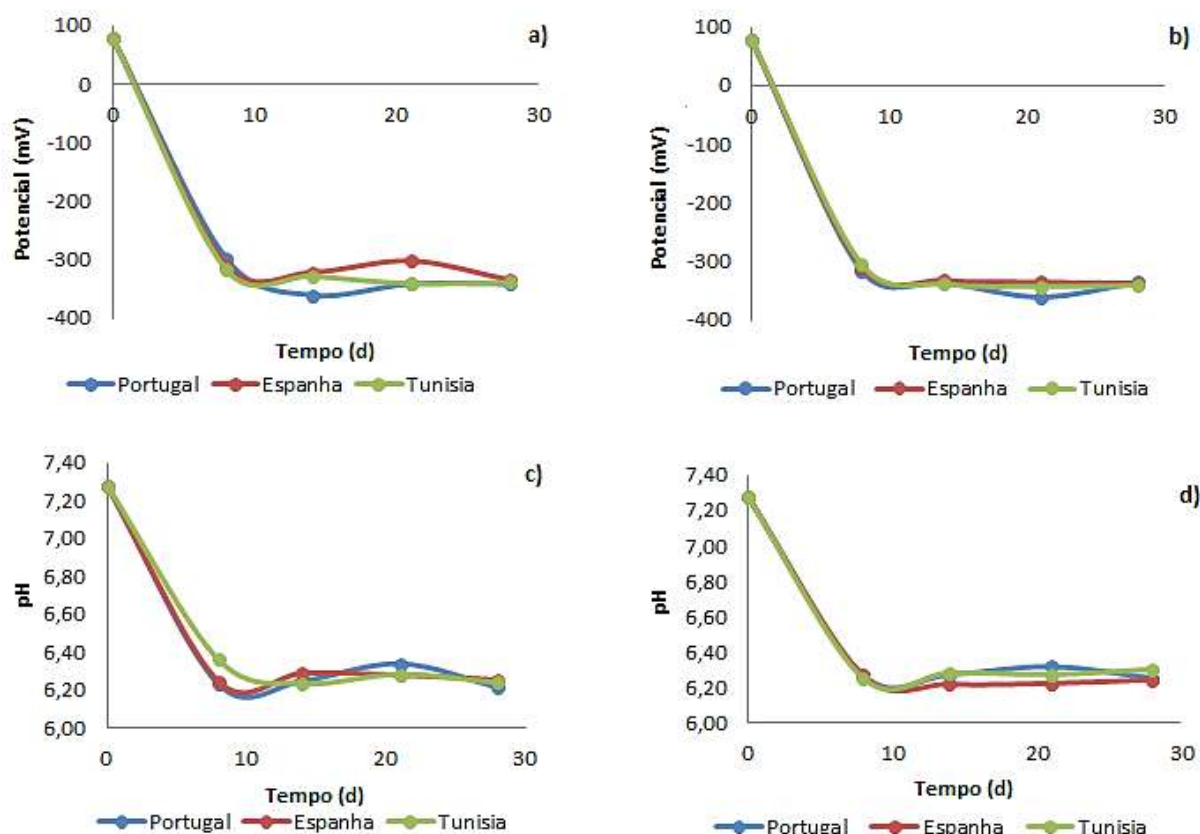


Figura 3.10 - Estudo da biotransformação de diferentes fosfogessos, com diferentes concentrações, pelas BSR (EL) com resíduos vinícolas como fonte de carbono ao longo de 30 dias: **a)** potencial redox para a concentração de fosfogesso de 5 g/L; **b)** potencial redox para a concentração de fosfogesso de 10 g/L; **c)** pH para a concentração de fosfogesso de 5 g/L e **d)** pH para a concentração de fosfogesso de 10 g/. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de duas preparações distintas.

Com o etanol e os resíduos vinícolas, também se verificou a alteração da cor do conteúdo dos frascos de incubação, adquirindo uma tonalidade escura e, a libertação do cheiro característico do sulfureto, igual ao registado nas experiências anteriores. Contudo, o cheiro nos resíduos vinícolas foi muito mais intenso, possivelmente associado a uma maior produção deste gás.

De um modo geral, os resultados obtidos com estas duas fontes de carbono foram muito promissores, pois ambas foram uma alternativa viável, que as BSR facilmente utilizaram. No caso do etanol, obtiveram-se melhores resultados em comparação com os obtidos com o lactato. Assim, e atendendo ao seu baixo custo, poderá ser uma melhor alternativa. No caso dos resíduos vinícolas, como os resultados obtidos foram semelhantes aos atingidos pelo lactato, também estes são um bom substituto, com uma vantagem acrescida pela utilização de um subproduto da indústria vinícola.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu no estudo da atividade de consórcios de bactérias sulfato-redutoras, num meio contendo um subproduto da indústria de fertilizantes, o fosfogesso, a ser usado por estas bactérias como fonte de sulfatos.

Comparando, numa primeira instância, os diferentes tipos de fosfogesso, confirmou-se em todos os casos a sua natureza ácida, sendo o fosfogesso da Tunísia, o que apresenta uma maior acidez. Verificou-se também que o fosfogesso proveniente de Portugal lixivia uma maior quantidade de sulfatos para o meio.

