

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOSIANE APARECIDA GASPAR

TESE DE DOUTORADO

**REMOÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM RESÍDUO
SÓLIDO DA INDÚSTRIA CANAVIEIRA PARA UTILIZAÇÃO COMO
CONDICIONADOR DE SOLO NA AGRICULTURA**

ORIENTADORA

Profa. Dra. Denise Bevilaqua

CO-ORIENTADORA

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

ARARAQUARA/SP

2016

JOSIANE APARECIDA GASPAR

**REMOÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM RESÍDUO DA
INDÚSTRIA CANAVIEIRA PARA UTILIZAÇÃO COMO CONDICIONADOR DE
SOLO NA AGRICULTURA**

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química - Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para a obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Drª Denise Bevilaqua

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

ARARAQUARA/SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

G249r Gaspar, Josiane Aparecida
Remoção de elementos potencialmente tóxicos em resíduo sólido da indústria canavieira para utilização como condicionador de solo na agricultura / Josiane Aparecida Gaspar – Araraquara : [s.n], 2016
192 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Denise Bevilaqua
Coorientador: Ana Teresa Lombardi

1. Lixiviação bacteriana. 2. Metais pesados.
3. Biorremediação. 4. Toxicidade-testes. 5. Resíduos sólidos.
I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

JOSIANE APARECIDA GASPAR

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 03/11/1983

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Bebedouro/SP

Filiação: Elisio Gonçalves Gaspar e Maria Emilia Bento Gaspar

Estado Civil: Casada

Profissão: Bióloga

Endereço: Rua Gavião Peixoto, 749, apto 201

Araraquara/SP

14801-029

e-mail: josianegaspar@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestre em Ciências dos Alimentos pela Universidade Estadual de São Paulo –
Faculdades de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara, concluído em
Dezembro de 2010.

Licenciada em Pedagogia pela Faculdade de Tecnologia, Ciências e Educação
FATECE, Pirassununga/SP, concluído em Dezembro de 2015.

Licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade Integradas FAFIBE,
Bebedouro/SP, concluído em Dezembro de 2006.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Apresentação de trabalhos em congressos científicos

GASPAR GRILLO, J. A., PALMIERI, M. C., MARUMO, J. T., LOMBARDI, A.T; FERREIRA, R.V.P., BEVILAQUA, D. Reduction of trace element in filter cake from sugarcane industry for the use in agriculture. In: 28° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis/SC.

GASPAR GRILLO, J. A., PALMIERI, M. C., MARUMO, J. T., LOMBARDI, A.T; FERREIRA, R.V.P., BEVILAQUA, D. Biolixiviação de elementos potencialmente tóxicos de elementos potencialmente tóxicos em torta de filtro de usina sucroalcooleira. In: XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental - ENAMA, 2014, Joao Pessoa/PB

3.2 Resumos publicados em anais de congressos científicos

GASPAR GRILLO, J. A., PALMIERI, M. C., MARUMO, J. T., LOMBARDI, A.T; FERREIRA, R.V.P., BEVILAQUA, D. Reduction of trace element in filter cake from sugarcane industry for the use in agriculture. In: 28° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis/SC.

GASPAR GRILLO, J. A., PALMIERI, M. C., MARUMO, J. T., LOMBARDI, A.T; FERREIRA, R.V.P., BEVILAQUA, D. Biolixiviação de elementos potencialmente tóxicos de elementos potencialmente tóxicos em torta de filtro de usina sucroalcooleira. In: XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental - ENAMA, 2014, Joao Pessoa/PB

3.3 Participação em eventos

- 28° Congresso Brasileiro de Microbiologia - Florianópolis/SC, 2015.
- XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental - ENAMA, João Pessoa/PB, 2014.

- Encontro - Entrepreneurship for graduate in chemistry: A glance for Brazilian competitiveness, innovation & development. 2014.
- Workshop Hands-on sobre Microscopia Eletrônica de Varredura e Preparação de Amostras. UNICAMP/Campinas, 2014.
- Treinamento sobre a Plataforma Web of Science, UNESP, Araraquara, 2014.
- Agilent Road Show, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2013.
- I Workshop da Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – IQ/UNESP, Araraquara/SP, 2012.
- Treinamento em Citometria de Fluxo. Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.
- Semana da SIPAT da UNESP – Araraquara, 2012.

3.4 Formação Complementar

- “Curso sobre Citometria de Fluxo”, oferecido pela BD-Biosciences em 13 de junho de 2012, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara/SP.

3.5 Visitas técnicas promovidas Instituto de Química:

- Usina Santa Fé, de Nova Europa, no dia 23 de maio de 2013.
- Cervejaria Heineken, Araraquara, no dia 7 de junho de 2013.
- Indústria Farmacêutica Cristália, Itapira /SP, no dia 26 de junho, 2013.

3.6 Trabalhos científicos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

Artigos científicos em preparação

GASPAR-GRILLO, J. A., FERREIRA, R.V.P., PALMIERI, M. C., LOMBARDI, A.T; MARUMO, J. T., BEVILAQUA. Metals bioremediation of filter cake from sugar cane industry for use as soil conditioner. Journal of Environmental Engineering.

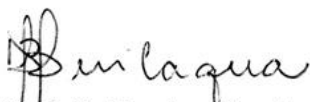
GASPAR-GRILLO, J. A., FERREIRA, R.V.P., PALMIERI, M. C., LOMBARDI, MARUMO, J. T., BEVILAQUA. Evaluation of the phytotoxicity of elutriate of filter cake bioleaching based on a bioassay with lettuce. Water, Air & Soil Pollution.

JOSIANE APARECIDA GASPAR

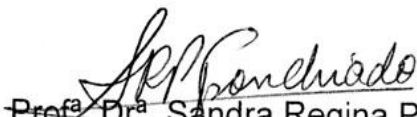
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 18 de abril de 2016.

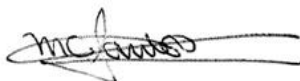
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Denise Bevilaqua (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Pompeiro Sponchiado
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Mirian Cristina dos Santos
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
Universidade Federal de São Carlos / UFSCar / São Carlos - SP

Dedico a eles esse título, meus pais amados (Elisio e Maria Emilia), meus irmãos queridos (Eloisa, Cintia e Marcio), meu sobrinho sapeca (Artur), aos meus sogros queridos (Jussara e Angelo). E uma dedicação especial ao grande amor da minha vida, você: Jean, meu amigo, companheiro e amante. Obrigada pelo carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Aos meus avós, Emilia, Rosa, Joaquim e Carlos (in memorian), pela sabedoria, experiência e humildade passadas. Infelizmente não tenho mais vocês aqui comigo, mas sei que lá de cima, estão felizes por mim

Obrigada por vocês acreditarem em meus sonhos e incentivarem meus estudos!

Espero corresponder a vocês e só dar motivos para orgulhá-los. Amo-os de todo o meu coração, nunca se esqueçam disto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a oportunidade de participar desta grande escola que é a vida, por ter iluminado a minha mente para que eu seguisse o caminho que, hoje, acredito ser o melhor.

A estimada professora Dra. Denise Bevilaqua, pela condução, condição de amadurecimento, pelos valiosos ensinamentos, pelo exemplo de profissional, pelos incentivos, pelas críticas que me fizeram e fazem crescer, pela confiança depositada que me fez ter responsabilidade pelo trabalho e pelas decisões tomadas, pelas oportunidades dadas a mim durante o desenvolvimento deste trabalho. A você, sempre serei grata!

A minha co-orientadora, Profa. Dra, Ana Teresa Lombardi, por suas grandes ideias, pelo seu apoio, incentivo, dedicação no ensino e exemplo de ética profissional associados com amizade e respeito. A sua seriedade e auxílio que permitiram a execução do trabalho.

Ao Instituto de Química de Araraquara pela excelente infraestrutura oferecida e a oportunidade concedida.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo), pela concessão de bolsa de doutorado (Processo número 2012 – 19115-0), pelo auxílio financeiro e no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial ao Waldenir (WAL), por toda amizade e pelo prazer da convivência ao longo deste período.

As secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia, bibliotecárias do IQ e funcionários do Banco da Fapesp - IQ, pela atenção e trabalhos prestados.

Ao Carlos A. Casali (UFSCAR), por sua valiosa e prestativa ajuda, na montagem dos ensaios fitotóxicos e pelo seu atencioso acompanhamento durante todo experimento.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela contribuição dada para enriquecimento de meus conhecimentos durante o curso de doutorado.

À usina São Martinho, pela concessão das amostras da pesquisa, bem como pelo apoio constante na realização deste trabalho, principalmente ao Sr. Oscar Paulino.

A banca examinadora de Qualificação, pelas sugestões.

