

Luís Miguel Babau Alexandre

Testes em *batch* para selecionar fontes de carbono de baixo custo adequadas ao crescimento e atividade de bactérias sulfato-redutoras



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias

2015

Luís Miguel Babau Alexandre

Testes em *batch* para selecionar fontes de carbono de baixo custo adequadas ao crescimento e atividade de bactérias sulfato-redutoras

Mestrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Maria Clara Costa

Co-orientação de:

Doutor Jorge Daniel Dias Carlier



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias

2015

Testes em *batch* para selecionar fontes de carbono de baixo custo adequadas ao crescimento e atividade de 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.”

(Luís Miguel Babau Alexandre)

Copyright©: “A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir, e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.”

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à professora Doutora Maria Clara Costa por me ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho. Gostaria também de agradecer pelo seu apoio, disponibilidade e partilha de conhecimentos durante este período.

Ao Doutor Jorge Carlier e à Doutora Ana Luís pelos ensinamentos, conselhos, apoio e amizade durante o tempo passado no laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologias Ambientais: Mestre Engenheira Ana Benedito; Mestre Engenheiro Gonçalo Vítor; Mestre Tânia Palma e João Nunes que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar/ensinar. O companheirismo tornou este percurso muito enriquecedor tanto a nível pessoal como profissional.

Aos meus pais: Florbela Alexandre e Luís Alexandre e ao meu irmão Rodrigo Alexandre por todo o suporte, incentivo, paciência e compreensão ao longo destes anos. Sem os seus esforços e sacrifícios nada disto seria possível.

À minha namorada Ana Morgado pela paciência, apoio e compreensão ao longo destes anos. Foi uma pessoa fundamental no meu percurso académico.

Aos meus avós por todo o apoio e incentivo durante este período.

Resumo

O tratamento biológico de águas com metais recorrendo a bactérias sulfato-redutoras (BSR) apresenta vantagens do ponto de vista ambiental, tecnológico e económico em relação ao tratamento químico.

A eficiência da ação de remediação das BSR depende em grande parte dos substratos orgânicos utilizados como fontes de compostos de carbono dadores de eletrões na respiração anaeróbica. As BSR utilizam compostos simples (ex.: lactato), no entanto os elevados custos tornam a sua aplicação nas formas puras em operações de larga escala inviável do ponto de vista económico.

A primeira fase deste trabalho consistiu em testar produtos de baixo custo como fontes de carbono para BSR. De todos os subprodutos testados o Carbocal®, as águas ruças, o melão de laranja e a água da lagoa 1 da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de São Domingos foram aqueles onde se registou uma boa atividade de BSR.

A segunda fase do trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade das BSR em utilizar produtos selecionados na primeira fase, no tratamento de dois efluentes contaminados com metais: Drenagem Ácida de Mina (DAM) da Mina de São Domingos e um efluente proveniente da indústria de galvanização de metais (*vertido de zinco*). Os subprodutos testados com este fim foram o Carbocal® e as águas ruças.

Observou-se que no tratamento da DAM de São Domingos utilizando Carbocal®, a atividade das BSR não foi significativo. Ainda assim a maioria dos metais em solução foram removidos. Pelo contrário, as águas ruças foram eficientes como fonte de carbono para BSR na remoção de metais de DAM. A eficiência da utilização deste produto pelas BSR aumenta quando se adiciona resíduos de calcite para neutralizar o pH.

No tratamento do *vertido de zinco*, nenhum dos subprodutos testados viabilizou a atividade de BSR, apesar de haver remoção de boa parte dos metais em solução.

Palavras-chave: metais pesados; bioremediação; bactérias sulfato-redutoras; fontes de carbono alternativas.

Título da tese em inglês: Batch Screening tests to select suitable and low cost carbon sources for Sulphate Reducing Bacteria (SRB) growth and activity

Abstract

The biological treatment using sulfate reducing bacteria (SRB) has advantages from environmental, technological and economic, points of view, comparing to chemical treatments.

The efficiency of SRB in the remediation of waters contaminated with metals depends largely on the organic substrates used as sources of carbon compounds donors of electrons in anaerobic respiration. SRB use simple compounds (e.g. lactate), though the high costs make their application in pure forms unwise for large-scale operations, from an economic point of view.

The first phase of this study consisted in testing low cost products as potential carbon sources for SRB. Among all tested products, Carbocal®, olive mill wastewater, orange's molasses and water from a lagoon of the São Domingos Waste Waters Treatment Plant (WWTP) were those where good SRB activity was observed.

The second phase of the study was to evaluate the ability of SRB to use products selected in the first phase for the treatment of two effluents contaminated with metals: Acid Mine Drainage (AMD) from São Domingos mine and an effluent from the galvanizing metals industry (*vertido de zincado*). The products tested for this purpose were Carbocal® and olive mill wastewater.

It was observed that in the treatment of AMD using Carbocal®, the SRB activity was not significant. Still most metals in solution were removed. On the contrary, the olive mill wastewater was efficient as carbon source for SRB in the treatment of AMD. The efficiency of utilization of this product by the BSR increases when calcite is added to neutralize the pH.

In *vertido de zincado* treatment tests, none of the tested products enabled SRB activity, despite the removal of a major part of metals in solution.

Key-words: heavy metals; bioremediation; sulfate-reducing bacteria; alternative carbon-sources.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de abreviaturas	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	xi
1. Objetivos	1
2. Introdução	2
2.1- Poluição ambiental resultante de contaminações com metais pesados	2
2.2 Indústria Mineira	3
2.2.1 Mina de São Domingos	6
2.3 Indústria da Galvanização	8
2.4 Tratamento físico-químico <i>versus</i> tratamento biológico em efluentes contaminados com metais pesados	10
2.4.1 Bactérias Sulfato Redutoras (BSR) como agente biológico para o tratamento de efluentes contaminados com metais pesados	11
2.5 Fontes de carbono alternativas para o crescimento de BSR	16
2.5.1 Indústria de açúcares - Espanha	19
2.5.2 Lagar de azeite - Portugal	19
2.5.3 Indústria de sumo de laranja - Portugal e Espanha	21
2.5.4 Indústria de papel - Portugal	22
2.5.5 Indústria de pinhão - Espanha	23
2.5.6 Estação de Tratamento de Águas residuais (ETAR) da aldeia de São Domingos – Portugal	23
2.6 Linhas gerais do trabalho realizado	24
3 Materiais e Métodos	26
3.1 Preparação do Inóculo	26
3.2 Testes de seleção de subprodutos/efluentes de baixo custo como possíveis fonte de carbono para o crescimento de BSR	27
3.3 Efluentes contaminados com metais pesados utilizados nos testes de remediação	29
3.4 Testes de remediação de efluentes contaminados com metais pesados	30
3.4.1 Carbocal® como agente neutralizador do pH dos efluentes contaminados com metais pesados	30
3.4.2 Carbocal® como fonte de carbono para as BSR no tratamento de <i>vertido de zinco</i> e de DAM de São Domingos	30

3.4.3	Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de DAM de São Domingos, na presença de calcite	32
3.4.4	Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de <i>vertido de zincado</i> e de DAM de São Domingos, na ausência de calcite.....	33
3.5	Métodos analíticos.....	34
3.5.1	Concentrações de sulfureto e sulfato.....	34
3.5.2	Valores de Eh e pH.....	34
3.5.3	Valores de Carência Química de Oxigénio (CQO)	34
3.5.4	Concentração de azoto e fósforo	35
3.5.5	Concentração de fenóis	35
3.5.6	Concentração de metais.....	35
3.5.7	Concentrações de boro	35
4.	Resultados e discussão	36
4.1	Seleção de subprodutos industriais como possíveis fonte de carbono para o crescimento de BSR	36
4.1.1	Caracterização inicial dos subprodutos	36
4.1.2	Caracterização inicial dos subprodutos diluídos em meio Postgate B modificado 38	
4.1.3	Atividade das BSR com os subprodutos testados.....	41
4.2	Testes de remediação de metais	50
4.2.1	Carbocal® como agente neutralizador do pH	51
4.2.2	Carbocal® como fonte de carbono para as BSR na remediação de efluentes contaminados com metais pesados.....	58
4.2.3	Águas ruças como fonte de carbono para as BSR na remediação de efluentes contaminados com metais pesados.....	71
5.	Resumo dos resultados obtidos	83
6.	Conclusões.....	86
7.	Perspetivas futuras.....	87
8.	Bibliografia	88
Anexos	96

Índice de abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADP - Adenosina difosfato

AMD - Adenosina monofosfato

ASP - Adenosina 5'-fosfosulfato

ATP - Adenosina trifosfato

BSR - Bactérias Sulfato-Redutoras

CQO - Carência Química de Oxigênio

CVS – Complexo Vulcano-Sedimentar

DAM - Drenagem ácida de mina

EAA - Espectroscopia de Absorção Atômica de chama

Eh - Potencial redox

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

FPI – Faixa Piritosa Ibérica

UV - Ultravioleta

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Atividade mineira, por região, desde 1850 até 2009. (Fonte: International Council on Mining & Metals, 2012)	3
Figura 2.2 - Fábrica na Achada do Gamo: (A) - na época em que a mina estava ativa (fonte: http://www.fundacaoserraomartins.pt/index.php?id=achada-do-gamo); (B) – hoje em dia (fonte: http://www.minasaodomingos.comyr.com/mina.html).....	6
Figura 2.3 - Resultados da poluição causada pelo abandono da mina: (A) – Lago do poço da mina a céu aberto (corta) com água ácida; (B) – Aspeto atual de escórias e lago com água ácida na área circundante da mina (foto tirada no âmbito deste trabalho).....	7
Figura 2.4 - Processos de galvanização: (A) – <i>Hot-dip galvanization</i> . Fonte: http://eng.galvano.no/?ac_id=12 (B) – Deposição eletrolítica. Fonte: http://mundoeletrolitico.blogspot.pt/	8
Figura 2.5 - Esquema representativo de uma célula de eletro galvanização. Fonte: GalvInfoNote, 2011.....	9
Figura 2.6 - Esquema representativo do trabalho realizado	25
Figura 3.1 - (A) – Frascos <i>batch</i> de 250 ml com calcite; (B) e (C) - Alguns dos subprodutos testados; (D) - Ensaio de seleção das fontes de carbono alternativas para o crescimento de BSR.	28
Figura 3.2 - (A) - Ensaio de Carbocal® com DAM São Domingos; (B) - Ensaio de Carbocal® com <i>vertido de zinco</i>	31
Figura 3.3 - (A) -Início do ensaio de águas ruças no tratamento de DAM e <i>vertido de zinco</i> ; (B) – Final do ensaio de águas ruças no tratamento de DAM e <i>vertido de zinco</i>	33
Figura 4.1 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com Carbocal® 10% (m/v)	48
Figura 4.2 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças não decantadas diluídas 1:6	48
Figura 4.3 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças decantadas diluídas 1:5	49
Figura 4.4 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melaço sem conservante diluído 1:200	49
Figura 4.5 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com água da Lagoa 1 da ETAR de São Domingos diluída 1:2.	49

Figura 4.6 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com água da Lagoa 1 da ETAR de São Domingos diluída 1:5	50
Figura 4.7 – Concentração de metais no <i>vertido de zincado</i> por ação do Carbocal® ao fim de 10 dias	53
Figura 4.8 - Diagrama que representa o balanço químico do zinco, elaborado através do <i>software</i> Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).....	54
Figura 4.9 - Diagrama do balanço químico do ferro, elaborado através do <i>software</i> Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).....	54
Figura 4.10 - Diagrama do balanço químico do boro, elaborado através do <i>software</i> Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).....	54
Figura 4.11 - Concentração de metais na DAM de São Domingos por ação do Carbocal® ao fim de 10 dias.....	57
Figura 4.12 - Diagrama do balanço químico do cobre, obtido com o <i>software</i> Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).....	57
Figura 4.13 - Monitorização do teste de 1% (m/v) de Carbocal® em <i>vertido de zincado</i> com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.....	59
Figura 4.14 - Monitorização do controlo negativo de 1% (m/v) de Carbocal® em <i>vertido de zincado</i> sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo	59
Figura 4.15 - Monitorização do teste de 10% (m/v) de Carbocal® em <i>vertido de zincado</i> com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.....	60
Figura 4.16 - Monitorização do controlo negativo de 10% (m/v) de Carbocal® em <i>vertido de zincado</i> sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo d tempo	60
Figura 4.17 - Monitorização do teste com 20% (m/v) de Carbocal® em <i>vertido de zincado</i> com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo	62
Figura 4.18 - Monitorização do controlo negativo de 20% (m/v) de Carbocal® em <i>vertido de zincado</i> sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo	62
Figura 4.19 - Monitorização do controlo positivo 10% (m/v) de Carbocal® em Postgate B modificado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.	63

Figura 4.20 - Monitorização do controlo com Postgate B original com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do ensaio; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do ensaio.....	63
Figura 4.21 - Monitorização do teste de 1% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo	65
Figura 4.22 - Monitorização do controlo negativo de 1% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo	65
Figura 4.23 - Monitorização do teste de 10% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.	67
Figura 4.24 - Monitorização do controlo negativo de 10% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo	67
Figura 4.25 - Monitorização do teste de 20% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.	69
Figura 4.26 - Monitorização do controlo negativo de 20% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo	69
Figura 4.27 - Monitorização do controlo positivo 10% (m/v) de Carbocal® em Postgate B modificado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo	70
Figura 4.28 - Monitorização do controlo com Postgate B original com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do ensaio; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do ensaio.....	70
Figura 4.29 - Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:5) em DAM de São Domingos com BSR e com 10% (m/v) de calcite: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.....	75
Figura 4.30 - Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:10) em DAM de São Domingos com BSR e com 10% (m/v) de calcite: (A) - Concentrações de	

sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo..... 75

Figura 4.31 - Monitorização do controlo negativo com águas ruças não decantadas e centrifugadas (1:5) em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo..... 75

Figura 4.32 - Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:5) em DAM São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo..... 77

Figura 4.33 - Monitorização do controlo negativo com águas ruças não decantadas (1:5) em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) - Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo. 78

Figura 4.34 - Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:5) em *vertido de zincado* com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco e ferro ao longo do tempo..... 80

Figura 4.35 - Monitorização do controlo negativo com águas ruças não decantadas (1:5) em *vertido de zincado* sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco e ferro ao longo do tempo 80

Figura 4.36 - Monitorização do controlo positivo com águas ruças não decantadas (1:5) em Postgate B modificado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo 81

Figura 4.37 - Monitorização do Postgate B modificado com águas ruças não decantadas (1:5) sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo 82

Figura 4.38 - Monitorização do controlo com Postgate B original com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do ensaio; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do ensaio..... 82

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Total de minas abandonadas de Portugal em 2009 e quais os minerais delas extraídos (adaptado de Empresa de Desenvolvimento Mineiro, 2009).....	5
Tabela 2.2 - Vantagens e desvantagens das diferentes fontes de eletrões utilizadas pelas BSR (adaptado de Kaksonen & Puhakka, 2007).	14 e 15
Tabela 2.3 - Diferentes subprodutos/efluentes já testados como fontes de carbono para o crescimento de BSR	17
Tabela 3.1 - Composições dos diferentes meios Postgate. As concentrações dos compostos estão expressas em g/L. (Postgate,1966).....	26
Tabela 3.2 - Subprodutos/ efluentes testados como fontes de carbono de baixo custo para as BSR	28
Tabela 3.3 - Caracterização dos principais constituintes da DAM e do <i>vertido de zincado</i>	29
Tabela 4.1 - Caracterização inicial dos subprodutos (pH, [SO ₄ ²⁻], COD, [N] total e [P] total).....	36 e 37
Tabela 4.2 - Valores iniciais dos subprodutos diluídos em meio Postgate B modificado	39 e 40
Tabela 4.3 – Valores finais de pH e Eh obtidos neste ensaio	41, 42 e 43
Tabela 4.4 - Concentrações máximas de sulfureto e percentagem máxima de redução de sulfato obtidas neste ensaio	45 e 46
Tabela 4.5 - Valores de Eh e pH no início (dia 1) e no fim (dia 10) do ensaio de neutralização do pH do <i>vertido de zincado</i>	52
Tabela 4.6 - Valores de Eh e pH no início (dia 1) e no fim (dia 10) do ensaio de neutralização do pH de DAM de São Domingos	55
Tabela 4.7 - Valores de pH da DAM de São Domingos em diferentes condições.....	72
Tabela 4.8 - Valores de pH do <i>vertido de zincado</i> em diferentes condições.....	78

1. Objetivos

Este trabalho dividiu-se em dois objetivos:

- Seleção em *batch* de subprodutos/efluentes de diferentes indústrias como possíveis fontes de carbono de baixo custo para o crescimento e atividade de bactérias sulfato-redutoras, em meio Postgate B sem lactato de sódio;
- Testar em *batch* subprodutos/efluentes, selecionados anteriormente, como fonte de carbono para bactérias sulfato-redutoras no tratamento de efluentes contaminados com metais pesados.

2. Introdução

2.1- Poluição ambiental resultante de contaminações com metais pesados

Durante o século XX observou-se um grande desenvolvimento da indústria química que gerou uma grande variedade de compostos, responsáveis pela modernização do nosso estilo de vida. A produção destes produtos em larga escala levou, contudo, a uma deterioração do meio ambiente, através da contaminação dos solos, do ar e das águas subterrâneas e superficiais (Socco *et al.*, 2003).

A acumulação de metais pesados no ambiente está maioritariamente relacionada com a descarga de efluentes provenientes da drenagem de minas e das indústrias metalúrgicas e de corantes (Viggi *et al.*, 2009; Kieu *et al.*, 2011; Bakarar, 2011). Estes efluentes apresentam, regra geral, uma alta concentração de sulfato e de iões solúveis de metais pesados (Kieu *et al.*, 2011; Wei-ting *et al.*, 2014). Consideram-se metais pesados, os elementos químicos com elevada densidade ($>4,0 \text{ g/cm}^3$), e que podem ser tóxicos a baixas concentrações, como é o caso do chumbo (Pb), zinco (Zn), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), arsénio (As), prata (Ag), crómio (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe) (Duruibe *et al.*, 2007; Barakat, 2011).

Assim sendo, com a industrialização das sociedades tornou-se necessário criar e implementar regras e diretrizes que permitissem prevenir e controlar a contaminação das águas superficiais e subterrâneas. Na União Europeia a diretiva 2000/60/CE estabelece um quadro de ações muito importantes na política de gestão da água. Os principais objetivos desta diretiva são:

- Prevenir uma maior deterioração dos recursos de água e melhorar a qualidades destes recursos;
- Promover o consumo sustentável de água;
- Reduzir progressivamente e eliminar as descargas de substâncias primárias, como por exemplo: cádmio, chumbo, mercúrio (extraído de Anexo I da diretiva 2013/39/UE);
- Reduzir progressivamente a poluição de águas subterrâneas;
- Contribuir para a atenuação dos efeitos das secas e das cheias.

O trabalho desenvolvido neste estágio pretendeu contribuir para a remediação de efluentes contaminados com metais pesados, de forma a obter efluentes que cumprissem os limites definidos na legislação portuguesa para águas destinadas a rega (ANEXO XVI - Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto).

2.2 Indústria Mineira

A extração de minérios é uma das mais antigas e mais importantes atividades descritas na história da civilização, uma vez que fornece matéria-prima para a elaboração da maioria dos materiais disponíveis hoje em dia (Coelho & Teixeira, 2011).

Na Europa, a indústria mineira é uma das indústrias com maior tradição, tendo um papel fundamental na sua economia. Contudo, na economia global o setor dos minerais é relativamente pequeno embora diverso, estando envolvidos países como os Estados Unidos da América, Canadá, Austrália, África do Sul, China, Rússia e alguns países ricos da União Europeia (maioritariamente países nórdicos), os quais acabam por ser os maiores produtores de minerais (Azapagic, 2004) (figura 2.1).

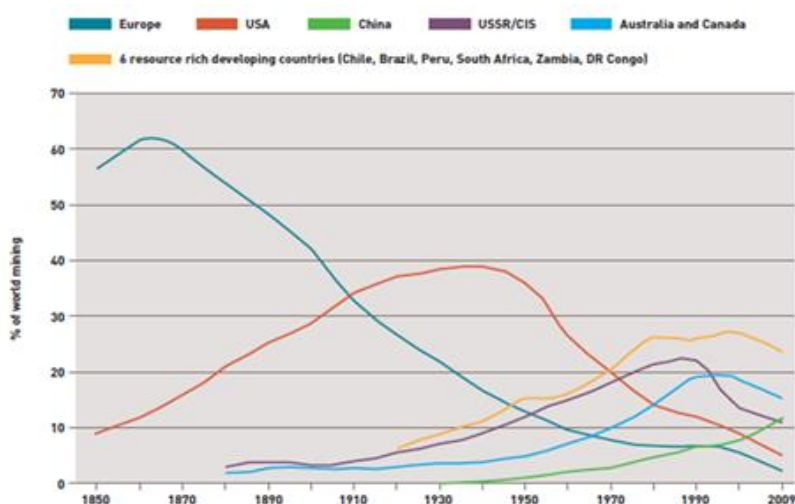
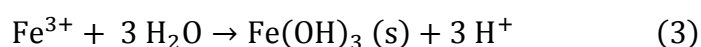
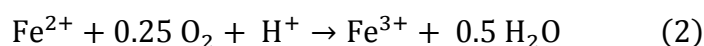
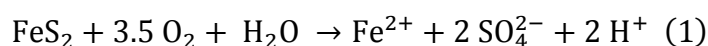


Figura 2.1- Atividade mineira, por região, desde 1850 até 2009. (Fonte: International Council on Mining & Metals, 2012)

Em Portugal, tal como na União Europeia, a atividade mineira tem vindo a decrescer ao longo do tempo. No ano de 2010 existiam cerca de 56 minas a operar em Portugal, gerando um total de 4.664.978 toneladas de minérios, o que se traduziu num lucro de 735 milhões de euros (Vitor *et al.*, 2012).

Embora desempenhando um papel importante na economia de muitos países, a indústria mineira é uma das atividades que causa maior risco ambiental (Coelho & Teixeira, 2011), principalmente a extração de minérios metálicos, onde o contacto das rochas sulfuretadas com águas subterrâneas ou superficiais leva à sua acidificação. Sob condições oxidativas a pirite (FeS₂) existente nas rochas produz sulfato e ferro dissolvido (1). O ferro dissolvido (Fe²⁺), vai reagir com o oxigénio (O₂), sendo oxidado a Fe³⁺ (2) que por ser pouco solúvel na presença de água precipita sob a forma de hidróxido de ferro III (Fe(OH)₃) (3) (Durkin & Herrmann, 1994; Christensen *et al.*, 1996; Cravotta III & Trahan, 1999;), fenómeno que é observável sob a forma de depósitos de cor ocre à superfície dos sedimentos dos cursos de água (Durkin & Herrmann, 1994).



A acidificação das águas de mina contribui para a dissolução de outros metais precipitados sob as rochas e sob os sedimentos dos cursos de água, lixiviando-as e originando águas contaminadas com metais e com baixos valores de pH, conhecidas como drenagem ácida de mina (DAM) (Durkin & Herrmann, 1994; Christensen, *et al.*, 1996; Doshi, 2006). A natureza/composição da DAM varia consoante a localização e tipo de mina, embora existam quatro características que são comuns a todas elas: valores de pH muito baixos; elevada concentração de metais em solução; elevada concentração de sulfato e acumulação de sólidos em suspensão (por exemplo, Durkin & Herrmann, 1994; Akcil & Koldas, 2006; Gaikwad & Gupta, 2008; Luptakova & Macingova, 2012).

O impacto ambiental da DAM é maior em minas abandonadas uma vez que após o seu encerramento as estruturas a céu aberto com resíduos rochosos da exploração dos minérios (escombreyras) e os túneis subterrâneos acabam por ser parcial ou totalmente inundados, resultando na formação deste efluente (Akcil & Koldas, 2006). Nos casos em que as estruturas (a céu aberto ou túneis) são totalmente inundadas e a sua capacidade máxima é ultrapassada, acabam por transbordar e contaminar as áreas envolventes

(Christensen *et al.*, 1996; Gaikwad & Gupta, 2008). A contaminação por DAM causa efeitos devastadores, reduzindo a diversidade biológica e a biomassa total nos ecossistemas terrestres e aquáticos (Elliot *et al.*, 1998; Gaikwad & Gupta, 2008).

No ano de 2009 existiam em Portugal 175 minas abandonadas, das quais 10 correspondiam a minas de sulfuretos polimetálicos (tabela 2.1) onde está incluída a mina de São Domingos (Mértola, Beja) (Empresa de Desenvolvimento Mineiro, 2009).

Tabela 2.1-Total de minas abandonadas de Portugal em 2009 e quais os minerais delas extraídos (adaptado de Empresa de Desenvolvimento Mineiro, 2009)

Mineral	Número de minas	Principal grupo
Estanho e Tungsténio	40	
Metais base (ex.: cobre, zinco, níquel, chumbo)	28	Minerais metálicos
Ouro	12	
Ferro e Manganês	16	
Sulfuretos polimetálicos (ex.: FeS; ZnS; PbS)	10	Sulfuretos polimetálicos
Radioativos (ex: rádio e urânio)	61	Radioativos
Carvão	3	
Amianto	1	-
Outros	4	
Total	175	

2.2.1 Mina de São Domingos

Localizada na freguesia de Corte do Pinto no conselho de Mértola (Beja), a mina de São Domingos iniciou a sua atividade em 1854, tendo-se extraído durante o seu funcionamento cobre, pirite, ouro e prata (Tavares *et al.*, 2008). A mina de São Domingos pertence à Faixa Piritosa Ibérica (FPI) que se estende desde as províncias de Huelva e Sevilha em Espanha, até ao Sul de Portugal, incluindo grande parte dos distritos de Beja e Setúbal. A sequência litoestratigráfica da FPI é dividida em 3 grandes unidades: Formação Filito-Quartzítica, Complexo Vulcano-Sedimentar (CVS) e Grupo Flysch do Baixo Alentejo (Andrade & Schermerhorn 1971, Matos 2005). Os depósitos de sulfuretos polimetálicos encontram-se na CVS. A atividade principal da mina era a produção de cobre concentrado, extraído da pirite cuprífera. Durante a exploração no século XIX a maioria do minério de cobre extraído seguia para a fábrica na Achada do Gamo (figura 2.2) onde era tratado, sendo depois exportado. A outra parte dos minérios de cobre extraídos era enviada para Inglaterra de onde se extraía ouro e prata (Instituto Geológico e Mineiro, 2000).

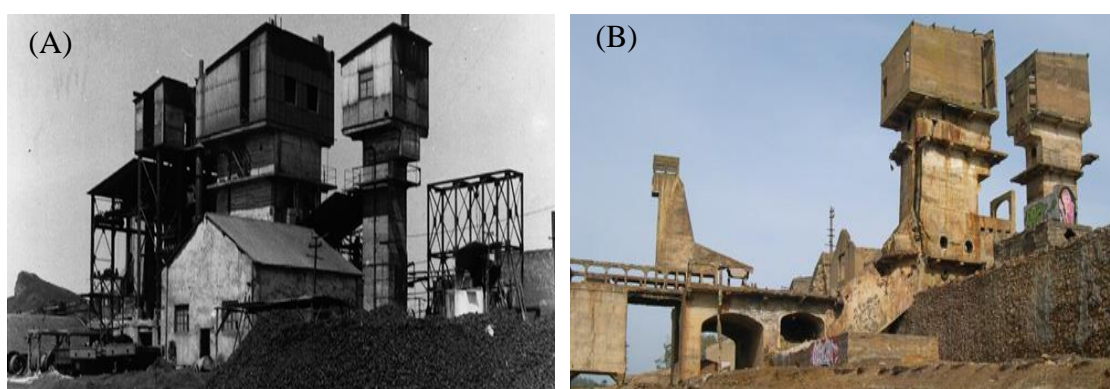


Figura 2.2- Fábrica na Achada do Gamo: (A) - na época em que a mina estava ativa (fonte: <http://www.fundacaoserraomartins.pt/index.php?id=achada-do-gamo>); (B) – hoje em dia (fonte: <http://www.minasaodomingos.comyr.com/mina.html>).

No início do século XX, a evolução da indústria do ácido sulfúrico (H_2SO_4) levou à extração de pirite para a produção deste ácido traduzindo-se num aumento das exportações (Instituto Geológico e Mineiro, 2000).

A mina encerrou em 1996 devido ao esgotamento dos minérios. O reflexo da extração de minerais neste local é visível através da presença de grandes quantidades de resíduos em que ocorre oxidação da pirite e resultando na formação de DAM (Pérez-

Lopez *et al.*, 2008 Álvarez-Valero *et al.*, 2008). A descarga final desta água ácida contaminada por metais, proveniente da mina, é o Rio Chança, principal efluente do rio Guadiana, causando a sua poluição parcial (Álvarez-Valero *et al.*, 2008). Para além da poluição parcial do rio Chança, a atividade mineira em São Domingos levou à formação de lagoas a céu aberto (figura 2.3 A) com águas contaminadas e a formação de escórias nas áreas circundantes (figura 2.3 B), causando assim alteração e destruição do ecossistema nessa zona.

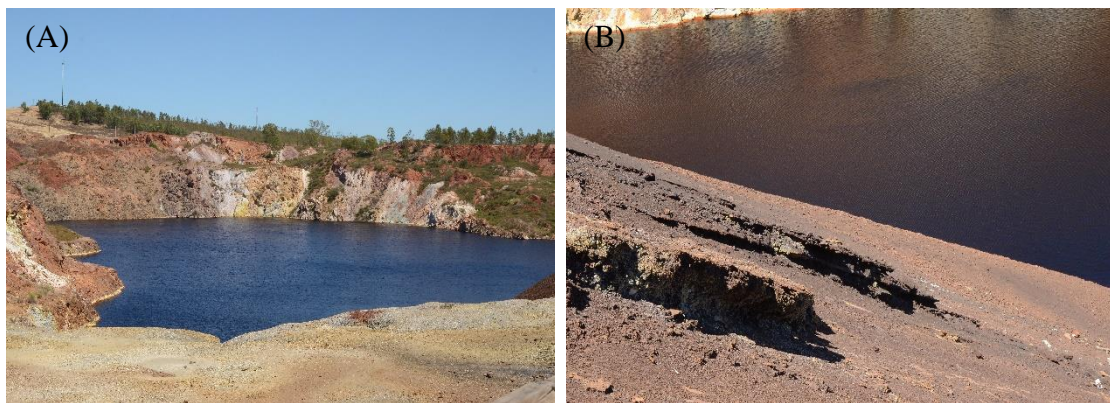


Figura 2.3- Resultados da poluição causada pelo abandono da mina: (A) – Lago do poço da mina a céu aberto (corta) com água ácida; (B) – Aspeto atual de escórias e lago com água ácida na área circundante da mina (foto tirada no âmbito deste trabalho).

Os resíduos encontrados neste local, resultado da atividade mineira, podem ser divididos em dois grupos: resíduos provenientes do processo de extração de minério e resíduos industriais resultantes do processamento dos minérios em matérias-primas (Álvarez-Valero *et al.*, 2008).

Segundo Álvarez-Valero *et al.* (2008), a área total afetada pela atividade mineira em São Domingos era de aproximadamente 3 200 000 m², onde 831 000 m² estavam contaminados com resíduos provenientes da extração dos minérios e 544 000 m² estavam contaminados com resíduos da indústria de processamento dos mesmos. Nos restantes 1 610 000 m³ de área afetada encontravam-se os materiais, compostos essencialmente por quartzo, que existiam no solo debaixo da zona habitacional da aldeia de São Domingos. Tendo em conta a área total afetada e a densidade dos resíduos estimou-se que se tenha originado aproximadamente 25 000 000 m³ de águas contaminadas.

A DAM da mina de São Domingos é caracterizada por um pH próximo de 2 e por concentrações elevadas de sulfato (~3000 mg/L), ferro (~500 mg/L), cobre (~140 mg/L) e zinco (140 mg/L) (Costa & Duarte, 2005).

2.3 Indústria da Galvanização

O zinco é um elemento químico de grande aplicabilidade industrial, usado na construção de pontes, estradas e outras estruturas que necessitem duma grande quantidade de aço galvanizado (Wei-ting *et al.*, 2014). A galvanização, a forma de proteção normalmente utilizada contra a corrosão do ferro e aço, é feita pela deposição de zinco metálico por imersão do metal a proteger num banho com zinco derretido (*Hot-dip galvanization*) ou por deposição eletrolítica (ou eletro galvanização) (Queiroz, 2003) (figura 2.4). No processo de *Hot-dip galvanization* o metal é imerso num banho com zinco derretido (~450°C) (Marder, 2000; Bicao *et al.*, 2008) e ao emergir o zinco vai reagir e formar óxido de zinco (ZnO) que vai acabar por reagir com o dióxido de carbono (CO₂) e formar carbonato de zinco (ZnCO₃), composto muito utilizado contra a corrosão (Galvanizing Asia).



Figura 2.4- Processos de galvanização: (A) – Hot-dip galvanization. Fonte: http://eng.galvano.no/?ac_id=12 (B) – Deposição eletrolítica. Fonte: <http://mundoeletrolitico.blogspot.pt/>

O processo de eletro galvanização consiste na eletro deposição de um filme de zinco aderente sob um substrato metálico (Queiroz, 2003; Marques, 2008). A figura 2.5 ilustra uma célula de electro galvanização onde o zinco é o ânodo, o substrato metálico o cátodo e a solução salina de zinco o eletrólito. A aplicação de uma corrente elétrica

contínua vai oxidar o zinco (ânodo) libertando dois elétrões, que se vão dissolver como cátions numa solução de zinco (eletrólito). No cátodo os cátions de zinco são reduzidos depositando-se sob a superfície do substrato. (GalvInfoNote, 2011).

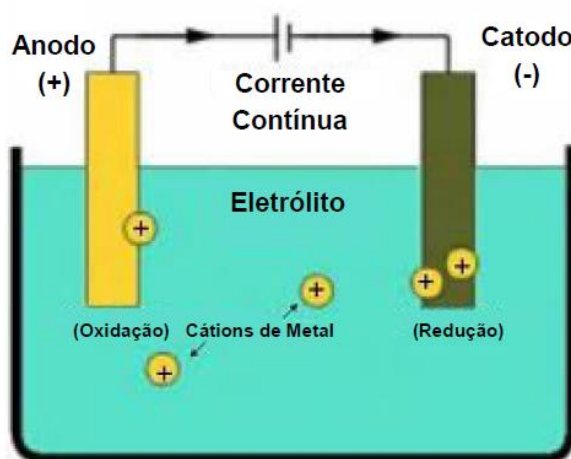


Figura 2.5 – Esquema representativo de uma célula de eletrogalvanização. Fonte: GalvInfoNote, 2011.

A nível industrial são normalmente utilizadas bobinas de aço como substrato metálico. Estas bobinas são soldadas umas às outras formando uma “tira” de aço que, antes do processo de electrogalvanização, vai sofrer uma limpeza para remover possíveis resíduos que possam afetar a aderência do revestimento (Marques, 2008). Os revestimentos formados durante o processo de electrogalvanização apresentam uma estrutura homogénea e não são tão espessos como os produzidos por *Hot-dip Galvanization*, (Queiroz, 2003; Marques, 2008).

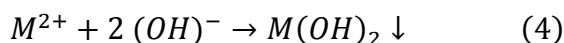
O zinco é um metal muito reativo, do ponto de vista eletroquímico, e como tal a sua corrosão aumenta com a exposição ao ar livre, sendo necessário um tratamento adicional, após ser aplicado no revestimento de outros metais (Granados-Neri, *et al.*, 2011; Tomachuck *et al.*, 2014). No caso das estruturas de aço revestidas com este metal, estas são tratadas normalmente com cromatos ou com fosfatos de forma a melhorar a sua resistência à corrosão. O tratamento com cromatos melhora a aparência do revestimento e retarda a corrosão, causada pela humidade. Já o tratamento com fosfatos aumenta a resistência à corrosão atmosférica (Marques, 2008).

Da lavagem dos tanques de deposição eletrolítica, gera-se uma quantidade de efluente contaminado com zinco (Pamar & Thakur, 2013), que por ser um metal pesado acarreta problemas ambientais e de saúde pública (Wei-ting *et al.*, 2014).

Estes efluentes industriais são caracterizados por valores de pH baixos e por elevadas concentrações de zinco e ferro. O zinco é o elemento em maior concentração, seguido do ferro. São constituídos ainda por cádmio, cobalto, crómio, níquel, cobre e boro em concentrações muito pequenas (Tahir & Rauf, 2004; Pereira *et al.*, 2010).

2.4 Tratamento físico-químico *versus* tratamento biológico em efluentes contaminados com metais pesados

Métodos como a precipitação química, a troca iónica, a osmose reversa ou a eletrólise podem ser aplicados na remoção de metais pesados de águas residuais acidificadas (Johnson & Hallberg, 2005; Kurniawan *et al.*, 2006; Wei-ting *et al.*, 2014). A precipitação química é a técnica mais utilizada para remover metais pesados de efluentes inorgânicos. No mecanismo de remoção (equação 4) o metal em solução (M^{2+}) vai reagir com o agente precipitante (OH^-), formando um hidróxido metálico insolúvel ($M(OH)_2$) (Kurniawan *et al.*, 2006; Barakat, 2010).



A precipitação do metal sob a forma deste hidróxido metálico dá-se através da alteração do pH para valores alcalinos (9-11). A cal e o calcário são os agentes precipitantes mais utilizados devido à sua grande abundância (Johnson & Hallberg, 2005; Barakat, 2010).

Apesar do seu tratamento ser eficaz estas técnicas são dispendiosas e acabam por gerar grandes quantidades de lamas relativamente solúveis (Kurniawan *et al.*, 2006; Kieu *et al.*, 2011; Wei-ting *et al.*, 2014).

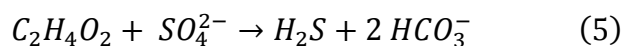
O tratamento por via biológica (bioremediação) é considerado uma alternativa promissora aos tratamentos físico-químicos devido principalmente às suas inúmeras vantagens: 1-elimina permanentemente os contaminantes através de transformação bioquímica ou mineralização; 2-evita o recurso a tratamentos químicos; 3- permite

aplicação *in situ*; 4-ser rentável do ponto de vista económico (Socco *et al.*, 2003; Kaksonen & Sahinkaya, 2007).