No estudo da atividade dos três consórcios de BSR, onde se utilizaram diferentes concentrações de fosfogessos provenientes do Barreiro, o objectivo foi o de seleccionar os melhores consórcios na redução de sulfatos e a melhor razão sólido/líquido no que respeita à eficiência da biotransformação do material. Concluiu-se que os melhores consórcios foram os provenientes de duas ETARS (BV e EL) obtendo-se reduções de cerca de 66% (2000 mg/L) de sulfatos. A pior performance foi obtida com o consórcio proveniente do enriquecimento prévio do próprio fosfogesso (D4). Os resultados obtidos, no presente trabalho, são mais promissores em termos de reduções de sulfato comparativamente aos observados por Wolicka e seus colaboradores, Rzczycka *et al.* 2003 e Rzczycka e Baszczyk., 2005, sendo a redução máxima registada de 1690 mg/L.

Tendo em conta os melhores consórcios e as melhores razões sólido/líquido utilizadas, variou-se a origem dos fosfogessos escolhendo amostras de Espanha e da Tunísia. O comportamento das BSR do consórcio EL na biotransformação destes fosfogessos foi semelhante ao registado com os fosfogessos do Barreiro. Ao contrário do consórcio BV, que apesar de uma redução inicial rápida de sulfato e sua consequente diminuição no meio, foi perdendo ao longo do tempo essa capacidade, concluindo-se assim, que as BSR que apresentam melhores resultados são do consórcio EL.

Mantendo o melhor consórcio de BSR, usando os fosfogessos das três diferentes origens, mas variando a fonte de carbono, passando de lactato de sódio para etanol e resíduos vinícolas, os resultados obtidos foram bastante promissores. Analisando os dados, a redução de sulfatos usando o etanol foi na ordem de 2500 mg/L. A utilização dos resíduos vinícolas como fonte de carbono resultou numa redução de sulfatos na ordem dos 2000 mg/L. Assim conclui-se que das duas alternativas testadas ambos

apresentam melhores resultados que os obtidos com o lactato, sendo o etanol aquele que obteve os melhores resultados. No entanto, com a utilização dos resíduos vinícolas como fonte de carbono, obtemos uma bioremediação dos fosfogessos que aproveita a utilização de um resíduo industrial contribuindo desta forma para a sua valorização, sendo um ótimo resultado tanto a nível biológico como a nível económico.

Propõe-se como trabalhos futuros a caracterização de todos os fosfogessos usados, para auferir a composição dos mesmos. Seria importante também analisar o sobrenadante e o *pellet*, presente nos frascos de incubação no final de todas as experiências realizadas para detectar todos compostos neles presentes. Relativamente aos consórcios de BSR utilizados, propõe-se identificar e caracterizar as mesmas e comparar o consórcio inicial com o final, para estudar a dinâmica da população.

5. BIBLIOGRAFIA

- Annachhatre, A.P. e Suktrakoolvait, S. (2001). Biological sulfate reducing using molasses as a carbon source. *Water Environmental Resource*, **73**: 118-126.
- Attar, L.A., AL-Oudat, M., Kanakri, S., Budeir, Y., Khalily, H. e Hamwi, A.A. (2011). Radiological impacts of phosphogypsum. *Journal of environmental Management*, **92**: 2151-2158.
- Azabou S., Mechichi T. e Sayadi S., (2005). Sulfate reduction phosphogypsum using a mixed culture of sulfate-reducing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **56**: 236 – 242.
- Azabou S., Mechichi T., Patel B.K.C e Sayadi S., (2006a). Isolation and characterization of a mesophilic bacteria heavy-metals-tolerant sulphate-reducing bacterium *Desulfomicrobium* sp. from an enrichment culture using phosphogypsum as a sulphate source. *Journal of Hazard Materials*, **140**: 264-270.
- Azabou S., Mechichi T. e Sayadi S., (2006b). Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. *Minerals Engineering*, **20**: 173 – 178.
- Barton, L.L. e Fauque G.D., (2009). Chapter 2: Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, **68**: 41-98.
- Castro, H.F., Williams, N.H. e Ogram, A., (1999). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **30**: 1 – 9.
- Cohen, R.H., (2006). Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. *Journal of Cleaner Production*, **14**: 1146-1157.
- Costa, M.C., Santos, E.S., Barros, R.J., Pires, C. e Martins, M. (2009). Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage. *Chemosphere*, **75**: 831 – 836.
- Demain, A.L. e Davies, J.E. (1999). *Manual of industry microbiology and biotechnology*. Second edition, American Society for Microbiology.
- Estudo de Impacto Ambiental da ETAR Barreiro/Moita. Acedido em: 5, Setembro, 2012, em http://www2.apambiente.pt/IPAMB_DPP/docs/RNT1478.pdf.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.P. (2010). Hydrogen production from agricultural wastes by dark fermentation: a review. *International Journal Hydrogen. Energy*, **35**: 10660-10673.
- Ibanez, J.G., Hernandez-Esparza, M., Doria-Serrano, C. e Fregoso-Infante, A., (2007). *Environmental Chemistry – Fundamentals*. Springer.
- Jordening, H.J. e Winter, J. (2005). *Environmental Biotechnology - Concepts and applications*. WILEY-VCH.