Aos meus amigos de Bebedouro e Rincão (Marcinha, Fabiana, Rubens (cunhado), Gabriele, André, Madalena, Oscar, Rodrigo, Ricardo, Roberta, Adelcio, Thais, meus agradecimentos pelos incentivos e amizade. Deus enviou todos vocês para tornar minha vida mais alegre. Obrigada por estarem sempre pertinho de mim (apesar da distância física...).

Às famílias Gaspar, Bento e Grillo pelo carinho e incentivo.

As amigas que aqui surgiram, e que fizeram da minha vida acadêmica um grande aprendizado, pessoal e profissional.

Renata, obrigada por toda paciência e ajuda, por todos conselhos e desabafos, por todo conhecimento dividido. **Ana Laura**, pela sua amizade e parceria mesmo que tendo um oceano entre nós. **Fabiana**, obrigada pela amizade e por todas conversas que me fizeram crescer, por toda a força e boas energias transmitidas.

Laize, obrigada pela amizade, conselhos, pela parceria do dia a dia, pelas ajudas e dicas e grandeza de caráter. **Milena**, pela seriedade, humildade, exemplo de dedicação a pesquisa, por todos os momentos felizes. **Luana**, pela alegria, troca de ideias e por toda ajuda que você ofereceu durante sua estadia em Araraquara, obrigada por sua amizade. **Sikandar**, obrigada por dividir comigo não somente conhecimento científico, mas também o conhecimento da sua cultura. **Mauricio**, pelas horas de discussão sobre os resultados.

Raquel, Débora, Mariana A, Mari B, Iris, Maiara Riberto, e Samir obrigada pela amizade, suporte, pelos momentos compartilhados de trabalho, conversas,

churrascos e eventos “Biohidro”. A alegria do ambiente permitiu que tudo ficasse mais prazeroso.

É um ORGULHO trabalhar com todos vocês!

A todos os alunos de iniciação científica e estagiários (Ariane, Victor, Ayme, Natalia, Greice, Weslei, Bernardo, Bruna e Débora) que passaram pelo laboratório que me auxiliaram bravamente nas tarefas diárias.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

As grandes amigas, Maria Fernanda e Adriana por estarem sempre presentes ao meu lado desde a minha chegada nessa cidade, por toda amizade, ajuda dispensada e incentivo.

A Selma, Willian e Mateus pela substancial contribuição nas análises de DRX-X e ART- FTIR, pelo auxílio na interpretação dos difratogramas.

Ao Laboratório de multiusuários pela disponibilidade de utilização do espectrômetro de infravermelho.

Ao Instituto de Pesquisa energéticas e Nucleares – IPEN e a Itatijuca Biotech pela disponibilização do ICP-OES, em especial, ao Prof. Julio T. Marumo e Rafael Vicente pelo acompanhamento das análises.

Este trabalho não se trata apenas de um esforço individual. Todo o trabalho foi construído com significativas contribuições em diferentes esferas, por pessoas que surgiram pelo caminho e com certeza deixaram seu nome registrado na minha vida.

Louvo a Deus pela vida de cada pessoa acima. Agradeço a Deus pela conclusão deste trabalho e de mais um sonho.

*[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito [...]
não sou o que deveria ser,
mas graças a Deus, não sou o que era antes.
(Martin Luther King)*

*A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos
pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma
(John Ruskin)*

RESUMO

Atualmente, a indústria sucroalcooleira é tida como uma das indústrias mais importantes do cenário socioeconômico brasileiro. Entretanto, este setor gera grandes quantidades de resíduos. Dentre esses resíduos encontra-se a torta de filtro (TF), um resíduo orgânico sólido representativo. Uma alternativa para a disposição final da TF tem sido a reciclagem agrícola. Contudo, uma das principais preocupações em relação à aplicação deste composto no solo é a presença de contaminantes, como os elementos potencialmente tóxicos (EPTs). Estudos têm mostrado que a biolixiviação, um processo que se baseia na capacidade dos microrganismos transformarem os EPTs ligados a resíduos sólidos em formas solúveis extraíveis, é uma alternativa promissora para o tratamento de diversos resíduos. Assim sendo, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a remoção de elementos potencialmente tóxicos presentes no composto de torta de filtro produzido por uma usina sucroalcooleira utilizando a biolixiviação. Para isso, foram realizados ensaios de biolixiviação, utilizando inicialmente as bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans* - LR e *Acidithiobacillus thiooxidans* - FG01. Iniciou-se a pesquisa com duas amostras do composto de torta de filtro de safras diferentes (2014 e 2015). As amostras foram caracterizadas quanto ao seu potencial agrônomo e EPTs. Os ensaios de biolixiviação foram realizados em frascos agitados (150 rpm, 30°C), utilizando uma bactéria oxidante de ferro e a bactéria oxidante de enxofre suplementadas com FeSO_4 ou S^0 , respectivamente, bem como seus controles abióticos correspondentes. Foi utilizada uma concentração inicial de densidade de polpa de 2% (m/v), e posteriormente com 10% (m/v) de torta de filtro. Observou-se que amostras coletadas na safra de 2014 inibiram a oxidação do Fe^{2+} e a produção de ácido, parâmetros relacionados com as atividades microbianas. Sugere-se que a concentração de carbono orgânico presente nas amostras coletadas em 2014 seja um dos responsáveis pela inibição observada. Todos os ensaios subsequentes foram realizados com as amostras da safra de 2015. As solubilizações dos EPTs na TF, em ordem decrescente, utilizando *At. ferrooxidans* - LR como inóculo foram: 91% de Mn, de 65% de Zn, 43% de Pb, 34% de Al, 32% de Cr, 22% de Cu, e em frascos inoculados com *At. thiooxidans* - FG01 foram de 93% de Mn, 62% de Zn, 38% de Cr, 35% de Al, 35% de Pb, e 24% de Cu. Os resultados mostraram que as solubilizações dos EPTs nos grupos experimentais inoculados

não foram significativamente diferentes exceto para os íons metálicos Cr e Pb. Os EPTs foram correlacionados negativamente com a variação do pH e positivamente com potencial redox. O modelo Logístico foi usado para acompanhar o estudo do processo de biolixiviação. Extração sequencial dos EPTs mostrou que a maioria dos elementos estavam ligadas a frações disponíveis ao ambiente. Após o tratamento microbiano a maioria dos EPTs remanescentes da TF apresentou-se ligadas às frações mais estáveis e, por conseguinte, o resíduo biolixiviado poderia ser aplicado sobre o solo. As extrações observadas do nitrogênio e fósforo após o processo estão relacionadas à condição ácida do sistema. Por fim, os ensaios de fitotoxicidade aguda mostraram que os elutriatos obtidos dos resíduos biolixiviados foram classificados como uma baixa toxicidade sobre a germinação e crescimento das radículas de *Lactuca sativa* (alface), enquanto que os elutriatos sem tratamento foram classificados com uma elevada toxicidade. Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram evidências de que a biolixiviação é eficaz para atenuar a concentração final de elementos potencialmente tóxicos na torta de filtro, evitando a sua acumulação no solo, podendo assim ser utilizada como condicionador na agricultura.

Palavras-chave: Biorremediação; biolixiviação; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*; elementos potencialmente tóxicos; torta de filtro, extração sequencial, fitotoxicidade.

ABSTRACT

Currently, the sugar industry is considered one of the most important industries of the Brazilian socioeconomic scenario. However, this sector generates large amount of waste products, among which the filter cake (FC) is a representative solid waste. Agricultural recycling can be considered as an alternative to the final disposal of such solid waste. However, one of the main concerns regarding its application in the soil is the presence of contaminants such as trace elements. Studies have shown that bioleaching is a promising alternative for the treatment of various wastes. Bioleaching is efficient for the removal of potentially toxic elements (PTE), allowing the compost to be used as soil conditioner, without causing additional problems. The objectives of the present work were to evaluate the removal of potentially toxic elements present in the filter cake produced by a sugar and alcohol industry, through bioleaching. To accomplish this objective, we used bioleaching tests performed initially with the bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* - LR and *Acidithiobacillus thiooxidans* - FG01. Initially two samples of the filter cake of different harvests in 2014 and 2015 were used. The samples were characterized for their agronomic potential and presence of potentially toxic elements. Bioleaching experiments were carried out in flasks shaken (150 rpm at 30 °C) supplemented with FeSO_4 or S^0 depending on the bacteria, as well as their corresponding abiotic controls. An initial concentration of 2% pulp density (w/v) followed by 10% (w/v) concentration of the filter cake along with T&K and 9K media were used. The results showed that samples from the 2014 crop inhibited the growth of microorganisms in comparison with the 2015 one. All subsequent tests were performed with samples from 2015 crop. The potentially toxic elements solubilization in the filter cake was, in descending order using *At. ferrooxidans* – LR, 91%, Mn; 65%, Zn; 43%, Pb; 34%, Al; 32%, Cr and 22% of the Cu, and with *At. thiooxidans* - FG01 93%, Mn; 62%, Zn; 38%, Cr; 35%, Al; 35%, Pb and 24% of the Cu. The solubilization of potentially toxic elements in the inoculated experimental groups did not show significant difference except for Cr and Pb. Potentially toxic elements were negatively correlated with pH and positively correlated with redox potential. The Logistic model was shown to accompany the study of the bioleaching process. The sequential extraction of potential toxic elements showed that most of the elements were connected to fractions considered

available to organisms, and after the microbial treatment, most of the remaining potential toxic elements of the filter cake were present as more stable fractions. Therefore, we suggest that the bioleached residue can be applied to the soil. Nitrogen and phosphorus leaching were observed, and this is related to the acidic condition of the system. Finally, we tested the bioleached filter cake in lettuce through acute phytotoxicity tests that showed lower toxicity when compared with untreated filter cake. For these tests, we used elutriates obtained from the bioleached filter cake and the untreated filter cake. The *Lactuca sativa* germination and rootlets were evaluated. In general, we demonstrated that the bioleaching with *At. ferrooxidans* and *At. thiooxidans* have attenuated the potentially toxic elements concentrations in the filter cake, so presenting no final toxicity to lettuce. This has important environmental implications, since a residue can be treated and safely used as soil conditioner in agriculture.