2.4.1 Bactérias Sulfato Redutoras (BSR) como agente biológico para o tratamento de efluentes contaminados com metais pesados

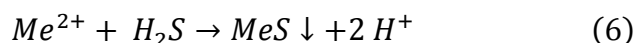
As Bactérias Sulfato Redutoras (BSR) são provavelmente uma das formas de vida mais antigas na Terra, tendo sido encontradas em rochas do início do período Arcaico (entre 3.85 biliões de anos e 2.5 biliões de anos atrás). Hoje em dia estas bactérias pode ser encontradas em ambientes terrestres e marítimos (Muyzer & Stams, 2008; Luptakova & Macingova, 2012).

A designação de Bactérias Sulfato Redutoras (BSR) destina-se a um grupo de bactérias anaeróbias que utilizam iões sulfato (SO_4^{2-}) como aceitadores finais de eletrões no metabolismo de oxidação (perda de eletrões) de substratos orgânicos para obtenção de energia, produzindo sulfureto (Muyzer & Stams, 2008). Como a sua capacidade para assimilar sulfureto é limitada, a maioria do sulfureto produzido por estas bactérias é libertado para o meio sob a forma de sulfureto de hidrogénio (H_2S) (Muyzer & Stams, 2008; Teclu & Wallis, 2009). Na equação 5 está representado o mecanismo de redução de sulfato (SO_4^{2-}), onde o substrato orgânico é ácido láctico ($C_2H_4O_2$), produzindo-se sulfureto de hidrogénio (H_2S) e bicarbonato (HCO_3^-) que vai neutralizar o pH do meio favorecendo a precipitação de metais sob a forma de carbonato (por exemplo: calcite ($CaCO_3$); dolomite ($CaMg(CO_3)_2$)) (Cravotta III & Trahan, 1999; Zagury *et al.*, 2006; Teclu & Wallis, 2009).



Devido à sua capacidade de adaptação a meios com condições físico-química extremas (Muyzer & Stams, 2008; Luptakova & Macingova, 2012), as BSR podem ser utilizadas para o tratamento de efluentes contaminados com metais pesados como é o caso da DAM ou de efluentes de indústrias metalúrgicas. O sulfureto de hidrogénio (H_2S) que produzem vai reagir com o metal em solução (Me^{2+}) (ex.: Cobre, Zinco), levando à sua precipitação sob a forma de sulfureto metálico ($MeS\downarrow$) como se pode ver pela equação 6 (Teclu & Wallis, 2009; Kieu *et al.*, 2011). Os resultados desta reação são a remoção dos

metais em solução (Cravotta III & Trahan, 1999; Zagury *et al.*, 2006; Teclu & Wallis, 2009; Viggi *et al.*, 2009).



De forma a garantir o crescimento das BSR existem principalmente 4 fatores a ter em conta: temperatura, pH, composição química do efluente e composição do substrato orgânico (Vela *et al.*, 2002; Doshi, 2006; Nucelita & Zagury, 2008).

A capacidade de adaptação das BSR a ambientes físicos-químicos adversos permite a sua utilização no tratamento de efluentes (Muyzer & Stams, 2008; Luptakova & Macingova, 2012). No entanto, mesmo conseguindo sobreviver numa grande gama de valores de pH, é normalmente necessário um pH acima de 5 para promover uma boa atividade das BSR (Cohen, 2006; Luptakova & Macingova, 2012). Os valores ótimos de crescimento para as BSR situam-se entre 5-9 (Elliott *et al.*, 1998).

Os efluentes contaminados com metais pesados geralmente apresentam valores de pH baixos (Kieu *et al.*, 2011; Wei-ting *et al.*, 2014). Por isso, o tratamento destes efluentes com BSR implica um ajuste prévio do pH, apesar de posteriormente a redução de sulfato se traduzir não só na produção de sulfureto de hidrogénio mas também de bicarbonato (5), provocando um aumento do pH (Cravotta III & Trahan, 1999; Zagury *et al.*, 2006; Teclu & Wallis, 2009).

As características fisiológicas e bioquímicas das BSR tornam-nas em bactérias com um grande potencial e aplicabilidade no tratamento de efluentes contaminados com diferentes metais. Os metais em solução nos efluentes e a sua concentração são outros fatores que influenciam a atividade das BSR (Doshi, 2006; Wei-ting *et al.*, 2014).

Azabou *et al.* (2012) estudaram a concentração máxima de zinco que uma cultura mista de BSR conseguiria remover eficientemente. Testaram uma gama de concentrações de zinco entre 0 e 200 mg/L, onde se verificou que até uma concentração de 150 mg/L as BSR conseguiram remover mais de 95% do metal. A partir das 150 mg/L, a atividade das bactérias foi bastante inibida removendo apenas 5% do zinco em solução (Azabou *et al.*, 2007). Já em 2012, Li *et al.* testaram em *batch* diferentes concentrações iniciais de zinco e verificaram que entre 73.7 e 196.8 mg/L houve crescimento de BSR, embora quando a concentração inicial aumentou para 262.97 mg/L, essa atividade foi inibida (Li *et al.*, 2012)

Efluentes contaminados com cobre são muito comuns devido à grande aplicabilidade deste metal em indústrias de metalúrgica e de eletrônica. Javali & Baldwin (2000) verificaram que numa solução com 150 mg/L de cobre (Cu^{2+}) as BSR conseguiram remover o metal na sua totalidade.

Atualmente por ação da atividade mineira e industrial são geradas grandes quantidades de efluentes com vários metais pesados em solução (Viggi *et al.*, 2009; Kieu *et al.*, 2011; Bakarar, 2011). Como tal, a análise da capacidade das BSR para crescer em meios com vários metais também tem sido estudada. Martins *et al.*, (2009) testaram um consórcio de BSR, resistente a metais pesados, em concentrações de ferro (400 mg/L), zinco (150 mg/L) e de cobre (80 mg/L), semelhante às encontradas normalmente em DAM. Os resultados demonstraram que este consórcio de BSR conseguiu desenvolver-se apresentando uma boa taxa de redução de sulfato e remoção de metais (Martins *et al.*, 2009).

A eficiência da ação de remediação das BSR depende em grande parte do substrato orgânico utilizado. O substrato tem como função fornecer compostos doadores de elétrons que permitam às bactérias reduzir o sulfato a sulfureto (5) (Cravotta III & Trahan, 1999; Doshi, 2006; Zagury *et al.*, 2006; Teclu & Wallis, 2009). Compostos de carbono como ácidos gordos voláteis (ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico) e ácidos gordos de cadeia curta (ácido láctico, ácido pirúvico, ácido málico) ou apenas hidrogénio são as fontes de elétrons mais utilizadas para o crescimento de BSR (Zagury *et al.*, 2006; Kaksonen e Puhakka, 2007). Compostos de carbono como o etanol e o metanol, resultantes de processos fermentativos, também podem ser utilizados como fontes de elétrons (Chang *et al.*, 2000; Zagury *et al.*, 2006; Kaksonen e Puhakka, 2007; Liamlcam & Annachatrc, 2007). Na tabela 2.2 encontram-se algumas das vantagens e desvantagens de algumas das fontes de elétrons utilizadas pelas BSR.

Tabela 2.2- Vantagens e desvantagens das diferentes fontes de eletrões utilizadas pelas BSR (adaptado de Kaksonen & Puhakka, 2007).

<i>Fonte de eletrões</i>	<i>Vantagens (+) e desvantagens (-)</i>	<i>Equação</i>
<i>Ácido Acético</i>	+ Intermediário na degradação de substâncias orgânicas em processos anaeróbios; - Baixa produção de biomassa; - Apenas algumas SRB são capazes de o oxidar.	$C_2H_4O_2 + SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + 2 HCO_3^-$
<i>Ácido Lático</i>	+ Boa fonte de carbono e eletrões para a maioria das BSR; + Elevada produção de biomassa; - Custos elevados, tornando-se pouco viável do ponto de vista económico.	$2 C_3H_6O_3 + 3 SO_4^{2-} \rightarrow 3 H_2S + 6 HCO_3^-$
<i>Etanol</i>	+ Facilmente oxidável pelas BSR; + Menores custos do que o lactato; - Não é totalmente oxidado impedindo o meio de se tornar alcalino e levando à acumulação de acetato.	$2 C_2H_6O + 3 SO_4^{2-} \rightarrow 3 HS^- + 3 HCO_3^- + CO_2 + 3 H_2O$
<i>Metanol</i>	+ Facilmente disponível; + Baixos custos; - Apenas algumas BSR são capazes de o utilizar.	$4 CH_4O + 3 SO_4^{2-} \rightarrow 3 HS^- + 3 HCO_3^- + CO_2 + 5 H_2O$
<i>Hidrogénio</i>	+ Muitas BSR podem crescer utilizando somente hidrogénio como fonte de eletrões; + Mais económico em efluentes com grandes concentrações de sulfato;	$4 H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^- + 4 H_2O$

- Requisitos de segurança rigorosos devido à sua natureza explosiva, tornando-se dispendioso;
- Disponibilidade limitada.

Para além do carbono (geralmente proveniente do substrato utilizado como fonte de eletrões) existem outros nutrientes essenciais para o crescimento das BSR como é o caso do azoto (N) e o fósforo (P) (Patidar & Tare, 2006; Das *et al.*, 2009; Dev *et al.*, 2015).

O azoto é um elemento muito importante em moléculas como aminácidos, pirimidinas, purinas e enzimas ou cofatores. Os aminoácidos são o maior componente das proteínas (Ex.: enzimas e peptidoglicanos). Pirimidinas e purinas constituem o principal componente dos desoxirribonucleotídeos, os blocos de construção dos ácidos nucleicos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP e dUTP), enquanto os cofatores permitem o correto funcionamento das enzimas controlando assim o metabolismo dos organismos (Dev *et al.*, 2015). Sendo assim, o crescimento bacteriano depende também da quantidade de azoto disponível no meio (Waybrant *et al.*, 1998; Dev *et al.*, 2015).

O fósforo é um dos principais macronutrientes responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento biológico (Rodriguez & Fraga, 1999). Um dos casos mais notórios da importância do fósforo é na produção de Adenosina Trifosfato (ATP), nucleótido composto por uma adenosina (formada por um anel de adenina e uma ribose) e três grupos fosfato, responsável pelo armazenamento e transferência intracelular de energia química. O ATP é o produto final resultante da fotofosforilação, respiração celular e fermentação, sendo utilizado por proteínas estruturais e enzimas em vários processos celulares (ex.: divisão celular, reações de anabolismo). Para além disso, o fósforo também está na composição dos desoxirribonucleotídeos. (Khakh & Burnstock, 2009,)

O próprio metabolismo de conversão de sulfato a sulfureto requer azoto e fósforo (Dev *et al.*, 2015). As moléculas de sulfato são energeticamente estáveis sendo necessário a sua ativação para garantir que desempenham a sua função de recetor de eletrões na degradação dos compostos orgânicos (Muyzer & Stams, 2008). O processo de ativação é feito pela enzima ATP sulfurilase, que utiliza ATP e sulfato formando adenosina 5'-fosfosulfato (APS). De seguida a APS vai ser reduzida pela APS reductase formando

sulfureto e Adenosina Monofostato (AMD), um monómero que vai permitir novamente a produção de ATP, após a sua reação com pirofosfato (Ex. Muyzer & Stams, 2008).

Sabendo-se então que o carbono e o azoto são essenciais para crescimento das BSR (Patidar & Tare, 2006; Das *et al.* 2009;), o rácio entre estes dois elementos permite avaliar o grau de complexidade do composto orgânico. Um rácio C/N entre 6 e 10 é normalmente considerado adequado para a degradação de compostos orgânicos complexos (Prasad *et al.*, 1999). Valores de rácio muito elevados (> 10) podem indicar excesso de fonte de carbono ou quantidade de azoto insuficiente, enquanto valores baixos (< 6) podem indicar falta de carbono (Zagury *et al.*, 2006).

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é estimada através da degradação oxidativa dos compostos orgânicos numa amostra de água, recorrendo a agentes oxidantes fortes como o dicromato e o permanganato. A extensão da degradação é então caracterizada pela quantidade de eletrões transferidos para o agente oxidante. A transferência dos eletrões é quantificada indiretamente através da medição da depleção do agente oxidante por titulação ou espectrometria (Zhao *et al.*, 2004). Este parâmetro é muito utilizado em experiências com BSR pois é indicador da quantidade de compostos orgânicos. Geralmente utiliza-se para avaliar a relação da quantidade destes compostos (dadores de eletrões e fontes de carbono) com a quantidade de SO_4^{2-} disponíveis. Sabendo-se que o rácio CQO/ SO_4^{2-} teórico ótimo para as BSR é 0.67 e que os valores observados em culturas com bons crescimentos de BSR estão normalmente entre 0.7-1.5, os valores desta relação (CQO/ SO_4^{2-}) podem utilizar-se para determinar a quantidade de composto orgânico a utilizar em culturas destes microrganismos (Greiben *et al.*, 2000; Vela *et al.*, 2002; Neculita e Zagury, 2008;).

2.5 Fontes de carbono alternativas para o crescimento de BSR

Os elevados custos de algumas das fontes de carbono utilizadas (ex.: lactato), para o crescimento de BSR, tornam-nas economicamente inviáveis em operações de larga escala para tratamento de águas contaminadas com metais e/ou sulfato (Kaksonen & Puhakka, 2007; Das *et al.*, 2013). Sendo assim torna-se necessário procurar substratos de baixo custo que garantam uma boa proliferação de BSR e viabilidade económica dos processos de bioremediação.

Atualmente já se estudou o potencial de substratos complexos presentes em resíduos industriais, agrícolas e municipais (Benner *et al.*,1999), na redução de sulfato.

Na tabela 2.3 encontram-se algumas dos subprodutos/ efluentes já testados como fontes de carbono, alternativas, para o crescimento e atividade de BSR.

Tabela 2.3 – Diferentes subprodutos/efluentes já testados como fontes de carbono para o crescimento de BSR.

<i>Fontes de carbono testadas</i>	<i>Referências</i>
<i>Aparas de madeira</i>	Yasmashita <i>et al.</i> , 2010; Luptkova & Macingova, 2012; Zhang & Wang, 2014
<i>Cascas de melancia</i>	Hussain & Qazi, 2012
<i>Celulose</i>	Cocos <i>et al.</i> , 2002
<i>Resíduos de curtumes</i>	Boshoff <i>et al.</i> , 2004
<i>Efluente de fábrica de doces</i>	Das <i>et al.</i> , 2013
<i>Estrume de animais</i>	Drury, 1999 ; Zhang & Wang, 2014
<i>Melaços</i>	Maree & Strydom, 1987; Wang <i>et al.</i> , 2008; Teclu & Wallis, 2009
<i>Lamas de esgoto municipal</i>	Burgess & Stuetz, 2002;Luptkova & Macingova, 2012
<i>Resíduos de cogumelos</i>	Neculita <i>et al.</i> , 2011; Luptkova & Macingova, 2012
<i>Resíduos da indústria do papel</i>	Chao-hai <i>et al.</i> , 2007
<i>Soro de queijo e resíduos vinícolas</i>	Martins <i>et al.</i> , 2009
<i>Pedaços de folhas</i>	Zagury <i>et al.</i> , 2006

No estudo realizado por Martins *et al.* (2009) verificou-se que os resíduos vinícolas e o soro do leite podem ser utilizados como fontes de carbono para a atividade de BSR, na presença de resíduos de calcite. A calcite vai atuar como agente de

neutralização do pH para valores ideais à proliferação de BSR. No soro do queijo mesmo com a adição de calcite o processo de redução de sulfato acaba por ser lento.

Na indústria de curtumes, durante o tratamento do couro gera-se um efluente com elevada carga orgânica (valor de CQO elevado), proveniente do couro e dos produtos químicos adicionados durante o processo (Boshoff *et al.*, 2004). Um efluente resultante da produção de couro foi utilizado por Boshoff *et al.* (2004) como fonte de carbono para a redução biológica de sulfato. O efluente foi testado num reator de fluxo em pistão (PFR) e num reator anaeróbio de fluxo ascendente com um leito de lama (UASB) com valores de rácio CQO/SO₄²⁻, à entrada, de 1.68 ± 0.73 e 1.78 ± 0.69 , respetivamente. A eficiência na redução do sulfato acabou por estar relacionada com os valores de pH, onde a maior eficiência correspondeu ao maior valor de pH (8.5).

Os efluentes da indústria do papel são caracterizados pela elevada carência química de oxigénio (CQO) e elevada concentração de sulfato. Chao-hai *et al.* (2007) testaram valores de rácio CQO/SO₄²⁻, entre 0.5 e 5.0, com o objetivo de estudar a relação entre o rácio e quantidade de sulfato removida no efluente da indústria de papel. Constataram que para rácios superiores a 1.2 a remoção de CQO era superior a 82% e para valores superiores a 3.0 a remoção de sulfato era superior a 95%.

Os melaços são compostos por cerca de 30 a 50% (m/m) de sacarose que, por processos fermentativos, pode ser convertida em dióxido de carbono, hidrogénio e principalmente em ácidos gordos de cadeia curta. Estes ácidos podem ser utilizados pelas BSR como fonte de carbono. Os restantes componentes dos melaços (entre 50 a 70% (m/v)) não são degradados com tanta facilidade pelas BSR, diminuindo a quantidade de carbono disponível para estas bactérias (Gonçalves *et al.*, 2005). Wang *et al.* (2008) testaram em reatores *batch*, melaços com um CQO de 800 mg/L e uma concentração de sulfato de 500 mg/L. Nestas condições 97.4% do sulfato inicial foi removido, produzindo 9.28 mg/L de sulfureto.

Neste trabalho procuraram-se subprodutos existentes na proximidade da região da Faixa Piritosa Ibérica (FPI), que possam ser utilizados como fontes de carbono, com vista a futuras aplicações no tratamento de DAM de áreas mineiras existentes nesta unidade geológica. Foram testados como fonte de carbono subprodutos ou efluentes de seis indústrias diferentes e um efluente de uma estação de tratamento de águas de águas

residuais. Na secção seguinte faz-se uma introdução a cada um destes produtos e às indústrias que as originam.

2.5.1 Indústria de açúcares - Espanha

As culturas de açúcares, para além de servirem de matéria-prima para a produção de açúcar, são utilizadas para a produção de etanol. Existem principalmente duas culturas de açúcar: açúcar de cana e açúcar de beterraba. Do processo de produção de açúcar de beterraba resultam, entre outros, compostos carbonatados geralmente utilizados na neutralização de solos agrícolas (Faostat,1994).

Neste trabalho foi utilizado um composto proveniente de uma fábrica de produção de açúcar de beterraba em Espanha, denominado de Carbocal® (Garcia-Zamarreño, 2013). Este composto resulta de um processo de depuração dos açúcares do sumo da beterraba através da ação de calcário. O Carbocal® é constituído maioritariamente por carbonato de cálcio (CaCO_3), tendo ainda uma alguma quantidade de matéria orgânica e, de fósforo e magnésio, provenientes dos adubos utilizados no cultivo da beterraba (Garcia-Zamarreño, 2013). Dependendo das características dos solos, este produto pode ser utilizado em solos com carência de cálcio, solos com pH ácido e solos com pH ácido e com problemas de salinidade causados pelo excesso de sódio.

Numa lagoa ácida de mina na Alemanha testou-se um produto semelhante ao Carbocal® juntamente com palha, de forma a analisar o efeito destes substratos na redução de sulfato e ferro e da neutralização da DAM. Após a adição dos substratos, na superfície, formou-se uma camada de sedimentos neutros onde ocorreu redução de sulfato e de ferro e precipitação de sulfuretos metálicos. (Koschorreck *et al.*, 2007).

2.5.2 Lagar de azeite - Portugal

O cultivo de oliveiras e a produção e utilização do azeite é uma prática bem conhecida e estabelecida na região do Mediterrâneo. Devido ao alto valor dietético e nutricional do azeite, o seu consumo mundial aumentou rapidamente (Tsagaraki *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2011). Espanha, Itália, Grécia e Portugal são responsáveis por mais de 95% da produção mundial de azeite. Em Portugal, a região do Alentejo é a maior

produtora e em 2010 foi responsável por 50.2% do total de azeite produzido no país. (Ferraz, 2012).

Os processos utilizados na extração do azeite à escala industrial são o sistema descontínuo de prensas, o sistema contínuo de três fases e o sistema contínuo de duas fases. A maior eficiência e rapidez no tratamento de grandes quantidades de pasta de azeitona fez dos sistemas contínuos os processos de extração mais utilizados nos principais países produtores de azeite (Tsagaraki *et al.*, 2007; Marinho, 2009;). Durante estes processos, para além da extração do azeite, formam-se grandes quantidades de efluentes (bagaço e águas ruças) com uma grande carga orgânica. A formação destes subprodutos depende do tipo de sistema utilizado (Marinho, 2009).

O bagaço é formado por polpa e caroço do fruto e em termos ambientais o seu impacto não é muito significativo pois é frequentemente utilizado pelas indústrias de extração de óleos de bagaço, que após a extração do óleo utilizam o subproduto (bagaço) como combustível (Marinho, 2009).

As águas ruças são efluentes líquidos que incluem água de vegetação da azeitona, água de lavagem dos frutos e água que é adicionada ao processo de extração do azeite (Marinho, 2009). A elevada carga orgânica e a presença de compostos fenólicos conferem um grande carácter poluente a este efluente (Capasso *et al.*, 1995; Blika *et al.*, 2009). A carga orgânica é normalmente apresentada sob a forma de CQO variando entre 50-150 gO₂/L (Rozzi & Malpei, 1996; Blika *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos são os principais agentes antimicrobianos e fitotóxicos das águas ruças conferindo-lhe uma cor avermelhada/castanha característica deste efluente (Marinho, 2009; Duarte *et al.*, 2011). A concentração de fenóis encontra-se normalmente entre 0.5-25 g/L (Duarte *et al.*, 2011).

Apesar de se terem testados várias tecnologias para o tratamento de águas ruças e algumas delas com resultados promissores, este subproduto ainda continua a ser depositado diretamente no ambiente em muitos países (Marinho, 2009).

As águas ruças utilizadas neste trabalho são provenientes do Lagar Santa Catarina localizado na aldeia de Santa Catarina da Fonte do Bispo, Algarve. É um lagar de linhas contínuas a trabalhar a três fases produzindo além de azeite, baço e águas ruças. Atualmente encontram-se apenas 5 lagares em funcionamento no Algarve e este lagar

assume uma grande importância socio-económica ao comprar azeitona aos pequenos produtores da região, que em muitos casos praticam uma agricultura de subsistência. A recolha das águas ruças para este trabalho foi feita antes e depois de decantação sucessiva em 3 tanques.

2.5.3 Indústria de sumo de laranja - Portugal e Espanha

Hoje em dia as indústrias de processamento de laranjas geram grandes quantidades de resíduos, como cascas de laranja, provenientes da extração do “sumo” da laranja. Ainda na extração de sumo, os processos de lavagem dos frutos e dos equipamentos utilizados na produção do sumo acabam por arrastar resíduos de hidratos de carbono, que aí possam ter ficado acumulados. A lavagem é feita utilizando água, gerando-se um efluente com carga orgânica, designado de água de lavagem (Can, 2014). Se não forem tratados, estes resíduos acabam por causar odor e a contaminação dos solos, representando um problema sério para a indústria alimentar (Mamma *et al.*, 2008; Torrado *et al.*, 2011).

A quantidade total de hidratos de carbono nas cascas de laranja varia entre 29 e 44%, sendo os principais a glucose, a frutose e a sacarose. Os hidratos de carbono solúveis e insolúveis são os constituintes mais abundantes nas cascas e os de maior interesse do ponto de vista biotecnológico e económico (Torrado *et al.*, 2001; Emaby *et al.*, 2014).

O licor é um subproduto, resultante da moagem das cascas de laranja. Devido à grande quantidade de compostos fenólicos naturais com capacidades oxidativas, este produto acaba por ser um subproduto com interesse comercial (Aravatinos-Zafiris *et al.*, 1994).

Da evaporação do licor resulta o melaço, um subproduto que apresenta um teor total de açúcares de 26%. Devido ao seu teor de açúcares este composto é normalmente incorporado em rações animais (Aravatinos-Zafiris *et al.*, 1994; Mamma *et al.*, 2015).

Neste trabalho os subprodutos testados foram as cascas de laranja, recolhidas numa fábrica de sumo de laranja de Espanha e o licor, o melaço (com conservante e sem conservante) e a água de lavagem, recolhidas na fábrica de produção de sumo de laranja Lara, situada no Algarve, Portugal.

2.5.4 Indústria de papel - Portugal

Na indústria do papel os processos utilizados para a obtenção do produto final podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo corresponde ao conjunto de processos que levam à formação de uma pasta a partir da madeira enquanto, do segundo grupo, fazem parte os processos de transformação da pasta em papel (Monte *et al.*, 2009).

Os diferentes processos utilizados resultam na formação de resíduos sólidos e lamas. Regra geral os resíduos sólidos resultantes da produção de pasta são húmidos e contêm alguns compostos orgânicos provenientes da madeira ou de fibras de papel reciclado. A composição das lamas depende do tipo de operações utilizadas no processo (Bloemhof-Ruwaard *et al.*, 1996; Monte *et al.*, 2009).

Resumidamente, no processo de obtenção de pasta geram-se dois efluentes, um alcalino e um ácido, que são misturados para tratamentos: um tratamento primário, por ação química, permitindo a remoção dos sólidos totais suspensos e um tratamento secundário, por via biológica, que leva à oxidação da matéria orgânica. Na produção de papel a partir de pasta o efluente gerado é alcalino e sofre tratamento secundário (Chelliapan *et al.*, 2012).

Para este trabalho foram recolhidos numa fábrica de papel em Portugal quatro efluentes diferentes. Nos processos de obtenção de pasta foram recolhidos dois efluentes, um antes dos tratamentos primários e outro após estes tratamentos. O efluente oriundo da produção de papel foi recolhido depois de misturado com o efluente alcalino da fábrica de pasta para neutralização do pH. Foi ainda recolhido o efluente final que é composto por todos os efluentes depois dos tratamentos primários e secundários.

2.5.5 Indústria de pinhão - Espanha

A produção mundial de pinhão aumentou 84% no período de 2004 a 2014 produzindo-se um total de 39.950 toneladas no final de 2014. Este aumento deveu-se principalmente ao aumento de produção na China, passando a ser o maior produtor mundial no final de 2014. Na Europa o pinhão é produzido principalmente na região do mediterrâneo, onde Espanha e Portugal são os maiores produtores (International Nut&Dried Fruit, 2015).

A vila de *Pedrajas de San Sebastian*, situada 32 km a sul de *Valladolid*, é a maior produtora de pinhões em Espanha. Nesta pequena vila existem cerca de 50 pequenas empresas, de cariz familiar e 3 a 4 empresas de média dimensão ligadas à produção deste produto.

A produção de grandes quantidades de pinhão gera grandes quantidades de resíduos, tais como as cascas dos pinhões. O elevado valor nutricional (ex.: minerais essenciais, vitaminas, ácidos gordos insaturados) e a disponibilidade destes resíduos fazem deles uma potencial fonte de carbono importante para as BSR.

Neste trabalho foram testados fragmentos de pinhas de pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Aiton) e de Pinheiro Manso (*Pinus pinea* L.), às quais se chamou pinhas 1 e pinhas 2, respetivamente e cascas de pinhão de pinheiro manso, todos provenientes da região de *Valladolid*, Espanha.

2.5.6 Estação de Tratamento de Águas residuais (ETAR) da aldeia de São Domingos – Portugal

Situada no perímetro da Mina de São Domingos no conselho de Mértola (Beja), esta estação de tratamento de águas residuais é formada por 3 lagoas de tratamento. A água residual proveniente da rede pública entra na estação de tratamento através da lagoa 1 onde fica em decantação. De seguida passa para a lagoa 2 onde há sistemas de arejamento que promovem a diminuição da carga orgânica por oxidação. Por fim a água é transferida para a lagoa 3 para uma nova decantação, e daqui as lamas são bombeadas para tanques de secagem.

Na lagoa 1, a água ainda não sofreu nenhum tratamento químico ou biológico, encontrando-se nas condições mais próximas às existentes na rede pública e como tal a sua carga orgânica é maior. Tendo isso em consideração, foi recolhida uma amostra dessa lagoa para se testar a sua eficiência como possível fonte de carbono para as BSR.

2.6 Linhas gerais do trabalho realizado

A Carência Química de Oxigênio (CQO) é um parâmetro importante em experiências com BSR uma vez que mede indiretamente a quantidade de compostos orgânicos na água e é geralmente analisada em função da quantidade de sulfato dissolvido pela relação CQO/SO_4^{2-} (Vela *et al.*, 2002; Neculita & Zagury, 2008). Segundo Greben *et al.* (2000) os valores teóricos da relação CQO/SO_4^{2-} ideais para o crescimento de BSR em DAM variam entre 0.5 e 0.67, quando o sulfato é reduzido a enxofre e sulfureto, respetivamente. Vela *et al.* (2002) verificou que efluentes com valores de rácio de 0.67 são indicadores que a quantidade sulfato existente é suficiente para remover a matéria orgânica, por via de redução do sulfato. Este valor foi calculado assumindo que todo o CQO pode ser consumido pelas BSR (Vela *et al.*, 2002). Os valores normalmente observados variam entre 0.7 e 1.5 (Wolicka & Borkowski, 2009). Valores acima de 1.5 tornam-se tóxicos para as BSR porque favorecem o crescimento de bactérias metanogénicas (Vela *et al.*, 2002; Wolicka & Borkowski, 2009). Sendo assim os valores de rácio são importantes para favorecer o crescimento de BSR em detrimento das metanogénicas.

Tendo em conta este facto analisou-se as concentrações de CQO e de sulfato (SO_4^{2-}) de cada um dos subprodutos/efluentes provenientes das indústrias referidas nas seções anteriores, permitindo determinar quais as diluições a fazer de forma a garantir rácios ideais para as BSR.

Os subprodutos/efluentes foram testados em meio Postgate B (adequado ao crescimento de BSR), substituindo o lactato de sódio. Tendo isto em conta, os rácios deveriam situar-se, de preferência, o mais próximo possível do valor do rácio CQO/SO_4^{2-} no meio Postgate B original (1.5).

Os subprodutos/efluentes que permitiram boa atividade das BSR (produção de sulfureto e consumo de sulfato) foram posteriormente testados na bioremediação de efluentes

contaminados com metais pesados (DAM de São Domingos e *vertido de zincado*). Na figura 2.6 está representado um resumo do trabalho realizado ao longo deste estágio.

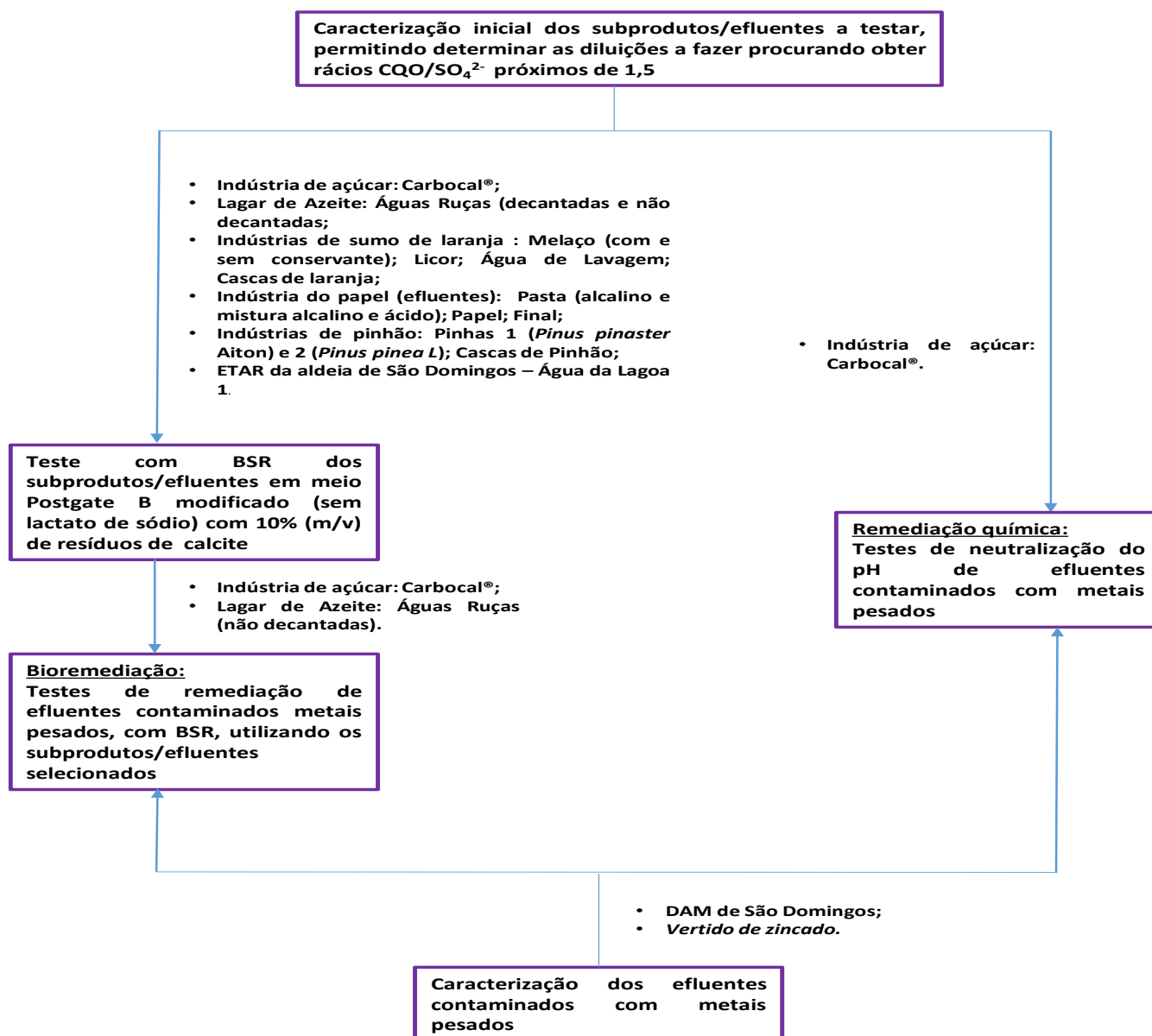


Figura 2.6 – Esquema representativo do trabalho realizado.

3 Materiais e Métodos

3.1 Preparação do Inóculo

A comunidade de bactérias sulfato-redutoras (BSR), utilizadas neste trabalho, foi obtida a partir de uma amostra de lama recolhida na estação de tratamento de águas residuais Faro-Olhão e enriquecida em meio Postgate E sem agar (tabela 3.1) (Postgate, 1966). Para garantir que, no início do ensaio, o inóculo utilizado se encontrasse nas melhores condições, reinoculou-se 1% (v/v) em meio Postgate B original (tabela 3.1), deixando-se a crescer durante uma semana. O crescimento do inóculo ocorreu à temperatura ambiente e em anaerobiose. Para tal, adicionou-se cerca de 10 ml de parafina líquida estéril selando-se o frasco de seguida.

Tabela 3.1- Composições dos diferentes meios Postgate. As concentrações dos compostos estão expressas em g/L. (Postgate,1966).

<i>Composto químico</i>	<i>Meio</i>	<i>Meio</i>	<i>Meio</i>
	<i>Postgate E</i>	<i>Postgate Original</i>	<i>B Postgate B modificado</i>
<i>KH₂PO₄</i>	0.50	0.50	0.50
<i>NH₄Cl</i>	1.00	1.00	1.00
<i>CaCl₂.6 H₂O</i>	1.00	-	-
<i>MgCl₂.7H₂O</i>	2.00	-	-
<i>CaSO₄</i>	-	1.00	1.00
<i>Extrato de levedura</i>	1.00	1.00	1.00
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	-	1.20	1.20
<i>Lactato de sódio</i>	3.50	3.5	-
<i>Ácido Ascórbico</i>	0.10	0.10	0.10
<i>Ácido Tioglicólico</i>	0.10	0.10	0.10
<i>FeSO₄.7H₂O</i>	0.50	0.50	0.50
<i>Agar</i>	15.00	-	-

3.2 Testes de seleção de subprodutos/efluentes de baixo custo como possíveis fonte de carbono para o crescimento de BSR

Delineamento experimental

Dado que a fonte de carbono é essencial para o crescimento e atividade das BSR e a quantidade adicionada vai influenciar os valores do rácio CQO/SO₄²⁻ (Vela *et al.*, 2002; Patidar & Tare, 2006; Das *et al.* 2009;), antes do ensaio mediu-se a concentração de sulfatos e a CQO dos diferentes subprodutos/efluentes a testar (tabela 3.2), de forma a saber que diluições destes poderiam garantir rácios CQO/SO₄²⁻ adequados para as BSR. Os rácios deveriam situar-se, de preferência, o mais próximo possível do valor do rácio CQO/SO₄²⁻ no meio Postgate B original (1.5). Decidiu-se testar para a maioria dos subprodutos/efluentes, mais duas diluições, para além da diluição que garantia um valor mais próximo de 1.5. Estas diluições adicionais permitiram assim analisar, ao longo do ensaio, se as diferenças no rácio se traduziam em diferenças significativas na atividade das BSR.

O ensaio foi realizado, à temperatura ambiente, em frascos *batch* de 100 mL e 250 ml, onde foram adicionados previamente 10% (m/v) de resíduos de calcite em pó (figura 3.1A), funcionando como agente neutralizador do pH. Cada uma das diluições dos vários subprodutos/efluentes (figura 3.1B e 3.1C) foi testada com 10% (v/v) de inóculo duma cultura de BSR em meio Postgate B modificado por substituição do lactato pela fonte de carbono a testar.

As condições de anaerobiose foram conseguidas acrescentando cerca de 10 mL de parafina líquida estéril e selando os frascos.

O controlo negativo foi efetuado no mesmo meio mas sem qualquer fonte de carbono adicionada e o controlo positivo foi feito em meio Postgate B original (tabela 3.1).