- Kaksonen, A.H. e Puhakka, J.A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Engineering Life Science*, **6**: 541-564.
- Liamleam, W. e Annachhatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, **25**: 452-463;
- Lottermoser, B.G. (2007). *Mine Wastes - Characterization, Treatment, Environmental Impacts*. Second edition, Springer.
- Martins, M., Faleiro, M.L., Barros, R.J., Veríssimo, A.R. e Costa, M.C. (2009). Biological sulfate reduction using food industry wastes as carbon sources. *Biodegradation*, **20**: 559 – 567.
- Muyzer, G. e Stams, A.J.M., (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews Microbiology*.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A. e Peeva, L. (2000). Ethanol Utilization by Sulphate reducing bacteria: An Experimental and modeling Study. *Biotechnology and Bioengineering*, **70**: 533- 543.
- Postgate, J.R. (1984). *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Qiu, R., Zhao, B., Liu, J., Huang, X., Li, Q., Brewer, E., Wang, S, e Shi, N. (2009). Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. *Journal of Hazardous Materials*, **164**: 1310-1315.
- Rutherford, P.M., Dudas, M.J. e Arocena, J.M., (1996). Heterogeneous distribution of radionuclides, barium and strontium in phosphogypsum by-product. *Science of the Total Environment*, **180**: 201–209.
- Rzeczycka, M. e Baszczyk, M., (2005). Growth and Activity of Sulphate-reducing bacteria in media containing phosphogypsum and different sources of carbon. *Polish Journal of Environmental Studies*, **14**: 891-895.
- Rzeczycka, M., Suszek, A. e Blaszczyk, M. (2003). Biotransformation of Phosphogypsum by sulphate-reducing bacteria in media containing different zinc salts. *Polish Journal of Environmental Studies*, **13**: 209-217.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2006). *Principles of instrumental Analysis*. Brookes Cole.
- Tayibi, H., Choura, M., López, F.A., Alguacil, F.J. e López-Delgado, A. (2009). Environmental impact and management of phosphogypsum. *Journal of environmental Management*, **90**: 2377-2386.
- Valls, M. e de Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metals pollution. *FEMS Microbiol, Rev.* **26**: 327-338;
- Van der Sloot, H.A., Heasman, L. e Quevauviller, Ph. (1998). *Harmonization of leaching/extraction tests*, Elsevier Science B.V.

- Wolicka, D. e Borkowski, A. (2009). Phosphogypsum biotransformation in cultures of sulphate reducing bacteria in whey. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**: 322 – 327;
- Wolicka, D., (2007). Biotransformation of phosphogypsum in wastewaters from de dairy industry. *Biosource Technology*, **99**: 5666 – 5672;
- Zagury, G.J., Kulnieks, V.I., Neculite, C.M. (2006). Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere*, **64**: 944-954.

ANEXOS

ANEXO 1 - DADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS DO BARREIRO PELAS DIFERENTES BSR

1.1 MEIO COM 1 g/L DE SULFATOS SEM FOSFOGESSOS - DADOS BRUTOS

Tabela 5 – Controlo Positivo

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-118	-102	-85	-90	-84	-31	-22	-34	-79
pH	7,58	7,43	7,43	7,53	7,53	7,47	7,46	7,17	7,15
Sulfatos (mg/L)	1310	1248	1245	1616	1544	1349	1313	1304	1259

Tabela 6 - D4

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-118	-121	-302	-326	-356	-314	-317	-333	-325
pH	7,58	7,18	7,22	7,13	7,35	7,16	7,15	7,01	6,92
Sulfatos (mg/L)	1310	1204	935	653	755	571	474	505	408

Tabela 7 - BV

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-118	-325	-349	-370	-373	-339	-333	-340	-335
pH	7,58	7,07	7,07	7,14	7,09	7,01	7,07	7,06	6,97
Sulfatos (mg/L)	1310	32	42	45	34			18	52

Tabela 8 - ETAR LAGOS

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-118	-363	-365	-373	-368	-371	-374	-350	-363
pH	7,58	7,03	7	7,07	7	6,94	6,96	7,08	6,86
Sulfatos (mg/L)	1310	29	38	30	35			11	49

1.1.1 MEIO COM 1 g/L DE SULFATOS SEM FOSFOGESSOS - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 9 - Controlo Positivo

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-118	7,58	1310	0	0	0
7	-93,5	7,43	1246,5	12,021	0,000	2,121
14	-87	7,53	1580	4,243	0,000	50,912
21	-26,5	7,465	1331	6,364	0,007	25,456
29	-56,5	7,16	1281,5	31,820	0,014	31,820

Tabela 10 - D4

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-118	7,58	1310	0	0	0
7	-211,5	7,2	1069,5	127,986	0,028	190,212
14	-341	7,24	704	21,213	0,156	72,125
21	-315,5	7,155	522,5	2,121	0,007	68,589
29	-329	6,965	456,5	5,657	0,064	68,589

Tabela 11 - BV

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-118	7,58	1310	0	0	0
7	-337	7,07	37	16,971	0,000	7,071
14	-371,5	7,115	39,5	2,121	0,035	7,778
21	-336	7,04	-	4,243	0,042	-
29	-337,5	7,015	35	3,536	0,064	24,042

Tabela 12 - ETAR DE LAGOS

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-118	7,58	1310	0	0	0
7	-364	7,015	33,5	1,414	0,021	6,364
14	-370,5	7,035	32,5	3,536	0,049	3,536
21	-372,5	6,95	-	2,121	0,014	-
29	-356,5	6,97	30	9,192	0,156	26,870

1.2 MEIO COM 2 g/L DE FOSFOGESSOS - DADOS BRUTOS

Tabela 13 – Lixiviação

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-108	-90	-70	-33	-36	n ha	n ha	-55	-60
pH	7,08	6,83	6,84	6,48	6,57	n ha	n ha	6,73	6,61
Sulfatos (mg/L)	586	889	852	1577	1564	n ha	n ha	1824	1891