Keywords: Bioremediation; bioleaching; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*; potentially toxic elements; filter cake, sequential extraction, phytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da relação entre as concentrações de íons metálicos essenciais e não essenciais e os efeitos microbiológicos provocados.....	33
Figura 2 - Diferentes vias de exposição dos elementos potencialmente tóxicos indicando as principais fontes.....	38
Figura 3 – Principais atividades da indústria sucroalcooleira.....	49
Figura 4 – Fertiirrigação com vinhaça.....	51
Figura 5 - Fases da compostagem.....	54
Figura 6 - Imagens da topografia microscopia de forças atômicas de <i>At. ferrooxidans</i> , linhagem LR na superfície da calcopirita (A) e morfologia da colônia em meio sólido (B).....	69
Figura 7 - Semente germinada de <i>Lactuca sativa</i> com sua radícula desenvolvida....	73
Figura 8 – Pilhas de compostagem de torta de filtro (A) e amostra de torta de filtro compostada utilizada na pesquisa.....	77
Figura 9 - Meio de cultura T&K utilizado para o crescimento de bactérias <i>At. ferrooxidans</i> . Em (A) início da oxidação do íon Fe^{2+} e (B) após oxidação completa do íon ferroso.....	79
Figura 10 - Meio de cultura 9K utilizado para o crescimento de bactérias <i>A. thiooxidans</i> . Em (A) início da oxidação do S^0 e (B) após oxidação completa do S^0 ..	80

Figura 11 - Sementes de <i>Lactuca sativa</i> utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade.....	95
Figura 12 - Modelo esquemático da composição dos tecidos da semente (aquênio) de alface.....	96
Figura 13 – Montagem dos experimentos com as sementes de <i>Lactuca sativa</i> utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade.....	100
Figura 14 – Difractogramas de raios X da amostra original de torta de filtro. Símbolos: K, caulinita; D, dolomita; Q, quartzo; H, hematita; M, magnetita; G, gibbsita e Sp, spangolita. A barra lateral indica a intensidade dos picos e os números acima da identificação dos picos, indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.....	106
Figura 15 - Concentração de íons ferrosos dissolvidos (a) e do potencial de óxido redução (b) em ensaios de biolixiviação com densidade de polpa de 2% de amostras de TF coletados nas safras dos anos de 2014 e 2015 utilizando <i>At. ferrooxidans</i> - LR (símbolos fechados). Símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.....	108
Figura 16 - Concentração de íons H ⁺ em ensaios de biolixiviação com densidade de polpa de 2% de amostras de TF coletados nas safras dos anos de 2014 e 2015 utilizando <i>At. thiooxidans</i> – FG01 (símbolos fechados). Símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.....	110
Figura 17 - Concentração de ácido sulfúrico 1 mol.L ⁻¹ consumido pela amostra para manutenção do pH a 2,0. Valor do pH inicial da amostra = 8,57.....	113
Figura 18 - Variação do pH em ensaios de biolixiviação utilizando 10% TF e <i>At. ferrooxidans</i> - LR e <i>At. thiooxidans</i> - FG01 (símbolos fechados). Os símbolos abertos correspondem ao controle abiótico. A seta (➡) indica correções nos valores do pH do meio.....	114

Figura 19 - Variação do Eh em ensaios de biolixiviação utilizando 10% TF e *At. ferrooxidans* - LR e *At. thiooxidans* - FG01 (símbolos fechados). Os símbolos abertos correspondem ao controle abiótico 117

Figura 20 - Variação da concentração de Ferro total, Fe^{2+} e Fe^{3+} por *At. ferrooxidans* - LR nos ensaios de biolixiviação com 10% TF. Símbolos fechados correspondem aos frascos inoculados e símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.....118

Figura 21 - Variação da concentração de íons H^+ utilizando *At. thiooxidans* - FG01 nos ensaios de biolixiviação com 10% TF. Símbolos fechados correspondem aos frascos inoculados e símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.....119

Figura 22 - Potencial mobilidade das espécies metálicas da torta de filtro antes (A) e após o processo de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* (B), *At. thiooxidans* (C) e potencial mobilidade dos EPTs (D).....121

Figura 23 - Solubilização dos elementos potencialmente tóxicos (a) Al, (b) Cr, (c) Cu, (d) Mn, (e) Pb e (f) Zn durante os ensaios de biolixiviação utilizando as bactérias *At. ferrooxidans* – LR (■) e *At. thiooxidans* – FG01 (●) (símbolos fechados) e seus respectivos controles (símbolos abertos) com uma concentração de 10% de densidade de polpa de TF.....124

Figura 24 - Eficiência da solubilização dos elementos potencialmente tóxicos durante os ensaios de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (a) and *At. thiooxidans* – FG01 (b). Os pontos representam as solubilizações do Al (■), Cr (●), Cu (▲), Mn (★), Pb (◀) e Zn (◆). As linhas vermelhas representam o cálculo do modelo Logística e a linha (·····) o valor do pH.....128

Figura 25 – Difrátogramas de raios X da amostra original de torta de filtro (A) e dos resíduos finais do ensaio de biolixiviação sob vários tratamentos: controle abiótico + Fe^{2+} (B), *At. ferrooxidans*. Símbolos: K, caulinita; S, enxofre; J, jarosita; D, dolomita; Q, quartzo; H, hematita; M, magnetita; G, gibbsita; Gy, gipsita; Sp, spangolita e Del, delafossita. A barra lateral indica a intensidade dos sinais e os números acima da identificação dos sinais, indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.....135

Figura 26 - Difrátogramas de raios X da amostra original de torta de filtro (A) e dos resíduos finais do ensaio de biolixiviação sob vários tratamentos: controle abiótico + S^0 (B), *At. thiooxidans* (C). Símbolos: K, caulinita; S, enxofre; J, jarosita; D, dolomita; Q, quartzo; H, hematita; M, magnetita; G, gibbsita; Gy, gipsita; Sp, spangolita e Del, delafossita. A barra lateral indica a intensidade dos sinais e os números acima da identificação dos sinais, indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.....136

Figura 27 - Espectros de ATR-FTIR de amostras de TF antes e após o processo de biolixiviação.....139

Figura 28 - Elutriatos das amostras antes (A) e após a biolixiviação (B).....144

Figura 29 – Taxa de germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas ao elutriato de TF em diferentes concentrações. Em (A) antes do processo de biolixiviação (B) após o processo de biolixiviação.....147

Figura 30 – Curva da taxa de germinação após 120 horas de exposição em função ao teor de TF.....148

Figura 31 – Germinação relativa para amostras com diferentes proporções de TF. Em (A) antes do processo de biolixiviação (B) após o processo de biolixiviação.....150