Cada uma das diluições em estudo foi realizada em duplicado (figura 3.1D).

Tabela 3.2 – Subprodutos/efluentes testados como fontes de carbono de baixo custo para as BSR.

<i>Indústria</i>	<i>Subproduto/Efluente</i>
<i>Indústria do açúcar - Espanha</i>	Carbocal®
<i>Lagar de azeite - Portugal</i>	Águas ruças (não decantadas e decantadas)
<i>Indústria de sumo de laranja - Portugal</i>	Melaço (com conservante e sem conservante); Licor; Água de lavagem
<i>Indústria de papel - Portugal</i>	Efluentes: da fábrica de pasta (alcalino e mistura de alcalino e ácido); da fábrica de papel e final
<i>Indústria de sumo de laranja - Espanha</i>	Cascas de laranja
<i>Indústria de pinhão - Espanha</i>	Pinhas (1 e 2); Casca de pinhão
<i>ETAR da aldeia de São Domingos - Portugal</i>	Água da Lagoa 1



Figura 3.1 - (A) - Frascos de 250 ml com calcite; (B) e (C) - Alguns dos subprodutos testados; (D) - Ensaio de seleção das fontes de carbono alternativas para o crescimento de BSR.

Monitorização

No decorrer deste ensaio foram avaliados semanalmente, os seguintes parâmetros: sulfureto, sulfato, potencial redox (Eh) e pH. Para tal, foram recolhidas amostras (~5mL) com uma seringa a partir do topo dos frascos, sem homogeneização da amostra, sendo estes parâmetros analisados de imediato.

3.3 Efluentes contaminados com metais pesados utilizados nos testes de remediação

Como resultado da intensa atividade industrial e mineira são gerados grandes quantidades de efluentes contaminados com metais (Wei-ting *et al.*, 2014). Os efluentes utilizados, neste trabalho, nos testes de remediação foram a DAM de São Domingos e o *vertido de zincado*.

Costa & Duarte (2005) caracterizaram a DAM de São Domingos como sendo um efluente com pH baixo e elevadas concentrações de sulfato, ferro, cobre e zinco, por isso monitorizou-se o comportamento destes elementos ao longo dos testes.

O *vertido de zincado* é um efluente proveniente da indústria da galvanização. Em regra, este tipo de efluentes apresentam valor de pH baixo e elevadas concentrações de zinco e ferro. O zinco é o elemento em maior concentração, seguido do ferro. São constituídos ainda por cádmio, cobalto, crómio, níquel, cobre e boro em concentrações muito pequenas (Tahir & Rauf, 2004). Como as concentrações destes metais no efluente são muito pequenas analisou-se apenas as concentrações de ferro e zinco.

A caracterização dos principais constituintes destes efluentes encontra-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Caracterização dos principais constituintes da DAM e do *vertido de zincado*.

	DAM de São Domingos	<i>Vertido de zincado</i>
pH (Escala de Sorensen)	2.48	2.06
SO₄²⁻ (mg/L)	1848	16
Fe (mg/L)	44.70	97.88
Cu (mg/L)	22.80	-
Zn (mg/L)	30.08	381.25
B (mg/L)	-	2.25

3.4 Testes de remediação de efluentes contaminados com metais pesados

3.4.1 Carbocal® como agente neutralizador do pH dos efluentes contaminados com metais pesados

Delineamento experimental

Sendo já conhecidas as capacidades do Carbocal® como agente neutralizador do pH em solos agrícolas ácidos (Garcia-Zamarreño, 2013), foram testadas várias percentagens (m/v) do mesmo no *vertido de zincado* e na DAM de São Domingos, monitorizando-se o seu comportamento durante 10 dias.

Os testes foram realizados em *falcons* de 50 ml, à temperatura ambiente, onde o Carbocal® seco foi misturado a cada um dos efluentes a tratar, fazendo-se a homogeneização das misturas por agitação, apenas no início da experiência. As percentagens testadas foram: 0.1; 1; 5; 10; 15 e 20 % (m/v). Cada uma destas percentagens foi testada em triplicado.

Monitorização

Durante 10 dias o pH e o potencial redox (Eh) foram monitorizados. No início e no fim do ensaio foram recolhidas amostras (~10 ml) para análise das concentrações de zinco, ferro e boro no *vertido de zincado* e das concentrações de zinco, ferro e cobre na DAM de São Domingos.

3.4.2 Carbocal® como fonte de carbono para as BSR no tratamento de *vertido de zincado* e de DAM de São Domingos

Delineamento Experimental

Os resultados dos testes de neutralização serviram como base para este ensaio, uma vez que permitiram seleccionar quais as percentagens de Carbocal® a testar, agora como fonte de carbono, de acordo com o seu comportamento na neutralização do pH dos efluentes. Os ensaios foram realizados em frascos *batch* de 100 ml, à temperatura

ambiente, onde foi testado 1;10 e 20 % (m/v) de Carbocal® em *vertido de zinco* e DAM de São Domingos (figura 3.2).

Para cada uma das percentagens de Carbocal® foi testado, nos dois ensaios, um controlo negativo, sem inóculo de BSR. Os controlos positivos dos dois ensaios são iguais e consistem na repetição da melhor diluição de Carbocal® observada na fase de seleção de subprodutos/efluentes: meio Postgate B modificado com 10% (m/v) de Carbocal®. A cada um dos testes e ao controlo positivo foram adicionados 5% (v/v) de inóculo de BSR. As condições de anaerobiose foram garantidas através da adição de cerca de 10 ml parafina líquida estéril e selando os frascos. As diferentes condições foram testadas em triplicado (figura 3.2).



Figura 3.2- (A) - Ensaio de Carbocal® com DAM São Domingos; (B) - Ensaio de Carbocal® com *vertido de zinco*.

Monitorização

Semanalmente foram recolhidas amostras (~10ml) sem agitação, com uma seringa através do topo dos frascos, sendo analisadas, as concentrações de sulfuretos e sulfatos, o pH e o potencial redox (Eh). Por fim, as amostras foram acidificadas com ácido nítrico 65% até pH <2, para posterior análise dos metais.

3.4.3 Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de DAM de São Domingos, na presença de calcite

Delineamento experimental

A DAM de São Domingos é caracterizada por valores de pH perto de 2 (Costa e Duarte, 2005). Assim, ao se juntar com as águas ruças (pH 3-5.9 (Tsagaraki *et al.*, 2007)), o valor de pH continua ácido e abaixo dos valores ideais (5-9) para o crescimento de BSR (Elliott *et al.*, 1998).

Sendo assim e conhecidas as capacidades do calcário (CaCO_3) em atuar como agente neutralizador em águas ácidas de minas (Cravotta III & Trahan, 1999; Zagury *et al.*, 2006; Teclu & Wallis, 2009), decidiu-se neutralizar *overnight* a DAM de São Domingos com rochas calcárias (tamanho de grão de 0.5 a 1.5 cm). O rácio de rochas calcárias em volume de DAM foi de 1 kg/L.

Neste ensaio utilizaram-se águas ruças não decantadas e diluídas 1:5 e 1:10 em DAM de São Domingos com 5% (m/v) de inóculo de BSR.

O ensaio foi realizado em frascos *batch* de 100 ml, à temperatura ambiente, e em condições de anaerobiose, com 10% (m/v) de resíduo de calcite em pó, já anteriormente testado para tamponização de culturas de BSR (Barros *et al.*, 2009).

Para o controlo negativo, sem inóculo de BSR, utilizaram-se águas ruças centrifugadas (4000 rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente) e diluídas 1:5 em DAM de São Domingos

Cada uma destes testes foi realizado em triplicado.

Monitorização

Durante este ensaio foram recolhidos semanalmente cerca de 10 ml de amostra com uma seringa, sem agitação, através do topo do frasco, analisando-se a concentração de sulfureto e sulfato e os valores de pH e potencial redox (Eh).

A restante quantidade de amostra foi acidificada com ácido nítrico a 65%, para posterior análise da concentração de metais

A concentração de fenóis foi analisada no início e no fim do ensaio.

3.4.4 Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de vertido de zincado e de DAM de São Domingos, na ausência de calcite

Delineamento experimental

Neste ensaio utilizaram-se águas ruças não decantadas e diluídas 1:5 em DAM de São Domingos e em *vertido de zincado* com 5% (v/v) de inóculo de BSR.

Os efluentes foram previamente neutralizados, *overnight*, com rochas calcárias (tamanho de grão de 0.5 a 1.5 cm) num rácio de 1 kg/L.

O ensaio foi realizado em frascos *batch* de 100 ml, à temperatura ambiente e em condições de anaerobiose.

Para cada um dos efluentes em estudo foi feito um controlo negativo, sem inóculo de BSR.

O Controlo positivo foi feito com meio Postgate B no qual se substituiu o lactato de sódio por águas ruças.

Cada uma destas condições foi testada em triplicado (figura 3.3).



Figura 3.3 (A) -Início do ensaio de águas ruças no tratamento de DAM e *vertido de zincado*; (B) – Final do ensaio de águas ruças no tratamento de DAM e *vertido de zincado*.

Monitorização

Durante este ensaio foram recolhidos semanalmente cerca de 10 ml de amostra com uma seringa, sem agitação, através do topo do frasco, analisando-se a concentração de sulfuretos e sulfatos e os valores de pH e potencial redox (Eh).

A restante quantidade de amostra foi acidificada com ácido nítrico 65%, para posterior análise da concentração de metais.

A concentração de fenóis foi analisada no início e no fim do ensaio.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Concentrações de sulfureto e sulfato

As concentrações de sulfureto e sulfato foram determinadas utilizando um espectrofotómetro de UV-Visível (DR 2800, Hach-Lange). A concentração de sulfuretos foi determinada pelo método azul-de-metileno (665nm, Hach-Lanche), enquanto a concentração de sulfatos foi obtida, a 450 nm, pelo método sulfaVer4 (Hach-Lange).

3.5.2 Valores de Eh e pH

O Eh e o pH foram determinados usando o potenciómetro pH/Eh Meter (GPL 21, Crison).

3.5.3 Valores de Carência Química de Oxigénio (CQO)

Os valores foram obtidos utilizando o *kit* LCK 514 (Hach-Lange) no espectrofotómetro de UV-Visível (DR 2800, Hach-Lange) a 605 nm.

3.5.4 Concentração de azoto e fósforo

As concentrações de azoto e fósforo, dos subprodutos testados como fonte de carbono, foram obtidas utilizando os *kits Nitrogen Total, Persulfate Digestion Method (Method 10072, Hach-Lange)* e *Phosphorus Total, Molybdovanadate with Acid Persulfate Digestion Method (Method 10127, Hach-Lange)*.

A leitura das concentrações foi feita em *cuvettes* de plástico, descartáveis de 1 ml de amostra no espectrofotómetro de UV-Visível (DR 2800, Hach-Lange) a 410 nm.

3.5.5 Concentração de fenóis

A concentração de fenóis presentes nas águas ruças não decantadas foi obtida utilizando os *kits LCK 345 (0.05-5 mg/L, Hach-Lange)* e *LCK 346 (5-200 mg/L, Hach-Lange)* no espectrofotómetro de UV-Visível (DR 2800, Hach-Lange) a 510 nm.

3.5.6 Concentração de metais

As concentrações de Ferro, Cobre e Zinco foram determinadas por espectroscopia de absorção atómica de chama (EAA), usando um espectrofotómetro modelo novAA 350 da *Analyticjena*.

3.5.7 Concentrações de boro

As concentrações de boro foram analisadas por espectrometria de UV-Visível a 410 nm, utilizando azometina-H como reagente colorimétrico.

A leitura dos valores foi feita em *cuvettes* descartáveis com 1 ml de amostra, no espectrofotómetro de UV-Visível (DR 2800, Hach-Lange).

4. Resultados e discussão

4.1 Seleção de subprodutos industriais como possíveis fonte de carbono para o crescimento de BSR

4.1.1 Caracterização inicial dos subprodutos

Os valores obtidos na caracterização inicial dos subprodutos testados encontram-se na tabela 4.1. Estes, para além de permitirem determinar quais as diluições necessárias, de forma a manter o rácio CQO/SO₄²⁻ próximo dos valores considerados ideais (0.5-0.67) para o crescimento de BSR (Greiben *et al.*, 2000; Vela *et al.*, 2002; Carmen *et al.*, 2008; Neculita & Zagury, 2008), permitiram também analisar outros parâmetros essenciais ao crescimento deste grupo bacteriano (pH, concentrações de N e P). Os valores da caracterização dos subprodutos sólidos (Carbocal® e cascas de laranja), na tabela 4.1, correspondem a valores da lixiviação, durante 24h, desses produtos para água destilada.

Os subprodutos da indústria de pinhão (cascas de pinhão, pinhas 1 e pinhas 2) não foram caracterizados uma vez que são compostos maioritariamente por celulose, um polímero de cadeia longa com uma estrutura compacta que os torna insolúveis em água (Kabir *et al.*, 2012).

Tabela 4.1-Caracterização inicial dos subprodutos (pH, [SO₄²⁻], COD, [N] total e [P] total).

Subprodutos	pH	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	CQO (mgO ₂ /L)	N (mg/L)	P (mg/L)
Indústria de Açúcar de beterraba - Espanha					
Carbocal® 10% (m/v) em água destilada	9.58	96	1118	0 (280*)	0 (34*)
Carbocal® 1% (m/v) em água destilada	9.62	6	453	0 (28*)	0 (3.4*)
Carbocal® 0.1% (m/v) em água destilada	9.63	3	189	0 (2.8*)	0 (0.34*)
Lagar de azeite- Portugal					

Subprodutos	pH	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	CQO (mgO ₂ /L)	N (mg/L)	P (mg/L)
Águas ruças não decantadas	4.73	530	44800	2182	127
Águas ruças decantadas	4.48	455	35900	2432	176
Indústria de sumo de laranja – Portugal					
Melaço – Sumo de laranja (com conservante)	4.20	675	724000	43864	168
Melaço - Sumo de laranja (sem conservante)	5.35	985	707000	21364	399
Licor (resultante da moagem das cascas de laranja com cal viva)	4.03	265	150400	3909	2659
Água de lavagem	6.46	410	4440	289	0
Indústria de papel - Portugal					
Pasta - alcalino	9.35	824	1552	2.9	3.4
Pasta - alcalino e ácido	7.80	820	1026	3.5	9.5
Papel	7.31	154	328	6.5	0.5
Final	7.49	560	190	2.0	3.4
Indústria de sumo de laranja – Espanha					
Cascas de laranja - 1% (m/v em água destilada)	3.58	1	829	n.d.	n.d.
Cascas de laranja - 2% (m/v em água destilada)	3.60	2	1461	n.d.	n.d.
ETAR da Aldeia de São Domingos - Portugal					
Água da Lagoa 1 + calcite 10% (m/v)	7.65	60	462	99.10	8.8

(*Valores calculados a partir dos dados fornecidos pela empresa produtora de Carbocal®; n.d.-não determinado).

O pH ótimo para o crescimento das BSR situa-se entre 5-9 (Elliot *et al.*, 1998) e analisando os resultados apresentados na tabela 4.1 é possível verificar que os efluentes do lagar e os subprodutos das fábricas de sumo de laranja tem valores de pH baixo, sendo por isso necessário neutralizá-los. Para isso utilizou-se pó de calcite, um resíduo resultante da indústria do mármore já anteriormente testado para este fim (Barros *et al.*, 2009). Deste modo, e de forma a garantir que todos os produtos testados se encontravam nas mesmas condições, adicionou-se calcite em todas as culturas.

Os melaços apresentaram valores de carência química de oxigênio muito altos, sendo por isso necessário fazer diluições muito grandes de forma a manter os valores da relação CQO/SO_4^{2-} abaixo de 1.5. Para valores acima de 1.5 a atividade das BSR é inibida e em consórcio de bactérias, como o utilizado neste ensaio, valores de rácio muito elevados podem favorecer o crescimento de bactérias metanogénicas (Wolicka & Borkowski, 2009).

O azoto, presente, nas proteínas, nos ácidos nucleicos e nos cofatores que controlam o metabolismo bacteriano e o fósforo, presente, no ADN e nos processos de armazenamento e transferência de energia química, são muito importantes para o crescimento das BSR. Tendo isto em consideração e sendo o objetivo destes ensaios testar apenas a viabilidade dos produtos enquanto fontes de carbono, a concentração destes elementos foi assegurada, não apenas pelas quantidades existentes nos subprodutos, mas principalmente pelas quantidades (0.26 g/L de N e 0.35 g/L de P) existentes na composição do meio Postgate B modificado, cuja única alteração foi a supressão do lactato. Isto é importante principalmente no caso dos subprodutos/efluentes com baixa concentração destes elementos como são o caso dos efluentes da fábrica de papel.

4.1.2 Caracterização inicial dos subprodutos diluídos em meio Postgate B modificado

Na tabela 4.2 encontram-se valores de concentração inicial dos meios usados nos diversos ensaios. Estes valores foram analisados antes de se adicionar o inóculo.

Os valores iniciais de pH (tabela 4.2) permitem ver o efeito da calcite na neutralização deste parâmetro, o qual foi particularmente importante no caso dos subprodutos das fábricas de laranja onde o pH original, que se encontrava entre 3 e 6.5, e subiu para valores entre 7 e 7.5.

A calcite ($CaCO_3$) é um composto químico muito comum em rochas como o mármore ou o calcário. A sua dissolução leva à formação do ião carbonato (CO_3^{2-}), responsável pela neutralização do pH. Analisando os valores finais (tabela 4.3) verifica-se que para todos os subprodutos/efluentes testados o pH ficou em valores ideais (5-9) para o crescimento e atividade de BSR (Elliot *et al.*, 1998; Cravotta III & Trahan, 1999; Barros *et al.*, 2009). Nos subprodutos das fábricas de sumo de laranja, os valores médios finais acabaram por diminuir um pouco, em relação ao valor inicial, principalmente no

caso do licor, mas mantendo-se ainda dentro de valores recomendados para o crescimento de BSR.

Relativamente aos valores iniciais de CQO (tabela 4.2) algumas das diluições testadas permitiram obter rácios CQO/SO₄²⁻ inferiores ou próximos de 0.5-0.67, valores descritos na literatura como favoráveis às BSR (Greben *et al.*, 2000; Vela *et al.*, 2002; Carmen *et al.*, 2008; Neculita & Zagury, 2008). No entanto, para o licor da fábrica de sumo de laranja, também se testou uma diluição (1:10) com um valor de CQO muito superior. O valor muito alto de CQO do licor está relacionado com o facto de este subproduto ser produzido a partir da moagem das cascas de laranja que apresentam uma grande quantidade de glúcidos (Aravantinos-Zafiriris *et al.*, 1994; Torrado *et al.*, 2001).

Tabela 4.2-Valores iniciais dos subprodutos diluídos em meio Postgate B modificado.

Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Valores iniciais				
		pH	Potencial-Eh (mv)	CQO (mgO ₂ /L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	CQO/[SO ₄ ²⁻]
Indústria de Açúcar de beterraba - Espanha						
Carbocal®	0.1% (m/v)	7.36	-176	1079	1476	0.73
	1% (m/v)	8.07	-229	1240	1552	0.80
	10% (m/v)	8.14	-197	1544	1589	0.97
Lagar de azeite - Portugal						
Águas ruças não decantadas + calcite 10% (m/v)	1:24	7.34	60	461	1062	0.43
	1:12	7.20	60	695	1044	0.67
	1:6	7.07	55	1142	1056	1.08
Águas ruças decantadas + calcite 10% (m/v)	1:30	7.45	63	428	1053	0.41
	1:15	7.43	57	627	998	0.63
	1:5	7.00	59	1357	835	1.63
Indústria de sumo de laranja - Portugal						
Melaço – Sumo de laranja (com conservante) + calcite 10% (m/v)	1:400	7.58	23	384	932	0.41
	1:200	7.41	31	760	844	0.90
	1:100	7.37	80	1359	1037	1.31
Melaço - Sumo de laranja (sem conservante) + calcite 10% (m/v)	1:400	7.63	53	448	1202	0.37
	1:200	7.57	64	741	1222	0.61
	1:100	7.30	57	1062	1190	0.89
Licor (resultante da moagem das cascas de laranja com cal viva) + calcite 10% (m/v)	1:80	7.39	26	577	1254	0.46
	1:40	7.26	26	877	1256	0.70
	1:10	6.52	60	3475	1093	3.18

Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Valores iniciais				
		pH	Potencial-Eh (mv)	CQO (mgO ₂ /L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	CQO/[SO ₄ ²⁻]
Água de lavagem + calcite 10% (m/v)	1:5	7.37	81	349	935	0.37
Indústria de papel - Portugal						
Pasta - alcalino + calcite 10% (m/v)	1:5	7.69	67	250	870	0.29
Pasta - alcalino e ácido + calcite 10% (m/v)	1:5	7.59	70	221	1001	0.22
Papel + calcite 10% (m/v)	1:5	7.55	53	212	111	0.19
Final + calcite 10% (m/v)	1:5	7.69	65	223	933	0.24
Indústria de sumo de laranja – Espanha						
Cascas de laranja + calcite 10% (m/v)	1% (m/v)	7.31	42	963.50	1138.50	0.85
	4% (m/v)	7.33	59	1146	1224	0.94
	8% (m/v)	7.02	35	1320	1164	1.13
Indústria de pinhão - Espanha						
Pinhão + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	7.14	27	877	951.50	0.92
Pinhas 1 + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	6.95	26	981	1029	0.95
Pinhas 2 + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	7.07	41	911.50	1007.50	0.90
ETAR da Aldeia de São Domingos - Portugal						
Água da Lagoa 1 + calcite 10% (m/v)	1:2	7.44	44	1099	469	2.34
	1:5	7.23	48	743	830	0.90
Controlos						
Meio Postgate B		6.64	184	4112	1442.00	2.85
Meio Postgate B + calcite 10% (m/v)		7.07	183	4112	1664	2.47
Meio Postgate B modificado + calcite 10% (m/v) (controlo negativo)		7.33	33	876	1089.50	0.80

Para a atividade e proliferação das BSR é essencial haver disponibilidade de sulfato uma vez que é da redução deste a sulfureto que as bactérias deste grupo obtêm energia (Ex.: Muyzer & Stams, 2008; Teclu & Wallis, 2009).

Apesar das diferentes concentrações de sulfato nos vários subprodutos testados (tabela 4.1), as diluições com meio Postgate B modificado que tem na sua composição reagentes, tal como por exemplo o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, permitiu aumentar a concentração de sulfato para valores favoráveis às BSR. Onde foi mais visível o aumento da concentração de sulfato, após a diluição dos subprodutos neste meio, foi nas cascas de laranja, uma vez que na caracterização inicial deste subproduto (tabela 4.1), a sua concentração era de apenas 1 mg/L e após a sua diluição no meio, passou para cerca de 1200 mg/L (tabela 4.2). Os sulfatos existentes nas cascas de laranja podem vir possivelmente de adubos aplicados. Um dos primeiros processos aplicados nas fábricas de produção de sumo de laranja é a lavagem dos frutos para eliminar alguma terra e vegetação provenientes da colheita (Bates *et al.*, 2001). Este processo provavelmente eliminou grande parte do possível sulfato.

4.1.3 Atividade das BSR com os subprodutos testados

A seleção dos subprodutos, como potenciais fontes de carbono para o crescimento e proliferação das BSR realizou-se nas condições descritas na secção 3.2 dos materiais e métodos, monitorizando-se a atividade destas bactérias. Os valores médios obtidos neste ensaio estão descritos nas tabelas 4.3 e 4.4.

Tabela 4.3- Valores finais de pH e Eh obtidos neste ensaio.

Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Valores finais			
		pH		Potencial- Eh (mv)	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Fábrica de Açúcar de beterraba -Espanha					
Carbocal®	0.1% (m/v)	7.25	0.03	-58	6
	1% (m/v)	7.85	0.02	-49	9
	10% (m/v)	7.85	0.00	-418	1
Lagar de azeite					
Águas ruças não decantadas + calcite 10% (m/v)	1:24	7.40	0.04	-343	10
	1:12	7.26	0.04	-352	6
	1:6	7.28	0.06	-332	50

Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Valores finais			
		pH		Potencial- Eh (mv)	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Águas ruças decantadas + calcite 10% (m/v)	1:30	7.35	0.01	-295	53
	1:15	7.47	0.11	-330	28
	1:5	7.24	0.04	-325	38
Fábrica de sumo de laranja - Portugal					
Melaço – Sumo de laranja (com conservante) + calcite 10% (m/v)	1:400	7.01	0.01	-304	59
	1:200	6.83	0.01	-298	71
	1:100	6.39	0.06	-225	31
Melaço - Sumo de laranja (sem conservante) + calcite 10% (m/v)	1:400	6.95	0.00	-303	57
	1:200	6.84	0.08	-344	1
	1:100	6.42	0.04	-233	13
Licor (resultante da moagem das cascas de laranja com cal viva) + calcite 10% (m/v)	1:80	6.85	0.09	-225	53
	1:40	6.50	0.11	-202	52
	1:10	5.94	0.08	-112	7
Água de lavagem + calcite 10% (m/v)	1:5	7.30	0.08	-314	67
Fábrica de papel - Portugal					
Pasta - alcalino + calcite 10% (m/v)	1:5	7.43	0.04	-93	23
Pasta - alcalino e ácido + calcite 10% (m/v)	1:5	7.41	0.01	-226	8
Papel + calcite 10% (m/v)	1:5	7.29	0.01	-209	181
Final + calcite 10% (m/v)	1:5	7.52	0.01	-49	14
Fábrica de sumo de laranja – Espanha					
Cascas de laranja + calcite 10% (m/v)	1% (m/v)	7.26	0.08	-363	1
	4% (m/v)	6.21	0.04	-258	22
	8% (m/v)	6.20	0.17	-110	12
Fábrica de pinhão - Espanha					
Pinhão + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	7.41	0.01	28	13
Pinhas 1 + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	6.82	0.22	-78	4

Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Valores finais			
		pH		Potencial- Eh (mv)	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Pinhas 2 + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	7.19	0.11	-124	36
ETAR da Aldeia de São Domingos - Portugal					
Água da Lagoa 1 + calcite 10% (m/v)	1:2	7.30	0.27	-197	133
	1:5	7.42	0.23	-251	175
Controlos					
Meio Postgate B		7.36	0.03	-392	2
Meio Postgate B + calcite 10% (m/v)		7.27	0.03	-399	1
Meio Postgate B modificado + calcite 10% (m/v) (controlo negativo)		7.57	0.10	-202	59

A percentagem máxima de redução de sulfato e conseqüente produção de sulfureto são indicadores da atividade das BSR (Elliot *et al.*, 1998; Muyzer & Stams, 2008; Teclu & Wallis, 2009). De acordo com os resultados obtidos para estes parâmetros (tabela 4.4) é possível verificar que na maioria dos subprodutos, pelo menos numa das diluições testadas, a remoção do sulfato inicial foi superior a 50%. Isto apenas não aconteceu nos subprodutos da fábrica de papel, no melaço com conservante e no licor.

No teste com Carbocal® o aumento da quantidade deste subproduto levou a um aumento da percentagem de remoção de sulfato. Apenas no teste com 10% (m/v) a percentagem de remoção (53%) foi superior a 50%.

Nas culturas com águas ruças as percentagens de redução de sulfato foram praticamente iguais nos dois subprodutos (decantado e não decantado). Em todas as diluições a percentagem de remoção foi superior a 50% e foi aumentando à medida que a diluição ia sendo menor (maior quantidade de águas ruças). Nas águas ruças não decantadas e diluídas 1:6 a redução foi de 95% e nas decantadas e diluídas 1:5 foi 93%.

Dos subprodutos da indústria de sumo de laranja de Portugal apenas o melaço sem conservante nas diluições 1:400 e 1:200 e a água de lavagem obtiveram percentagens de

remoção superiores a 50%. No melão a maior percentagem foi na diluição 1:200 onde 68% do sulfato inicial foi removido. Na água de lavagem a remoção foi de 53%.

As cascas de laranja (provenientes de Espanha) nos testes com 1% (m/v) e 4% (m/v) atingiram percentagens máximas de remoção de sulfato muito próximas e superiores a 50%. Ainda assim no teste com 4% (m/v) a percentagem de remoção foi ligeiramente superior, removendo-se 99% do sulfato inicial. No entanto isto apenas foi constatado cerca de 3 meses depois do fim das monitorizações semanais, isto é 121 dias depois do inóculo.

Os testes com água da lagoa da ETAR de São Domingos revelaram percentagens de remoção de sulfato muito próximas sendo essa percentagem maior na diluição 1:2. Nesta diluição a remoção máxima de sulfato foi 83.23%.

Nos efluentes da indústria do papel a percentagem de redução de sulfato foi baixa (inferior a 30%), atingindo a percentagem máxima no efluente da fábrica de papel.

Nas culturas onde se testou os subprodutos da indústria de pinhão como fonte de carbono, a produção de sulfureto foi muito baixa apesar das elevadas percentagens de redução de sulfato (82% nas cascas de pinhão e 99 e 97% nas pinhas 1 e 2 respetivamente). Tal como nos testes com cascas de laranja, estas percentagens de redução de sulfato verificaram-se cerca de 3 meses depois do fim das monitorizações semanais, ou seja 121 dias depois do inóculo.

Apesar de na maioria dos subprodutos testados se ter verificado uma diminuição do sulfato inicial superior a 50%, em grande parte deles essa redução não se traduziu numa produção significativa de sulfureto. Os subprodutos que apresentaram melhores resultados tendo em conta a relação diminuição de sulfato e produção de sulfureto (sugerindo grande atividade de BSR) foram: o Carbocal® 10% (m/v), as águas ruças não decantadas na diluição 1:6, águas ruças decantadas diluídas 1:5, o melão sem conservante diluído 1:200 e a água da lagoa 1 da ETAR de São Domingos nas diluições 1:2 e 1:5 como se pode verificar pelos resultados apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4- Concentrações máximas de sulfureto e percentagem máxima de redução de sulfato obtidas neste ensaio.

Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Valores máximos obtidos					
		Máx. [S ²⁻] (mg/L)		Percentagem máxima de redução de SO ₄ ²⁻ (%)		Tempo para o máx. de redução de SO ₄ ²⁻ (dias)	Tempo até atingir 90 % do máx. de redução de SO ₄ ²⁻ (dias)
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão		
Fábrica de Açúcar - Espanha							
Carbocal®	0.1% (m/v)	7.00	0.03	18	0.17	17	17
	1% (m/v)	1.00	0.79	21	0.71	29	17
	10% (m/v)	195.00	2.07	53	1.48	40	26
Lagar de azeite							
Águas ruças não decantadas + calcite 10% (m/v)	1:24	44.00	1.38	55	13.72	28	28
	1:12	59.00	7.16	69	26.55	28	28
	1:6	149.00	48.93	95	2.01	28	28
Águas ruças decantadas + calcite 10% (m/v)	1:30	45.00	0.17	55	1.95	28	28
	1:15	52.00	8.53	69	7.86	28	28
	1:5	226.00	39.43	93	1.61	28	28
Fábrica de sumo de laranja - Portugal							
Melaço – Sumo de laranja (com conservante) + calcite 10% (m/v)	1:400	48.00	1.97	22	0.99	28	28
	1:200	26.00	9.23	49	0.59	42	42
	1:100	56.00	36.78	18	14.52	42	42
Melaço - Sumo de laranja (sem conservante) + calcite 10% (m/v)	1:400	49.00	10.04	51	3.06	28	28
	1:200	106.00	11.70	68	2.65	28	28
	1:100	83.00	13.58	46	0.24	28	21
Licor (resultante da moagem das cascas de laranja com cal viva) + calcite 10% (m/v)	1:80	21.00	27.46	37	0.79	28	21
	1:40	39.00	38.42	34	12.55	28	21
	1:10	5.00	0.43	11	0.13	14	7
Água de lavagem + calcite 10% (m/v)	1:5	49.00	15.98	53	12.10	21	21
Fábrica de papel - Portugal							

		Valores máximos obtidos					
		Máx. [S ²⁻] (mg/L)		Percentagem máxima de redução de SO ₄ ²⁻ (%)		Tempo para o máx. de redução de SO ₄ ²⁻ (dias)	Tempo até atingir 90 % do máx. de redução de SO ₄ ²⁻ (dias)
Subprodutos	Diluições em meio Postgate B modificado	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão		
Pasta - alcalino + calcite 10% (m/v)	1:5	4.00	1.34	11	4.63	21	21
Pasta - alcalino e ácido + calcite 10% (m/v)	1:5	17.00	0.70	25	5.65	14	14
Papel + calcite 10% (m/v)	1:5	31.00	1.58	29	1.78	14	14
Final + calcite 10% (m/v)	1:5	23.00	9.43	27	1.59	28	28
Fábrica de sumo de laranja – Espanha							
Cascas de laranja + calcite 10% (m/v)	1% (m/v)	106.00	44.71	91	8.70	121	-
	4% (m/v)	95.00	8.38	99	0.69	121	-
	8% (m/v)	2.00	0.70	-16	12.64	121	-
Indústria de pinhão - Espanha							
Pinhão + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	7.00	1.68	99	0.30	121	-
Pinhas 1 + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	21.00	0.50	82	1.24	121	-
Pinhas 2 + calcite 10% (m/v)	10% (m/v)	18.00	1.27	97	0.49	121	-
ETAR da Aldeia de São Domingos - Portugal							
Água da Lagoa 1 + calcite 10% (m/v)	1:2	153.20	60.29	82	18.03	28	28
	1:5	218.36	16.29	81	1.69	28	28
Controlos							
Meio Postgate B		279.00	22.56	85	0.52	14	7
Meio Postgate B + calcite 10% (m/v)		259.00	8.76	87	0.10	14	7
Meio Postgate B modificado + calcite 10% (m/v) (controlo negativo)		9.00	4.57	25	9.80	28	28

Nas culturas com Carbocal® 10% (m/v) a máxima concentração de sulfureto atingida foi de 195.00 mg/L e a máxima redução de sulfato foi de 53%. Apesar da boa

produção de sulfureto e da boa redução de sulfato estes valores só foram obtidos ao fim de 40 dias, como se pode observar nos gráficos da figura 4.1.

Nos ensaios com águas ruças (figuras 4.2 e 4.3), apesar das percentagens máximas de redução de sulfato próximas (95% nas águas ruças não decantadas diluídas 1:6 e 93% nas decantadas diluídas 1:5), a produção máxima de sulfureto foi ligeiramente diferente: maior nas decantadas diluídas 1:5 (226 mg/L) do que nas não decantadas diluídas 1:6 (149 mg/L). O tempo necessário para a máxima redução de sulfato foi igual nos dois casos, 28 dias (tabela 4.4). No entanto, no ensaio com as águas ruças decantadas o valor de sulfato na primeira semana é baixo e depois sobe e volta a descer (Figura 4.3). Isto sugere que águas ruças decantadas devem ser mais ricas em compostos orgânicos que podem ser diretamente utilizados pelas BSR enquanto as águas ruças não decantadas devem ter mais compostos que só podem ser utilizados pelas BSR depois de sofrerem alguma alteração por via metabólica ou química. Isto tem implicações em futuros testes e numa eventual utilização em reatores em contínuo pois neste caso é importante os compostos orgânicos serem rapidamente consumidos pelas BSR de forma a ser possível ter tempos de retenção o mais pequenos possível.

No melão sem conservante diluído 1:200 (figura 4.4) a percentagem máxima de redução de sulfato foi de 68%, o que correspondeu a uma produção máxima de sulfureto de 106 mg/L, ao fim de 28 dias (tabela 4.4). Os valores de produção de sulfureto ficaram assim próximos dos obtidos nas águas ruças não decantadas 1:6. Neste caso parece haver duas fases de redução de sulfato a sulfureto: uma na primeira semana e outra na quarta semana. Isto pode ser indicativo de disponibilidade no melão de compostos orgânicos diretamente consumidos pelas BSR e também de outros compostos que apenas podem ser consumidos por estas bactérias depois duma alteração que ocorreu depois do 21º dia.

Na água da lagoa 1 da ETAR de São Domingos (figuras 4.5 e 4.6) a produção de sulfureto foi maior na diluição 1:5 (218.36 mg/L) do que na diluição 1:2 (153.20 mg/L). A redução de sulfato ao fim de 28 dias (tabela 4.4) foi praticamente igual nos dois casos (82.83% na diluição 1:2 e 80.80 na diluição 1:5).

Outro subproduto onde se verificou boa redução de sulfato e conseqüente produção de sulfureto foi nas cascas de laranja 1% e 4% (m/v). No entanto isso não aconteceu no primeiro mês de ensaio em que se fizeram análises semanais e só foi constatado quando se analisaram as culturas passados 121 dias. No teste com 1% (m/v) a produção máxima de sulfureto foi de 106.00 mg/L com uma percentagem de remoção de

sulfato de 91% ao fim de 121 dias. Contudo, o tempo necessário para se atingir esse valor torna este produto pouco viável para reatores de fluxo contínuo, já que se trata de uma fonte de carbono de utilização lenta mais compatível com a utilização de sistemas passivos. O comportamento do teste com 4% (m/v) foi semelhante ao do teste com 1% (m/v) ao nível da produção de sulfureto (95.00 mg/L), da percentagem de redução de sulfato (99%) e do tempo necessário para essa redução (121 dias).

Tendo por base os resultados obtidos na primeira fase do trabalho (tabelas 4.3 e 4.4) escolheram-se os melhores subprodutos/efluentes como fontes de carbono para uso das BSR para os testes de tratamento dos efluentes DAM de São Domingos e *vertido de zincado*: o Carbocal® 10% (m/v), as águas ruças não decantadas diluídas 1:6 e decantadas 1:5, o melaço sem conservante na diluição 1:200 e o efluente da lagoa 1 da ETAR nas diluições 1:2 e 1:5. Para estes subprodutos/efluentes apresenta-se de seguida a redução da concentração de sulfato e produção de sulfureto ao longo do tempo. Destes produtos foram testados no âmbito do trabalho para esta tese o Carbocal® e as águas ruças não decantadas.