Tabela 14 - D4

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-294	-313	-353	-340	-372	-376	-329	-345
pH	7,36	7,02	6,46	7,11	7,36	7,04	7,2	6,92	7,07
Sulfatos (mg/L)	313	945	738	680	519	685	615	597	284

Tabela 15 - BV

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-309	-346	-369	-367	-352	-370	-318	-322
pH	7,36	6,91	6,91	6,92	6,89	6,87	6,99	6,73	6,83
Sulfatos (mg/L)	313	28	33	59	150	40	38	46	47

Tabela 16 - ETAR Lagos

Tempo (Dias)	0	7(1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-307	-298	-368	-354	-377	-376	-378	-351
pH	7,36	6,5	6,61	7,09	6,95	6,84	6,89	6,81	6,78
Sulfatos (mg/L)	313	604	548	44	11	18	12	34	72

1.2.1 MEIO COM 2 g/L DE FOSFOGESSOS - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 17 – Lixiviação

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-108	7,08	586	0	0	0
7	-80	6,835	870,5	14,142	0,007	26,163
14	-34,5	6,525	1570,5	2,121	0,064	9,192
21	-	-	-	-	-	-
29	-57,5	6,67	1857,5	3,536	0,085	47,376

Tabela 18 – D4

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80,00	7,36	313,00	0	0	0
7	-303,50	6,74	841,50	13,435	0,396	146,371
14	-346,50	7,24	599,50	9,192	0,177	113,844
21	-374,00	7,12	650,00	2,828	0,113	49,497
29	-337,00	7,00	440,50	11,314	0,106	221,324

Tabela 19 - BV

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-327,5	6,91	30,5	26,163	0,000	3,536
14	-368	6,905	104,5	1,414	0,021	64,347
21	-361	6,93	39	12,728	0,085	1,414
29	-320	6,78	46,5	2,828	0,071	0,707

Tabela 20 - ETAR Lagos

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-302,5	6,555	576	6,364	0,078	39,598
14	-361	7,02	27,5	9,899	0,099	23,335
21	-376,5	6,865	15	0,707	0,035	4,243
29	-364,5	6,795	53	19,092	0,021	26,870

1.3 MEIO COM 5 g/L DE FOSFOGESSOS - DADOS BRUTOS

Tabela 21 - Lixiviação

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-108	-72	-78	-29	-38	n ha	n ha	-63	-42
pH	7,08	6,99	7,02	6,46	6,57	n ha	n ha	6,5	6,53
Sulfatos (mg/L)	586	1447	1649	2150	2318	n ha	n ha	2620	2638

Tabela 22 - D4

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-349	-366	-349	-353	-373	-373	-330	-342
pH	7,36	7,09	6,94	6,98	7,19	7,05	7,09	7,08	7,19
Sulfatos (mg/L)	313	1443	1373	1559	1383	1454	1548	1794	1639

Tabela 23 - BV

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-363	-370	-359	-367	-362	-355	-372	-362
pH	7,36	6,95	6,82	6,95	7,11	7,09	7,09	6,97	7,03
Sulfatos (mg/L)	313	71	39	45	133	46	199	22	331

Tabela 24 - ETAR Lagos

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-308	-302	-377	-384	-375	-380	-395	-393
pH	7,36	6,61	6,53	6,81	7,11	7,16	7,27	7,23	7,17
Sulfatos (mg/L)	313	793	839	422	653	106	247	68	87

1.3.1 MEIO C/ 5 g/L DE FOSFOGESSOS - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 25 – Lixiviação

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-108	7,08	586	0	0	0
7	-75	7,005	1548	4,243	0,021	142,836
14	-33,5	6,515	2234	6,364	0,078	118,794
21	-	-	-	-	-	-
29	-52,5	6,515	2629	14,849	0,021	12,728

Tabela 26 - D4

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-357,5	7,015	1408	12,021	0,106	49,497
14	-351	7,085	1471	2,828	0,148	124,451
21	-373	7,07	1501	0,000	0,028	66,468
29	-336	7,135	1716,5	8,485	0,078	109,602

Tabela 27 - BV

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-366,5	6,885	55	4,950	0,092	22,627
14	-363	7,03	89	5,657	0,113	62,225
21	-358,5	7,09	46	4,950	0,000	108,187
29	-367	7	22	7,071	0,042	218,496

Tabela 28 - ETAR Lagos

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-305	6,57	816	4,243	0,057	32,527
14	-380,5	6,96	537,5	4,950	0,212	163,342
21	-377,5	7,215	176,5	3,536	0,078	99,702
29	-394	7,2	77,5	1,414	0,042	13,435

1.4 MEIO COM 10 g/L DE FOSFOGESSOS - DADOS BRUTOS

Tabela 29 - Lixiviação

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-108	-105	-83	-58	-28			-72	-71
pH	7,08	6,77	6,76	6,4	6,56			6,43	6,5
Sulfatos (mg/L)	586	1878	1971	2781	2937			3129	3197

Tabela 30 - D4

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-307	-305	-340	-346	-363	-352	-369	-359
pH	7,36	6,9	6,97	7,23	7,19	7,25	7,27	7,14	7,1
Sulfatos (mg/L)	313	1722	1883	1661	1810	1886	1567	1975	2102

Tabela 31 - BV

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-386	-393	-358	-394	-394	-395	-388	-394
pH	7,36	7,13	7,15	7,29	7,3	7,2	7,25	6,94	6,93
Sulfatos (mg/L)	313	381	272	1084	919	1087	965	1060	1439