Figura 32 – Índice de velocidade da germinação para amostras com diferentes proporções de TF. Em (A) antes do processo de biolixiviação (B) após o processo de biolixiviação.....	152
Figura 33 - Logaritmo do índice de velocidade da germinação das sementes de alface para amostras com diferentes porcentagens de TF	153
Figura 34 – Alongamento relativo das radículas para amostras com diferentes proporções de TF. Em (a) antes do processo de biolixiviação (b) após o processo de biolixiviação.....	154
Figura 35 – Regressão linear obtidas a partir do tratamento de sementes de alface com elutriato de TF com diferentes proporções de TF antes do processo de biolixiviação.....	157
Figura 36 – Índice de germinação para amostras com diferentes proporções de Em (a) antes do processo de biolixiviação (b) após o processo de biolixiviação.....	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo médio de elementos potencialmente tóxicos nos principais tipos de rochas e na solução do solo.....	35
Tabela 2 - Função biológica, toxicidade para plantas e animais e classificação de risco à saúde humana em relação a alguns EPTs importantes.....	45
Tabela 3 - Produção de cana de açúcar, açúcar e etanol nos estados brasileiro da safra 2013/2014.....	48
Tabela 4 - Concentração da matéria orgânica (MO) e elementos minerais, valores de pH, e taxas de C/N determinadas em torta de filtro foram calculados com base no peso seco. Os dados são extraídos de relatórios diferentes autores para contrastar condições pedoclimáticas.....	52
Tabela 5 - Valores orientadores dos elementos potencialmente tóxicos da Resolução 420 do CONAMA e da CETESB nº45/14 para solos no Estado de São Paulo.....	58
Tabela 6 - Limite máximo de EPTs na massa seca permitidos nos diferentes fertilizantes orgânicos.....	59
Tabela 7 - Teores máximos de EPT's nos compostos orgânicos em vários países europeus.....	60
Tabela 8 - Métodos de extração sequencial de elementos-traços desenvolvidos por vários autores para diferentes matrizes.....	64
Tabela 9 - Exemplos de espécies de animais e de plantas usadas na avaliação ecotoxicológica de solos.....	72
Tabela 10 - Composição do composto da torta de filtro.....	76

Tabela 11 - Tratamento experimental do item 4.4.....	83
Tabela 12 - Tratamento experimental para os experimentos de biolixiviação.....	84
Tabela 13 - Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de analitos por FAAS.....	88
Tabela 14 - Extração sequencial utilizada para especiação dos elementos potencialmente tóxicos.....	90
Tabela 15 - Instrumentos e parâmetros analíticos para ICP-OES.....	92
Tabela 16 - Condições gerais utilizadas no ensaio de germinação e desenvolvimento da <i>L. sativa</i>	99
Tabela 17 - Caracterização da torta de filtro das safras de 2014 e 2015.....	105
Tabela 18 - Concentração total do Al, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn remanescentes na amostra da torta de filtro após o processo de biolixiviação.....	120
Tabela 19 - Ajuste da curva segundo modelo logístico.....	129
Tabela 20 - Análise do coeficiente de correlação de Pearson e Spearman dos ensaios de biolixiviação.....	131
Tabela 21 - Extração dos nutrientes (N e P) durante o processo de biolixiviação em amostras inoculadas com <i>At. thiooxidans</i> - FG01.....	132
Tabela 22 - Minerais identificados através das fases cristalinas mostradas nas Figuras 25 e 26.....	134
Tabela 23 - Média e desvio padrão do peso seco da torta de filtro antes e após o processo de biolixiviação.....	142

Tabela 24 - Media e desvio padrão da capacidade de campo das amostras antes e após o processo de biolixiviação.....	143
Tabela 25 - Concentração de elementos potencialmente tóxicos no elutriato (em mg L ⁻¹).....	145
Tabela 26 - Valores de pH no elutriato utilizados nos ensaios de fitotoxicidade	145
Tabela 27 – Classificação de toxicidade proposta por Martignon e Kapustka.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TF – torta de filtro

EPTs – elementos potencialmente tóxicos

At. ferrooxidans – *Acidithiobacillus ferrooxidans*

At. thiooxidans – *Acidithiobacillus thiooxidans*

pH – potencial hidrogeniônico

Eh – potencial redox

Fe²⁺ - íon ferroso

Fe³⁺ - íon ferrico

FAAS – espectrometria de absorção atômica de chama

ICP - OES – espectrometria emissão atômica

DRX – difratometria de raio X

FTIR – espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier

ATR – espectroscopia refletância total atenuada

IG – Índice de germinação

IVG – índice de velocidade de germinação

IC₅₀ – concentração necessária para obter 50% de inibição no desenvolvimento radicular

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	33
2.1 Contaminação dos solos por elementos potencialmente tóxicos	33
2.1.1 Fontes de elementos potencialmente tóxicos.....	35
2.1.2 Fatores que afetam a disponibilidade de elementos potencialmente tóxicos no solo	40
2.1.3 Elementos potencialmente tóxicos e seus impactos em plantas e na saúde pública	42
2.2 Resíduos orgânicos	46
2.3 Fontes de resíduos da indústria canavieira	48
2. 3.1 Uso da torta de filtro na produção de cana de açúcar.....	52
2.4 Elementos traço em fertilizantes orgânicos	56
2.5 Legislação	57
2.5.1 Legislação - Elementos potencialmente tóxicos nos solos	57
2.5.2 Legislação - Elementos potencialmente tóxicos nos fertilizantes orgânicos.....	59
2.6 Extração sequencial	61
2.7 Biolixiviação	66
2.8 Microrganismos envolvidos no processo	68
2.8.1 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	69
2.8.2 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	71
2.9 Testes de Toxicidade	71
2.9.1 Organismo Teste – <i>Lactuca sativa</i>	73
3 OBJETIVOS	76
3.1 Objetivos específicos	76
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
4.1 Composto da torta de Filtro da usina de açúcar e álcool.....	77
4.2 Caracterização Físico-Química.....	78

4.2.1 Caracterização da torta de filtro	78
4.2.2 Elementos potencialmente tóxicos	79
4.2.3 Consumo de ácido da amostra de TF da safra de 2015	79
4.3 Linhagens bacterianas	80
4.3.1 Cultivo e manutenção dos microrganismos	81
4.3.1.1 Meio de cultivo específico para o crescimento e a manutenção da linhagem de <i>At. ferrooxidans</i> - LR	81
4.3.1.2 Meio de cultivo específico para crescimento e manutenção das linhagens de <i>At. thiooxidans</i> – FG01	82
4.4 Influência das amostras de torta de filtro sob a oxidação dos íons ferrosos e produção de ácido	83
4.5 Ensaios de biolixiviação na presença de íons ferrosos e enxofre elementar	84
4.6 Procedimentos analíticos realizados nos ensaios descritos dos itens 4.4 e 4.5	85
4.6.1 Medidas de pH e potencial redox (Eh)	86
4.6.2 Determinação de íons ferrosos (Fe^{2+})	86
4.6.3 Determinação da concentração de H^+ no meio (produção de ácido)	88
4.7 Determinação de Al, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn por espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS)	88
4.8 Distribuição das Espécies Metálicas	89
4.9 Análise da extração sequencial utilizando ICP-OES	92
4.10 Avaliação dos nutrientes após os ensaios de biolixiviação	93
4.11 Análises mineralógicas	94
4.11.1 Difração de raios X (DRX)	94
4.11.2 Análise estrutural por FTIR-ATR	94
4.12 Análise fitotóxica	95
4.12.1 Processamento do composto da torta de filtro para os bioensaios	97

4.12.2 Cálculo do peso seco das amostras	97
4.12.3 Capacidade de campo das amostras	97
4.12.4 Obtenção do elutriato - INGERSOLL (1995); ABNT, 2004 – norma NBR 10.006.....	98
4.13 Ensaio de germinação e desenvolvimentos das radículas de <i>L. sativa</i>	98
4.13.1 Taxa de Germinação das sementes (%)	101
4.13.2 Germinação relativa das sementes (%G)	101
4.13.3 Índice de velocidade de germinação	102
4.13.4 Alongamento relativo das radículas.....	102
4.13.5 Índice de germinação (IG).....	103
4.14 Análises estatísticas	103
5. Resultados e Discussão	105
5.1 Caracterização inicial da torta de filtro	106
5.2 Influência das amostras de torta de filtro sob a oxidação dos íons ferrosos e produção de ácido	108
5.3 Consumo ácido da amostra	112
5.4 Ensaios de biolixiviação com 10% de densidade de polpa de TF na presença de íons ferrosos e enxofre elementar com a amostra da safra de 2015.....	114
5.5 Distribuição das espécies químicas dos EPTs.....	120
5.6 Solubilização de elementos potencialmente tóxicos.....	124
5.7 Estudo do coeficiente de correlação entre a eficiência da solubilização com pH e Eh	131
5.8 Avaliação dos nutrientes após o processo de biolixiviação.....	133
5.8.1 Extração de nutrientes (N, P).....	133
5.9 Caracterização Mineralógicas dos resíduos finais da biolixiviação	135
5.9.1 Análise DRX	135
5.9.2 ATR – FTIR	139

5.10 Estudo fitotóxico dos resíduos	143
5.10.1 Peso seco das amostras.....	143
5.10.2 Capacidade de campo das amostras	143
5.10.3 Obtenção dos elutriatos	144
5.11 Testes de germinação e desenvolvimento das radículas de <i>L. sativa</i>.....	147
5.11.1 Germinação relativa	150
5.11.2 Índice de velocidade de germinação (IVG).....	152
5.11.3 Alongamento relativo das Radículas	154
5.11.4 Índice de germinação	158
6 CONCLUSÃO	162
REFERENCIAS.....	164

1 INTRODUÇÃO

A indústria sucroalcooleira é tida como uma das indústrias mais importantes do cenário socioeconômico brasileiro. Um dos subprodutos gerados na produção de açúcar e etanol é a torta de filtro (TF), sendo sua composição variável dependente do processo de fabricação que é utilizado. A produção desse resíduo varia de 30 a 40 kg por tonelada de cana processada.