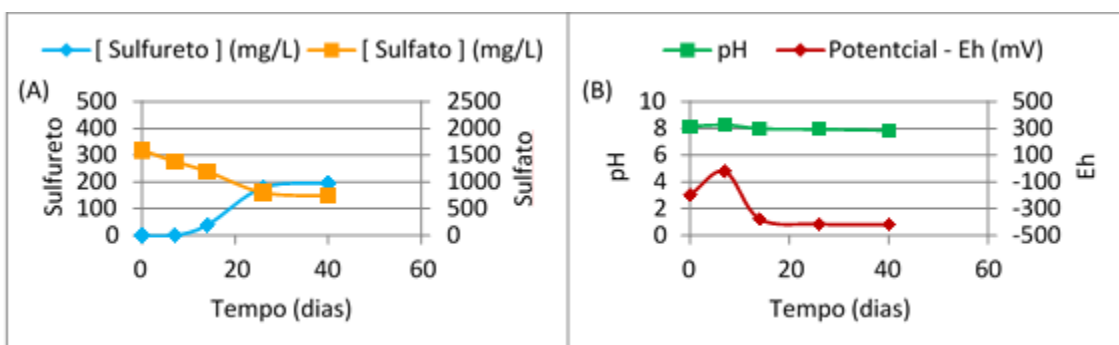


Figura 4.1-Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com Carbocal® 10% (m/v).

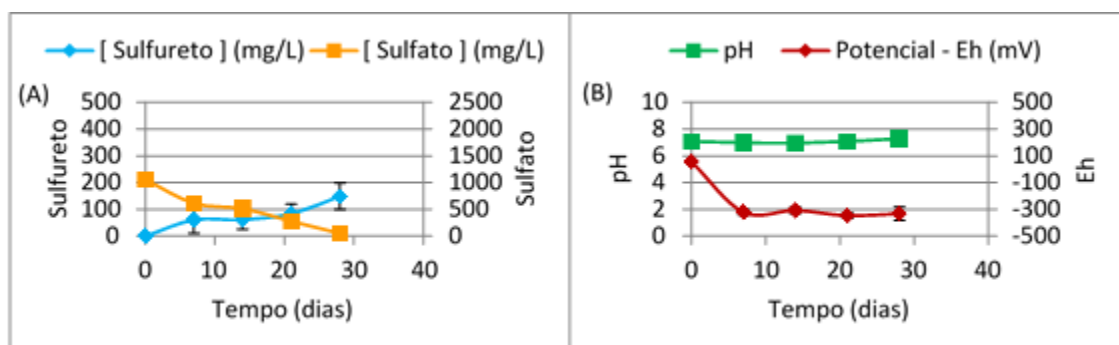


Figura 4.2-Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças não decantadas diluídas 1:6.

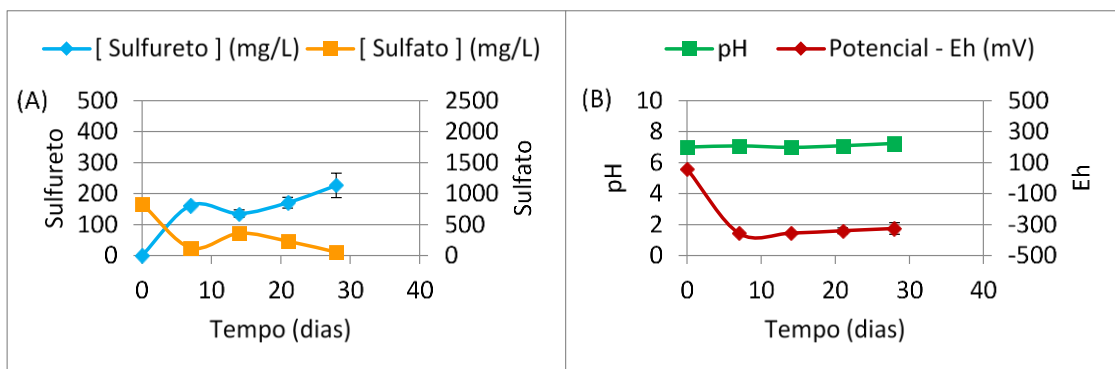


Figura 4.3- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças decantadas diluídas 1:5.

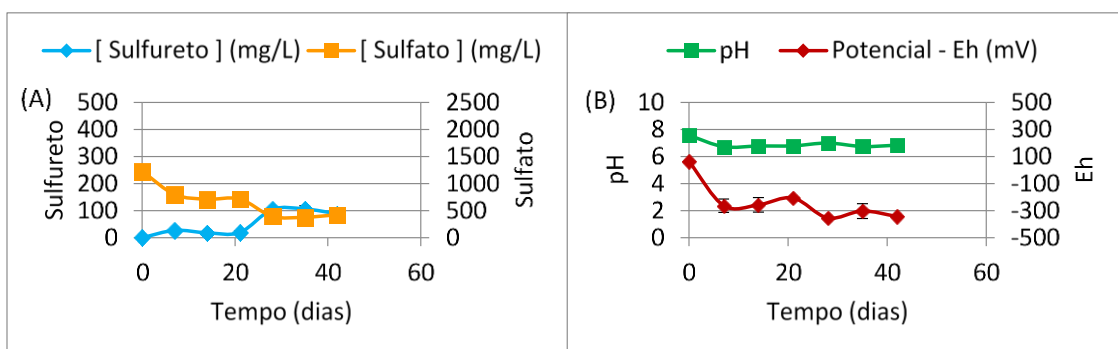


Figura 4.4- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melação sem conservante diluído 1:200.

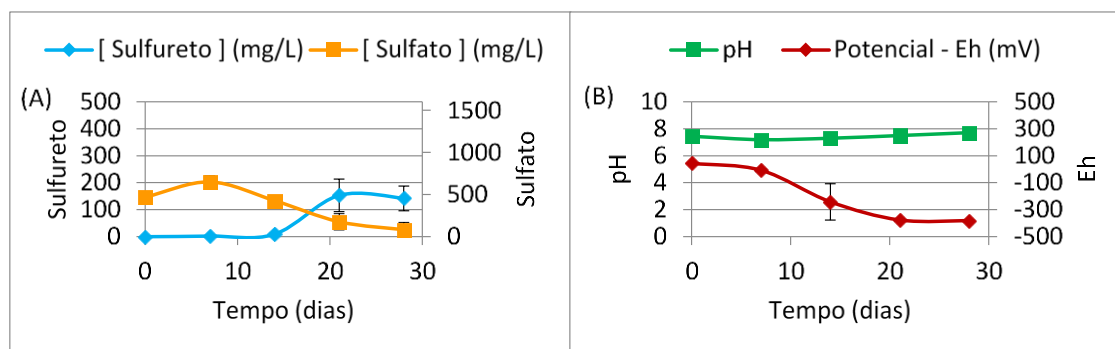


Figura 4.5- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com água da Lagoa 1 da ETAR de São Domingos diluída 1:2.

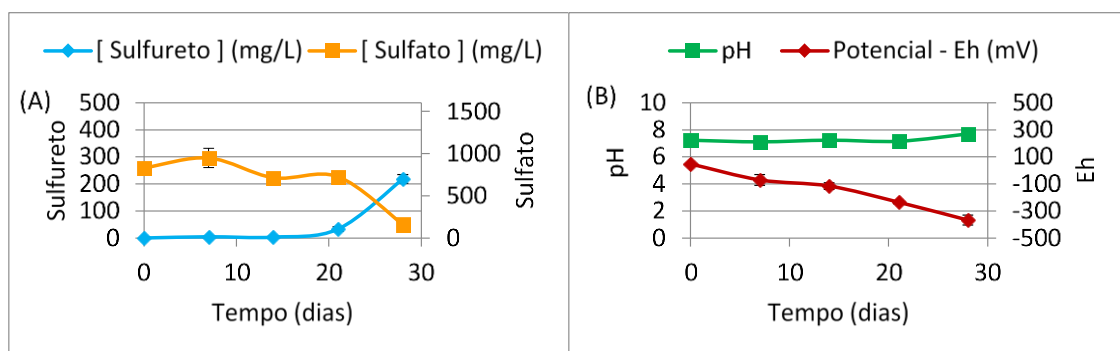


Figura 4.6- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com água da Lagoa 1 da ETAR de São Domingos diluída 1:5.

4.2 Testes de remediação de metais

Os efluentes de DAM contaminados com metais pesados são uma das principais fontes de contaminação ambiental. Estes efluentes apresentam por norma grandes concentrações de sulfato e de iões solúveis de metais pesados, sendo necessária a aplicação de processos de remediação eficientes e de baixo custo (Kieu *et al.*, 2011; Weiting *et al.*, 2014).

A DAM de São Domingos é caracterizada por um valor de pH baixo e elevadas concentrações de sulfato, ferro, cobre e zinco (Costa & Duarte, 2005). As concentrações de sulfato e metais neste efluente encontram-se muito acima dos limites estabelecidos na legislação portuguesa para águas destinada a rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto) e a concentração de metais em particular pode afetar o crescimento e atividade das BSR.

O *vertido de zinco* é um tipo de efluente industrial caracterizado principalmente por valores baixos de pH, elevadas concentrações de zinco, algum ferro, sulfato e boro (Tahir & Rauf, 2004). Em termos de remediação utilizando BSR os principais desafios são a elevada concentração de zinco, que pode ser tóxico para estas bactérias e a baixa concentração de sulfato, que pode também limitar o seu crescimento e atividade.

O boro em baixas concentrações é considerado um micronutriente importante para muitas plantas e animais contudo em valores elevados torna-se tóxico. A remoção de boro

é um processo complexo e é feita normalmente recorrendo a processos físico-químicos como a troca iónica, eletrodialise e coagulação (Ezechi *et al.*, 2014)

No efluente *vertido de zincado* utilizado neste trabalho as concentrações de ferro e zinco estão muito acima dos limites estabelecidos na legislação portuguesa para águas destinada a rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto). A concentração de boro já se encontra abaixo do valor máximo admissível na legislação portuguesa nas águas para rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

4.2.1 Carbocal® como agente neutralizador do pH

Antes de se avançar para os testes com Carbocal® como fonte de carbono para BSR na remediação de metais da DAM de São Domingos e do *vertido de zincado*, fez-se um estudo da capacidade deste produto para a neutralização do pH destas águas contaminadas com metais uma vez que os valores de pH destes efluentes (DAM e *vertido de zincado*, respetivamente) são incompatíveis com o crescimento e atividade das BSR.

4.2.1.1 Ação do Carbocal® na neutralização do pH do *vertido de zincado*

Com esta experiencia (resultados resumidos na tabela 4.5) foi possível verificar a importância da quantidade de Carbocal® na neutralização do *vertido de zincado* ao longo de 10 dias.

O pH foi aumentando com a quantidade de Carbocal® adicionada. No dia 1 nos testes com 5, 10 15 e 20% (m/v) os valores de pH já se encontravam acima de 6. Com o tempo os valores de pH foram aumentando por ação do Carbocal® e ao fim de 10 dias também no teste com 1% (m/v) o valor foi superior a 6. O aumento gradual das concentrações deste subproduto acabou por não se traduzir em grandes diferenças no comportamento do pH do efluente nos testes com 10, 15 e 20% (m/v),ao fim de 10 dias (tabela 4.5).

Tabela 4.5- Valores de Eh e pH no início (dia 1) e no fim (dia 10) do ensaio de neutralização do pH do *vertido de zincado*.

% de Carbocal® (m/v) em <i>vertido de zincado</i>	Parâmetros	Dia 1		Dia 10	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0 % (m/v) Branco	Eh (mV)	486.00	0.00	486.00	0.00
	pH	2.06	0.00	2.01	0.00
0.1% (m/v)	Eh (mV)	460.00	8.29	370.67	29.89
	pH	2.26	0.02	3.02	0.10
1% (m/v)	Eh (mV)	156.33	6.18	220.67	22.10
	pH	5.55	0.28	6.82	0.02
5% (m/v)	Eh (mV)	121.00	3.74	183.33	2.87
	pH	6.27	0.03	7.27	0.04
10% (m/v)	Eh (mV)	107.33	4.19	168.00	3.74
	pH	6.36	0.06	7.44	0.03
15% (m/v)	Eh (mV)	91.67	4.92	154.67	0.94
	pH	6.61	0.08	7.57	0.03
20% (m/v)	Eh (mV)	107.33	1.89	151.00	3.74
	pH	6.66	0.09	7.69	0.04

A ação do Carbocal® na neutralização do pH do *vertido de zincado* levou à precipitação de zinco e conseqüente diminuição da sua concentração em solução. A concentração de zinco, metal em concentração mais elevada no *vertido de zincado* (~400 mg/L), diminuiu à medida que se aumentou a quantidade de Carbocal® (figura 4.7). Apesar disso, considerando os valores médios, em nenhum caso o zinco foi removido na sua totalidade, permanecendo em valores muito superiores aos admissíveis (10 mg/L) e aos recomendados (2 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). No entanto, o efeito do Carbocal® levou a grandes variações na concentração de zinco nos triplicados da experiência (ver barras de desvio padrão da figura 4.7) e em alguns casos com 10, 15 e 20% (m/v), o zinco foi mesmo totalmente removido. A principal razão para esta variação na concentração de zinco entre triplicados está relacionada com pequenas variações dos valores de pH nas condições testadas, provavelmente devido a não ter sido efetuada homogeneização das misturas ao longo de todo o ensaio. Nestes testes os valores de pH situam-se entre 6 e 8, gama na qual começa a ocorrer precipitação do metal em solução de acordo com estimativas obtidas pelo *software* Medusa-Hydra (figura 4.8). Contudo a precipitação total não é repentina e

pequenas variações nos valores de pH nesta gama alteram significativamente a solubilidade do metal, condicionando que quantidade deste precipita ou permanece na solução sob a forma de ião metálico (figura 4.8).

O ferro é o segundo elemento em maior concentração neste efluente (~100 mg/L) sendo removido praticamente na totalidade nos testes com 1% (m/v) ou mais de Carbocal®. Este metal ficou em valores acima do valor máximo recomendado (5 mg/L) da legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto) no teste sem Carbocal® e no teste contendo 0.1%. Nestes dois casos o pH ficou abaixo de 3.5, valor a partir do qual começa a ocorrer precipitação deste metal de acordo com os dados do *software* Medusa-Hydra (Figura 4.9).

A concentração de boro no *vertido de zincado* (~2 mg/L) sofreu alterações mínimas com todas as quantidades de Carbocal® testadas, mantendo-se abaixo do valor máximo admissível (3.75 mg/L) e acima do valor máximo recomendado (0.3 mg/L) na legislação portuguesa para as águas de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto). Os valores de pH atingidos neste ensaio (o mais alto foi 7.69 com 20% (m/v) de Carbocal®) estão na gama em que o Boro se mantém em solução (figura 4.10).

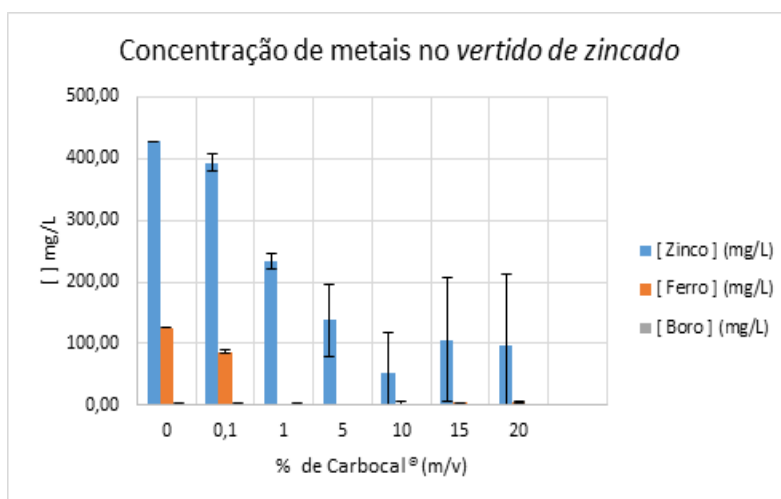


Figura 4.7- Concentração de metais no *vertido de zincado* por ação do Carbocal® ao fim de 10 dias.

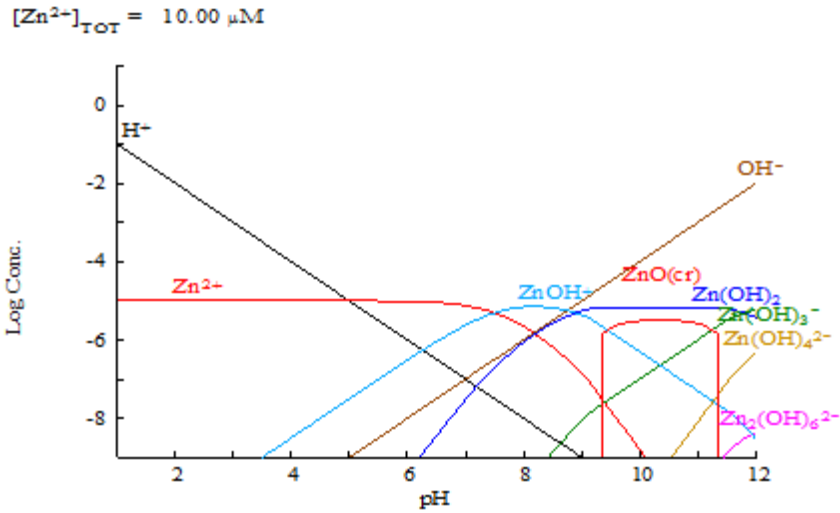


Figura 4.8-Diagrama que representa o balanço químico do zinco, elaborado através do *software* Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).

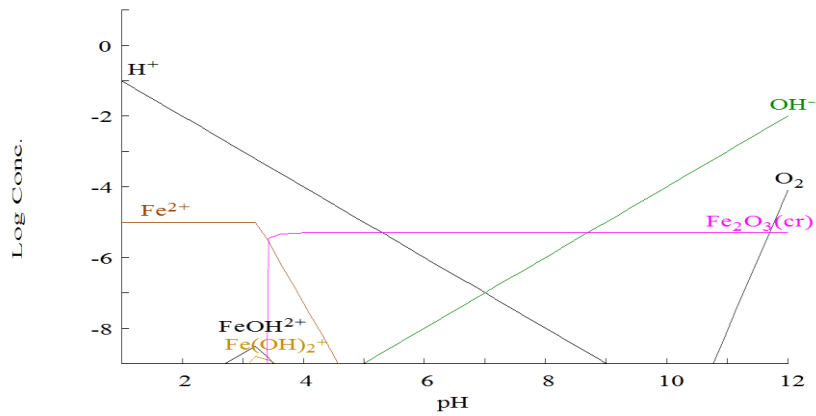


Figura 4.9-Diagrama do balanço químico do ferro, elaborado através do *software* Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).

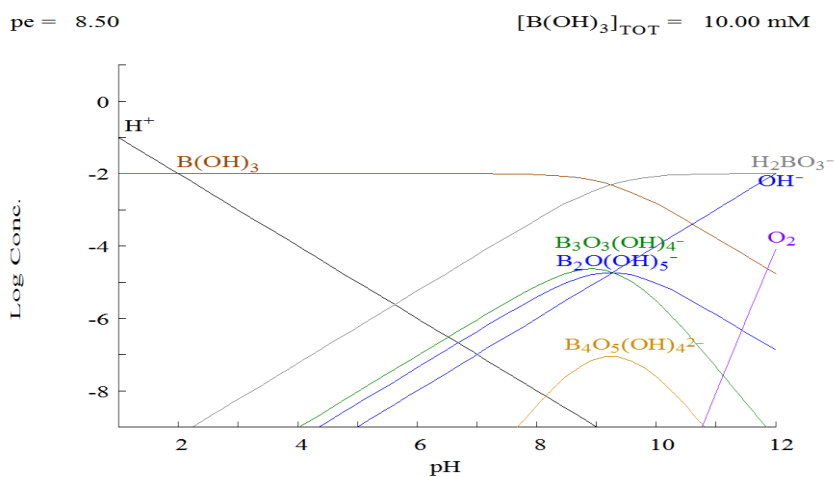


Figura 4.10- Diagrama do balanço químico do boro, elaborado através do *software* Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).

4.2.1.2 Ação do Carbocal® na neutralização do pH da DAM de São Domingos

No ensaio de neutralização da DAM por ação do Carbocal® os valores de pH e Eh foram analisados durante 10 dias. Os valores iniciais e finais para as diferentes quantidades de Carbocal® (%) estão indicados na tabela 4.6.

Tal como no teste anterior de neutralização do pH no vertido de zincado, neste teste o aumento da quantidade de Carbocal®, traduziu-se num aumento dos valores de pH, logo no dia 1 (tabela 4.6). A rápida ação do Carbocal® na neutralização do pH em águas ácidas de mina vai de encontro ao estudado por Koschorreck *et al.* (2007) em que após a adição de um produto de composição semelhante ao Carbocal® juntamente com palha, formou-se uma camada de sedimentos neutros onde ocorreu redução de sulfato e de ferro e precipitação de sulfuretos metálicos.

Os testes com 5 e 10% (m/v) acabaram por ter um comportamento semelhante, apesar do pH inicial no teste com 5% (m/v) ter sido um pouco mais baixo. O mesmo aconteceu com os testes com 15 e 20% (m/v).

Tabela 4.6- Valores de Eh e pH no início (dia 1) e no fim (dia 10) do ensaio de neutralização do pH de DAM de São Domingos.

% de Carbocal® (m/v) em DAM de São Domingos	Parâmetros	Dia 1		Dia 10	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0 % (m/v) Branco	Eh (mV)	543.00	0.00	542.00	0.00
	pH	2.45	0.00	2.57	0.00
0.1% (m/v)	Eh (mV)	407.67	28.55	414.67	8.18
	pH	3.71	0.26	3.94	0.12
1% (m/v)	Eh (mV)	334.67	6.24	330.33	7.04
	pH	6.24	0.09	6.86	0.06
5% (m/v)	Eh (mV)	308.33	3.68	305.33	4.99
	pH	6.82	0.04	7.20	0.02
10% (m/v)	Eh (mV)	289.00	4.55	285.67	5.44
	pH	7.13	0.01	7.27	0.02
15% (m/v)	Eh (mV)	273.00	2.94	264.67	6.24
	pH	7.33	0.02	7.37	0.00
20% (m/v)	Eh (mV)	252.00	8.52	150.00	0.05
	pH	7.37	0.10	7.40	4.55

Tal como no teste com *vertido de zincado*, também no teste com DAM a alteração do pH provocada pelo efeito de neutralização do Carbocal® levou a alterações da solubilidade dos metais e consequentemente à sua remoção por precipitação (figura 4.11).

A diminuição da concentração de ferro ficou bem patente à medida que a quantidade de Carbocal® aumentou, sendo que uma pequena adição deste subproduto (0,1%) suficiente para aumentar o pH do efluente para valores perto de 4 e a concentração deste metal baixar de 76 mg/L para 1.1 mg/L, ficando abaixo do valor máximo recomendado (5 mg/L) na legislação portuguesa para a água destinadas à rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

A concentração de zinco também diminuiu com o aumento da quantidade de Carbocal®. No teste com 1% (m/v) a concentração já se encontrava abaixo do limite máximo admissível (10 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto). A partir desta percentagem as concentrações diminuiram para valores inferiores ao valor máximo recomendado na legislação (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

No caso do cobre, mais uma vez a concentração do metal diminuiu com o aumento de Carbocal®. A partir de 1% de Carbocal® (m/v) o pH ficou acima de valores a partir dos quais o cobre começa a precipitar [aproximadamente 6.0 (figura 4.12)] e por isso a concentração deste metal manteve-se abaixo do limite máximo admissível (5 mg/L) na legislação portuguesa para água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto). Apesar disso, nesses casos (1% Carbocal® ou mais), o comportamento do cobre ao longo do ensaio acabou por ser diferente do comportamento dos outros metais analisados, uma vez que a sua concentração nem sempre diminuiu com o aumento da quantidade de Carbocal®. No entanto, as variações na concentração deste metal são muito pequenas e pouco significativas.

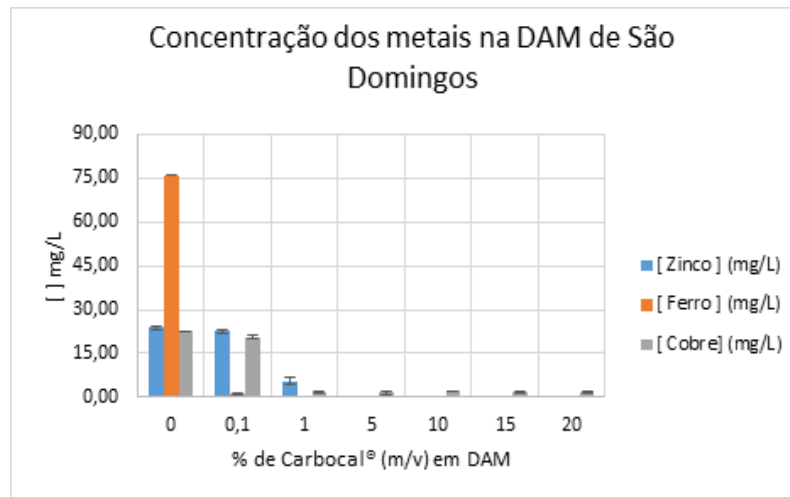


Figura 4.11- Concentração de metais na DAM de São Domingos por ação do Carbolcal® ao fim de 10 dias.

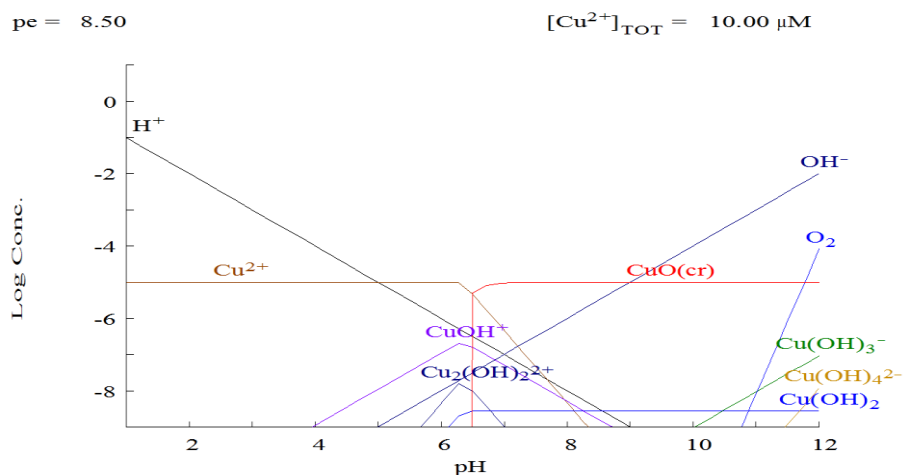


Figura 4.12- Diagrama do balanço químico do cobre, obtido com o *software* Medusa-Hydra (Ignasi Puigdomenech, atualizado em 2015).

Pode então concluir-se que o Carbolcal® é um bom agente neutralizador do pH, tanto do vertido de zincado como da DAM de São Domingos, o que lhe confere grande potencial na remediação química de metais deste tipo de efluentes. O aumento do pH provocado pela ação deste subproduto levou à precipitação química dos metais dos efluentes tendo estes sido removidos praticamente na sua totalidade, exceto no caso do zinco do *vertido de zincado*, onde o zinco permaneceu em solução devido à sua sensibilidade a pequenas diferenças de pH.

4.2.2 Carbocal® como fonte de carbono para as BSR na remediação de efluentes contaminados com metais pesados

Depois de confirmadas as capacidades do Carbocal® como fonte de carbono para as BSR (tabelas 4.3 e 4.4 e figura 4.1) e como agente neutralizador do pH de efluentes contaminados com metais (tabela 4.5) tentou-se testar estes dois aspetos em simultâneo na remediação de metais do *vertido de zinco* e de DAM de São Domingos com o objetivo de obter em simultâneo uma remoção de metais e de sulfato.

4.2.2.1 Carbocal® como fonte de carbono para as BSR na remediação de *vertido de zinco*

Apesar do *vertido de zinco* ter uma baixa concentração de sulfato (16 mg/L), na caracterização inicial do Carbocal® em água verificou-se que com 10% (m/v) deste produto há lixiviação de sulfato para uma concentração de 96 mg/L (Tabela 4.1), e num trabalho anterior efetuado neste laboratório testaram-se com sucesso culturas de BSR com apenas 150 mg/L deste anião (Carlier *et al.*, 2014).

Foram testadas diferentes quantidades de Carbocal® (1, 10 e 20%) e avaliou-se a atividade das BSR e a remoção de zinco, metal em grande concentração neste efluente.

No teste com 1% (m/v) de Carbocal® (figura 4.13) os resultados em termos de atividade das BSR (redução de sulfato e produção de sulfureto) foram quase nulos, apesar de se ter verificado uma lixiviação de sulfato que fez aumentar a sua concentração até 132 mg/L nos primeiros 14 dias (figura 4.13). Quanto à remoção de zinco, a sua concentração baixou para valores próximos de 15% dos 358 mg/ iniciais, tanto no teste com BSR como no controlo negativo (figura 4.14), o que é indicativo que esta remoção ocorreu por formação de precipitados devido ao aumento do pH.

No controlo negativo já seria expectável que não ocorresse produção de sulfureto devido à ausência de inóculo. No entanto, como se trata de um produto não estéril com resíduos de beterraba, é possível que tenha BSR provenientes dos solos onde a beterraba é cultivada. Sabemos que na fábrica que forneceu o Carbocal® há um reator alimentado com a água de lavagem das beterrabas para produzir metano mas que o metano por este produzido não pode ser aproveitado por estar contaminado com sulfureto e num trabalho

anterior confirmou-se por contagem do número mais provável que as lammas desse reator têm 36667 unidades formadoras de colónias de BSR por ml (dados não publicados).

Comparando as concentrações finais de sulfato e zinco, no teste e no controlo negativo com 1%, com os limites estabelecidos na legislação portuguesa para as águas de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto), verificou-se que em ambos a concentração de sulfato (27 mg/L no teste e 33 mg/L no controlo negativo) ficou abaixo do valor máximo recomendado (575 mg/L) e a concentração de zinco (43 mg/L no teste e 62 mg/L no controlo negativo) ficou muito acima do valor admissível (10 mg/L) e do recomendado (2 mg/L).

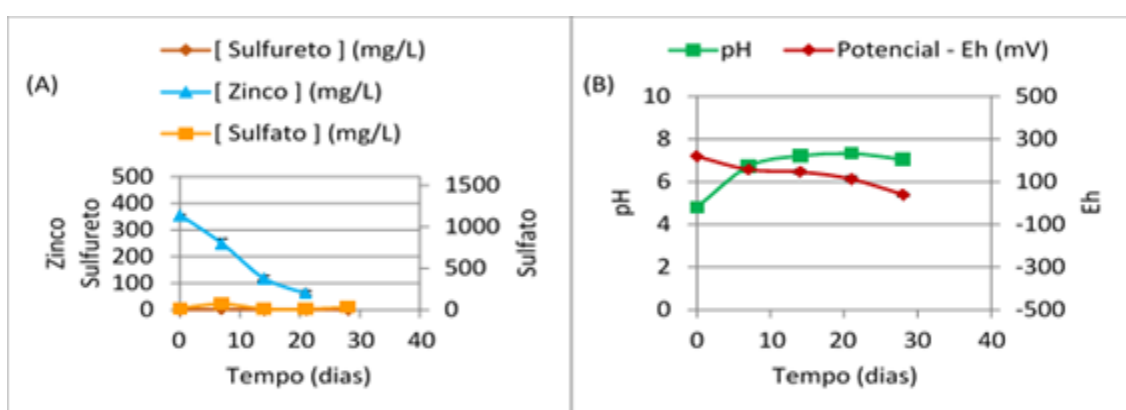


Figura 4.13- Monitorização do teste de 1% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zincado* com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

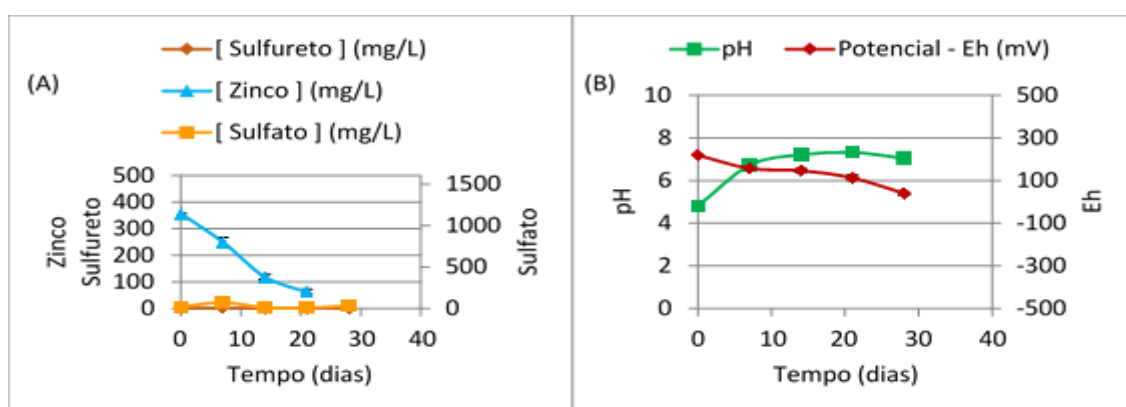


Figura 4.14- Monitorização do controlo negativo de 1% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zincado* sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

No ensaio com 10% (m/v) de carbocal (figuras 4.15 e 4.16) apesar da maior quantidade de Carbocal® disponível e da lixiviação de sulfato até valores entre 330 e 350 mg/L, não se verificou atividade das BSR, tal como havia acontecido no teste com 1% (m/v). A produção de sulfureto foi muito baixa e só ao fim de 28 dias se verificou consumo de sulfato (figura 4.15). A remoção de zinco foi praticamente total (97-99%) no teste e no controlo negativo (figura 4.16) indicando que a esta remoção ocorreu por formação de precipitados devido ao aumento do pH.

As concentrações finais de sulfato (62 mg/L no teste e 46 mg/L no controlo negativo) no teste com 10% (m/v) de Carbocal® ficaram abaixo do valor máximo recomendado (575 mg/L) na legislação portuguesa para as águas de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). No caso do zinco as concentrações finais (2 mg/L no teste e 6 mg/L no controlo negativo) acabaram por ficar abaixo do valor máximo admissível (10 mg/L) mas atingiram o valor máximo recomendado (2 mg/L).

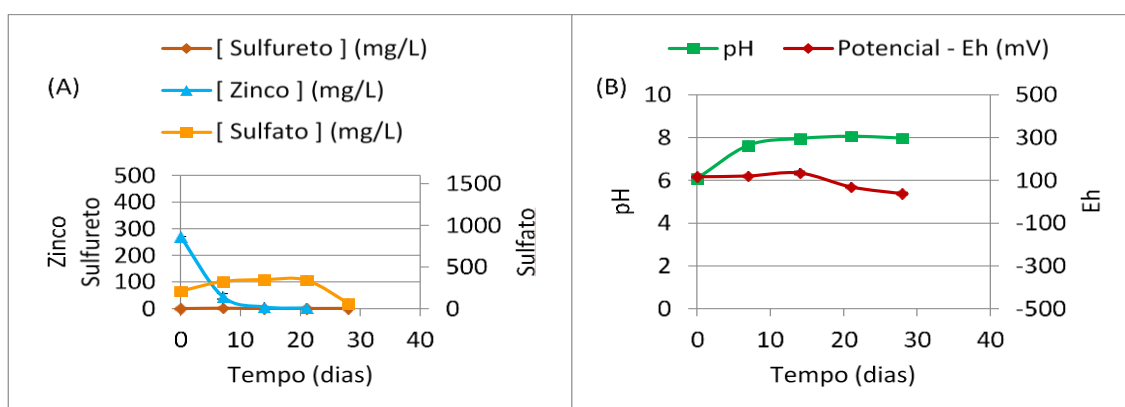


Figura 4.15- Monitorização do teste de 10% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zincado* com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

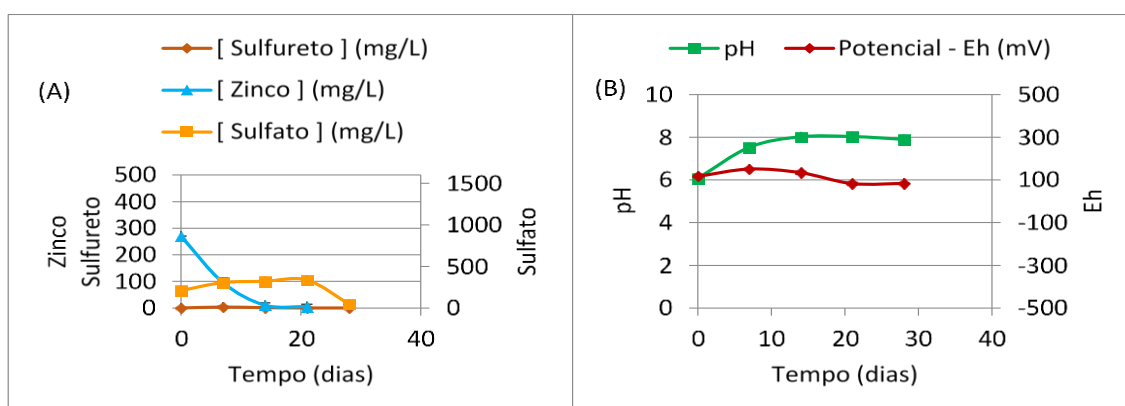


Figura 4.16- Monitorização do controlo negativo de 10% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zincado* sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

Tal como se constatou nos testes com 1 e 10% (m/v) de Carbocal®, o teste com 20% (m/v) deste produto também não revelou resultados positivos no que diz respeito à atividade das BSR, apesar da concentração de sulfato ter aumentado até valores acima de 500 mg/L. A produção de sulfureto foi muito baixa e a concentração de sulfato, depois da lixiviação manteve-se relativamente estável ao longo do tempo (figura 4.17).

O comportamento do sulfato, ao fim de 7 dias, foi igual nas duas condições testadas, a concentração aumentou como resultado da lixiviação do Carbocal® para o meio. Os valores finais de sulfato no teste (458 mg/L) e no controlo negativo (319 mg/L) ficaram abaixo do valor máximo recomendado na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto).