Tabela 32 - ETAR Lagos

Tempo (Dias)	0	7 (1)	7(2)	14(1)	14(2)	21(1)	21(2)	29(1)	29(2)
Potencial redox (mV)	-80	-339	-307	-382	-373	-389	-387	-381	-385
pH	7,36	6,55	6,45	7,06	6,9	7,11	7,04	6,99	6,93
Sulfatos (mg/L)	313	1297	1452	1024	736	867	1083	1040	1104

1.4.1 MEIO COM 10 g/L DE FOSFOGESSOS - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 33 - Lixiviação

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-108	7,08	586	0	0	0
7	-94	6,765	1924,5	15,556	0,007	65,761
14	-43	6,48	2859	21,213	0,113	110,309
21						
29	-71,5	6,465	3163	0,707	0,049	48,083

Tabela 34 - D4

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-306	6,935	1802,5	1,414	0,049	113,844
14	-343	7,21	1735,5	4,243	0,028	105,359
21	-357,5	7,26	1726,5	7,778	0,014	225,567
29	-364	7,12	2038,5	7,071	0,028	89,803

Tabela 35 - BV

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-389,5	7,14	326,5	4,950	0,014	77,075
14	-376	7,295	1001,5	25,456	0,007	116,673
21	-394,5	7,225	1026	0,707	0,035	86,267
29	-391	6,935	1249,5	4,243	0,007	267,993

Tabela 36 - ETAR Lagos

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-80	7,36	313	0	0	0
7	-323	6,5	1374,5	22,627	0,071	109,602
14	-377,5	6,98	880	6,364	0,113	203,647
21	-388	7,075	975	1,414	0,049	152,735
29	-383	6,96	1072	2,828	0,042	45,255

ANEXO 2 - DADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS DE ESPANHA E TUNÍSIA PELAS DIFERENTES BSR

2.1 CONCENTRAÇÕES DE FOSFOGESSOS 5 g/L

2.1.1 DADOS BRUTOS

Tabela 37 - Lixiviação 5 g/L, Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-148	-148	7,49	7,49	307	307
8	-102	-100	7,36	7,84	899	945
14	-136	-131	7,26	7,18	1002	1163
21	-66	-78	7,24	7,21	1231	1412
28	-95	-111	7,19	7,18	1448	1157

Tabela 38 - BV, Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-148	-148	7,49	7,49	307	307
8	-298	-302	7,05	6,98	40	41
14	-319	-325	6,93	7,12	35	32
21	-326	-312	7,1	7,04	77	230
28	-328	-315	7,14	7,1	570	915

Tabela 39 – Lagos, Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-148	-148	7,49	7,49	307	307
8	-312	-309	6,91	7,06	60	48
14	-378	-375	7,07	7,03	41	37
21	-361	-379	7,14	7,14	35	35
28	-383	-374	7,22	7,26	24	12

Tabela 40 - Lixiviação 5g/l, Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-148	-148	7,49	7,49	307	307
8	-105	-99	7,58	7,68	893	920
14	-161	-150	7,38	7,44	1386	1104
21	-63	-64	7,25	7,36	1823	1626
28	-74	-69	7,22	7,31	1972	1757

Tabela 41 – BV, Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-148	-148	7,49	7,49	307	307
8	-289	-292	7,06	7,13	49	50
14	-330	-328	7,06	7,03	25	33
21	-327	-322	7,13	7,12	50	37
28	-325	-323	7,11	7,18	155	200

Tabela 42 – Lagos, Tunisia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-148	-148	7,49	7,49	307	307
8	-315	-333	7,08	7	36	51
14	-391	-362	6,82	6,94	22	23
21	-372	-373	6,97	7,06	17	17
28	-374	-375	7,13	7,2	32	40

2.1.2 MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 43 - Lixiviação fosfogessos, Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-148,00	7,49	307,00	0	0	0
8	-101,00	7,60	922,00	2,12	0,05	0,71
14	-133,50	7,22	1082,50	1,41	0,02	5,66
21	-72,00	7,23	1321,50	3,54	0,01	9,19
28	-103,00	7,19	1302,50	1,41	0,05	31,82

Tabela 44 - BV, Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-148,00	7,49	307,00	0	0	0
8	-300,00	7,02	40,50	12,73	0,06	10,61
14	-322,00	7,03	33,50	20,51	0,08	0,71
21	-319,00	7,07	153,50	0,71	0,06	0,00
28	-321,50	7,12	742,50	0,71	0,05	5,66

Tabela 45 – Lagos, Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-148,00	7,49	307,00	0	0	0
8	-310,50	6,99	54,00	4,24	0,07	19,09
14	-376,50	7,05	39,00	7,78	0,04	199,40
21	-370,00	7,14	35,00	0,71	0,08	139,30
28	-378,50	7,24	18,00	3,54	0,06	152,03

Tabela 46 - Lixiviação fosfogesso, Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-148,00	7,49	307,00	0	0	0
8	-102,00	7,63	906,50	2,83	0,05	0,71
14	-155,50	7,41	1245,00	4,24	0,13	2,12
21	-63,50	7,31	1724,50	9,90	0,04	108,19
28	-71,50	7,27	1864,50	9,19	0,03	243,95

Tabela 47 – BV, Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-148,00	7,49	307,00	0	0	0
8	-290,50	7,10	49,50	2,12	0,11	8,49
14	-329,00	7,05	29,00	2,12	0,03	2,83
21	-324,50	7,13	43,50	12,73	0,00	0,00
28	-324,00	7,15	177,50	6,36	0,03	8,49