A torta de filtro apresenta uma composição química que confere a este resíduo uma potencialidade de ser utilizado como fertilizante orgânico na agricultura. Embora o uso da TF no setor agrícola possa ser interessante, existe a presença de patógenos, compostos fitotóxicos, odores e principalmente elementos potencialmente tóxicos (EPTs), que podem estar presentes em formas móveis, podendo vir a ser biodisponíveis, provocando bioacumulação nas cadeias alimentares.

Na literatura têm sido propostas várias alternativas para se diminuir os EPTs em diferentes tipos de resíduos, sendo que a biolixiviação tem sido considerada uma das melhores opções, pois apresenta alta eficiência na remoção de elementos potencialmente tóxicos, a um custo energético inferior se comparada com processos pirometalúrgicos. Há também a economia de insumos utilizados, pois o próprio microrganismo produz ácidos e agentes oxidantes a partir de substratos presentes na amostra, sendo necessário um baixo investimento de capital inicial, com baixo custo operacional e reduzida necessidade de mão de obra especializada na operação (GARCIA JR, BEVILAQUA, 2008).

A biolixiviação ou lixiviação bacteriana é um processo biotecnológico que se fundamenta na utilização de microrganismos capazes de solubilizar elementos potencialmente tóxicos pela oxidação de sulfetos minerais (BABEL e DACERA, 2006; BEVILAQUA et al., 2011).

A concentração total de EPTs diz pouco sobre sua disponibilidade e ação ou destino desses elementos no ambiente, mas combinada com informações da especiação dos elementos, previsões mais realísticas dos efeitos ambientais dos elementos potencialmente tóxicos podem ser feitas. O conhecimento da especiação é importante para prognosticar o comportamento dos EPTs na TF e, posteriormente, no conjunto solo / TF, no que diz respeito à sua mobilidade, biodisponibilidade,

possibilidade de imobilização e avaliação das frações biodisponíveis. De acordo com a literatura, a eficiência da biolixiviação é dependente da especiação do metal, e diversos métodos de extração sequencial têm sido propostos com a finalidade de se quantificar a distribuição das frações de EPTs.

Diante do exposto, fica claro que a adição do composto da torta de filtro no solo pode aumentar significativamente a concentração de elementos potencialmente tóxicos. Apesar de que muitas vezes a concentração de EPTs possa estar dentro do limite máximo permitido pela legislação, é importante remover ou reduzir a concentração do mesmo, uma vez que esses elementos não são biodegradáveis e podem se associar a formas disponíveis para o meio ambiente, promovendo a contaminação ambiental futura.

Após o tratamento biológico do resíduo é importante avaliar os potenciais efeitos adversos de substâncias tóxicas, caso presentes, por meio de testes de toxicidade. Estes ensaios são realizados utilizando elutriatos obtidos dos resíduos que podem identificar e quantificar as concentrações das substâncias tóxicas presentes no resíduo. Trata-se de análises complementares para avaliar o risco ambiental desses elementos.

Até o presente momento não foram reportados na literatura estudos relacionados com a biolixiviação de elementos potencialmente tóxicos em torta de filtro, nem registros de pesquisas relacionadas à sua toxicidade. Sendo assim, é de extrema importância o estudo deste material, uma vez que o mesmo é rico em nutrientes e matéria orgânica, indo ao encontro das propostas de desenvolvimento sustentável.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Contaminação dos solos por elementos potencialmente tóxicos

O solo desempenha papel fundamental na sustentabilidade do ecossistema terrestre, pois serve de habitat para diversos organismos, bem como é responsável pelo crescimento de plantas, pela degradação e pela reciclagem da biomassa microbiana. Trata-se, portanto, de um sistema heterogêneo complexo, constituído por componentes orgânicos, minerais, gasosos e líquidos (ALLOWAY, 1995). O solo ainda possui as funções de constituir uma fonte de alimento para diferentes grupos de organismos, atuando como coletor de resíduos orgânicos e inorgânicos, sequestrando compostos perigosos e agindo como manto protetor para as águas subterrâneas (SOUSA et al., 2008).

A contaminação do solo por elementos potencialmente tóxicos tem se tornado motivo de preocupação mundial, não só devido à sua toxicidade para todos os organismos, mas por não se degradarem, serem estáveis e persistentes no meio ambiente (HSEU et al., 2010). A acumulação dos elementos potencialmente tóxicos em certas regiões tem atingido níveis preocupantes para o equilíbrio dos ecossistemas, sendo na maioria das vezes causado pela ação antrópica do homem (PEREIRA, 2010).

Os elementos potencialmente tóxicos são geralmente sólidos à temperatura ambiente, possuem condutividade elétrica elevada, brilho, maleabilidade, e podem perder elétrons e formar íons positivos. De acordo com a sua posição na Tabela Periódica, os elementos potencialmente tóxicos incluem elementos potencialmente tóxicos alcalinos, alcalinos elementos potencialmente tóxicos terrosos, elementos potencialmente tóxicos de transição e elementos potencialmente tóxicos de terras raras. No entanto, dentro desta classificação estão presentes os não elementos potencialmente tóxicos, que existem principalmente no estado gasoso à temperatura ambiente (FRAGA, 2005; UKIWE, 2013).

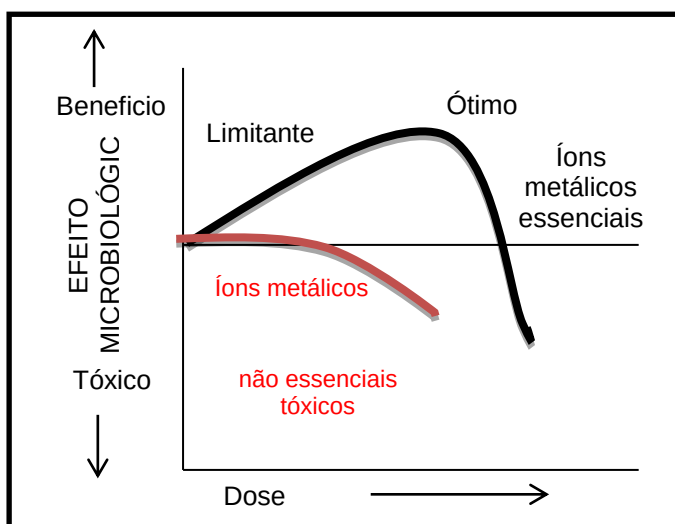
Apesar do termo EPTs remeter a uma conotação de toxicidade, alguns destes elementos são considerados essenciais do ponto de vista biológico, e são ditos bioenergéticos como o sódio (Na), magnésio (Mg), potássio (K), cálcio (Ca), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), cobre, (Cu), zinco (Zn), selênio (Se) e

molibdênio (Mo), pois sua presença é essencial para permitir o funcionamento de algumas rotas bioquímicas, sendo essenciais também ao crescimento de comunidades microbianas (GADD, 1992; NOGUEIROL, 2008).

Outros, como o cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), e o arsênio (As), não possuem qualquer função biológica e/ou fisiológica conhecida (VALLS e DE LORENZO, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996), sendo, portanto, considerados elementos não essenciais. Todavia, mesmo os que possuem uma função biológica e/ou fisiológica, quando presentes em altas concentrações no ambiente e sob condições específicas, podem causar efeitos negativos ao ecossistema. Além disso, ao entrarem na cadeia alimentar e serem absorvidos pelo ser humano, são responsáveis por diversas doenças (MARTINS, C. A. et al., 2011).

No caso dos efeitos microbiológicos, os íons metálicos essenciais também possuem uma gama de concentração que pode limitar o crescimento ótimo dos microrganismos. Contudo, os íons não essenciais provocam toxicidade a qualquer concentração, existindo, no entanto, um limite até onde os microrganismos conseguem tolerar esses efeitos nocivos (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da relação entre as concentrações de íons metálicos essenciais e não essenciais e os efeitos microbiológicos provocados



Fonte: GADD, 1992 (com modificações).

Fatores como concentração, tipos de organismos expostos, capacidade de assimilação dos EPTs, vias de exposição, entre outros, devem ser contextualizados para definir uma real toxicidade desses elementos (PEINENBURG & JAGER, 2003).

2.1.1 Fontes de elementos potencialmente tóxicos

Em ecossistemas terrestres, o solo é o principal repositório de contaminantes químicos. Da mesma forma, em sistemas aquáticos, os sedimentos servem de destino final para esses produtos químicos. Os elementos potencialmente tóxicos têm acesso ao solo através dos processos pedogênico e antropogênico (BOLAN et al., 2014; KABATA-PENDIAS, MURKHERJEE, 2007).