No teste com 20% (m/v) Carbocal® o aumento da quantidade em relação ao ensaio com 10% (m/v) deste produto teve uma pequena influência de uma décima no pH inicial: 6.18 e 6.08, respetivamente. Contudo esta pequena diferença foi suficiente para que a concentração inicial de zinco fosse de apenas 94.50 mg/L neste teste com 20% de Carbocal®, enquanto tinha sido de 270 mg/L no teste de 10% (m/v).

O comportamento do zinco foi igual nas duas condições testadas (com e sem BSR) (figuras 4.17 e 4.18), diminuindo ao longo do tempo, e comparando as suas concentrações finais com os limites na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto) verificou-se que no teste com BSR a concentração (1.7 mg/L) ficou abaixo do valor máximo recomendado (2 mg/L) e no controlo negativo (sem BSR) (figura 4.18) a concentração (3.8 mg/L) ficou acima do valor máximo recomendado (2 mg/L) mas ainda assim ficou abaixo do valor máximo admissível (10 mg/L).

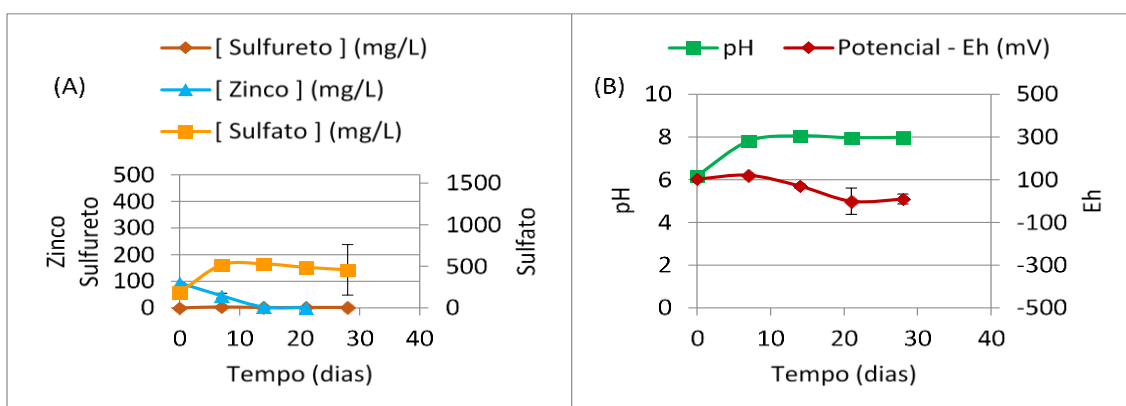


Figura 4.17- Monitorização do teste com 20% (m/v) de Carbocal® em vertido de zincado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

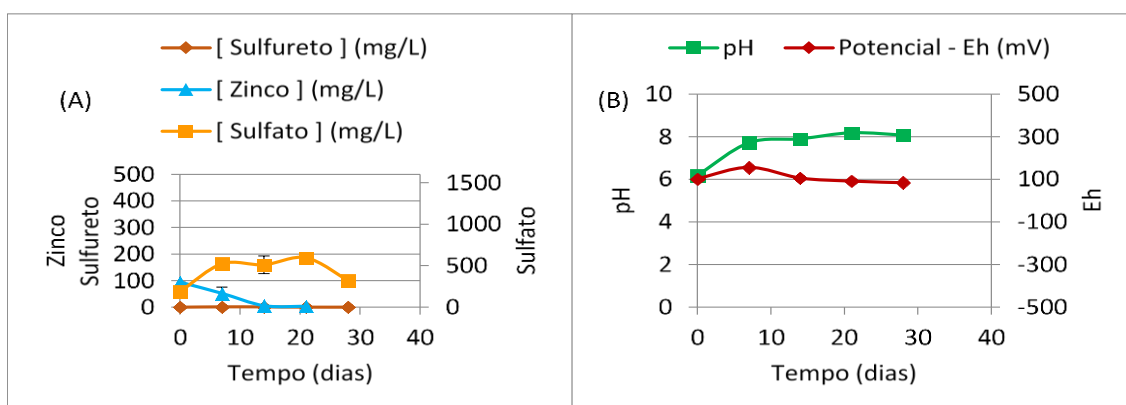


Figura 4.18- Monitorização do controlo negativo de 20% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zinco* sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de zinco ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

No controlo positivo, com Carbocal® em meio Postgate B sem lactato (figura 4.19) verificou-se atividade de BSR. Isto era expectável uma vez que as condições testadas foram iguais às utilizadas na seleção de produtos viáveis como fontes de carbono para este grupo de bactérias e nas quais se tinham obtido bons resultados. A produção máxima de sulfureto foi de 293.11 mg/L ao fim de 21 dias enquanto o consumo máximo de sulfato ocorreu ao fim de 28 dias, terminando com uma concentração de 185 mg/L. Este controlo serviu principalmente para verificar se a fonte de carbono a ser testada estava a ser utilizada pelas BSR.

O controlo com meio Postgate B original (figura 4.20) serviu para verificar se o inóculo utilizado neste ensaio tinha BSR viáveis. Sendo um meio favorável ao seu crescimento (Postgate, 1966), verificou-se grande atividade de BSR uma vez que ao fim de 7 dias se atingiu a produção máxima de sulfureto (414 mg/L) e ao fim de 14 dias o sulfato já tinha sido praticamente todo reduzido a sulfureto.

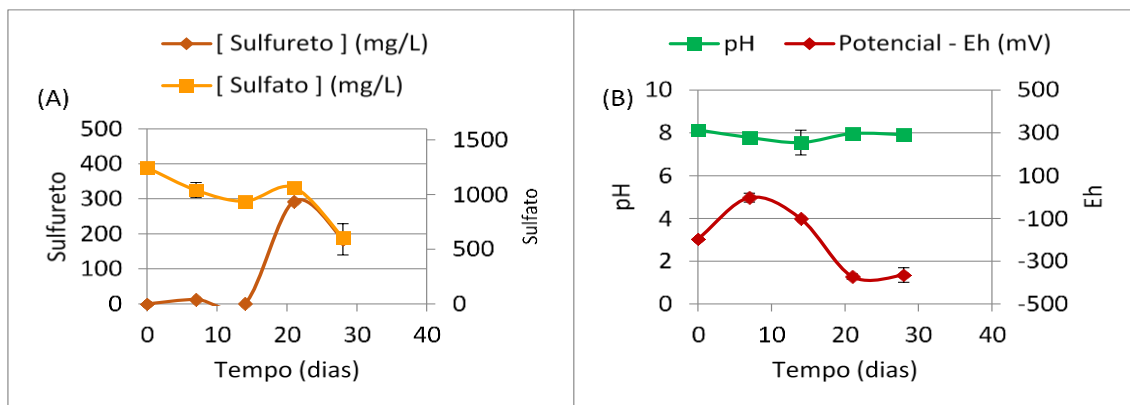


Figura 4.19- Monitorização do controlo positivo 10% (m/v) de Carbocal® em Postgate B modificado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

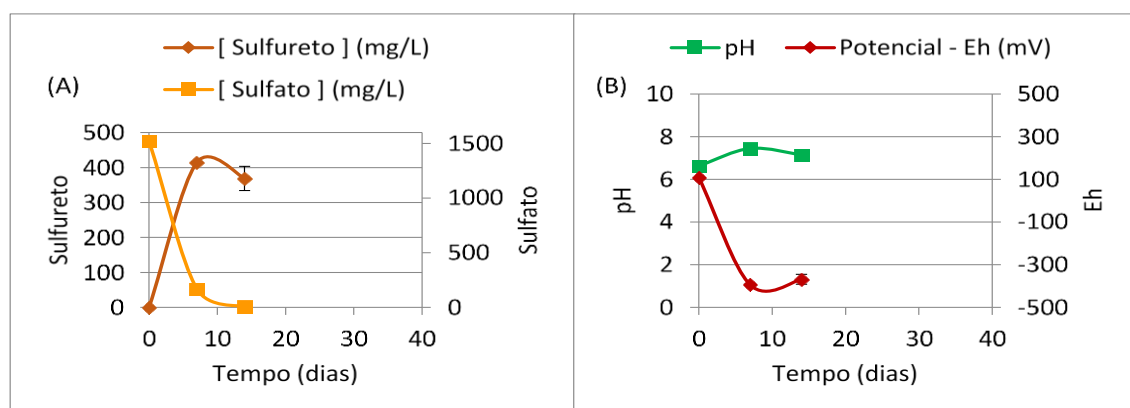


Figura 4.20- Monitorização do controlo com Postgate B original com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do ensaio; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do ensaio.

Os resultados destes controlos positivos (com Postgate B modificado e com Postgate B original) permitiram verificar que tanto o inóculo como a fonte de carbono (Carbocal®) estavam em condições favoráveis ao crescimento de BSR. Sendo assim, tudo aponta para que o principal problema estivesse no efluente que se pretendeu tratar. Tendo em conta que experiências efetuadas por outros autores revelaram que em efluentes com concentrações de zinco superiores a 260 mg/L a atividade das BSR é significativamente inibida (Wei-ting *et al.*, 2014), e que nos testes com 1% e 10% (m/v) de Carbocal®, as concentrações iniciais foram de 358 mg/L e 270 mg/L, respetivamente, este pode ter sido o principal fator inibitório da atividade das BSR. Este pode mesmo ter sido também o fator que inibiu a proliferação de BSR no teste com 20% de Carbocal®, em que a concentração de zinco no início rondou os 100 mg/L, pois em trabalhos anteriores verificou-se que foi este o limite de tolerância a este metal para comunidades de BSR

provenientes de inóculos semelhantes aos utilizados neste trabalho (dados não publicados).

4.2.2.2 Carbocal® como fonte de carbono para as BSR na remediação de DAM de São Domingos

A DAM de São Domingos é um efluente caracterizado por valores de pH baixo, grandes concentrações de sulfato, ferro, cobre e zinco (Costa e Duarte, 2005).

Conhecidas as capacidades do Carbocal® como agente neutralizador da DAM (figura 4.11) e como fonte de carbono para a atividade das BSR (Figura 4.1) testou-se estes dois aspetos em simultâneo.

Foram testadas diferentes quantidades de Carbocal® (1, 10 e 20%) e avaliou-se a atividade das BSR e a remoção de sulfato, ferro, zinco e cobre do efluente.

No teste com 1% (m/v) de Carbocal® a atividade biológica parece ter sido mínima uma vez que a produção de sulfureto foi muito pequena, atingindo o seu valor máximo (6.87 mg/L) ao fim de 7 dias (figura 4.21).

O sulfato nas duas condições testadas (com e sem BSR) aumentou nos primeiros 14 dias, devido à lixiviação do Carbocal®, terminando, ao fim de 42 dias, em concentrações (1282 mg/L no teste com BSR e 1396 mg/L no controlo negativo), bem superiores ao valor máximo recomendado na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

A remoção de zinco e cobre no final da experiência foi praticamente total e igual no teste e no controlo negativo (figuras 4.21 e 4.22), indicando que a formação de precipitados devido ao aumento do pH teve um papel importante nesta remoção. As concentrações finais de zinco (0.5 mg/L no teste e 1.9 mg/L no controlo negativo) ficaram abaixo do valor máximo recomendado (2 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

No caso do cobre a concentração final (0.1 mg/L) no teste com BSR ficou abaixo do limite máximo recomendado (0.2 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto), enquanto no controlo negativo a concentração (1.72 mg/L) acabou por ser superior a esse valor mas ficando ainda assim abaixo do valor máximo admissível (5 mg/L).

O aumento da concentração de ferro no teste com 1% (m/v) de Carbocal® e com BSR está relacionado com o fato do Carbocal® ser um subproduto proveniente do processamento de beterraba sacarina que tem resíduos desta planta, a qual apresenta elevados teores de ferro. Comparando a concentração final de ferro (6.5 mg/L) com os limites para água de rega na legislação portuguesa (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto), que não refere limite máximo admissível para este metal, verifica-se que esta ficou acima do valor máximo recomendado (5 mg/L). Curiosamente, no controlo negativo não houve aumento da concentração de ferro (0.3 mg/L), terminando abaixo do valor máximo recomendado (5 mg/L).

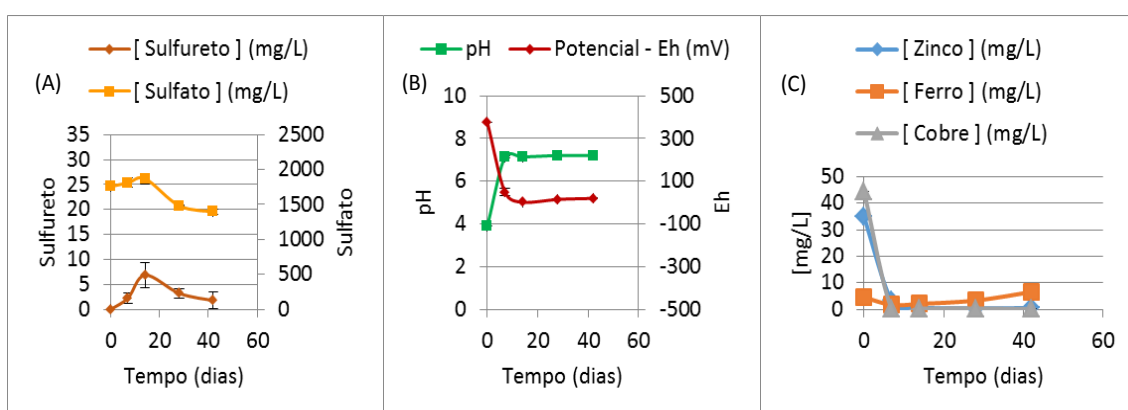


Figura 4.21- Monitorização do teste de 1% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo

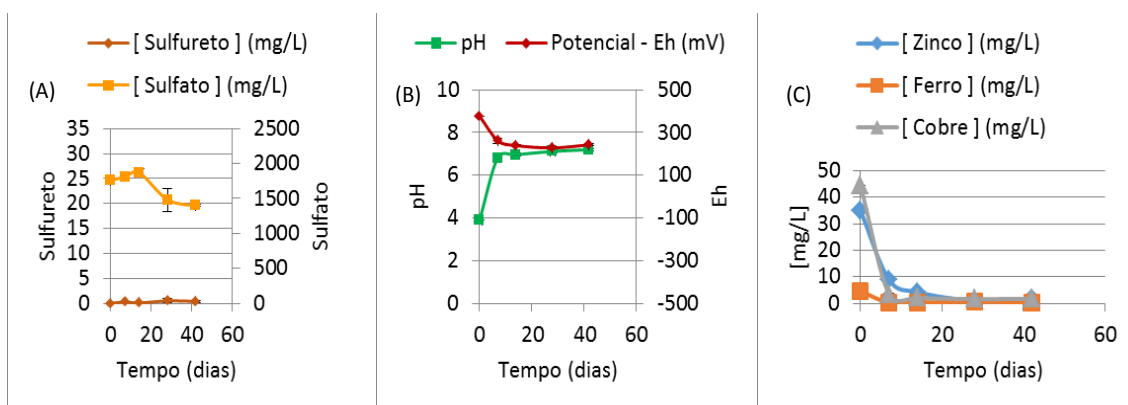


Figura 4.22- Monitorização do controlo negativo de 1% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

Com 10% (m/v) de Carbocal® como fonte de carbono para as BSR na remediação de DAM também foi possível verificar alguma produção de sulfureto, ainda que pequena, indicando alguma atividade de BSR. A produção máxima de sulfureto foi de 6.9 mg/L ao fim de 28 dias (figura 4.23).

A maior remoção de sulfato no teste, com BSR, quando comparado com o controlo negativo é também outro indicador da atividade deste grupo bacteriano. Apesar de ter sido maior no teste, o valor final, correspondeu apenas a uma redução de cerca de 30% da concentração inicial de sulfato. As concentrações finais de sulfato no teste (1349 mg/L) e no controlo negativo (1612 mg/L) ficaram ainda muito acima do valor máximo recomendado (575 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

A remoção de zinco e cobre foi praticamente igual nas duas condições testada, indicando que a precipitação dos metais ocorreu por ação do pH (figuras 4.23 e 4.24). O zinco foi removido praticamente na sua totalidade no teste e no controlo negativo, ficando abaixo do valor máximo recomendado (2 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

A concentração final de cobre no teste (0.1 mg/L) foi inferior ao valor máximo recomendado (0.2 mg/L) enquanto no controlo negativo (1.05 mg/L) foi superior ao valor máximo recomendado mas inferior ao valor máximo admissível (5 mg/L).

Provavelmente devido à passagem de ferro dos resíduos de beterraba do Carbocal® para o meio, acabou por se registar em alguns dias um aumento da concentração de ferro em solução. O aumento da concentração final de ferro em relação ao valor inicial acabou por não ter influência em termos de cumprimento dos limites legais para rega uma vez que a concentração final (1.2 mg/L) no teste e no controlo negativo (1.7 mg/L) foi inferior ao valor máximo recomendado (5 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

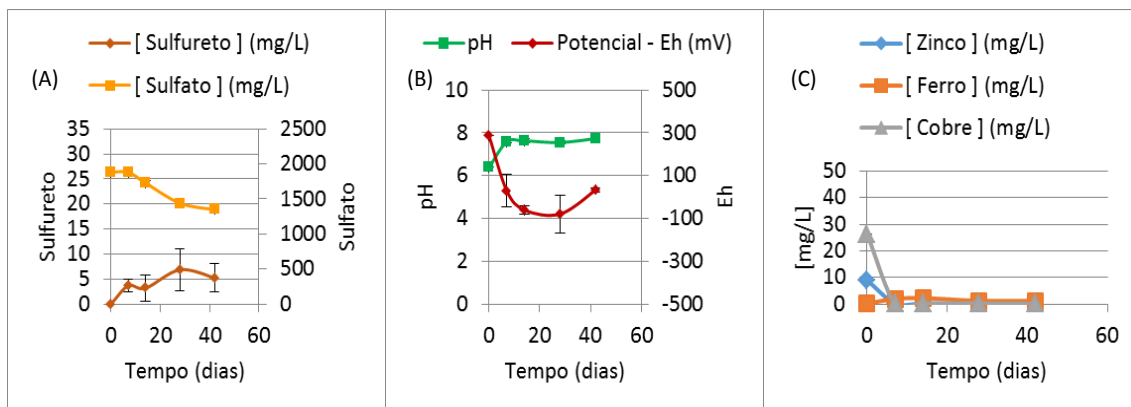


Figura 4.23- Monitorização do teste de 10% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

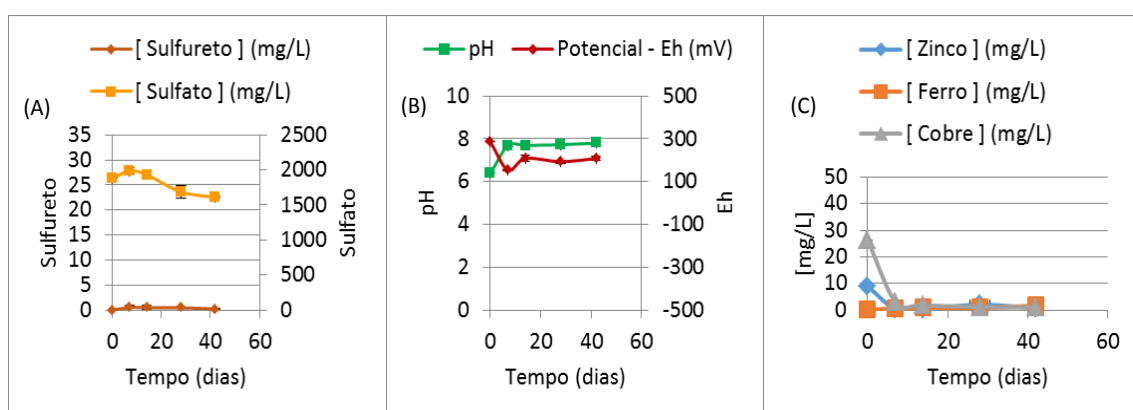


Figura 4.24- Monitorização do controlo negativo de 10% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

De todas as percentagens de Carbocal® testadas (1%, 10% e 20%) como fonte de carbono, para o tratamento da DAM de São Domingos, a de 20% (m/v) foi a que apresentou melhores resultados no que diz respeito à atividade das BSR. No teste com 20% (m/v) e com BSR (figura 4.25), atingiu-se uma produção máxima de sulfureto de 24.3 mg/L, ao fim de 42 dias. No entanto, a remoção de sulfato em relação ao valor inicial, foi de apenas cerca de 30%, ficando a concentração final (1296 mg/L) muito acima do valor máximo recomendado na legislação portuguesa par a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). No controlo negativo (figura 4.26) a concentração final (1742 mg/L) também ficou acima desse valor.

A remoção de metais no teste de 20% (m/v) com BSR pode ter ocorrido por duas vias: pela produção de sulfureto e conseqüente precipitação dos metais sob a forma de sulfureto metálico (Kieu *et al*, 2011; Viggì *et al*, 2009) e através do aumento do pH,

causando a sua precipitação como hidróxidos e consequente remoção (Lee e Saunders, 2003). Assumindo que ao fim de 7 dias, altura de maior decréscimo da concentração de metais em solução, todo o sulfato consumido (113 mg/L) originou sulfureto, ter-se-ia produzido 38 mg/L deste ião (eq. 5).

No mesmo período de tempo (7 dias) foram removidos 1.19 mg/L de zinco e, de acordo com a equação 6, a concentração teórica de sulfureto necessária para precipitar este metal seria 6mg/L.

No caso do cobre, foram removidos 7 mg/L ao fim de 7 dias. Uma vez que o cobre se encontra no mesmo estado de oxidação que o zinco (2+), a equação 6 pode também ser aplicada a este metal. Como tal seria necessária uma concentração de sulfureto de cerca de 4 mg/L para precipitar quantidade de cobre removida no dia 7.

Uma vez que a quantidade teórica de sulfureto produzida seria 38 mg/L e apenas seriam necessários 10 mg/L para precipitar estes metais, restariam 28 mg/L em solução. Ao fim dos 7 dias a quantidade de sulfureto medida (4.95 mg/L) foi bastante inferior a esse valor. Contudo, este sulfureto poderá ser apenas já o que restou depois da precipitação de sulfuretos metálicos e, num meio tão complexo e com um inóculo bacteriano misto, há muitas outras possíveis justificações para este facto.

O zinco foi praticamente removido na sua totalidade, tanto no teste com BSR como no controlo negativo sem BSR, ao fim de 42 dias, terminando em ambos os casos com concentrações (0.2 mg/L no teste e 0.6 mg/L no controlo negativo) inferiores ao valor máximo recomendado (2 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

A concentração de cobre também diminuiu ao longo do tempo nas duas condições testadas (teste com BSR e controlo negativo sem BSR) com 20% (m/v) de Carbocal®. No teste com BSR a concentração final (0.12 mg/L) foi inferior ao valor máximo recomendado (0.2 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto). No controlo negativo a concentração final (0.62 mg/L) acabou por ser superior ao valor máximo recomendado (0.2 mg/L), mas mesmo assim muito inferior (5 mg/L) ao valor máximo admissível.

Também neste caso é provável que os resíduos de beterraba existentes no Carbocal® tenham afetado a evolução da concentração de ferro ao longo do ensaio. Os

valores de ferro foram oscilando ao longo do tempo no teste com BSR enquanto no controlo negativo esse aumento foi progressivo. Ainda assim, em qualquer uma das condições testadas, as concentrações finais (0.5 mg/L no teste com BSR e 3.2 mg/L no controlo negativo) foram inferiores ao valor máximo recomendado na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto).

O facto de nas condições testadas com 20% (m/v) de Carbocal®, os valores de pH serem semelhantes e ainda assim se ter verificado uma maior remoção de metais no teste com BSR parece indicador de que estas bactérias, através da produção de sulfureto, possam ter influenciado as concentrações de metais em solução.

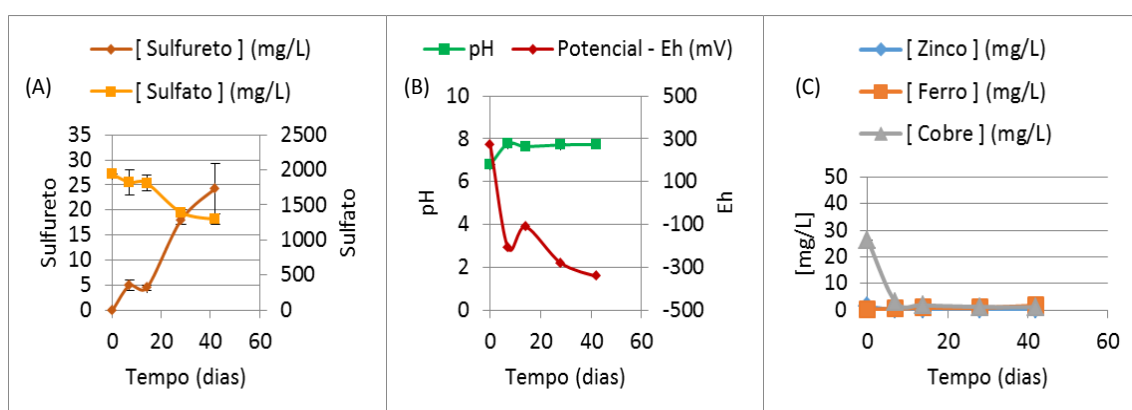


Figura 4.25- Monitorização do teste de 20% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

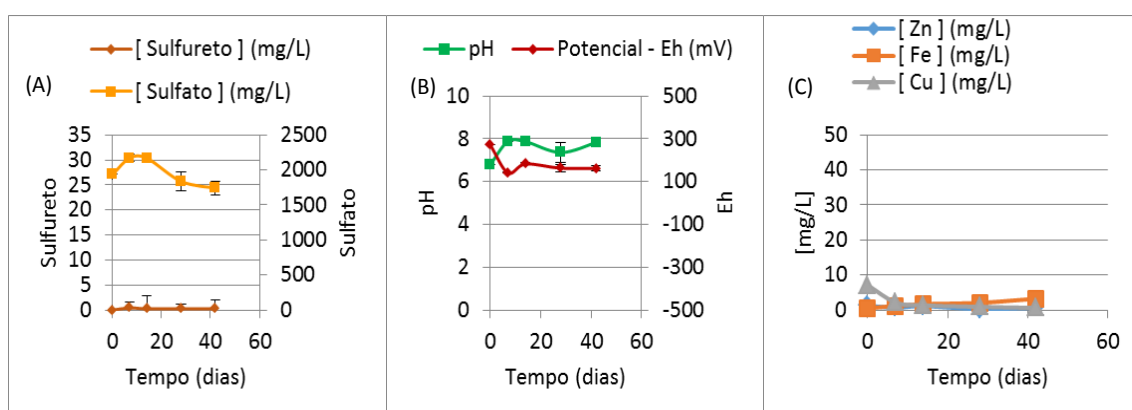


Figura 4.26- Monitorização do controlo negativo de 20% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) – Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

No controlo positivo, com Carbocal® em meio Postgate B sem lactato (figura 4.27) verificou-se atividade de BSR. A produção máxima de sulfureto foi de 219 mg/L

ao fim de 42 dias. O maior consumo de sulfato ocorreu também no mesmo período (42 dias), terminando com uma concentração de 597 mg/L. Isto era expectável uma vez que as condições testadas foram iguais às utilizadas na seleção de produtos viáveis como fontes de carbono para este grupo de bactérias e nas quais se tinham obtido bons resultados.

Este controlo serviu principalmente para verificar se o Carbocal® estava a ser utilizado pelas BSR.

O controlo com meio Postgate B original (figura 4.28) serviu para verificar se o inóculo utilizado neste ensaio tinha BSR viáveis. Sendo um meio favorável ao seu crescimento verificou-se grande atividade de BSR uma vez que ao fim de 7 dias se atingiu a produção máxima de sulfureto (369 mg/L) e ao fim de 14 dias o consumo de sulfato foi praticamente todo consumido.

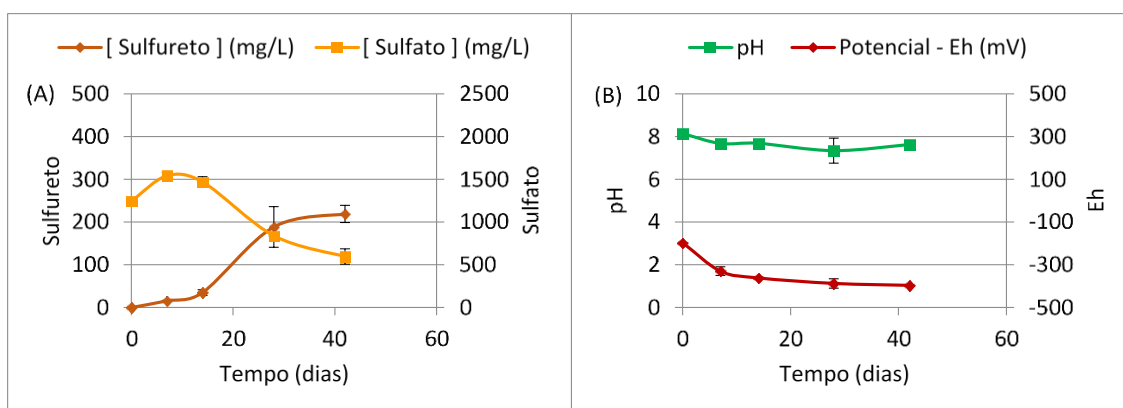


Figura 4.27- Monitorização do controlo positivo 10% (m/v) de Carbocal® em Postgate B modificado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

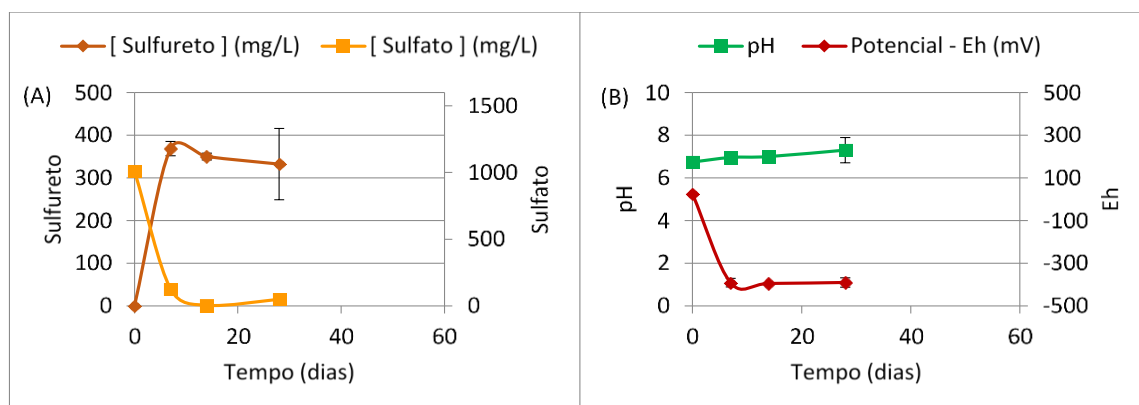


Figura 4.28- Monitorização do controlo com Postgate B original com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do ensaio; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do ensaio.

Em suma, nos testes com 1, 10 e 20% (m/v) de Carbocal® foi possível verificar alguma atividade de BSR através da produção de sulfureto e do consumo de sulfato, no

entanto o principal fator que parece ter contribuído para a remoção de metais foi o aumento do pH pela ação deste subproduto.

Nas diferentes quantidades de Carbocal® testadas (1, 10 e 20 % (m/v)) com BSR foi possível remover o zinco, ferro e cobre na sua totalidade ficando este abaixo dos limites para a água de rega.

O aumento da concentração de sulfato em solução, resultante da lixiviação é um dos principais problemas deste subproduto uma vez que o limite de sulfato está legislado para as águas de rega (575 mg/L) e em nenhum dos testes a sua concentração ficou abaixo desse limite. Sendo assim, o Carbocal® perfila-se como um bom agente de remedição química por ação do pH e como um bom substrato para a utilização de BSR na remediação biológica de metais de águas com pouco sulfato.

4.2.3 Águas ruças como fonte de carbono para as BSR na remediação de efluentes contaminados com metais pesados

As águas ruças são um resíduo resultante da produção de azeite. São efluentes complexos que resultam da mistura de água de vegetação da azeitona, com água de lavagem dos frutos e com água que é adicionada ao processo de extração do azeite (Marinho, 2009).

A sua elevada carga orgânica e principalmente a presença de compostos fenólicos conferem-lhe um grande carácter poluente (Capasso *et al*, 1995). Os fenóis são compostos solúveis em água e sendo as águas ruças compostas maioritariamente por estes compostos a sua remoção torna-se muito difícil (Tsagaraki *et al*, 2007).

Tendo em conta a disponibilidade de águas ruças nos países onde há produção de grandes quantidades de azeite e a sua capacidade para atuarem como fonte de carbono para as BSR em meio Postgate B sem lactato (figuras 4.2 e 4.3), decidiu-se testar em simultâneo a capacidade destas bactérias para utilizar este efluente como fonte de carbono na remediação de efluentes contaminados com metais pesados e a sua capacidade de removerem compostos fenólicos das águas ruças. Isto até porque era importante avaliar se enquanto se resolvia o problema da contaminação de metais não se criava um problema de contaminação com fenóis.

Fizeram-se testes com águas ruças não decantadas na remediação do *vertido de zincado* e da DAM de São Domingos, depois do pH de ambos ser neutralizado por mistura *overnight* com resíduos de rochas calcárias (pedras calcárias) numa razão de 100% (m/v).

4.2.3.1 Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de DAM de São Domingos

Apesar da eficiência das pedras calcárias na neutralização da DAM, constatou-se que após se misturar DAM de pH previamente neutralizado com as águas ruças, o pH da mistura ficava abaixo da gama de valores de pH 5 a 9, ideais para o crescimento das BSR (Elliot, *et al.*, 1998), embora relativamente próximo (Tabela 4.7). Para voltar a neutralizar o pH desta mistura adicionou-se 10% (m/v) de pó de calcite, tal como se havia feito nos testes para seleção de produtos com potencial como fontes de carbono. Com a calcite o valor de pH aumentou para 6.32.

Tabela 4.7- Valores de pH da DAM de São Domingos em diferentes condições.

Efluente	pH
DAM São Domingos	2.52
DAM São Domingos neutralizada (com pedras calcárias)	6.79
DAM São Domingos neutralizada + águas ruças não decantadas e diluídas 1:5	4.23
DAM São Domingos neutralizada + águas ruças não decantadas e diluídas 1:5 + 10% (m/v) de calcite	6.32

Para tratamento de DAM utilizando águas ruças como fonte de carbono para BSR testaram-se misturas com e sem adição de calcite, com o objetivo de analisar também a capacidade de remediação de metais por ação das BSR aos valores de pH resultantes da mistura de águas ruças com os efluentes no limiar de acidez que este grupo de bactérias tolera.

4.2.3.1.1 Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de DAM de São Domingos, na presença de calcite

Para a remediação da DAM de São Domingos testaram-se duas diluições de águas ruças não decantadas em DAM: 1:5 e 1:10 (v/v), com adição de 10% (m/v) de pó de calcite. Como controlo negativo utilizou-se águas ruças centrifugadas (5 min a 4000 rpm) e diluídas 1:5 (v/v) em DAM, também com adição de 10% (m/v) de calcite em pó mas sem inóculo.

A centrifugação das águas ruças para o controlo negativo fez-se para tentar diminuir a quantidade de bactérias nelas presentes. A recente identificação de uma nova espécie de BSR (*Desulfovibrio marreckhensis*) em águas ruças provenientes da produção de azeite em Marrocos (Chamkh *et al.*, 2009) pesou na decisão desta tentativa.

Nesta experiência foi possível verificar atividade das BSR nas duas diluições testadas: 1:5 e 1:10 (v/v) (figuras 4.29 e 4.30).

Na diluição 1:5 um maior consumo de sulfato e uma maior produção de sulfureto sugerem que a atividade das BSR foi mais acentuada. Nesta diluição atingiu-se uma produção máxima de sulfureto de 160 mg/L ao fim de 21 dias, com redução de cerca de 70% do sulfato inicial, o qual no fim do ensaio apresentava uma concentração (207 mg/L) inferior ao valor máximo recomendado (575 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto).

Na diluição 1:10 a menor quantidade de águas ruças (fonte de carbono) acabou por levar a uma menor atividade de BSR. A máxima concentração de sulfureto que se atingiu foi de 61 mg/L ao fim de 21 dias e apenas 26% do sulfato inicial foi reduzido. Apesar disso, a concentração final de sulfato (568 mg/L), tal como na diluição 1:5, acabou por ficar abaixo do limite máximo recomendado (575 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto).

No que diz respeito à bioremoção de metais por ação das BSR, esta experiência não foi elucidativa uma vez que a neutralização da DAM com pedras calcárias, seguida da neutralização da mistura de DAM com águas ruças por adição de resíduos de calcite acabou por remover logo no início grande parte dos metais em solução por precipitação devido à subida do pH. No início dos testes as concentrações de metais já eram muito

baixas e ao fim de 7 dias foram praticamente removidos na sua totalidade, apesar de nesse tempo não haver indícios de atividade de BSR: redução de sulfato a sulfureto (figuras 4.29 e 4.30).

No controlo negativo (figura 4.31), apesar da tentativa de diminuição da quantidade de bactérias das águas ruças utilizadas, no dia 28 observou-se um pequeno aumento da concentração de sulfureto, mas muito reduzido, comparativamente aos testes com inóculo de BSR. Em todo o caso isto sugere a presença de BSR nas águas ruças utilizadas, ficando por descobrir se são da espécie descoberta recentemente em Marrocos, ou outras também já conhecidas, ou até de espécies ainda desconhecidas.

Relativamente à evolução da concentração de fenóis em solução, houve uma diminuição muito significativa nas duas diluições (1:5 e 1:10) testadas com inóculo de BSR, assim como no controlo negativo sem BSR e com diluição 1:5 (Figuras 4.29 e 4.30), o que sugere que esta diminuição parece não ser influenciada pela atividade das BSR. Ainda assim, nas duas diluições testadas, as concentrações finais de fenóis ficaram acima do limite de emissão (0.5 mg/L) para a legislação portuguesa para descargas de águas residuais (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). No entanto, nessa mesma legislação não estão definidos limites para este parâmetro para a água de rega. Assim, a possibilidade de utilização das águas tratadas por esta via para esse fim ficará dependente da tolerância aos fenóis das espécies a regar.