Tabela 48 – Lagos, Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-148,00	7,49	307,00	0	0	0
8	-324,00	7,04	43,50	1,41	0,34	32,53
14	-376,50	6,88	22,50	3,54	0,06	113,84
21	-372,50	7,02	17,00	8,49	0,02	127,99
28	-374,50	7,17	36,00	11,31	0,01	205,77

2.2 CONCENTRAÇÕES FOSFOGESSOS 10 g/L

2.2.1 DADOS BRUTOS

Tabela 49 - Lixiviação fosfogessos, Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-61	-61	7,17	7,17	190	190
6	-35	-38	6,9	6,93	1268	1243
13	-21	-19	6,82	6,86	2114	1930
20	-30	-18	6,56	6,63	2721	2580
27	-9	3	6,34	6,45	2992	2808

Tabela 50 – BV, Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-61	-61	7,17	7,17	190	190
6	-325	-330	7,22	7,19	27	19
13	-338	-341	7,21	7,28	347	277
20	-339	-353	7,1	7,09	1063	892
27	-348	-357	7,25	7,12	1714	1497

Tabela 51 – Lagos, Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-61	-61	7,17	7,17	190	190
6	-286	-320	6,53	6,62	840	992
13	-338	-356	6,79	7,02	1656	1342
20	-368	-380	7,02	7,19	968	389
27	-374	-389	7,1	7,19	759	594

Tabela 52 - Lixiviação fosfogessos, Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-61	-61	7,17	7,17	190	190
6	-27	-27	6,47	6,49	1491	1420
13	-5	-14	6,43	6,45	2250	2279
20	5	1	6,29	6,27	2600	2520
27	19	12	6,18	6,18	2712	2726

Tabela 53 – BV, Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-61	-61	7,17	7,17	190	190
6	-332	-332	7,11	7,2	19	38
13	-339	-370	7,05	7,13	320	435
20	-332	-371	6,95	7,01	1189	1176
27	-371	-371	7,01	6,9	1312	1433

Tabela 54 – Lagos, Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	-61	-61	7,17	7,17	190	190
6	-281	-284	6,55	6,61	1034	877
13	-339	-341	6,81	6,83	1427	1301
20	-371	-372	7,01	7,03	627	424
27	-381	-377	7,06	7,02	456	301

2.2.2 MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 55 - Lixiviação fosfogessos, Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-61,00	7,17	190,00	0	0	0
8	-36,50	6,92	1255,50	2,12	0,02	17,68
14	-20,00	6,84	2022,00	1,41	0,03	130,11
21	-24,00	6,60	2650,50	8,49	0,05	99,70
28	-3,00	6,40	2900,00	8,49	0,08	130,11

Tabela 56 – BV, Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-61,00	7,17	190,00	0	0	0
8	-327,50	7,21	23,00	3,54	0,02	5,66
14	-339,50	7,25	312,00	2,12	0,05	49,50
21	-346,00	7,10	977,50	9,90	0,01	120,92
28	-352,50	7,19	1605,50	6,36	0,09	153,44

Tabela 57 – Lagos, Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-61,00	7,17	190,00	0	0	0
8	-303,00	6,58	916,00	24,04	0,06	107,48
14	-347,00	6,91	1499,00	12,73	0,16	222,03
21	-374,00	7,11	678,50	8,49	0,12	409,41
28	-381,50	7,15	676,50	10,61	0,06	116,67

Tabela 58 - Lixiviação fosfogessos, Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-61,00	7,17	190,00	0	0	0
8	-27,00	6,48	1455,50	0,00	0,01	50,20
14	-9,50	6,44	2264,50	6,36	0,01	20,51
21	3,00	6,28	2560,00	2,83	0,01	56,57
28	15,50	6,18	2719,00	4,95	0,00	9,90

Tabela 59 – BV, Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-61,00	7,17	190,00	0	0	0
8	-332,00	7,16	28,50	0,00	0,06	13,44
14	-354,50	7,09	377,50	21,92	0,06	81,32
21	-351,50	6,98	1182,50	27,58	0,04	9,19
28	-371,00	6,96	1372,50	0,00	0,08	85,56

Tabela 60 – Lagos, Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	-61,00	7,17	190,00	0	0	0
8	-282,50	6,58	955,50	2,12	0,04	111,02
14	-340,00	6,82	1364,00	1,41	0,01	89,10
21	-371,50	7,02	525,50	0,71	0,01	143,54
28	-379,00	7,04	378,50	2,83	0,03	109,60

ANEXO 3 - DADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FOSFOGESSOS PELAS BSR COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

3.1 SEM FONTE DE CARBONO

3.1.1 CONCENTRAÇÃO 5 g/L - DADOS BRUTOS

Tabela 61 - Portugal

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	90		7,71		237	
8	-182	-191	7,01	6,98	1517	1414
14	-175	-173	6,65	6,68	1825	1726
21	-196	-204	6,78	6,88	2042	2093
28	-209	-207	6,81	6,82	2527	2336

Tabela 62 - Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	90		7,71		237	
8	-181	-213	7,09	7,05	1125	922
14	-180	-181	6,71	6,74	1299	1631
21	-196	-218	6,9	6,87	1965	2009
28	-199	-213	6,25	6,26	2254	2243

Tabela 63 - Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	90		7,71		237	
8	-231	-204	7,09	7	930	1079
14	-189	-174	6,87	6,68	1347	1533
21	-215	-193	6,86	6,82	1902	2208
28	-209	-198	6,79	6,8	1811	2025