A origem primária dos EPTs no solo é o material de origem, uma vez que a maioria das rochas contém em sua composição grande número de elementos potencialmente tóxicos. Os processos naturais que contribuem para a presença de elementos traço na água são a solubilização de rochas e lixiviação a partir do solo (COSTA, N. C., 2005; MATINS, 2011).

O teor total de elementos potencialmente tóxico não pode ser utilizado como índice para estimar a sua disponibilidade em solos, visto que somente as formas solúveis e trocáveis é que estão disponíveis para absorção pelas raízes das plantas (SCHMIDT, 2013). A textura do solo, o pH, o potencial redox (Eh), o teor de matéria orgânica (MOS), a capacidade de troca de cátions (CTC) e os teores de óxidos de Fe, Al, Mn são importantes fatores que influenciam a biodisponibilidade dos EPTs para o solo (HOOD, 2010; KABATA - PENDIAS, MURKHERJEE, 2007).

Os fatores citados acima controlam os complexos na solução do solo, as concentrações de íons metálicos, e ainda exercem influência na absorção das plantas (McLEAN & BLEDSOE, 1992; SPOSITO et al., 1982). A disponibilidade e absorção dos EPTs às plantas é dependente da quantidade total de elementos disponíveis na solução (fator quantidade), da atividade dos íons da solução do solo (fator intensidade), e da taxa de transferência do elemento da fase sólida às fases líquida e às raízes da planta (SCHMIDT, 2013). Os fatores que afetam a disponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos nos solos se encontram discutidos com mais afinco no próximo item.

Os níveis naturais de elementos potencialmente tóxicos no solo dependem de duas características: o tipo de rocha sobre a qual o solo se desenvolveu e, principalmente, os constituintes minerais do material de origem, conforme demonstrado na Tabela 1.

De acordo com Zhang, X. P. e colaboradores (2002), quanto maior for o desenvolvimento do solo, menor será a influência da rocha parental.

Tabela 1 - Conteúdo médio de elementos potencialmente tóxicos nos principais tipos de rochas e na solução do solo

Elemento	Crosta terrestre	Rochas ígneas			Rochas sedimentares			Solução do solo
		Ultramáficas	Máficas	Graníticas	Cabonatos	Arenitos	Folhelhos	
.....mg Kg ⁻¹								mmol L ⁻¹
As	1,5	1	1,5	1,5	1	1	13	0,01
Cd	0,1	0,12	0,13	0,009	0,028	0,05	0,22	0,04
Co	20	110	35	1	0,1	0,3	19	0,08
Cr	100	2980	200	4	11	35	90	0,01
Cu	50	42	90	13	5,5	30	39	1
Hg	0,05	0,004	0,01	0,08	0,16	0,29	0,18	0,0005
Ni	80	2000	150	0,5	7	9	68	0,17
Pb	14	14	3	24	5,7	10	23	00,005
Se	0,05	0,05	0,13	0,05	0,03	0,01	0,5	0,06
Zn	75	58	100	52	20	30	120	0,08

Fonte: NOGUEIROL, 2008.

Conforme já citado anteriormente, as ocorrências dos elementos potencialmente tóxicos possuem dependência com a origem onde o solo se formou nos processos de formação da composição e da partição dos componentes com a parte sólida. A evidencia da relação do solo com a origem de formação é maior quando o primeiro é formado “in situ” sobre a rocha, tornando-se menos expressiva nos solos originados sobre materiais intemperizados (NOGUEIROL, 2008, VALADARES, 1975).

Contudo, os solos originados de rochas básicas, naturalmente mais ricas em elementos potencialmente tóxicos, possuem teores mais elevados desses elementos, quando comparados com aqueles formados sobre granitos, gnaisses, arenitos e siltitos (NOGUEIROL, 2008). Sabe-se, ainda, que esses solos também apresentam um potencial maior de disponibilidade de elementos potencialmente

tóxicos para as plantas quando comparados com os desenvolvidos de gnaiss e arenito + sedimentos do terciário (OLIVEIRA, T. S., 1996).

Fadigas (2006), em estudos realizados no Brasil, analisando um conjunto de 256 amostras de solo, principalmente latossolos e argissolos, encontrou teores totais em mg Kg^{-1} de Cd (0,3 - 1,6), Pb (3 - 40), Zn (6 - 79), Cu (2 - 119), Ni (5 - 35), Cr (19 - 65) e Co (2 - 20).

Entre os EPTs citados anteriormente, alguns são comuns à nutrição de plantas (Cu, Mn, Zn, Co, etc), e (Cr, Cu, Se e Zn) são comuns à saúde humana, recebendo o nome de micronutrientes. É válido ressaltar que, dependendo dos teores e das condições físico-químicas ambientais, os micronutrientes passam a ser potencialmente tóxicos, exercendo função de contaminante do solo, da água e do ar (LARCHER, 2004). Como exemplo, uma concentração de 2 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se em água torna-se prejudicial à sobrevivência de peixes e à vida selvagem (LEMLY, 2004). O selênio orgânico dissolvido ou sob formas aniônicas, Se (IV) e Se (VI), podem ser bioacumulados. O selênio na forma orgânica pode substituir o enxofre em aminoácidos e proteínas, sendo estas essenciais na transição genética, e as alterações ocorridas podem resultar no desenvolvimento de malformações ocasionadas por mudanças genéticas (ANDRADE, M. G. et al., 2014).

A outra categoria mencionada é denominada antropogênicos, ou seja, quando os elementos potencialmente tóxicos são adicionados ao solo pelas atividades humanas como a mineração, fundição, aplicação de agrotóxicos, fertilizantes corretivos, resíduos orgânicos e inorgânicos, irrigação com água contaminada, queima de biomassa na zona rural, fabricação de baterias e eletrônicos, dentre outros, conforme relatado por Alloway, (1990; 1995).

Em áreas agrícolas a adição de fontes antrópicas como resíduos orgânicos, que apresentam com frequência teores elevados de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni e Zn, contribuem para o aumento dos teores desses elementos potencialmente tóxicos nos solos das áreas cultivadas. Quando esses elementos são adsorvidos e, principalmente, bioacumulados nas plantas, podem entrar na cadeia alimentar por meio do consumo dos produtos agrícolas (GHOSHROY et al., 1998).

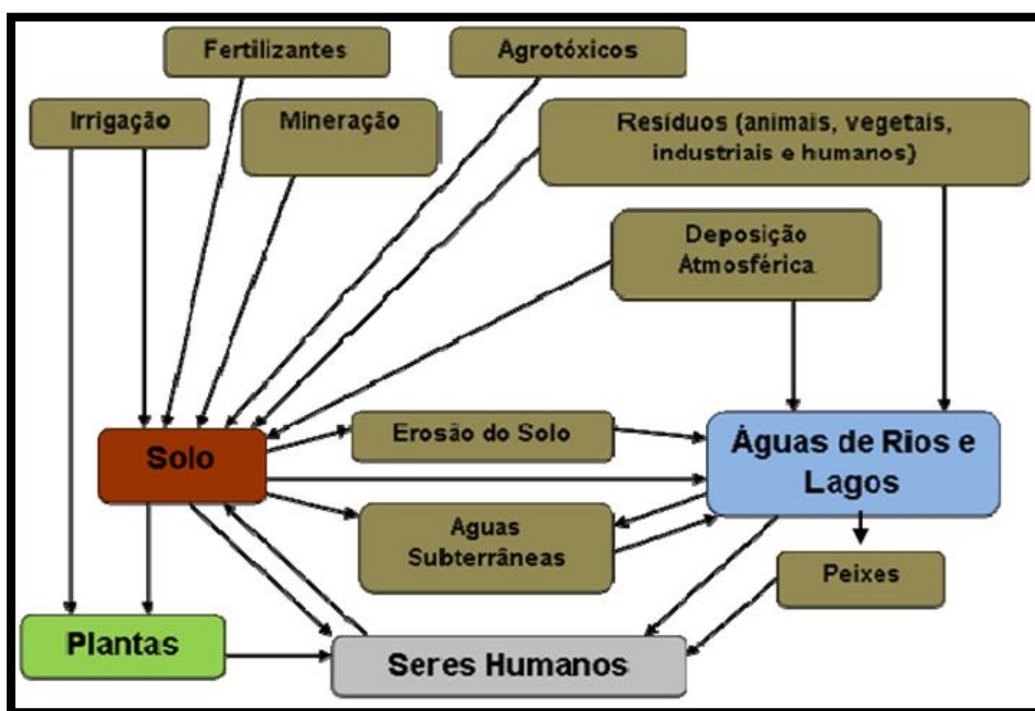
Os elementos tóxicos podem também se acumular no solo pelo uso contínuo e prolongado de resíduos industriais e urbanos, de água de irrigação poluída e pela deposição atmosférica.