No tempo zero a concentração de metais é muito pequena o que significa que a calcite por si só ao aumentar o pH os remove por precipitação. A vantagem da atividade bacteriana com águas ruças como fonte de carbono é a remoção de sulfato, para valores abaixo dos limites na legislação portuguesa para águas de rega, enquanto a concentração de fenóis nas águas ruças também diminuiu o que é vantajoso do ponto de vista da sua descontaminação.

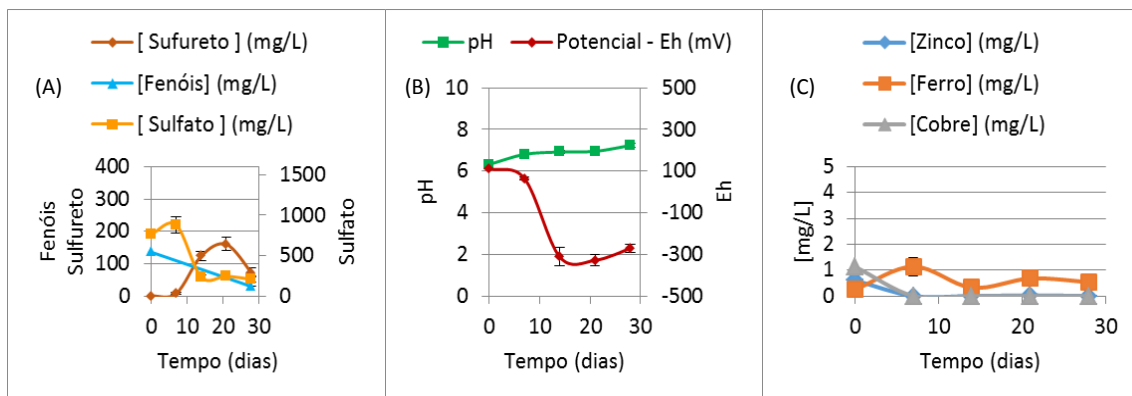


Figura 4.29- Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:5) em DAM de São Domingos com BSR e com 10% (m/v) de calcite: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

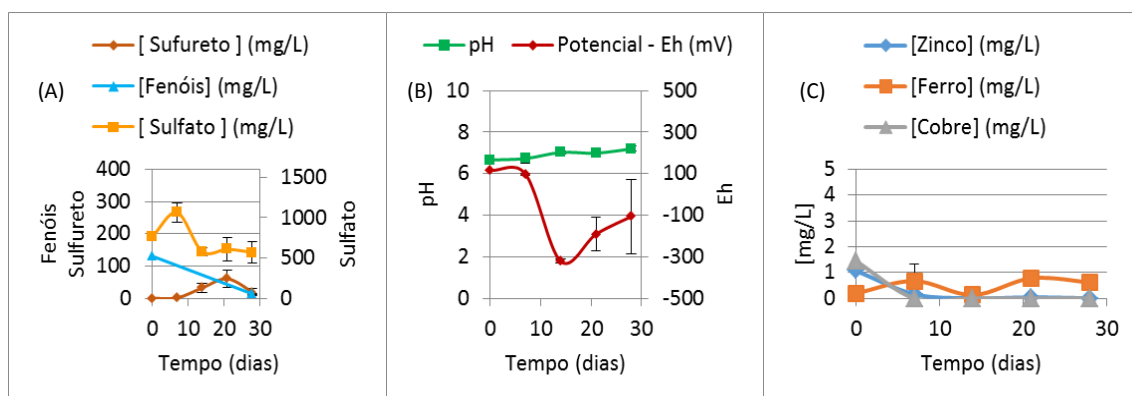


Figura 4.30- Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:10) em DAM de São Domingos com BSR e com 10% (m/v) de calcite: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

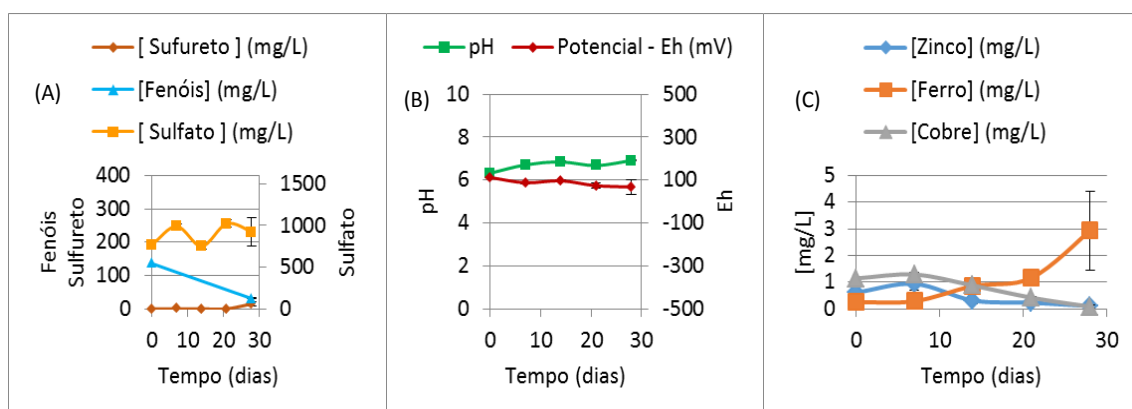


Figura 4.31- Monitorização do controlo negativo com águas ruças não decantadas e centrifugadas (1:5) em DAM de São Domingos com BSR e com 10% (m/v) de calcite: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

4.2.3.1.2 Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de DAM de São Domingos, na ausência de calcite

Uma vez que no teste em que se utilizou calcite para neutralizar o pH das misturas de DAM de São Domingos com águas ruças não decantadas os resultados sugeriram uma atividade de BSR, significativamente maior quando as águas ruças eram menos diluídas 1:5 (v/v) do que quando eram diluídas 1:10, nesta experiência sem calcite testou-se somente a primeira diluição.

Desta vez, apesar da acentuada diminuição da concentração de sulfato sugerir uma atividade significativa de BSR, a pequena concentração de sulfureto atingida pode sugerir o contrário. A quantidade máxima de sulfureto medida foi 3.3 mg/L ao fim de 21 dias (figura 4.32), o que se poderá dever ao valor de pH inicial, 4, que não é adequado para o crescimento e atividade das BSR, mas também a uma provável formação de precipitados de sulfuretos metálicos. De referir, que ao longo do trabalho o pH subiu para valores superiores a 6.5 e portanto favoráveis à atividade das BSR. Na mesma altura verificou-se a diminuição mais acentuada da concentração de sulfato, tendo sido removido cerca de 48% do sulfato inicial (1408 mg/L). Ainda assim a concentração (741 mg/L) acabou por ficar acima do limite máximo recomendado (575 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

No controlo negativo (figura 4.33) o decréscimo da concentração de sulfato não foi tão acentuada, tendo sido removido apenas cerca de 28% do sulfato inicial. Sendo assim, a concentração final (1017 mg/L) acabou por também ser superior ao limite máximo recomendado (575 mg/L) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

Apesar de o pH inicial (4.28) não estar no intervalo de valores (5-9) ideais para o crescimento de BSR (Elliot *et al*, 1998), estas conseguiram, através de uma pequena atividade produzir algum sulfureto, aumentando o pH, o que também contribuí para a precipitação dos metais em solução.

Os resultados do controlo negativo acabam por suportar a hipótese da remoção de metais através da atividade das BSR, uma vez que, a ausência de inóculo fez com que o pH fosse constante ao longo do tempo, em valores próximos do inicial, e acabou por não ocorrer remoção significativa de metais.

A remoção de metais no teste com inóculo de BSR foi visível e as concentrações finais dos metais analisados (0.67 mg/L de ferro, 0.20 mg/L de zinco e 0.11 mg/L de cobre) foram menores que os respectivos os valores máximos recomendados (5mg/L no ferro, 2 mg/L no zinco e 0.2 mg/L no cobre) na legislação portuguesa para a água de rega (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto).

A concentração de fenóis diminuiu, ao fim de 28 dias, no teste (figura 4.32) e no controlo negativo (figura 4.33) mas em ambos os valores finais (5.5 mg/L no teste e 5.0 mg/L no controlo) foram superiores ao limite de emissão (0.5 mg/L) na legislação portuguesa para descargas de águas residuais (Decreto-Lei n.o 236/98 de 1 de Agosto). Estes resultados sugerem que a diminuição da concentração não se relacionou com a atividade das BSR tal como se tinham verificado nos testes de remediação com águas ruças na presença de resíduos de calcite.

Como na legislação portuguesa para a água de rega não estão definidos limites para a concentração de fenóis, a possibilidade de utilização para esse fim de águas tratadas desta forma fica dependente da tolerância aos fenóis das espécies a regar.

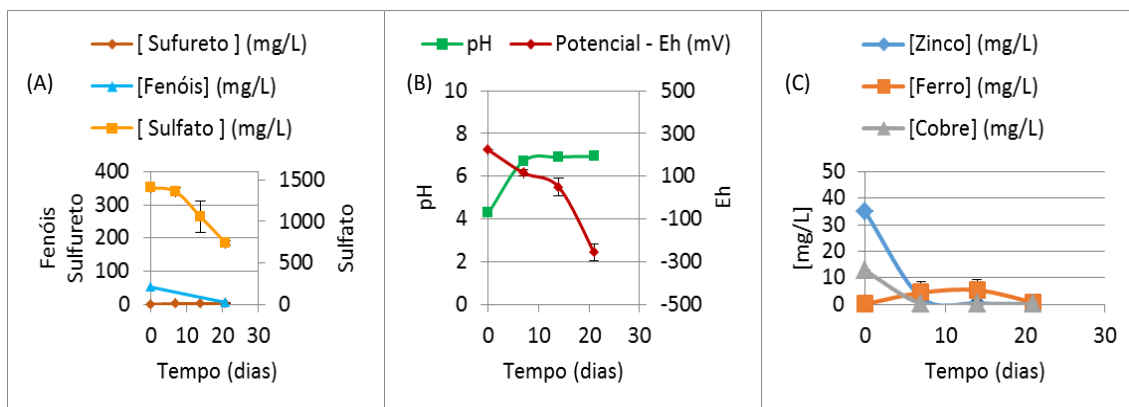


Figura 4.32- Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:5) em DAM São Domingos com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

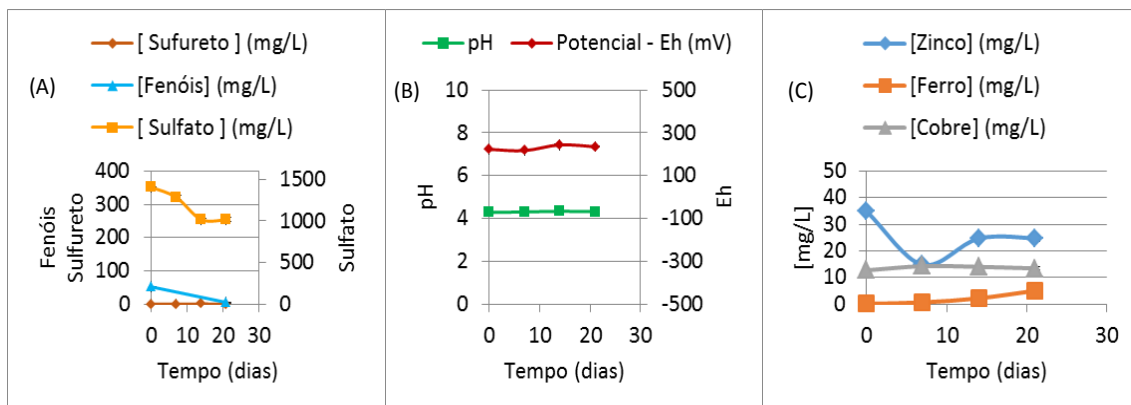


Figura 4.33- Monitorização do controlo negativo com águas ruças não decantadas (1:5) em DAM de São Domingos sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco, de ferro e de cobre ao longo do tempo.

4.2.3.2 Águas ruças como fonte de carbono, para as BSR, no tratamento de *vertido de zinco*, na ausência de calcite

Uma vez que na experiência de remediação de DAM de São Domingos com águas ruças em que se adicionou calcite à mistura (águas ruças + DAM São Domingos) os metais acabaram por ser removidos por via química logo no início do ensaio e que mesmo no ensaio sem adição de calcite houve alguma redução de sulfato a sulfureto, os testes de utilização deste produto ao tratamento do *vertido de zinco* (previamente neutralizado com pedras calcárias) com BSR fizeram-se apenas sem a calcite adicionada, com o objetivo de analisar a capacidade de remediação de metais deste efluente por ação das BSR em pH 4.77 (tabela 4.8) perto dos limites de acidez tolerados por este grupo de bactérias.

Tabela 4.8- Valores de pH do *vertido de zinco* em diferentes condições.

Efluente	pH
<i>vertido de zinco</i>	2.06
<i>vertido de zinco</i> neutralizado com pedras calcárias	6.92
<i>vertido de zinco</i> neutralizado + águas ruças não decantadas diluídas 1:5	4.77

Mesmo tendo em conta o facto de a concentração de sulfato (16 mg/L) no *vertido de zinco* ser baixa resolveu-se testar a remediação de metais deste efluente por ação de

BSR “alimentadas” com águas ruças não decantadas, uma vez que a caracterização inicial deste subproduto revelou uma concentração de 530 mg/L (Tabela 4.1).

Uma vez que, considerando as caracterizações iniciais dos efluentes e potenciais fontes de carbono, seria espectável uma concentração de apenas cerca de 171 mg/L de sulfato numa diluição de 1:5 (v/v) de águas ruças não decantadas em *vertido de zincado* e que num trabalho anterior efetuado neste laboratório se testaram com sucesso culturas de BSR com um mínimo de 150 mg/L deste anião (Carrier *et al.*, 2014), não se testou neste caso a diluição 1:10.

Mais uma vez, tal como no ensaio em que se testou Carbocal® como fonte de carbono, no tratamento do *vertido de zincado*, utilizando águas ruças como fonte de carbono, a evolução das concentrações de sulfato e sulfureto não indicam atividade de BSR (figura 4.34). Para a inibição das BSR contribuíram certamente três condições iniciais: uma baixa concentração de sulfato, um baixo pH e uma elevada concentração de zinco. A concentração inicial de sulfato (39 mg/L) foi muito mais baixa do que era expectável, ficando num valor desfavorável à proliferação de BSR e o pH inicial estava como anteriormente referido no limiar da tolerância destas bactérias. Quanto ao zinco, o valor inicial neste teste (327 mg/L) está acima dos valores máximos já reportados como limites de tolerância das BSR a este metal: 260 mg/L (Wei-ting, *et al.*, 2014).

As diferenças observadas nas concentrações de metais entre o teste com BSR e o controlo negativo (figura 4.35) estão relacionadas com as pequenas diferenças de pH entre eles. Essas duas condições testadas terminaram com concentrações de zinco de 272 mg/L no teste e 323 mg/L no controlo negativo e de 7.6 mg/L ferro no teste com BSR e 13.4 mg/L no controlo negativo, superiores aos valores máximos recomendados na legislação portuguesa para a água de rega (2 mg/L no zinco e 5 mg/L no ferro).

A concentração de fenóis diminuiu significativamente ao fim de 28 dias nas duas condições testadas para valores relativamente próximos, indicando que a remoção deste composto ocorreu por via química e não pela atividade de BSR. Apesar dessa diminuição, as concentrações finais, 4.8 mg/L no teste com BSR e 6.0 mg/L no controlo negativo, ficaram ainda acima do limite de emissão (0.5 mg/L) da legislação portuguesa para descargas de águas residuais (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto).

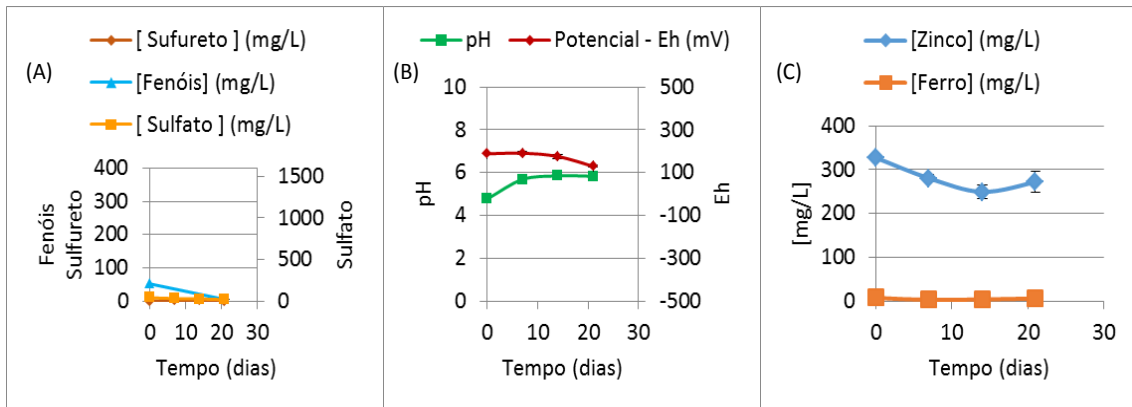


Figura 4.34- Monitorização do teste com águas ruças não decantadas (1:5) em *vertido de zincado* com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco e ferro ao longo do tempo.

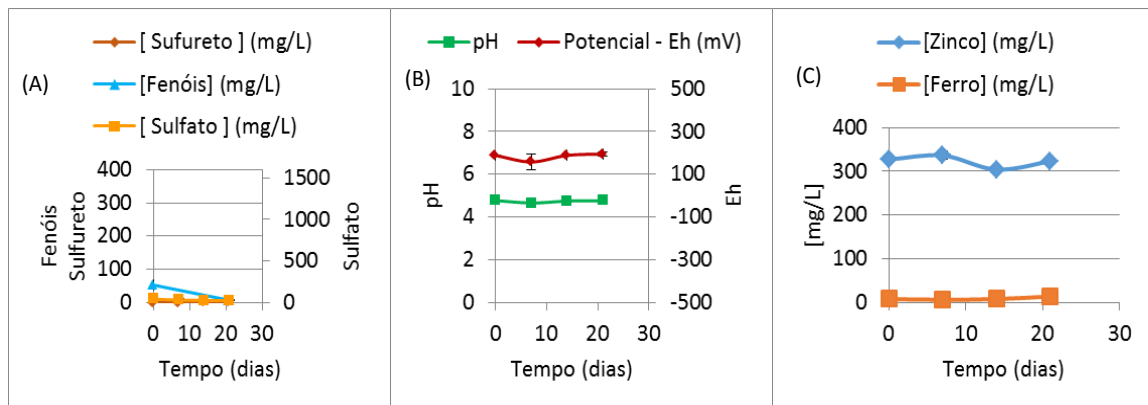


Figura 4.35- Monitorização do controlo negativo com águas ruças não decantadas (1:5) em *vertido de zincado* sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo; (C) -Concentrações de zinco e ferro ao longo do tempo.

4.2.3.3 Controlos em meio de cultura utilizados nos testes de águas ruças como fonte de carbono para BSR na remediação de metais

Um dos controlos positivos (figura 4.36) consistiu em águas ruças não decantadas e diluídas 1:5 em meio Postgate B sem lactato, sem adição de calcite, ao qual se adicionou 5% (v/v) de inóculo duma cultura de BSR. O pH inicial do meio Postgate B original (com lactato) situa-se normalmente entre 6.5 e 8 (Postgate, 1966). Neste caso o meio sem lactato foi ajustado para 7.0 mas a adição de águas ruças, devido ao seu pH ácido, acabou por levar a uma diminuição do pH para 5.30. Ainda assim os resultados sugerem uma boa atividade de BSR. A produção máxima de sulfureto foi de 92.3 mg/L ao fim de 14 dias e

a concentração de sulfato foi diminuindo ao longo do tempo (28 dias) sendo no final 50% do valor inicial.

Sabendo-se que foi identificada uma nova espécie de BSR (*Desulfovibrio marreckhensis*) em águas ruças provenientes de lagares de azeite de Marrocos (Chamkh, et al., 2009) e sendo as águas ruças uma boa fonte de carbono para BSR, como ficou provado nos testes de seleção compostos orgânicos de baixo custo, era importante avaliar a atividade de BSR provenientes das próprias águas ruças utilizadas neste trabalho. Com este fim fez-se um controlo negativo com águas ruças não decantadas diluídas 1:5 em meio Postgate B sem lactato, sem inóculo de cultura de BSR.

Apesar duma pequena diminuição da concentração de sulfato e duma evolução do potencial redox de valores positivos para valores negativos (figura 4.37) sugerirem alguma atividade de BSR, a evolução da concentração de sulfureto não permite confirmar essa atividade.

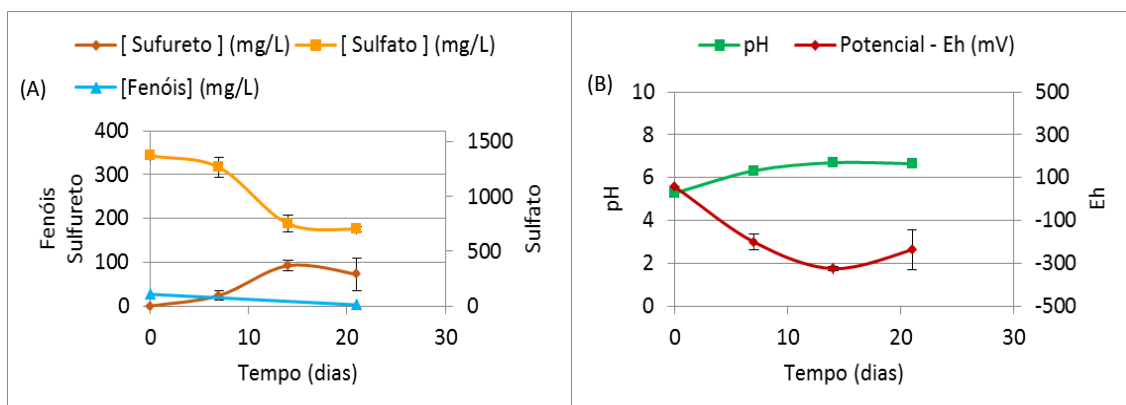


Figura 4.36- Monitorização do controlo positivo com águas ruças não decantadas (1:5) em Postgate B modificado com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

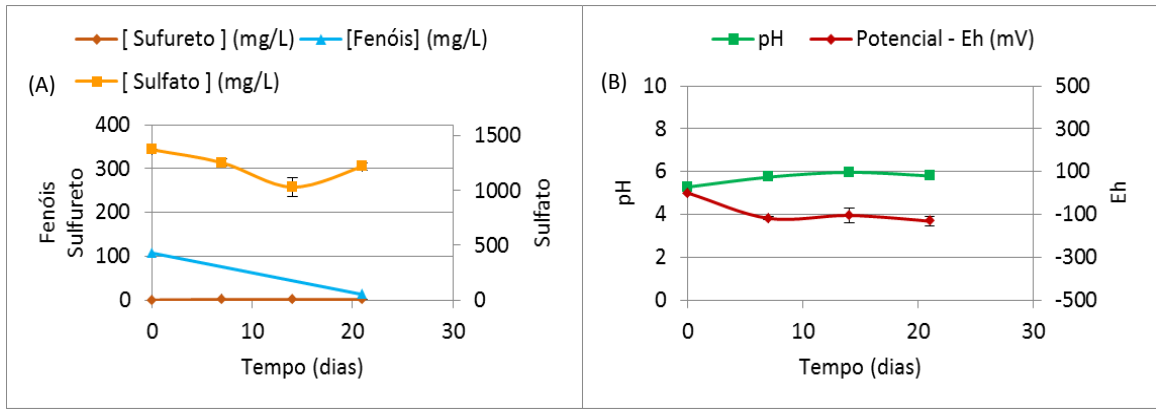


Figura 4.37- Monitorização do Postgate B modificado com águas ruças não decantadas (1:5) sem BSR: (A) - Concentrações de sulfureto, de sulfato e de fenóis ao longo do tempo; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do tempo.

Como controlo positivo geral, utilizou-se o meio Postgate B original inoculado com a cultura de BSR utilizada nas experiências. A evolução deste controlo (figura 4.38) confirmou que o inóculo utilizado neste ensaio era rico em BSR viáveis: ao fim de apenas 7 dias atingiu-se a concentração máxima de sulfureto (456.4 mg/L) com o sulfato praticamente todo consumido.

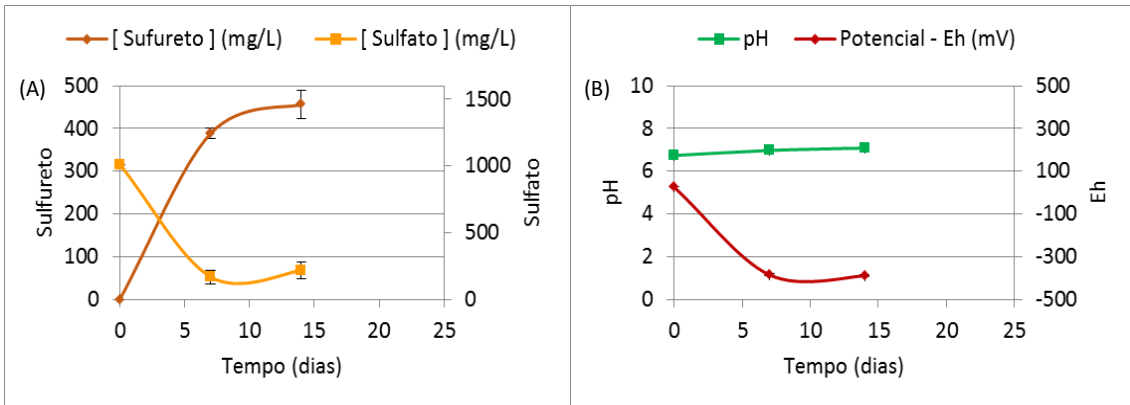


Figura 4.38- Monitorização do controlo com Postgate B original com BSR: (A) - Concentrações de sulfureto e de sulfato ao longo do ensaio; (B) - Valores de pH e Eh ao longo do ensaio.

5. Resumo dos resultados obtidos

De todos os diferentes subprodutos/efluentes testados como fontes de carbono para o crescimento de BSR, em alternativa ao lactato de sódio em meio Postgate B modificado, apenas quatro levaram a resultados que indicam uma atividade significativa de BSR nos primeiros 2 meses de ensaio: Carbocal®, águas ruças, melão de laranja sem conservante e água da Lagoa 1 da ETAR de São Domingos.

O Carbocal®, para além de se revelar viável enquanto fonte de carbono para BSR, mostrou também fazer aumentar a concentração de sulfato, o que pode ajudar a criar condições favoráveis a estas bactérias e confirmou ser um bom agente químico para a neutralização do pH dos dois efluentes ácidos contaminados com metais testados (DAM de São Domingos e *vertido de zincado*), o que contribuí para a remoção de metais em solução nos mesmos.

Confirmadas estas propriedades do Carbocal®, este foi um dos produtos selecionados para testes de bioremediação por ação de BSR nestes dois efluentes.

Nos testes com DAM de São Domingos os resultados indicam atividade de BSR com todas as quantidades de Carbocal® testadas: 1, 10 e 20% (m/v). No entanto, no teste com 20% (m/v) a atividade destas bactérias foi mais significativa, atingindo-se uma concentração de sulfureto cinco vezes maior (cerca de 25 mg/L).

Relativamente à eficiência para bioremediação nesta experiência mesmo as menores quantidades de Carbocal® testadas (1 e 10%) levaram a que ao fim de 7 dias fossem removidos quase na totalidade dois dos metais analisados (Zn e Cu), sendo as suas concentrações finais abaixo dos limites máximos recomendados na legislação portuguesa para água de rega (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). Com 20% de Carbocal® a concentração inicial de Zn já se encontrava abaixo dos limites máximos recomendados continuando assim ao longo do tempo. Quanto ao Fe, a dissolução do Carbocal® leva a um pequeno aumento da sua concentração, para todas as concentrações testadas de Carbocal®. Apesar disso, este metal ficou sempre abaixo ou muito próximo do limite máximo recomendado para água de rega em Portugal e neste caso não há limite máximo admissível.

O papel das BSR na remoção de metais nesta experiência é evidente apenas no ensaio com 1% de Carbocal® pois neste caso as concentrações de Zn e Cu no controlo negativo (sem BSR) ao fim de 7 dias são significativamente maiores que no teste com BSR: no controlo negativo [Zn] = 8.9 mg/L e [Cu] = 3.4 mg/L, no teste com BSR [Zn] = 3.2 mg/L e [Cu] = 0.1 mg/L.

Nos ensaios com 10 e 20% de Carbocal® não foi possível avaliar o papel das BSR pois logo na primeira recolha para monitorização da sua atividade (7 dias de ensaio) a remoção de metais nos testes e respetivos controlos negativos foi semelhante.

Nestes dois ensaios ao fim de 7 dias o pH da DAM já tinha subido para valores próximos de 8, tanto nos testes como nos controlos negativos, levando a uma precipitação dos metais antes de se poder avaliar o efeito das BSR ao contrário do que aconteceu com 1% de Carbocal®, em que o pH subiu apenas para valores próximos de 7, o que permitiu que ficassem ainda em solução alguns metais no controlo negativo.

Apesar da eficiência do Carbocal® mostrada na remoção de metais, e deste produto se ter revelado uma fonte de carbono viável para as BSR, a atividade destas bactérias no tratamento de DAM da mina de São domingos nunca foi suficiente para remover o sulfato até valores abaixo do limite deste anião para águas de rega em Portugal (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). Por este motivo, o Carbocal® perfila-se mais como um possível agente de remediação química de águas ácidas contaminadas com metais através da neutralização do pH.

Na experiência com Carbocal® em *vertido de zincado* os resultados sugerem que este efluente inibe a atividade das BSR. Em nenhuma das quantidades de Carbocal® testadas (1, 10 e 20% (v/v)) como fonte de carbono, e neste caso também como fonte de sulfato, houve sinais de proliferação de BSR: redução de sulfato a sulfureto, fazendo baixar o potencial redox para valores abaixo de -100 mV. Apesar disso, nesta experiência confirmou-se novamente que este produto promove a remoção de metais por via química através da neutralização do pH.

Os testes de seleção permitiram identificar as águas ruças como potenciais fontes de carbono para as BSR, com base nas percentagens próximas de 95% de redução de sulfato verificadas com a utilização das mesmas (praticamente iguais nos dois tipos deste subproduto: decantado e não decantado) e na produção máxima de sulfureto, que foi ligeiramente maior nas águas decantadas diluídas 1:5 (226 mg/L) do que nas não

decantadas diluídas 1:6 (149 mg/L). Esta diferença na produção máxima de sulfureto pode estar relacionada com as variações do sulfato que apresentaram um comportamento errático, nas águas ruças decantadas, o que sugere que as águas ruças decantadas devem ser mais ricas em compostos orgânicos que podem ser imediatamente utilizados pelas BSR, enquanto as águas ruças não decantadas devem ter outros compostos que só podem ser utilizados mais tarde pelas BSR, depois de sofrerem alguma alteração por via metabólica ou química.

Após a observação destes resultados favoráveis, decidiu-se testar, em simultâneo, a eficácia das BSR na utilização das águas ruças como fonte de carbono alternativa, na remediação da DAM de São Domingos e *vertido de zincado* para diminuição das concentrações de metais pesados e na remoção de compostos fenólicos (característicos pela sua toxicidade elevada) deste subproduto. Para isso, efetuaram-se dois ensaios teste para tratamento da DAM previamente neutralizada, usando as águas ruças não decantadas, um sem calcite e outro com calcite. No teste com águas ruças com calcite, verificou-se maior atividade de BSR, já que a adição de calcite permitiu subir o pH inicial da mistura (águas ruças + efluente) para valores ideais ao crescimento das BSR (5 a 9 (Elliott *et al.*, 1998)) e permitiu a remoção dos metais em solução logo no início do ensaio. Já no teste com águas ruças sem calcite, o pH diminuiu para valores desfavoráveis ao crescimento de BSR (4.23), não tendo sido suficiente a neutralização prévia da DAM de modo a possibilitar a máxima atividade possível das BSR. No entanto, este segundo teste permitiu verificar que, mesmo assim, a atividade das BSR foi responsável pela remoção de metais da DAM.

As águas ruças não decantadas demonstraram ser uma fonte de carbono de baixo custo favorável à atividade de BSR em testes de remediação. A adição de um agente neutralizador às águas ruças foi fundamental para aumentar a atividade destas bactérias.

Para o tratamento do *vertido de zincado* foram testadas as mesmas condições das águas ruças que as testadas para DAM, sem calcite. Contudo, a atividade das BSR não foi efetiva, devido possivelmente a: elevada concentração inicial de zinco inicial (327 mg/L), baixa concentração de sulfato (18 mg/L) e pH ácido (4.77), condições que se sabe serem inibidoras do crescimento destas bactérias.

Apesar da atividade de BSR, da remoção de metais, e da concentração de fenóis, principal poluente das águas ruças, não ter aumentado e, pelo contrário, ter sido reduzida

para cerca de um décimo do seu valor inicial, esta última ficou ainda aproximadamente 10 vezes acima do limite de emissão (0.5 mg/L) na legislação portuguesa para descargas de águas residuais (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto). Como na legislação portuguesa para a água de rega não se encontram definidos limites para a concentração de fenóis, a possibilidade de utilização destas águas tratadas com BSR para esse fim, fica dependente da tolerância das espécies a regar, aos fenóis.

6. Conclusões

- De todos os diferentes subprodutos/efluentes testados como fontes de carbono alternativos, ao lactato de sódio em meio Postgate B modificado, para o crescimento de BSR, apenas com quatro (Carbocal®, águas ruças, melão sem conservante e água da Lagoa 1 da ETAR de São Domingos) se verificou atividade significativa das BSR;
- O Carbocal® acabou por se mostrar como um bom agente neutralizador de pH, permitindo a remoção dos metais dos efluentes. Enquanto fonte de carbono para as BSR, no tratamento do *vertido de zincado* e de DAM de São Domingos, apenas no teste com 20% (m/v) com a DAM foi possível verificar a atividade das mesmas;
- Nos testes das águas ruças como fonte de carbono também se verificou atividade das BSR, principalmente nos testes onde se adicionou calcite. A adição de calcite permitiu neutralizar o pH inicial da mistura (subproduto + efluente contaminado com metais pesado) o que levou a uma maior atividade bacteriana. Apesar desta diferença (entre com e sem calcite), em ambos os casos houve uma remoção quase total dos metais da DAM. Nestes testes a quantidade de fonte de carbono adicionada também acabou por ter influência na atividade das BSR. A adição de mais quantidade de fonte de carbono traduziu-se num maior consumo de sulfato e numa maior produção de sulfureto.

7. Perspetivas futuras

No futuro poder-se-á:

- Testar e otimizar a utilização de águas ruças como fonte de carbono para BSR num reator a funcionar em fluxo contínuo para tratamento de DAM de São Domingos;
- Testar os restantes subprodutos que deram bons resultados como fonte de carbono para BSR no tratamento de efluentes contaminados com metais (por exemplo: *vertido de zincado* e DAM), primeiro em *batch* e posteriormente nos casos em que os resultados forem promissores também em reatores de fluxo contínuo;
- Otimizar a utilização de reatores com BSR ou desenvolver outro tratamento acoplado ao primeiro, de preferência biológico, para refinar a remoção dos fenóis das águas ruças até valores abaixo dos limites legais, procurando resolver um problema atualmente urgente, que consiste na dificuldade em tratar localmente as águas ruças;
- Utilizar o Carbocal® como alternativa aos agentes alcalinos tradicionalmente aplicados no tratamento de efluentes contaminados com metais pesados.

8. Bibliografia

- Akcil, A., & Kolgas, S. (2006). Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production*. 14: 1139-1145.
- Álvarez-Valero, A. M., Pérez-López, R., Matos, J., Cápitan, M. A., Nieto, J., Sáez, J., & Carballo, M. (2008). Potential environmental impact at São Domingos mining district (Iberian Pyrite Belt, SW, Iberian Peninsula): evidence from a chemical and mineralogical characterization. *Environmental Geology*. 65: 117-120.
- Andrade, F., & Schermerhorn, L. (1971). Aljustrel e Gaivão. Principais Jazigos Minerais do Sul de Portugal. 4. pp. 32-59.
- Aranvantis-Zafiridis, G., Tzia, C., Orepoulou, V., & Thomopoulos, C. D. (1994). Fermentation of Orange Processing Wastes for Citric Acid Production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 65: 117-120.
- Azabou, S., & Mechichi, T. S. (2007). Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. 20: 173-178.
- Azapagic, A. (2004). Developing a framework for sustainable development indicators for the mining and minerals industry. 12: 639-662.
- B., C., Laake, M., & Lien, T. (1996). Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria: Results from a bench scale experiment. *Water Research Journal*. 30: 1617-1624.
- Barakat, M. A. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*. 4: 361-377.
- Barros, R., Jesus, C., Martins, M., & Costa, M. C. (2009). Marble stone processing powder residue as chemical adjuvant for the biologic treatment of acid mine drainage. *Process Biochemistry*. 44: 477-480.
- Bates, R. P., Morris, J. R., & Crandall, P. G. (2001). Principles and practices of small- and medium-scale fruit juice processing. *FAO Agricultural services bulletin*. ISBN: 92-5-104661-1
- Benner, S. G., Blowes, D. W., Herbert Jr., R. B., & Ptacek, C. J. (1999). Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. *Environmental Science & Technology*. 33: 2793-2799.
- Bicao, P., Jihua, W., Xuping, S., & Zhi, L. F. (2008). Effects of zinc bath temperature on the coatings of hot-dip galvanizing. *Surface & Coatings Technology*. 202: 1785-1788.
- Blika, P. S., Stamatelatos, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Anaerobic Digestion of Olive Mill Wastewater. *Global NEST Journal*. 11(3): 364-372.