3.1.2 CONCENTRAÇÃO 5 g/L - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 64 - Portugal

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	90	7,71	237	0	0	0
8	-186,5	7,00	1465,5	6,36	0,02	72,83
14	-174	6,67	1775,5	1,41	0,02	70,00
21	-200	6,83	2067,5	5,66	0,07	36,06
28	-208	6,82	2431,5	1,41	0,01	135,06

Tabela 65 - Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	90	7,71	237	0	0	0
8	-197	7,07	1023,5	22,63	0,03	143,54
14	-180,5	6,73	1465	0,71	0,02	234,76
21	-207	6,89	1987	15,56	0,02	31,11
28	-206	6,26	2248,5	9,90	0,01	7,78

Tabela 66 - Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	90	7,71	237	0	0	0
8	-217,5	7,05	1004,5	19,09	0,06	105,36
14	-181,5	6,78	1440	10,61	0,13	131,52
21	-204	6,84	2055	15,56	0,03	216,37
28	-203,5	6,80	1918	7,78	0,01	151,32

3.1.3 CONCENTRAÇÃO 10 g/L - DADOS BRUTOS.

Tabela 67 - Portugal

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	90		7,71		237	
8	-191	-178	7,03	6,95	1360	1647
14	-194	-191	6,62	6,62	2053	2290
21	-221	-240	6,88	6,89	2077	2484
28	-218	-223	6,78	6,73	2425	2536

Tabela 68 - Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	90		7,71		237	
8	-199	-189	6,99	6,99	1019	835
14	-164	-165	6,6	6,59	1865	1892
21	-180	-212	6,88	6,85	2083	2068
28	-191	-206	6,15	6,23	2383	2384

Tabela 69 - Tunisia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	90		7,71		237	
8	-176	-157	7,07	7,02	680	648
14	-171	-174	6,54	6,68	1783	1435
21	-194	-197	6,8	6,7	2266	2450
28	-205	-197	6,79	6,71	2106	2204

3.1.4 CONCENTRAÇÃO 10 g/L - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 70 - Portugal

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	90	7,71	237	0	0	0
8	-184,5	6,99	1503,5	9,19	0,06	202,94
14	-192,5	6,62	2171,5	2,12	0,00	167,58
21	-230,5	6,89	2280,5	13,44	0,01	287,79
28	-220,5	6,76	2480,5	3,54	0,04	78,49

Tabela 71 - Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	90	7,71	237	0	0	0
8	-194	6,99	927	7,07	0,00	130,11
14	-164,5	6,60	1878,5	0,71	0,01	19,09
21	-196	6,87	2075,5	22,63	0,02	10,61
28	-198,5	6,19	2383,5	10,61	0,06	0,71

Tabela 72 - Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	90	7,71	237	0	0	0
8	-166,5	7,05	664	13,44	0,04	22,63
14	-172,5	6,61	1609	2,12	0,10	246,07
21	-195,5	6,75	2358	2,12	0,07	130,11
28	-201	6,75	2155	5,66	0,06	69,30

3.2 ESTUDO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE FOSFOGESSOS PELAS BSR COM ETANOL

3.2.1 CONCENTRAÇÃO 5 g/L - DADOS BRUTOS

Tabela 73 - Portugal

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	82		7,22		293	
8	-280	-288	6,64	6,63	575	677
14	-297	-304	6,2	6,32	523	429
21	-287	-303	6,21	6,24	223	278
28	-277	-296	5,99	6,17	164	155

Tabela 74 - Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	82		7,22		293	
8	-288	-298	6,4	6,4	173	118
14	-286	-293	6,07	6,13	205	338
21	-288	-298	5,95	6	39	82
28	-280	-287	5,84	5,92	66	105

Tabela 75 - Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	82		7,22		293	
8	-296	-339	6,45	6,55	374	290
14	-341	-336	6,28	6,2	237	414
21	-306	-305	6,29	6,25	11	238
28	-304	-311	6,1	6,5	2	186

3.2.2 CONCENTRAÇÃO 5 g/L - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 76 - Portugal

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	82	7,22	293	0	0	0
8	-284	6,64	626	5,66	0,01	72,12
14	-300,5	6,26	476	4,95	0,08	66,47
21	-295	6,23	250,5	11,31	0,02	38,89
28	-286,5	6,08	159,5	13,44	0,13	6,36

Tabela 77 - Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	82	7,22	293	0	0	0
8	-293	6,40	145,5	7,07	0,00	38,89
14	-289,5	6,10	271,5	4,95	0,04	94,05
21	-293	5,98	60,5	7,07	0,04	30,41
28	-283,5	5,88	85,5	4,95	0,06	27,58

Tabela 78 - Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	82	7,22	293	0	0	0
8	-317,5	6,50	332	30,41	0,07	59,40
14	-338,5	6,24	325,5	3,54	0,06	125,16
21	-305,5	6,27	124,5	0,71	0,03	160,51
28	-307,5	6,30	94	4,95	0,28	130,11

3.2.3 CONCENTRAÇÃO 10 g/L - DADOS BRUTOS

Tabela 79 - Portugal

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	82		7,22		293	
8	-288	-293	6,61	6,6	875	746
14	-307	-307	6,27	6,34	846	512
21	-306	-306	6,21	6,25	880	338
28	-294	-299	6,12	6,13	590	315

Tabela 80 - Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	82		7,22		293	
8	-300	-303	6,37	6,41	105	23
14	-320	-328	6,21	6,24	374	356
21	-323	-332	6,06	6,07	265	208
28	-318	-331	6,05	6,07	285	343