Produtos como os fertilizantes fosfatados podem apresentar em suas moléculas elementos traço, que são liberados ao ambiente após a biodegradação biológica do produto. Isto se confirma pela afirmação de Malavolta (1994), em que os defensivos agrícolas podem conter Cu, Hg, Cd, que podem ser liberados no ambiente, chegando por fim ao solo.

Conforme relatado, as diferentes atividades humanas provocam impactos ambientais que na maioria dos casos podem colocar em risco o meio ambiente e a própria qualidade de vida das pessoas. Dentro desse contexto de mudanças no ambiente causadas pelo homem surge a problemática ambiental acerca dos elementos traço.

As vias de exposição são as mais diversas, podendo percorrer vários caminhos diferenciados sendo, contudo, as principais vias diretas de exposição humana os solos, as águas e as plantas (BURAK et al., 2008). A Figura 2 apresenta alguns desses caminhos, indicando as principais fontes de adição de elementos potencialmente tóxicos traço no ambiente.

Figura 2 - Diferentes vias de exposição dos elementos potencialmente tóxicos indicando as principais fontes



Fonte: MARTINS, C. A. et al., 2011.

A poluição atmosférica causada pela presença de chumbo na gasolina era um grande problema em muitos países onde não havia nenhuma restrição sobre o uso de gasolina com chumbo (FENGER, 2009). Na Europa e na América do Norte o bio-sólido é a principal fonte de elementos potencialmente tóxicos nos solos. No entanto, os fertilizantes fosfatados são considerados como sendo a maior fonte de EPTs, especialmente de Cd, na Austrália e na Nova Zelândia (LOGANATHAN, et al., 2008).

Os compostos à base de fosfato contêm uma variedade EPTs (WUANA, OKIEIMEN, 2011). A contaminação por cádmio dos solos agrícolas é preocupante porque atinge a cadeia alimentar através do uso regular de fertilizantes fosfatados contendo Cd. O cádmio presente na maioria dos fertilizantes fosfatados se origina principalmente das rochas fosfáticas utilizadas para a fabricação fertilizantes fosfatados (VALLE, 2012).

Grandes quantidades de Cu são utilizadas na agricultura, na horticultura e na pecuária. Muitas formulações de fungicidas contêm Cu, tais como oxicloreto de cobre e mistura de 'Bordeaux', que atua como um promotor de crescimento em

unidades de criação de porcos e aves caipira (BOLAN, ADRIANO, NAIDU, 2003). As acumulações de Cu em solos agrícolas são resultantes do contínuo uso de Cu presentes em fungicidas e biofertilizantes, e a sua aplicação tem sido relatada em muitos países (CHOPIN et al., 2008; WIGHTWICK et al., 2010).

Uma das principais consequências da acumulação de excesso de Cu em solos é a sua toxicidade para as plantas e comunidades microbianas, como no exemplo a aplicação de fungicidas contendo Cu que resulta no acúmulo de Cu no solo diminuindo a diversidade da comunidade microbiana (ZHOU et al., 2011).

2.1.2 Fatores que afetam a disponibilidade de elementos potencialmente tóxicos no solo

Os elementos potencialmente tóxicos podem ser retidos no solo pelas reações de complexação, pela sorção e pela precipitação, e são removidos do solo através da absorção pelas plantas, lixiviação e volatilização. Apesar da maioria dos EPTs não estarem sujeitos a perdas por volatilização, alguns EPTs, como As, Hg, e o Se, tendem a formar compostos gasosos (BOLAN, CHOPPALA, KUNHIKRESHNAN, 2013; MAHIMAIRAJA et al., 2005). O destino dos EPTs no solo é dependente das propriedades do solo e de fatores ambientais (BOLAN et al., 2014), além da forma com que o elemento se encontra no solo.

A retenção (adsorção) dos elementos potencialmente tóxicos nas superfícies das partículas coloidais dos solos pode acontecer através de mecanismos de adsorção específica e adsorção não-específica (BOLAN et al., 1999; SPARKS, 2003).

Segundo Sposito (1984), a mobilidade dos íons metálicos depende da natureza da fase sólida e da proporção de seus constituintes, da propriedade da fase líquida e das espécies metálicas presentes no solo.

Os principais atributos do solo que afetam a disponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos são o pH, a composição e a força iônica da solução, a presença de ligantes e íons competidores, as espécies e a concentração dos elementos. Dentre todos os parâmetros citados da solução do solo, o pH é um dos mais importantes, pois está correlacionado positivamente com a adsorção e

dessorção dos elementos potencialmente tóxicos (HARTER, NAIDU, 2001; ROSS, S. M., 1994).

A fração orgânica do solo também exhibe propriedades de adsorção. Ela tem uma afinidade muito grande pelos cátions e normalmente se correlaciona com a quantidade desses no solo (HODGSON, 1963). A matéria orgânica oferece sítios para a troca de cátions, mas sua grande afinidade com os elementos potencialmente tóxicos é devida a ligantes ou grupos que formam quelatos ou complexos com esses elementos potencialmente tóxicos.

Os complexos formados entre os elementos potencialmente tóxicos e a fração orgânica dos solos podem ser solúveis ou não, e a solubilidade dos complexos que são formados são dependentes da natureza dos ligantes orgânicos. Complexos metálicos formados, por exemplo, com ácidos húmicos são insolúveis, ao passo que os complexos formados com os ácidos fúlvicos, proteínas e aminoácidos são geralmente solúveis. Contudo, a fração solúvel da matéria orgânica pode se tornar insolúvel quando se forma complexos organominerais com a fração argila (NAIDU et al., 1994).

O aumento do pH e os principais grupos funcionais que tomam parte dessas reações são os carboxílicos, fenólicos, alcoólicos, enólicos e alguns tipos de carbonila (C=O) (BOLAN et al., 2014).

Em pH ácido os elementos potencialmente tóxicos se encontram na sua forma livre. Contudo, a pH alcalino os cátions pesados se precipitam sob forma de hidróxidos ou óxidos insolúveis (GADD, GRIFFITHS, 1978). Isso significa que em solos ácidos os EPTs possuem uma maior mobilidade, ficando disponíveis para serem absorvidos pelos microrganismos e pelas plantas. Adicionalmente, para cada unidade decrescente de pH ocorre um aumento geralmente de duas unidades a concentração de EPTs na solução do solo (RIEUWERTS et al., 1998; SANDERS et al., 1986).

Segundo Alloway (1995), as principais formas em que os EPTs podem estar no solo são:

- ✓ Solúveis: íons livres, complexos solúveis com ânions inorgânicos ou ligantes orgânicos (biomoléculas e ácidos fúlvicos). Nesta forma os EPTs são absorvidos pelas plantas ou lixiviados no solo;

- ✓ Trocáveis: adsorvidos por forças eletromagnéticas em sítios carregados negativamente presentes na matéria orgânica. Geralmente a energia de ligação envolvida neste caso é baixa, o que promove uma troca rápida com a fração presente na solução do solo.
- ✓ Adsorvidos especificamente: são adsorvidos covalentemente a sítios específicos de adsorção em filossilicatos, óxidos e a matéria orgânica. Neste caso envolve alta energia de ligação, ou seja, os EPTs são liberados de forma muito mais lenta.
- ✓ Ligados a materiais orgânicos insolúveis: estes EPTs complexados por materiais orgânicos resistentes à degradação microbiana ou presentes em células recentemente mortas e;
- ✓ Precipitados: na forma de carbonatos (CO_3^{2-}), sulfatos (SO_4^{2-}), fosfatos (PO_4^{3-}) e hidróxidos (M-OH^-). Os elementos potencialmente tóxicos podem formar precipitados diretamente com os ânions, ou ainda podem ser co-precipitados junto a componentes pouco solúveis de Ca, Mg, Fe e Al conforme estes se formam. Essas reações são previstas pela constante do produto de solubilidade. Segundo Alloway, (1993) existe a possibilidade dos elementos potencialmente tóxicos serem adsorvidos na superfície amorfa destes precipitados, podendo passar para a forma trocável ou covalentemente adsorvida quando as camadas superficiais cristalizarem.

As superfícies dos solos são eletricamente carregadas devido ao excesso ou ao déficit de elétrons, e podem atuar como barreiras geoquímicas à evolução da mobilidade dos elementos no solo (BRADL, 2004).

2.1.3 Elementos potencialmente tóxicos e seus impactos em plantas e na saúde pública

De acordo com as considerações realizadas acima, as excessivas concentrações de elementos essenciais e não essenciais aplicados ao solo para o desenvolvimento de plantas podem ser tradução de fitotoxicidade.