- Bloemhof-Ruwaard, J. M., Van Wassenhove, L. N., & Weaver, P. M. (1996). An Environmental Life Cycle Optimization Model for the European Pulp and Paper Industry. *Omega, International Journal of Management Science*. 24(6): 615-629.
- Boshoff, G., Duncan, J., & Rose, P. D. (2004). Tannery effluent as a carbon source for biological sulphate reduction. *Water Research*. 38: 2651-2658.
- Burgess, J. E., & Stuetz, R. M. (2002). Activated Sludge for the treatment of sulphur-rich wastewaters. *Minerals Engineering*. 15: 839-846.
- Can, O. T. (2014). COD removal from fruit-juice production wastewater by electrocoagulation and electro-Fenton processes. *Destination and Water Treatment*. 52: 65-73.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M. A., & Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*. 79(4): 393-398.
- Carlier, J. D., Barros, R. J., & Costa, M. C. (2014). Testing Sulphate Reducing Bacteria for the bioremediation of metal-contaminated wastewaters with relatively low sulfate concentrations. *International Congress on Green Chemistry and Sustainable Engineering*. Barcelona, Spain, July 29.
- Carmen, M., Neculita, Z., & Gerald, J. (2008). Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials*. 157: 358-366.
- Chamkh, F., Sproer, C., Lemos, P., Besson, S., El Asli, A., Bennisse, R., Qatibi, A. (2009). *Desulfovibrio marreckhensis* sp. nov., a 1-4 tyrosol-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from olive mill wastewater. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. 59: 936-942.
- Chao-hai, W., Wen-xiang, D. Z., & Chao-fei, W. (2007). Characteristics of high-sulfate treatment by two-phase anaerobic digestion process with Jet-loop anaerobic fluidized bed. *Journal of Environmental Sciences*. 19: 264-270.
- Chelliapan, S., Mahat, S. B., Din, M. F., Yuzir, A., & Otham, N. (2012). Anaerobic Digestion of Paper Mill Wastewater. *Iranica Journal of Energy & Environment*. 3: 85-90.
- Cocos, I., Zagury, G. J., Clément, B., & Samson, R. (2002). Multiple factor design for reactive mixture selection for use in reactive walls in mine drainage. *Water Research*. 36(1): 1667-177.
- Coelho, P. C., & Teixeira, J. P. (2011). Mining Activities: Health Impacts. *Elsevier*, 788-802.
- Costa, M. C., & Duarte, J. C. (2005). Bioremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water Air Soil Pollution*. 165: 325-345.

- Cravotta III, C. A., & Trahan, M. K. (1999). Limestone drains to increase dissolved metals from acidic mine drainage. *Applied Geochemistry*. 14: 581-606.
- Cravotta III, C. A., & Trahan, M. K. (1999). Limestone drains to increase dissolved metals from acidic mine drainage. *Applied Geochemistry*. 14: 581-606.
- Das, B. K., Gauri, S. S., & Bhattacharya, J. (2013). Sweetmeat waste fractions as suitable organic carbon source for biological sulfate reduction. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 82: 215-223.
- Dev, S., Patra, A. D., Mukherjee, A., & Bhattacharya, J. (2015). Suitability of different growth substrates as source of nitrogen for sulfate reducing bacteria. *Biodegradation*. 26: 1-16.
- Doshi, S. (2006). *Bioremediation of Acid Mine Drainage Using Sulfate-Reducing Bacteria*. University of Indiana, National Network of Environmental Management Studies Fellow. Indiana: U.S. Environmental Protection Agency.
- Drury, W. (1999). Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid substrate reactors. *Water Environmental Research*. 71: 1244-1250.
- Duarte, J., Pires, S. O., Paixão, S. M., & Sááguas, M. C. (2011). New approaches to olive mill wastes bioremediation. In J. D. Corrigan, *Olive Oil and Health*. Nova Science Publishers, Inc.
- Durkin, T. V., & Herrmann, J. G. (1994). Focusing on the problema of Mining Wastes: Na Introduction to Acid Mine Drainage. In U. E. Publication, *In Maiaging Environmental Problems at Inactive and Abandoned Mine Sites*. US EPA Seminar Publication.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. C., & Ekwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*. 2(5): 112-118.
- Elliott, P., Rasuga, S., & Catcheside, D. (1998). Growth of sulfate reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research Journal*. 3724-3730.
- Emaby, A. M., Masoud, A. A., Marey, H. S., Shaban, N. Z., & Ghonaim, T. M. (2014). SpringerPlus. *Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from Bacillus licheniformis SHG10*. 3 (327): 1-13.
- Empresa de Desenvolvimento Mineiro, S. (2009). Environmental Rehabilitation of Abandoned Mines in Portugal. *Meeting on Inventories of Closed Mine Waste Facilities*. Budapest, Hungary, 11-13 May 2009.
- Ezechi, E. H., Isa, M. H., Kutty, S. R., & Yaqub, A. (2014). Boronremoval from produced water using electrocoagulation. *Preprocess Safety and Environmental Protection*. 92(6): 509-514.

- Faostat. (1994). *Definition and classification of commodities: Sugar crops and Sweeteners and derived products*. Obtido em 16 de Setembro de 2015, de <http://www.fao.org/es/faodef/fdef03e.HTM>
- Ferraz, M. M. (2012). *Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes de lagares de azeite*. Tese de mestrado em Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Lisboa, 137 pp.
- Fruit, I. N. (2015). *Global Staistical Review 2014-2015*. Obtido de http://www.nutfruit.org/global-statistical-review-2014-2015_101779.pdf
- Fruit, I. N. (2015). *Global Statistical Review 2014-2015*. Obtido em 16 de Setembro de 2015, de International Nut&Dried Fruit: http://www.nutfruit.org/global-statistical-review-2014-2015_101779.pdf
- Gaikwad, R., & Gupta, D. (2008). Review on removal of heavy metals from acid mine drainage. *Applied Ecology and Enviromental Research*. 6 (3): 81-98.
- Galvanizing, & Asia. (s.d.). *Hot dip galvanizing-Process, aplicaciones, properites*. Obtido em 26 de Setembro de 2015, de <http://www.galvanizingasia.com/pdfs/page9-25.pdf>
- GalvInfo. (2011). *GalvInfo 2.2-The continuous Electroplating Process for Steel Sheets Products*. In *GalvInfo Center- A Program of the International Zinc Association*. Obtido de http://www.icz.org.br/upfiles/arquivos/GalvInfoNotes/GalvInfoNote_2_5.pdf
- García, R., & Baez, A. P. (2012). Atomic Absorption Spectrometry (AAS). In M. A. Farrukh, *Atomic Absorption Spectroscopy*. Intech. Retrieved from InTech: <http://www.intechopen.com/books/atomic-absorption-spectroscopy/atomic->
- Garcia-Zamarreño, A., Maté, G., Guzmán, J., Lopez, R., Piedra, C., & Garcia, M. (2013). APPSOIL: Una herramienta informática para la dosificación de espuma de azucarera como enmienda de suelos. *VII Congresso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas*. Madrid, Espanha, 26-29 de Agosto.
- Gonçalves, M. M., Leite, S. G., & Jr, S. (2005). The bioactivation procedure increasing the sulphate-reducing bacteria in UASB reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engeneering*. 22(4): 565-571.
- Granados-Neri, M., Huizar, L. H., & Rios-Reyes, C. H. (2011). Electrochemical study about zinc electrodeposition onto gce and hopg substrates. *Química Nova*. 34(3): 439-443.
- Greben, H. A., Maree, J. P., Singmin, Y., & Mnqanqeni, S. (2000). Biological sulphate removal from acid mine drainage using etanol as carbon and energy source. *Water Science Technology*. 42 (3): 339-344.
- Hussain, A., & Qazi, J. I. (2012). Biological sulphate reduction using watermelon rind as a carbon source. *Biologia (Pakistan)*. 58 (1 & 2): 85-92.

- Instituto Geológico e Mineiro. (2000). *Environmental State in the Portuguese Test Site: São Domingos Mine: Past and Present*. Mineo Report, Instituto Geológico e Mineiro.
- International Council on Mining & Metals. (2012). Trends in the mining and metals industry. In *Mining's contribution to sustainable development*. InBrief.
- Javali, K., & Baldwin, S. A. (2000). The role of sulphate reducing bacteria in copper removal from aqueous sulphate solutions. *Waters Research*. 34(3): 797-806.
- Kabir, M. M. (2012). Chemical Treatments on Plant-based Natural Fibre Reinforced Polymer Composites: An Overview. *Composites:part B*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.04.053
- Kaksonen, A. H., & Puhakka, J. A. (2007). Sulfate reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. *Engineering in Life Sciences*. 7(6): 541-564.
- Khakh, B. S., & Burnstock, G. (2009). The double life of ATP . *Scientific American*. 301(6): 84-92.
- Kieu, H., Muller, E., & Horn, H. (2011). Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Research Journal*. 45: 3863-3870.
- Koschorreck, M., Wendt-Potthoff, K., Bozau, E., Herzsprung, P., Geller, W., & Schultze, M. (2007). In situ neutralization of acidic pit lakes: processes in the sediment and limiting factors. In R. Cidu, & F. F. (Ed.), *IMWA Symposium: Water in Mining Environments*. Caigliari, Italy, 23-31 May.
- Lee, M., & Saunders, A. (2003). Effects of pH on Metal Precepitation and Sorption: Field Bioremediation and Geochemical Modeling Approaches. *Vadose Zone Journal*. 2: 177-185.
- Li, S. J., Chen, T. H., & Zhou, Y. F. (2012). Effect of Zn (II) on microbial activity in anaerobic acid mine drainage system with biomass as carbon source. *Environmental Science*. 33(1): 293-298.
- Liamlcam, W., & Annachhatrc, A. P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*. 25: 452-463.
- Luptakova, A., & Macingova, E. (2012). Alternative substrates of bacterial sulfate reduction suitable for the biological-chemical treatment of acid mine drainage. *Acta Montanistica Slovaca*. 17(1): 74-80.
- Mamma, D., Kourtoglou, E., & Christakopoulos, P. (2008). Fungal mutienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Biosource Technology*, 2373-2383.
- Marder, A. R. (2000). The metallurgy of zinc-coated steel. *Progress in Materials Science*. 45: 191-271.

- Maree, J. P., & Strydom, W. F. (1987). Biological sulphate removal from industrial effluente in na upflow packed bed reactor. *Water Research*. 21(2): 141-146.
- Marinho, C. M. (2009). *Caracterização físico-química e microbiológica de águas residuais de lagares de azeite. Seleção de leveduras para aplicação ao tratamento de águas ruças*. Tese de Doutoramento em Ciências do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes, 208 pp.
- Marques, R. J. (2008). *Avaliação da resistência à corrosão de aços IF revestidos com zinco e ligas de zinco-ferro destinadas à indústria automobilística*. Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Escola de Engenharia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 132 pp.
- Martins, M., Faleiro, M. L., & Barros, R. J. (2009). Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine decontamination. *Journal of Hazardous Materials*. 166: 706-713.
- Martins, M., Faleiro, M. L., Barros, R. J., Veríssimo, A., & Costa, M. C. (2009). Biological sulphate reduction ussing fod industry wastes as carbon sources. *Biodegradation*. 20: 559-567.
- Matos, J. X. (2005). *Carta geológica e mineira da Mina de Aljustrel esc. 1/5000*. INETI.
- Muyzer, G., & Stams, A. F. (2008). The ecology and biotechnology of suphate-reducing bacteria. *Nature Reviiews Microbiology*. 6: 441-454.
- Nable, R. O., Bañuelos, G. S., & Paull, J. (1997). Bron toxicity. *Plant and Soil*. 193: 181-198.
- Neculita, C. M., Yim, G., Lee, G., Ji, S., Jung, J., Park, H., & Song, H. (2011). Comparative effectiveness of mixed organic substrates to mushroom compost for treatment of mine drainage in passive bioreactors. *Chemosphere*. 83: 76-82.
- Neucelita, C. M., & Zagury, G. J. (2008). Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reators: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Harzadous Materials*. 157, 359-366.
- Pamar, M., & Thakur, L. S. (2013). Heavy metal Cu, Ni, and Zn: toxicity, health hazards and their removal techniques by low cost adsorventes: a hort overview. *International Journal of plant, animal anf environmental sciences*, 3(3): 143-157.
- Parnis, J. M., & Oldham, K. B. (2013). Beyond the Beer –Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 267: 6-10.
- Patidar, S. K., & Tare, V. (2006). Effect of nutrientes on biomass activity in degradation of sulfate laden organics. *Process Biochemistry*. 41: 489-495.
- Pérez-de-los-Reyes, C., A. O.-V., Garcia Navarro, F., Martín-Consuerga, S. B., Sanchez Jiménez, C., Chocano Eteson, D., & Jiménez-Ballesta, R. (2011). Changes in water retention properties due to the application of sugar foam in red soils. *Agricultural Water Management*. 98: 1834-1839.

- Perez-Lopez, R., Álvarez-Valero, A. M., Nieto, J. M., & Sáez, R. (2008). Use of sequential extraction procedure for assessing the environmental impact at regional scale of the São Domingos Mine (Iberian Pyrite Belt). *Applied Geochemistry*. 23: 3452-3463.
- Postgate, J. (1966). Media for sulphur bacteria. *Laboratory Practice*. 15(11): 1239-1244.
- Queiroz, F. M. (2003). *Caracterização Eletroquímica e Morfológica de Aço "Galvannealed" Comercial*. Tese de Mestrado em Ciências na Área da Tecnologia Nuclear- Materiais, Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, São Paulo.
- Rozzi, A., & Malpei, F. (1996). Treatment and Disposal Of Olive Mill Effluents. *International Bioremediation & Biodegradation*. 135-144.
- Socco, C. R., Vanderberghe, L. P., Woiciechowski, A. L., Thomaz-Soccol, V., Correia, C. T., & Ashok, P. (2003). Bioremediation: An important alternative for soil and industrial wastes clean-up. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41: 1030-1045.
- Tahir, S. S., & Rauf, N. (2004). Removal of Fe (II) from wastewater of a galvanized pipe manufacturing industry by adsorption onto bentonite clay. *Journal of Environmental Management*. 73: 285-292.
- Tavares, M. T., Sousa, A. J., & Abreu, M. M. (2008). Ordinary kriging and indicator kriging in the cartography of trace elements contamination in São Domingos mine site (Alentejo, Portugal). *Journal of Geo Chemical Exploration*. 98: 43-56.
- Teclu, D. G., Liang, M. D., & Wallis, F. M. (2009). Bioremediation of contaminated water sources with sulphate-reducing bacteria. *Proceedings of the International Mine Water Conference*, (pp. 606-613). Pretoria, South Africa, 19-23 October.
- Tomachuck, C. R., Elsner, C. I., & Di Sarli, A. R. (2014). Electrochemical characterization of Chromate free Conversion Coatings on Electrogalvanized Steel. *Materias Research*. 17(1): 61-68.
- Torrado, A. M., Cortés, S., Salgado, J. M., Max, B., Rodríguez, N., Bibbins, B. P., Domínguez, J. M. (2011). Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 394-409.
- Tsagaraki, E., Lazarides, H. N., & Petrotos, K. B. (2007). Olive Mill Wastewater Treatment. In V. Oreopoulou, & W. Russ, *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in Food Industry*. New York: Springer ISBN: 978-0-387-33511-7.
- Vela, F. J., Ziat, M., & Foresti, E. (2002). Influence of the COD to sulfate ratio on the anaerobic organic matter degradation kinetics. *Water SA*. 28(2): 213-216.
- Viggi, C. C., Pagnanelli, F., & Toro, L. (2009). Sulphate bioreduction for the treatment of polluted waters: solid versus liquid organic substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84(6): 859-863.

- Vitor, M. S., Rocha, A. O., & Reis, J. M. (2012). *Portugal Mining & Minerals Legal Regime, Incentives and Taxation in Portugal*. Obtido em 10 de Setembro de 2015, de <http://www.worldservicesgroup.com/publications.asp?action=article&artid=4804>
- Wang, A., Nanqi, R., Wang, X., & Lee, D. (2008). Enhanced sulfate reducing with acidogenic sulfate-reducing bacteria. *Journal of Hazardous Materials*. 154: 1060-1065.
- Waybrant, K. R., Blowes, D., & Ptacek, C. J. (1998). Selection of Reactive Mixtures for Use in Permeable Reactive Walls for Treatment of Mine Drainage. *Environmental Science and Technology*. 32(13): 1972-1979.
- Wei-ting, C., Hong-gou, Z., Ding-gui, L., & Young-heng, C. (2014). Research on Treating Acid Wastewater Containing Heavy Metals by Sulfate-Reducing Bacteria. *International Conference on Material and Environmental Engineering (ICMAEE)*. JuiJiang, China.
- Wolicka, D., & Borkowski, A. (2009). Phosphogypsum biotransformation in cultures of sulphate reducing bacteria in whey. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63: 322-327.
- Xia, J., Qu, J. G., & Ma, J. M. (2005). Microbiological treatment technology for wastewater containing zinc. *Environmental protection of chemical industry*. 25(3): 191-194.
- Yamashita, T., Yamamoto-Ikemoto, R., & Zhu, J. (2011). Sulfate-reducing bacteria in a denitrification reactor packed with wood as a carbon source. *Biosource Technology*. 102: 2235-2241.
- Zagury, G. V. (2006). Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage. *Chemosphere Journal*. 64: 944-954.
- Zhang, M., & Wang, H. (2014). Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage. *Minerals Engineering*. 69: 81-90.
- Zhao, H., Jiang, D., Zhang, S., Catterall, K., & John, R. (2004). Development of a Direct Photoelectrochemical Method for Determination of Chemical Oxygen Demand. *Analytical Chemistry*. 76: 155-160.

Anexos

Anexo I- Resultados dos testes de seleção de fontes de carbono de baixo custo para o crescimento de BSR

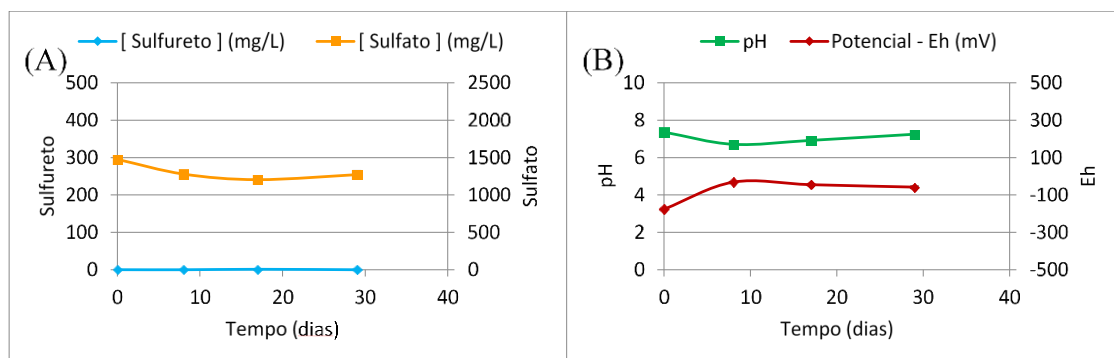


Figura 1- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com carbocel 0.1% (m/v).

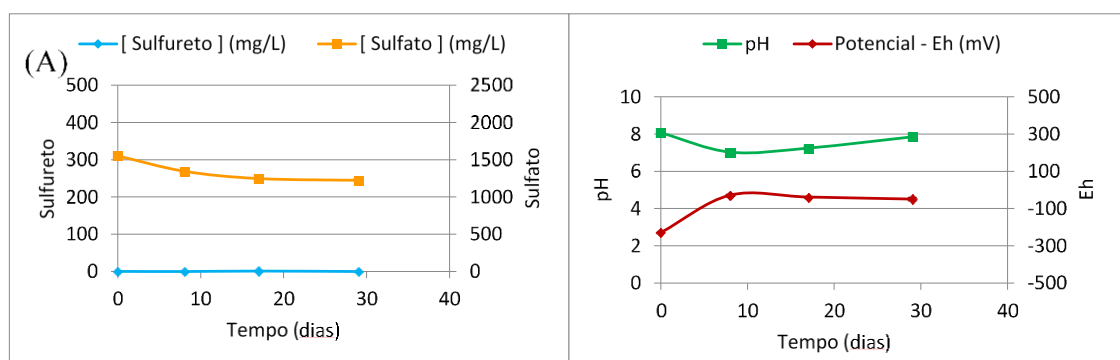


Figura 2- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com carbocel 1% (m/v).

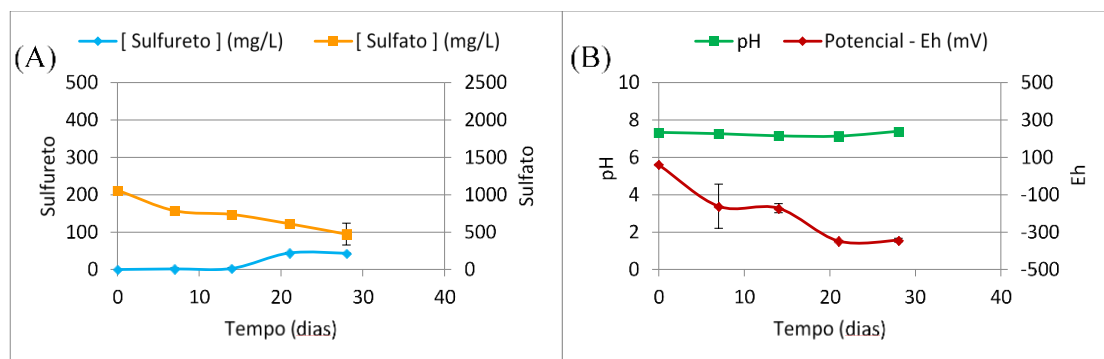


Figura 3- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças não decantadas e diluídas 1:24.

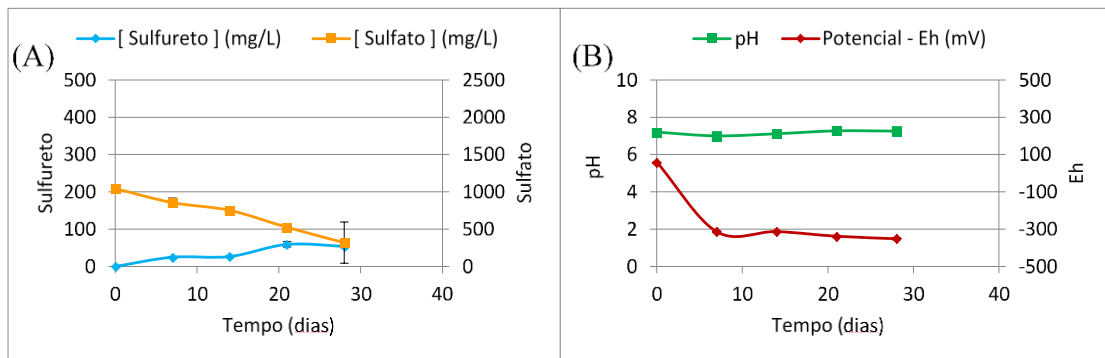


Figura 4- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças não decantadas e diluídas 1:12.

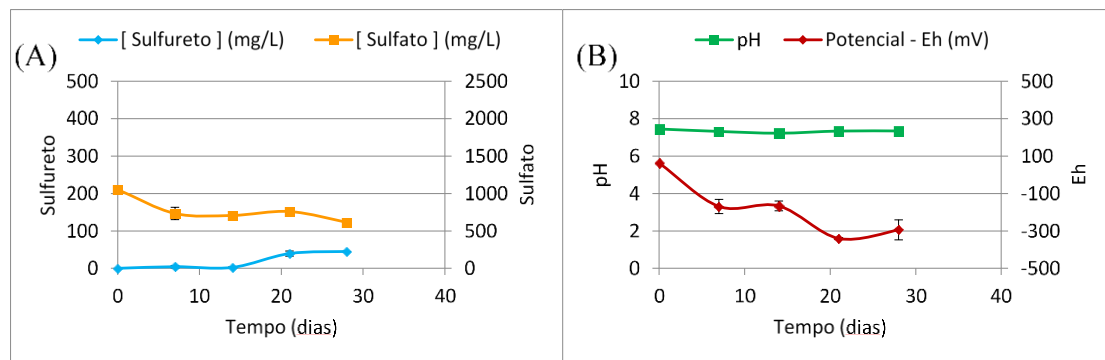


Figura 5- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças decantadas e diluídas 1:30.

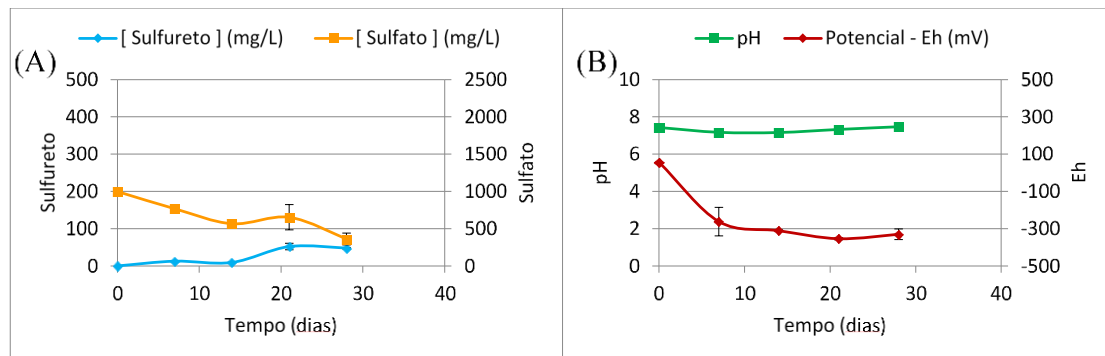


Figura 6- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com águas ruças decantadas e diluídas 1:15.

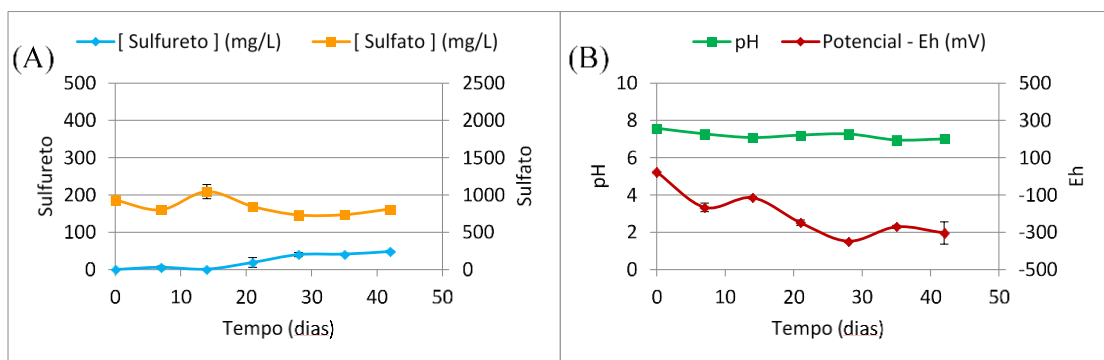


Figura 7- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melão com conservante diluído 1:400.

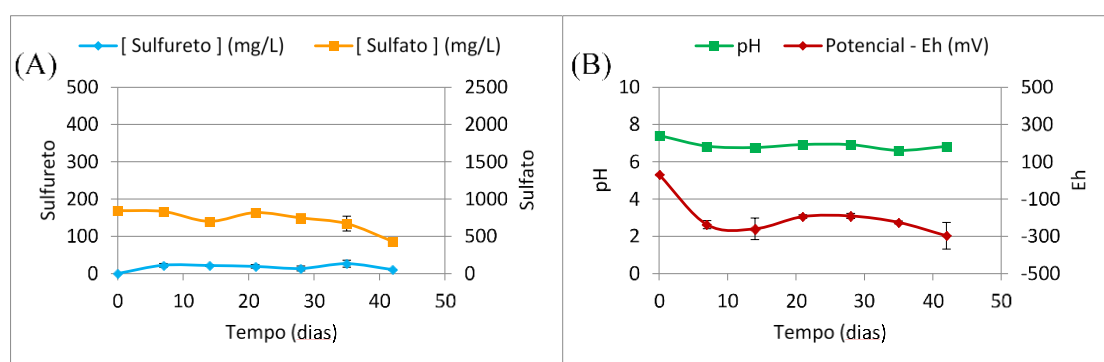


Figura 8- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melão com conservante diluído 1:200.

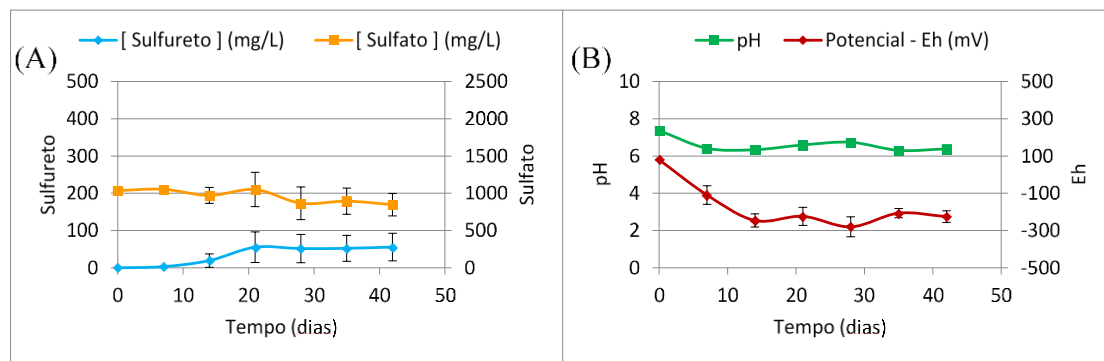


Figura 9- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melão com conservante diluído 1:100.

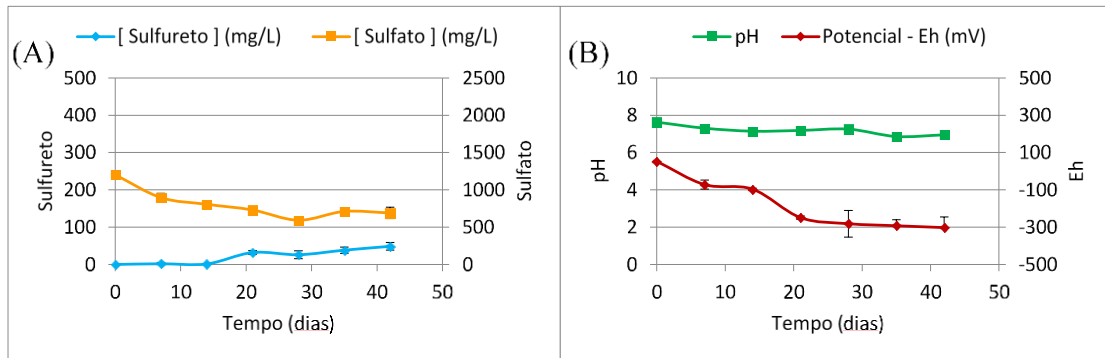


Figura 10 - Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melão sem conservante diluído 1:400.

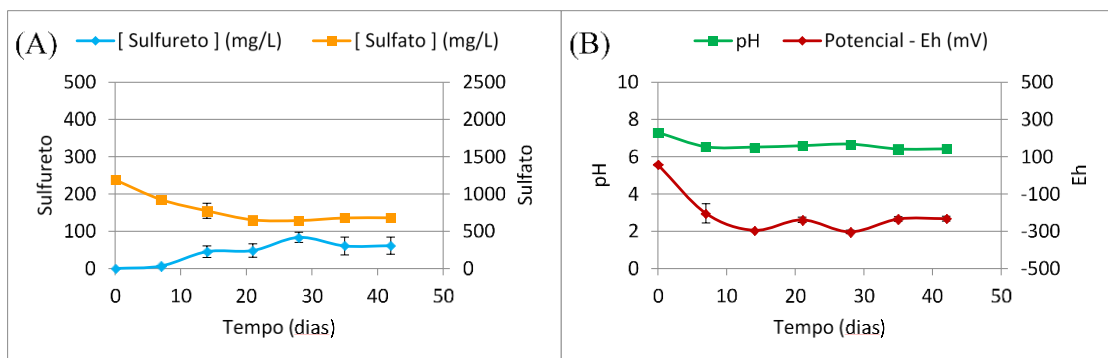


Figura 11- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com melão sem conservante diluído 1:100.

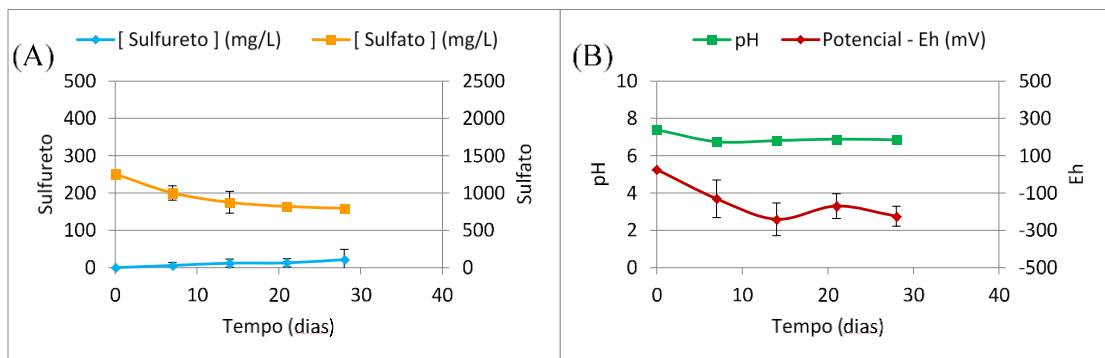


Figura 12- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com licor diluído 1:80.

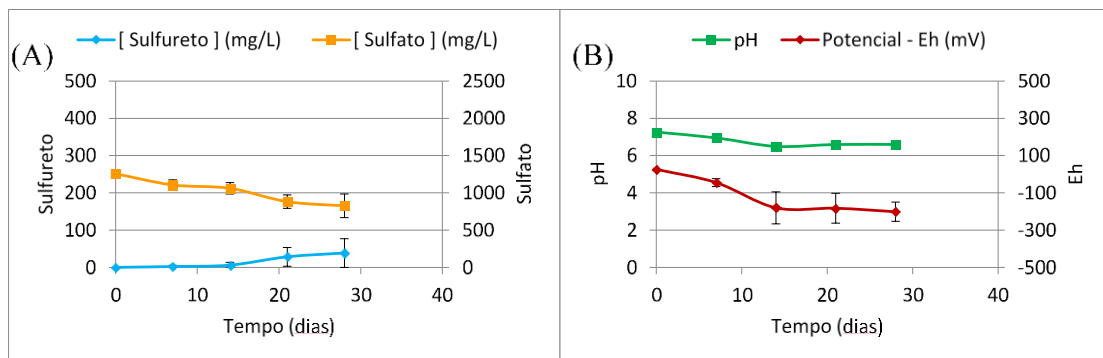


Figura 13- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com licor diluído 1:40.

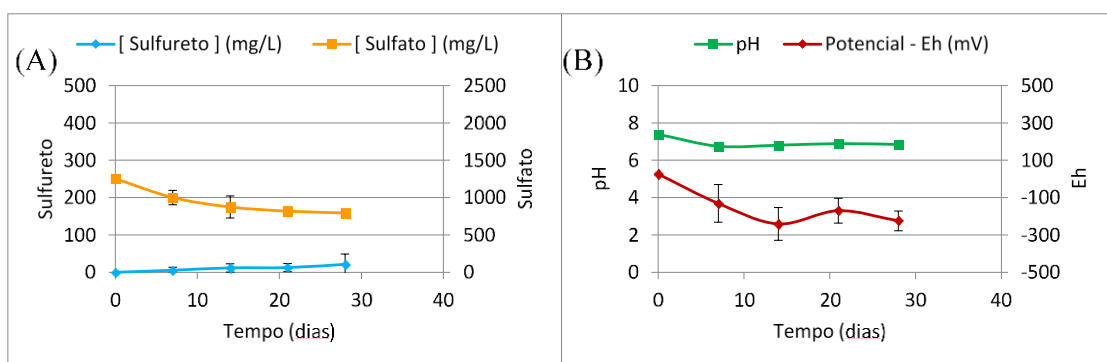


Figura 14- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com licor diluído 1:20.

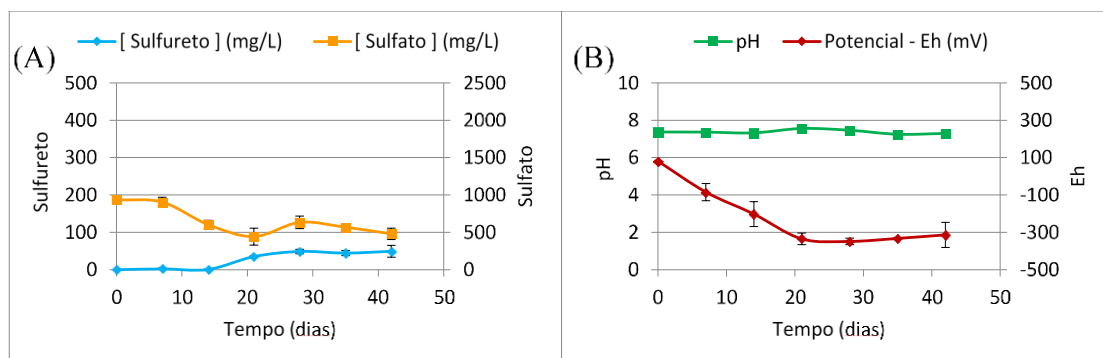


Figura 15- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com água de lavagem diluída 1:5.

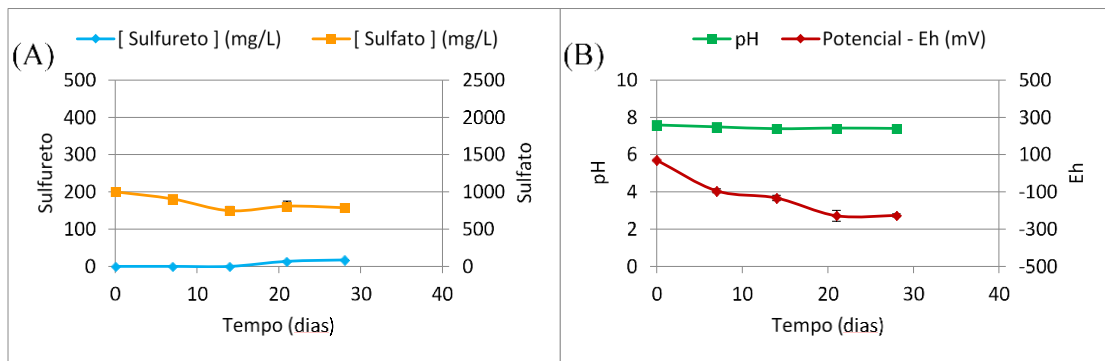


Figura 16- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com efluente pasta alcalino e ácido diluído 1:5.