Tabela 81 - Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	82		7,22		293	
8	-383	-295	6,38	6,4	356	270
14	-329	-331	6,9	6,1	584	777
21	-314	-332	6,12	6,13	641	844
28	-299	-320	5,96	5,98	585	851

3.2.4 CONCENTRAÇÃO 10 g/L - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 82 - Portugal

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	82	7,22	293	0	0	0
8	-290,5	6,61	810,5	3,54	0,01	91,22
14	-307	6,31	679	0,00	0,05	236,17
21	-306	6,23	609	0,00	0,03	383,25
28	-296,5	6,13	452,5	3,54	0,01	194,45

Tabela 83 - Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	82	7,22	293	0	0	0
8	-301,5	6,39	64	2,12	0,03	57,98
14	-324	6,23	365	5,66	0,02	12,73
21	-327,5	6,07	236,5	6,36	0,01	40,31
28	-324,5	6,06	314	9,19	0,01	41,01

Tabela 84 - Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	82	7,22	293	0	0	0
8	-339	6,39	313	62,23	0,01	60,81
14	-330	6,50	680,5	1,41	0,57	136,47
21	-323	6,13	742,5	12,73	0,01	143,54
28	-309,5	5,97	718	14,85	0,01	188,09

3.3 ESTUDO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE FOSFOGESSOS PELAS BSR COM RESÍDUOS VINÍCOLAS

3.3.1 CONCENTRAÇÃO 5 g/L - DADOS BRUTOS

Tabela 85 - Portugal

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	78		7,28		125	
8	-297	-300	6,2	6,26	298	359
14	-383	-338	6,26	6,24	633	573
21	-339	-344	6,32	6,36	559	606
28	-343	-340	6,18	6,25	334	323

Tabela 86 - Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	78		7,28		125	
8	-311	-308	6,25	6,24	481	458
14	-332	-311	6,32	6,26	512	342
21	-303	-301	6,3	6,26	581	447
28	-333	-337	6,28	6,23	312	221

Tabela 87 - Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	78		7,28		125	
8	-330	-305	6,48	6,24	351	43
14	-342	-314	6,32	6,15	348	199
21	-345	-337	6,34	6,23	567	281
28	-342	-336	6,29	6,19	501	38

3.3.2 CONCENTRAÇÃO 5 g/L - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 88 - Portugal

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	78	7,28	125	0	0	0
8	-298,5	6,23	328,5	2,12	0,04	43,13
14	-360,5	6,25	603	31,82	0,01	42,43
21	-341,5	6,34	582,5	3,54	0,03	33,23
28	-341,5	6,22	328,5	2,12	0,05	7,78

Tabela 89 - Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	78	7,28	125	0	0	0
8	-309,5	6,25	469,5	2,12	0,01	16,26
14	-321,5	6,29	427	14,85	0,04	120,21
21	-302	6,28	514	1,41	0,03	94,75
28	-335	6,26	266,5	2,83	0,04	64,35

Tabela 90 - Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	78	7,28	125	0	0	0
8	-317,5	6,36	197	17,68	0,17	217,79
14	-328	6,24	273,5	19,80	0,12	105,36
21	-341	6,29	424	5,66	0,08	202,23
28	-339	6,24	269,5	4,24	0,07	327,39

3.3.3 CONCENTRAÇÃO 10 g/L - DADOS BRUTOS

Tabela 91 - Portugal

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	78		7,28		125	
8	-316	-316	6,26	6,27	865	513
14	-335	-336	6,25	6,29	977	754
21	-383	-340	6,26	6,37	994	1162
28	-335	-338	6,24	6,26	1027	1075

Tabela 92 - Espanha

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	78		7,28		125	
8	-306	-314	6,26	6,27	216	691
14	-331	-335	6,21	6,22	495	676
21	-335	-337	6,23	6,21	756	1126
28	-336	-340	6,25	6,23	738	1008

Tabela 93 - Tunísia

Tempo (dias)	Potencial (mV)	Potencial (mV)	pH	pH	Sulfatos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)
0	78		7,28		125	
8	-301	-310	6,23	6,27	721	614
14	-339	-340	6,29	6,27	676	738
21	-343	-343	6,28	6,26	1056	1167
28	-342	-341	6,32	6,28	1023	1049

3.3.4 CONCENTRAÇÃO 10 g/L - MÉDIA DOS VALORES E DESVIO PADRÃO

Tabela 94 - Portugal

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	78	7,28	125	0	0	0
8	-316	6,27	689	0,00	0,01	248,90
14	-335,5	6,27	865,5	0,71	0,03	157,68
21	-361,5	6,32	1078	30,41	0,08	118,79
28	-336,5	6,25	1051	2,12	0,01	33,94

Tabela 95 - Espanha

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	78	7,28	125	0	0	0
8	-310	6,27	453,5	5,66	0,01	335,88
14	-333	6,22	585,5	2,83	0,01	127,99
21	-336	6,22	941	1,41	0,01	261,63
28	-338	6,24	873	2,83	0,01	190,92

Tabela 96 - Tunísia

Tempo (dias)	Valores Médios			Desvio Padrão		
	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)	Potencial (mV)	pH	Sulfatos (mg/L)
0	78	7,28	125	0	0	0
8	-305,5	6,25	667,5	6,36	0,03	75,66
14	-339,5	6,28	707	0,71	0,01	43,84
21	-343	6,27	1111,5	0,00	0,01	78,49
28	-341,5	6,30	1036	0,71	0,03	18,38