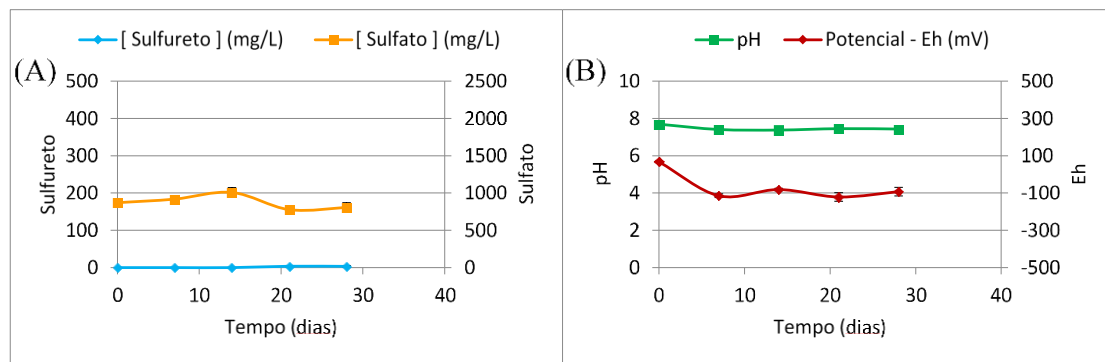


Figura 17- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com efluente pasta alcalino diluído 1:5.

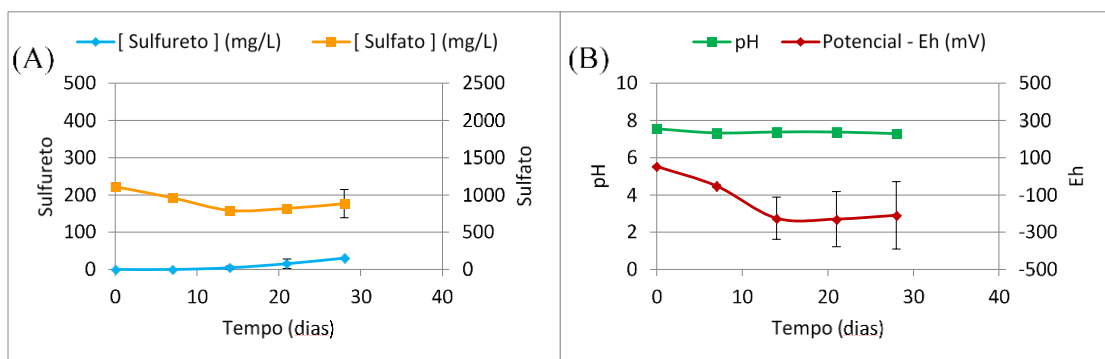


Figura 18- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com efluente papel diluído 1:5.

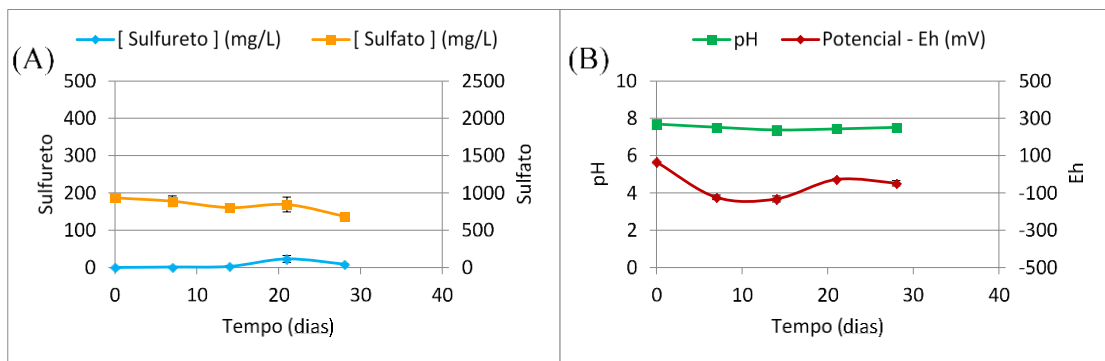


Figura 19- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com efluente final diluído 1:5.

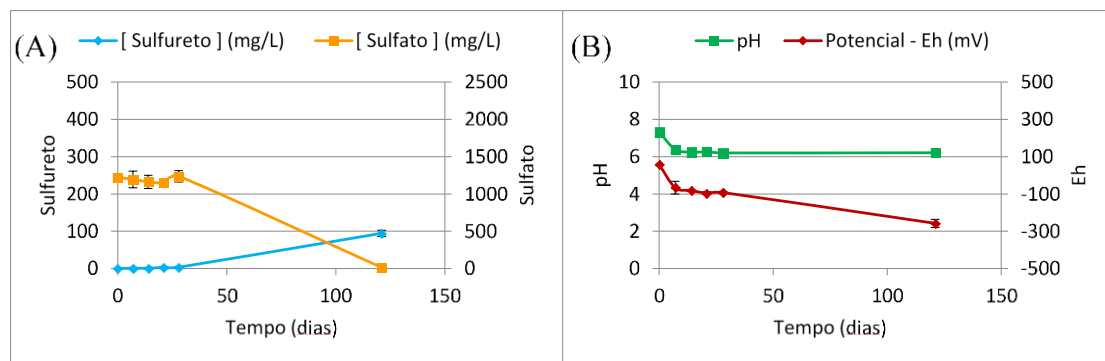


Figura 20- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com cascas de laranja 1% (m/v).

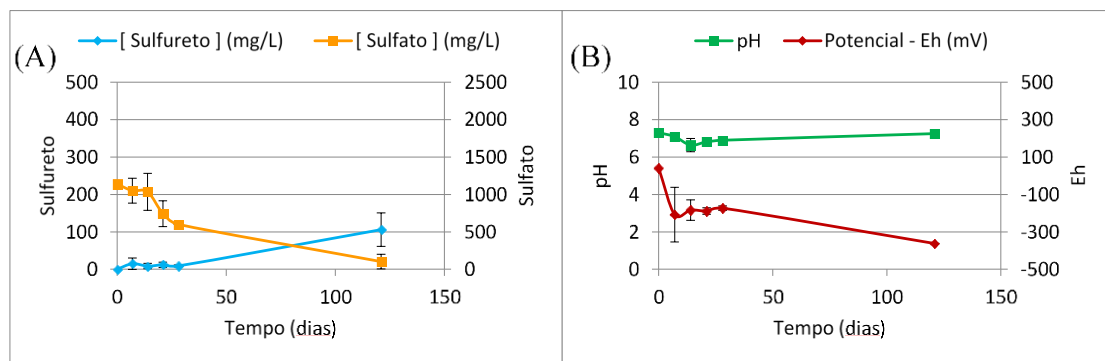


Figura 21- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com cascas de laranja 4% (m/v).

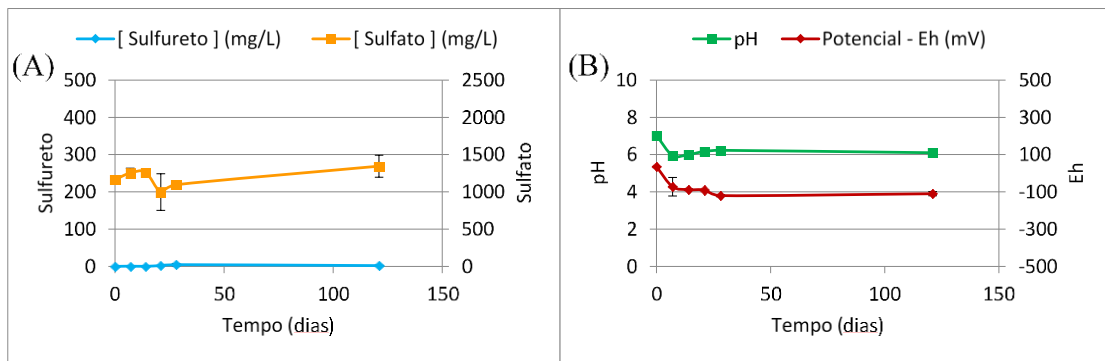


Figura 22- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com cascas de laranja 4% (m/v).

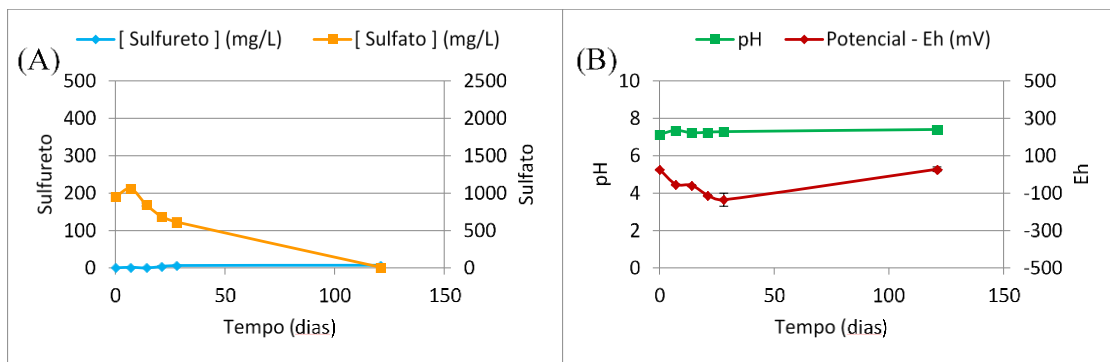


Figura 23- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com pinhão 10% (m/v).

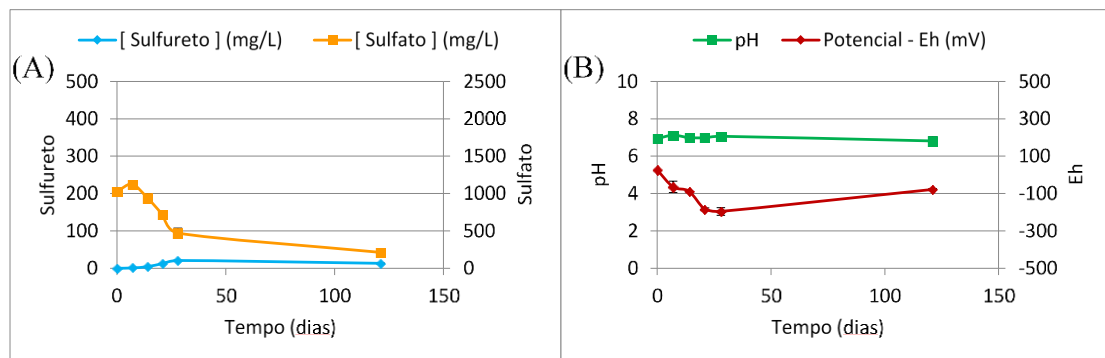


Figura 24- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com pinhas 1 (10% (m/v)).

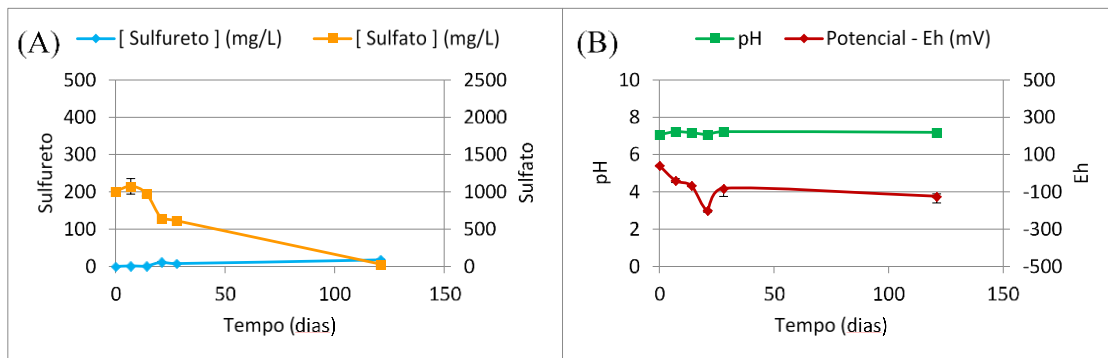


Figura 25- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) das culturas com pinhas 2 (10% (m/v)).

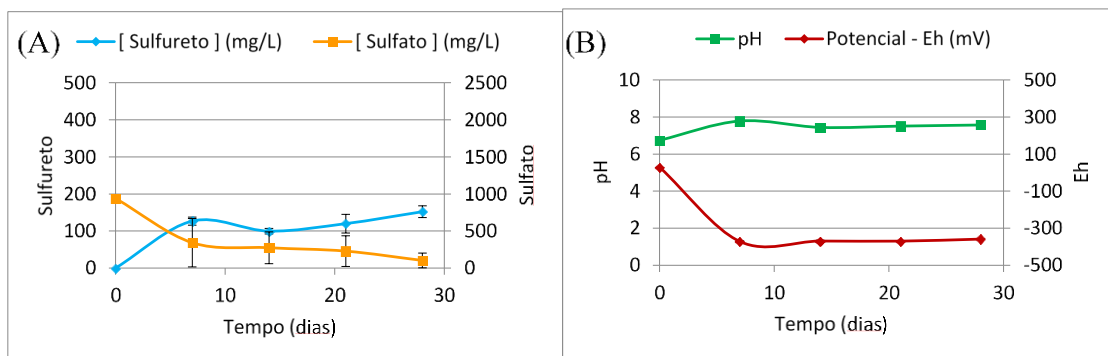


Figura 26- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) do controlo com Postgate B original.

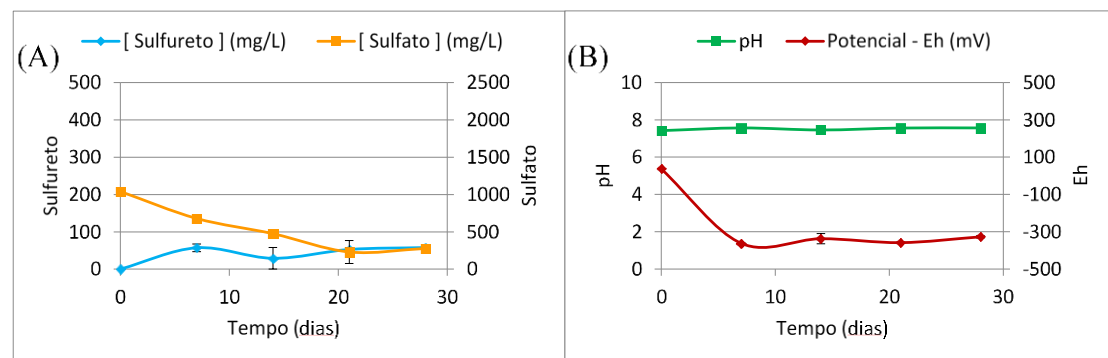


Figura 27- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) do controlo positivo.

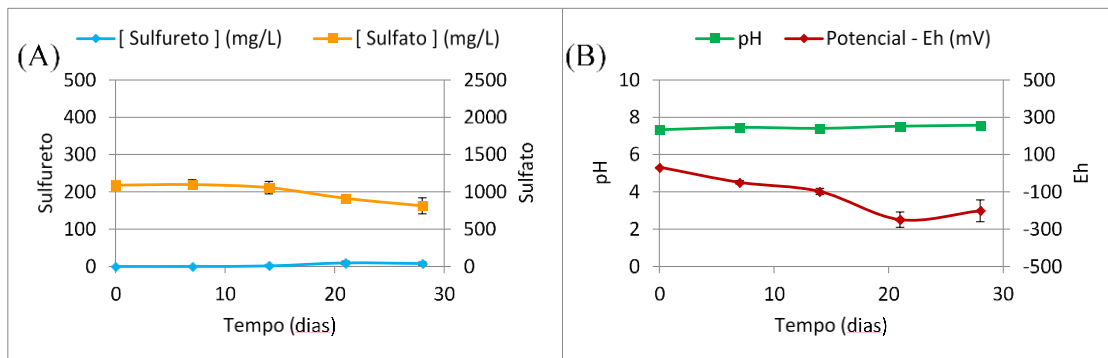


Figura 28- Monitorização das concentrações de sulfureto e sulfato (A) e dos valores de pH e Eh (B) do controlo negativo (Meio Postgate B modificado + calcite 10% m/v).

Anexo II- Resultados dos testes de remediação de efluentes contaminados com metais utilizando BSR

Tabela 1 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto e zinco) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com 1% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zinco*.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21		28	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1% (m/v) de Carbocal® + <i>vertido de zinco</i> com BSR	Potencial (Eh)	219	0	26.33	20.93	-22.67	3.21	-12.33	7.51	-48.83	7.23
	pH	4.82	0.00	6.86	0.11	7.41	0.02	7.30	0.04	7.09	0.01
	[Zinco] mg/L	358	0	138.28	47.95	78.10	7.28	43.20	3.84	-	-
	[Sulfato] mg/L	18	0	75.33	19.43	132.17	6.11	66.00	9.64	26.67	11.72
	[Sulfureto] mg/L	0	0	2.36	0.76	0.00	0.00	0.15	0.05	0.33	0.33
Controlo Negativo 1% (m/v) de Carbocal® + <i>vertido de zinco</i> sem BSR	Potencial (Eh)	219	0	157.33	4.16	147.33	8.62	113.00	12.29	40.33	7.09
	pH	4.82	0.00	6.73	0.17	7.22	0.05	7.33	0.02	7.04	0.16
	[Zinco] mg/L	358	0	250.47	17.72	118.97	9.02	62.88	8.27		
	[Sulfato] mg/L	18	0	72.67	4.04	10.00	2.00	9.35	3.06	33.00	26.89
	[Sulfureto] mg/L	0	0	2.55	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.09

Tabela 2 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto e zinco) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com 10% (m/v) de Carbocal® em *vertido do zincado*.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21		28	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
10% (m/v) de Carbocal® + <i>vertido de zincado</i> com BSR	Potencial (Eh)	117	0	120.67	1.53	134.67	8.50	69.33	3.06	38.00	6.00
	pH	6.08	0.00	7.64	0.01	7.96	0.06	8.07	0.04	7.98	0.06
	[Zinco] mg/L	270	0	46.06	10.48	6.18	0.43	2.18	0.31	-	-
	[Sulfato] mg/L	210	0	324.67	12.50	348.00	22.72	342.33	6.51	62.33	23.16
	[Sulfureto] mg/L	0	0	1.50	0.70	0	0	0.40	0.05	0.80	0.14
Controlo Negativo 10% (m/v) de Carbocal® + <i>vertido de zincado</i> sem BSR	Potencial (Eh)	117	0	151.33	0.58	134.00	6.56	83.00	6.24	84.33	2.08
	pH	6.08	0.00	7.53	0.04	8.03	0.07	8.04	0.04	7.90	0.03
	[Zinco] mg/L	270	0	95.95	19.83	10.42	1.60	5.99	0.77		
	[Sulfato] mg/L	210	0	305.67	33.50	321.33	17.01	337.33	4.04	45.67	3.21
	[Sulfureto] mg/L	0	0	3.45	1.61	1.22	2.11	0.09	0.04	0.22	0.19

Tabela 3 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto e zinco) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com 20% (m/v) de Carbocal® em *vertido de zincado*.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21		28	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
20% (m/v) de Carbocal® + <i>vertido de zincado</i> com BSR	Potencial (Eh)	103	0	121.00	1.73	70.33	9.07	-0.67	61.40	9.67	22.94
	pH	6.18	0.00	7.80	0.08	8.05	0.06	7.97	0.10	7.99	0.03
	[Zinco] mg/L	94.50	0.00	45.88	9.39	3.56	2.35	1.70	0.58	-	-
	[Sulfato] mg/L	188	0	516.67	34.02	529.67	15.50	488.33	59.50	458.33	303.1
	[Sulfureto] mg/L	0	0	3.91	1.76	1.56	1.25	2.02	0.61	2.02	0.98
Controlo Negativo 20% (m/v) de Carbocal® + <i>vertido de zincado</i> sem BSR	Potencial (Eh)	103	0	156.33	4.93	106.00	3.46	91.67	4.62	84	1
	pH	6.18	0.00	7.71	0.03	7.90	0.03	8.19	0.02	8.07	0.03
	[Zinco] mg/L	94.50	0.00	52.09	23.60	5.71	0.38	3.76	0.23	-	-
	[Sulfato] mg/L	188	0	522.67	56.62	511.33	107.4	595.67	10.02	319.00	51.45
	[Sulfureto] mg/L	0	0	1.28	0.59	1.18	1.26	0.14	0.01	0.13	0.04

Tabela 4 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato e sulfureto) ao longo do tempo, no controlo positivo com 10% (m/v) de carbocal em Postgate B modificado e no controlo com Postgate B original.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21		28	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controlo Positivo: Postgate B modificado + 10% (m/v) Carbocal® com BSR	Potencial (Eh)	-197	0	-3.00	21.21	-102.00	1.41	-372.50	12.02	-365.00	33.94
	pH	8.14	0.00	7.79	0.01	7.55	0.58	7.97	0.06	7.92	0.04
	[Sulfato] mg/L	1245	0	1039.00	69.30	938.00	26.87	1064.00	18.38	603.50	21.92
	[Sulfureto] mg/L	0.00	0	12.59	2.13	0.37	0.28	293	0	184.67	44.65
Controlo: Postgate B original com BSR	Potencial (Eh)	110	0	-393.67	3.21	-368.33	23.03	-	-	-	-
	pH	6.63	0.00	7.45	0.05	7.14	0.05	-	-	-	-
	[Sulfato] mg/L	1521	0	170.00	29.82	8.33	3.06	-	-	-	-
	[Sulfureto] mg/L	0	0	414.31	2.27	368.70	34.77	-	-	-	-

Tabela 3 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto, zinco, ferro e cobre) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com 1% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos.

Teste	Parâmetros	0		7		14		28		42	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1% (m/v) de Carbocal® + DAM São Domingos com BSR	Potencial (Eh)	377	0	49.00	15.39	1.67	3.51	15.00	2.65	19.67	4.51
	pH	3.89	0.00	7.13	0.07	7.14	0.11	7.20	0.03	7.20	0.05
	[Zinco] mg/L	34.80	0.00	3.19	1.56	0.70	0.04	0.33	0.07	0.50	0.40
	[Ferro] mg/L	4.55	0.00	1.63	0.59	2.05	0.76	3.31	0.25	6.53	0.29
	[Cobre] mg/L	44.40	0.00	0.14	0.03	0.29	0.05	0.32	0.07	0.12	0.04
	[Sulfato] mg/L	1760	0	1818.00	67.29	1751.33	77.62	1210.33	4.73	1282.00	38.35
	[Sulfureto] mg/L	0	0	2.28	1.06	6.87	2.55	3.20	0.89	1.76	1.65
Controlo Negativo 1% (m/v) de Carbocal® + DAM São Domingos sem BSR	Potencial (Eh)	377	0	262.33	12.34	239.33	5.51	228.37	7.27	243.00	6.00
	pH	3.89	0.00	6.82	0.05	6.96	0.06	7.11	0.09	7.20	0.04
	[Zinco] mg/L	34.80	0.00	8.89	0.32	4.17	1.11	0.99	0.05	1.89	0.91
	[Ferro] mg/L	4.55	0.00	0.23	0.12	0.28	0.06	0.64	0.44	0.34	0.05
	[Cobre] mg/L	44.40	0.00	3.42	0.43	2.09	0.20	1.61	0.16	1.72	0.07

	[Sulfato] mg/L	1760	0.00	1810.00	21.07	1870.33	59.50	1482.00	166.22	1396.33	12.74
	[Sulfureto] mg/L	0.00	0.00	0.27	0.16	0.09	0.07	0.49	0.37	0.39	0.24

Tabela 4 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto, zinco, ferro e cobre) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com 10% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos.

Teste	Parâmetros	0		7		14		28		42	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
10 % (m/v) de Carbocal ® + DAM São Domingos com BSR	Potencial (Eh)	286	0	29	17.58	-60.67	19.66	-79.33	20.65	33.33	1.53
	pH	6.38	0.00	7.58	0.07	7.62	0.05	7.55	0.23	7.74	0.03
	[Zinco] mg/L	9	0	0.27	0.40	0.14	0.08	0.16	0.08	0.18	0.14
	[Ferro] mg/L	0.2	0.00	1.91	0.66	2.25	0.41	1.20	0.14	1.16	0.03
	[Cobre] mg/L	26.40	0.00	0.14	0.01	0.23	0.05	0.23	0.01	0.10	0.01
	[Sulfato] mg/L	1881	0	1881.00	36.76	1728.67	27.06	1438.67	49.34	1349.33	19.40
	[Sulfureto] mg/L	0	0	3.66	1.34	3.17	2.60	6.86	4.23	5.22	2.88
Controlo Negativo	Potencial (Eh)	286	0	154	2.65	208.67	13.20	193.33	7.09	208.33	11.68

10 % (m/v) de Carbocal ® + DAM São Domingos sem BSR	pH	6.38	0.00	7.68	0.03	7.69	0.04	7.73	0.07	7.80	0.04
	[Zinco] mg/L	9	0	0.32	0.04	0.31	0.02	2.00	2.48	0.67	0.57
	[Ferro] mg/L	0.2	0.00	0.47	0.07	0.84	0.09	0.82	0.13	1.68	0.34
	[Cobre] mg/L	26.40	0.00	3.07	0.23	1.83	0.05	1.19	0.15	1.05	0.18
	[Sulfato] mg/L	1881	0	1987.00	46.57	1931.33	63.11	1684.33	91.66	1612.67	17.01
	[Sulfureto] mg/L	0	0	0.52	0.52	0.47	0.45	0.45	0.14	0.21	0.17

Tabela 5 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto, zinco, ferro e cobre) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com 20% (m/v) de Carbocal® em DAM de São Domingos.

Teste	Dias	0		7		14		28		42	
		Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média
20 % (m/v) de Carbocal ® + DAM São Domingos com BSR	Potencial (Eh)	271	0	-208.67	77.52	-111.00	18.08	-280.00	88.79	-342.33	8.96
	pH	6.80	0.00	7.77	0.04	7.64	0.08	7.72	0.06	7.74	0.07
	[Zinco] mg/L	1.23	0.00	0.04	0.02	0.13	0.06	0.09	0.02	0.17	0.16
	[Ferro] mg/L	0.52	0.00	0.86	0.19	0.52	0.11	0.16	0.07	0.47	0.04
	[Cobre] mg/L	7.14	0.00	0.16	0.01	0.20	0.01	0.23	0.01	0.12	0.01

	[Sulfato] mg/L	1936	0	1823.00	181.94	1811.00	108.37	1393.00	37.64	1296.33	77.14
	[Sulfureto] mg/L	0	0	4.95	1.00	4.42	0.61	17.99	0.99	24.29	5.07
Controlo Negativo 20 % (m/v) de Carbocal ® + DAM São Domingos sem BSR	Potencial (Eh)	271	0	141.00	3.00	182.67	5.03	163.00	17.06	162.00	12.12
	pH	6.80	0.00	7.88	0.01	7.87	0.06	7.36	0.47	7.84	0.06
	[Zinco] mg/L	1.23	0.00	0.68	0.55	1.14	0.13	0.29	0.06	0.65	0.57
	[Ferro] mg/L	0.52	0.00	1.20	0.27	1.67	0.29	2.07	0.26	3.24	0.52
	[Cobre] mg/L	7.14	0.00	2.16	0.14	1.36	0.28	0.92	0.32	0.62	0.36
	[Sulfato] mg/L	1936.00	0.00	2172.33	56.72	2169.00	52.56	1836.67	134.58	1742.00	100.26
	[Sulfureto] mg/L	0	0	0.44	0.16	0.25	0.22	0.24	0.12	0.26	0.14

Tabela 6 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato e sulfureto) ao longo do tempo, no controlo positivo com 10% (m/v) de Carbocal® em Postgate B modificado e no controlo com Postgate B original.

Teste	Parâmetros	0		7		14		28		42	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controlo Positivo:	Potencial (Eh)	-197	0	-329.67	20.03	-361.33	4.04	-387.00	22.11	-396.00	4.00

Postgate B modificado + 10% (m/v) Carbocal® com BSR	pH	8.14	0.00	7.68	0.07	7.69	0.05	7.34	0.59	7.63	0.04
	[Sulfato] mg/L	1245	0	1542.00	38.59	1470.00	60.53	840.33	6.11	597.00	89.37
	[Sulfureto] mg/L	0.00	0.00	15.70	1.16	35.07	6.53	188.51	47.59	219.06	20.21
Controlo: Postgate B original com BSR	Potencial (Eh)	25.00	0.00	-391.33	2.08	-394.67	1.15	-390.00	2.65	-	-
	pH	6.74	0.00	6.95	0.01	7.00	0.03	7.30	0.36	-	-
	[Sulfato] mg/L	1011	0	126.33	9.24	4.67	4.51	50.00	32.53	-	-
	[Sulfureto] mg/L	0	0	368.62	16.79	349.97	7.88	332.15	83.63	-	-

Tabela 7 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentrações de zinco, ferro, cobre, sulfato, sulfureto e fenóis) ao longo do tempo, no teste com águas ruças diluídas 1:5 em DAM São Domingos neutralizada com BSR e no controlo negativo com águas ruças centrifugadas e diluídas 1:5 em DAM São Domingos neutralizada sem BSR.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21		28	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Águas Ruças não decantadas (1:5) + DAM São Domingos	Potencial (Eh)	112	0	63.67	9.07	-312.67	44.06	-328.67	27.47	-271.00	19.70
	pH	6.32	0.00	6.81	0.05	6.92	0.09	6.95	0.08	7.23	0.09
	[Zinco] mg/L	0.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

+10% (m/v) de calcite com BSR	[Ferro] mg/L	0.25	0.00	1.14	0.35	0.32	0.02	0.68	0.04	0.53	0.01
	[Cobre] mg/L	1.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	[Sulfato] mg/L	766	0	879.67	104.64	234.67	23.67	245.00	7.55	206.67	41.53
	[Sulfureto] mg/L	0	0	7.60	3.23	123.76	14.52	160.17	20.68	71.73	14.36
	[Fenóis] mg/L	136	0	--	--	--	--	--	--	29.50	0.75
Controlo negativo: Águas Ruças não decantadas e centrifugadas (1:5) + DAM São Domingos +10% (m/v) de calcite com BSR	Potencial (Eh)	112	0	87.67	5.51	96.67	2.52	73.67	10.12	68.00	33.96
	pH	6.32	0.00	6.71	0.01	6.84	0.04	6.68	0.01	6.98	0.01
	[Zinco] mg/L	0.61	0.00	0.94	0.24	0.31	0.12	0.23	0.08	0.10	0.01
	[Ferro] mg/L	0.25	0.00	0.28	0.02	0.85	0.12	1.16	0.08	2.93	1.48
	[Cobre] mg/L	1.14	0.00	1.29	0.08	0.87	0.04	0.41	0.06	0.08	0.07
	[Sulfato] mg/L	766	0	990.00	23.90	750.67	37.86	1023.00	48.14	922.33	173.59
	[Sulfureto] mg/L	0	0	0.33	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	15.04	6.88
	[Fenóis] mg/L	136	0	--	--	--	--	--	--	30.75	1.20

Tabela 8 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentrações de zinco, ferro, cobre, sulfato, sulfureto e fenóis) ao longo do tempo, no teste com BSR e águas ruças diluídas 1:10 em DAM de São Domingos neutralizada.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21		28	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Águas Ruças não decantadas (1:10) + DAM São Domingos +10% (m/v) de calcite com BSR	Potencial (Eh)	116.00	0.00	97.33	4.04	-322.67	9.71	-191.33	82.37	-106.33	180.10
	pH	6.66	0.00	6.73	0.25	7.02	0.08	6.99	0.07	7.20	0.12
	[Zinco] mg/L	1.07	0.00	0.16	0.20	0.00	0.00	0.04	0.06	0.00	0.00
	[Ferro] mg/L	0.19	0.00	6.19	0.67	0.45	0.13	0.78	0.11	0.61	0.12
	[Cobre] mg/L	1.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	[Sulfato] mg/L	763	0.00	1063.33	122.19	579.67	52.35	608.00	142.20	568.33	131.46
	[Sulfureto] mg/L	0.00	0.00	1.18	1.60	32.31	13.77	60.67	26.21	18.90	12.16
	[Fenóis] mg/L	131	0	--	--	--	--	--	--	--	13.60

Tabela 9 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto, zinco, ferro, cobre e fenóis) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com águas ruças não decantadas diluídas 1:5 em DAM de São Domingos.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Águas Ruças não decantadas (1:5) + DAM São Domingos com BSR	Potencial (Eh)	223	0	115.67	15.04	48.67	41.36	-258.00	38.74
	pH	4.28	0.00	6.71	0.03	6.89	0.09	6.93	0.07
	[Zinco] mg/L	34.80	0.00	2.58	0.58	0.40	0.15	0.20	0.04
	[Ferro] mg/L	0.07	0.00	4.38	4.11	5.35	4.10	0.67	0.37
	[Cobre] mg/L	12.70	0.00	0.27	0.00	0.09	0.03	0.11	0.03
	[Sulfato] mg/L	1408	0	1359.33	50.80	1055.33	191.68	740.67	20.26
	[Sulfureto] mg/L	0	0	2.19	0.79	2.01	1.41	3.26	2.49
	[Fenóis] mg/L	52	0	-	-	-	-	5.52	0.55
Controlo negativo: Águas Ruças não decantadas (1:5) + DAM São	Potencial (Eh)	223	0	217.00	3.61	244.00	2.00	235.00	1.73
	pH	4.28	0.00	4.30	0.03	4.33	0.02	4.32	0.03
	[Zinco] mg/L	34.80	0.00	14.80	0.15	24.26	0.73	24.74	1.09
	[Ferro] mg/L	0.07	0.00	0.63	0.09	2.14	0.26	4.98	1.11

Domingos sem BSR	[Cobre] mg/L	12.70	0.00	14.26	0.15	14.00	0.09	13.42	0.56
	[Sulfato] mg/L	1408	0	1285.33	24.34	1017.33	16.17	1017.00	29.87
	[Sulfureto] mg/L	0	0	0.09	0.16	0.22	0.13	0.14	0.11
	[Fenóis] mg/L	52	0	-	-	-	-	5.04	0.28

Tabela 10 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto e zinco e fenóis) ao longo do tempo, no teste e no controlo negativo com águas ruças não decantadas diluídas 1:5 em *vertido de zincado*.

Teste	Parâmetros	Dias 0		7		14		21	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Águas Ruças não decantadas (1:5) + <i>vertido de zincado</i> com BSR	Potencial (Eh)	188	0	191.00	7.55	175.67	9.45	129.67	5.13
	pH	4.77	0.00	5.68	0.03	5.85	0.01	5.83	0.04
	[Zinco] mg/L	327	0	280.42	8.41	249.37	14.86	272.00	23.30
	[Ferro] mg/L	7.39	0.00	2.64	0.23	3.75	0.17	5.79	0.71
	[Sulfato] mg/L	39	0	30.57	3.51	25.67	11.68	18.00	4.36
	[Sulfureto] mg/L	0	0	0.41	0.11	0.32	0.28	0.06	0.11
	[Fenóis] mg/L	52	0	---	---	---	---	4.78	0.18

Controlo negativo: Águas Ruças não decantadas (1:5) + vertido de zinco sem BSR	Potencial (Eh)	188	0	157.33	35.81	188.33	2.08	194.33	8.39
	pH	4.77	0.00	4.65	0.02	4.74	0.03	4.76	0.02
	[Zinco] mg/L	327	0	336.23	10.04	303.85	5.66	323.68	2.23
	[Ferro] mg/L	7.39	0.00	5.95	0.23	7.49	0.30	13.44	0.09
	[Sulfato] mg/L	39	0	26.00	17.58	22.30	8.07	23.33	6.03
	[Sulfureto] mg/L	0	0	0.07	0.11	0.37	0.23	0.34	0.39
	[Fenóis] mg/L	52	0	-	-	-	-	6.12	0.07

Tabela 11 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato, sulfureto e fenóis) ao longo do tempo, no Postgate B modificado com águas ruças não decantadas diluídas 1:5 com e sem BSR.

Teste	Parâmetros	0		7		14		21	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Águas Ruças não decantadas (1:5) + Postgate B modificado com BSR	Potencial (Eh)	57	0	-201.00	35.93	-325.33	11.59	-237.33	91.74
	pH	5.28	0.00	6.32	0.05	6.70	0.02	6.65	0.04
	[Sulfato] mg/L	1374	0	1266.33	94.85	752.33	76.13	703.33	24.01
	[Sulfureto] mg/L	0	0	23.97	11.31	92.30	11.67	72.36	36.88

	[Fenóis] mg/L	108	0	---	---	---	---	6.65	0.04
Águas Ruças não decantadas (1:5) + Postgate B modificado sem BSR	Potencial (Eh)	57	0	-118.33	8.50	-104.67	33.32	-131.33	22.74
	pH	5.28	0.00	5.74	0.04	5.97	0.06	5.80	0.20
	[Sulfato] mg/L	1374	0	1254.67	32.72	1031.33	83.17	1222.00	32.97
	[Sulfureto] mg/L	0	0	1.45	0.03	0.88	0.28	0.96	0.23
	[Fenóis] mg/L	108	0	---	---	---	---	5.80	0.20

Tabela 12 - Monitorização dos parâmetros (Eh, pH, concentração de sulfato e sulfureto) ao longo do tempo, no controlo com Postgate B original.

Teste	Parâmetros	Dias 0		7		14	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controlo: Postgate B original com BSR	Potencial (Eh)	25	0	-385.67	3.79	-390.33	4.04
	pH	6.74	0.00	6.97	0.02	7.09	0.02
	[Sulfato] mg/L	1011	0	167.67	52.00	216.67	65.92
	[Sulfureto] mg/L	0	0	388.30	12.92	456.35	32.13