A mudança na permeabilidade da membrana celular, reações de grupo sulfidril com cátions de elementos potencialmente tóxicos, afinidade para reagir com grupos fosfatos e grupos atuantes de difosfato de adenosina (ADP) e trifosfano de

adenosina (ATP), substituição de íons essenciais para grupos fosfato e nitrato, e competição com metabólitos essenciais por sítio de ligação são algumas das possíveis causas da fitotoxidez em plantas (KABATA-PENDIAS, PENDIAS, 2001).

Para tolerar a toxidez de EPTs ou para manter o teor desses elementos dentro de uma faixa fisiológica tolerada, as plantas desenvolvem mecanismos complexos com o objetivo de controlar a adsorção, o acúmulo e detoxificação dos elementos potencialmente tóxicos. (MENDES, A. M. S., 2010).

Segundo Chibuike e Obiora (2014), quando as concentrações dos elementos potencialmente tóxicos excedem os níveis ideais no interior das plantas, eles podem afetar negativamente a planta, tanto direta como indiretamente.

Um dos efeitos tóxicos que afetam diretamente é causado pela elevada concentração dos elementos potencialmente tóxicos, pois promovem a inibição de enzimas citoplasmáticas e causam danos às estruturas celulares decorrentes do stress oxidativo (ASSCHE, CLIJSTERS, 1990).

Um exemplo do efeito tóxico indireto é a substituição de nutrientes essenciais pela troca de cátions em plantas. Os elementos potencialmente tóxicos possuem influência negativa sobre as atividades e crescimentos dos microrganismos presentes no solo, podendo também afetar indiretamente o crescimento das plantas. Um exemplo é a redução no número de microrganismos benéficos do solo devido à alta concentração de elementos potencialmente tóxicos, que pode levar à diminuição da decomposição da matéria orgânica, havendo um declínio em nutrientes do solo (CHIBUIKE, OBIORA, 2014).

As atividades enzimáticas úteis para o metabolismo das plantas também podem ser dificultadas devido a interferência dos elementos potencialmente tóxicos nas atividades dos microrganismos no solo. Estes efeitos tóxicos (diretos e indiretos) levam a um declínio no crescimento da planta, que por vezes resultam na sua morte (CHIBUIKE, OBIORA, 2014).

Além dos efeitos de bioacumulação e biomagnificação, a presença de mais de um elemento em uma mesma matriz pode causar efeitos sinérgicos, ou seja, quando a presença de um elemento pode resultar no aumento de absorção de outro (ARAGÃO, ARAUJO, 2006).

Ghani (2010) avaliou o efeito do Cd, Cr, Co, Mn e Pb no crescimento do milho e os resultados mostraram que a presença desses EPTs no solo reduziram o

crescimento e o teor de proteína no milho. A toxicidade desses elementos potencialmente tóxicos apresentou-se na seguinte ordem: Cd > Co > Hg > Mn > Pb > Cr. Adicionalmente, no presente estudo foi observado que o efeito combinado de dois ou mais elementos potencialmente tóxicos foi tão prejudicial quanto o efeito do EPTs mais tóxico. Este resultado foi atribuído à relação antagônica que existe entre os elementos potencialmente tóxicos.

Convém destacar que determinadas plantas são capazes de tolerar alta concentração de elementos potencialmente tóxicos no meio ambiente. A tolerância dessas plantas aos EPTs pode ocorrer por 3 mecanismos: a exclusão: restrição do transporte do EPTs e manutenção de uma concentração constante de EPTs na parte aérea sobre uma faixa de concentrações no solo; inclusão: as concentrações dos EPTs na parte aérea refletem aqueles da solução do solo através de uma relação linear; e a bioacumulação: acumulação dos ET's na parte aérea e nas raízes de plantas, tanto em baixas e elevadas concentrações no solo (BAKER, 1981).

Segundo Camilotti et al., (2007), apesar das possibilidades para a indisponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos no solo e do mecanismo de proteção dos vegetais, a adsorção dos EPTs, dependendo das condições do sistema, pode ocorrer em quantidades suficientes para o surgimento de sintomas de fitotoxicidade. Ainda, Lake (1987) e Melo et al., (1997) estabeleceram as seguintes faixas fitotóxicas para Cd (2 - 10 mg kg⁻¹), Cr (10 – 100 mg kg⁻¹), Ni (11 -100 mg kg⁻¹) e Pb (35 – 400 mg kg⁻¹).

Há uma preocupação de que parte da população possa estar sofrendo de doenças relacionadas ao envenenamento por EPTs sem ao menos perceber. A avaliação dos efeitos dos baixos níveis de EPTs sobre a saúde em longo prazo é difícil e custoso. Além disso, os riscos mundiais de envenenamento por EPTs estão longe de serem universalmente aceitos, especialmente quando os benefícios econômicos se contrapõem aos riscos de exposição (SENESIL et al., 1999).

Os sintomas de toxicidade no ser humano pelos EPTs se tornam visíveis apenas depois que o processo de intoxicação está avançado, e geralmente envolve neurotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. São as diferenças na solubilidade, absorção, transporte e na reatividade química que resultará nas diferenças na toxicidade dos humanos (STOHS; BAGCHI, 1995). Apesar de alguns

serem considerados essenciais ao desenvolvimento humano e desempenharem funções vitais, os limites de tolerância a esses microelementos é muito baixa.

A Tabela 2 mostra um resumo de alguns elementos potencialmente tóxicos importantes e sua toxicidade para o ser humano e para plantas.

Tabela 2 - Função biológica, toxicidade para plantas e animais e classificação de risco à saúde humana em relação a alguns EPTs importante

ET	Função biológica	Toxicidade Relativa		Classificação de risco	
		Plantas	Mamíferos	2001	2003
		mg Kg ⁻¹		mg Kg ⁻¹	
Al	Pode ativar o glutamato desidrogenase	M (500– 200)	B	186	194
As	Nenhuma conhecida em animas. Constituinte de fosfolipídios em algas e fungos	MA (5-20)	A	1	1
Cd	Nenhuma conhecida	MA (5-30)	A (acumul.)	7	7
Cr	Parece estar envolvido no metabolismo de açucares em mamíferos	MA (5-30)	Cr ⁶⁺ A Cr ³⁺ M	49	49
Cu	Essencial para todos os organismos. Cofator em enzimas redox e no transporte do O ₂	MA (20-100)	M	129	141
Hg	Nenhuma conhecida	A (1-3)	A (acumul.)	3	3
Mn	Essencial para todos os organismos. Cofator em enzimas. Envolvido na reação de quebra da água na fotossíntese	BM (300-500)	M	138	131
Ni	Nenhuma conhecida em mamíferos. Parece ser essencial para plantas. Encontrado na enzima uréase	MA (10-100)	M	53	51
Pb	Nenhuma conhecida	M (30-300)	A	2	2

¹Letras classificam a toxicidade como baixa (B), moderada (M), e alta (A). ²Números em parêntese denotam a concentração do elemento na base foliar (base seca). ³Elementos não classificados não se enquadram na lista dos poluentes prioritários.

Fonte: MENDES, A. M. S., 2010.

2.2 Resíduos orgânicos

A urbanização, industrialização e o crescimento populacional das sociedades modernas têm conduzido a um aumento considerável da produção de resíduos,

tornando necessária a utilização de estratégias adequadas para gestão dos mesmos.

De acordo com Silva, C. A., (2008) resíduos orgânicos recebem esta denominação devido às elevadas quantidades de carbono, hidrogênio e oxigênio que armazenam em suas moléculas componentes.

O descarte inadequado, bem como o uso inadequado dos resíduos orgânicos aumentam as chances de contaminação no ambiente. A utilização agronômica desses materiais tem sido a forma mais adequada de aproveitamento, uma vez que esses resíduos podem ser utilizados na fabricação de adubos orgânicos, na alimentação animal, entre outros (GLORIA, 1992).

Os resíduos podem ser classificados em produtos de origem animal, vegetal agroindustrial e industrial (SILVA, C. A., 2008). Os resíduos orgânicos geralmente são utilizados na agricultura como fertilizantes orgânicos. Adicionalmente, os resíduos orgânicos vegetais e animais constituem excelentes fontes de matéria prima para serem transformadas em fertilizante orgânico humificado (KIEHL, 2004; PIGATIN, 2011).

A aplicação dos resíduos destinados à fertilização apenas pode ser efetuada após um tratamento prévia de estabilização dos mesmos, de forma a eliminar organismos patogênicos e compostos voláteis que provocam mau odor, e ainda para prevenir a acumulação de alguns contaminantes biodegradáveis (U.S EPA, 1999; RAMÍREZ et al., 2008).

Os tratamentos de estabilização mais comumente utilizados incluem processos de digestão anaeróbia: processos bioquímicos para estabilização de diversos tipos de materiais orgânicos; estabilização química com cal: para garantir a inocuidade do resíduo); compostagem: que permite a decomposição biológica dos compostos orgânicos; secagem térmica: utilizada para reduzir o teor de humidade; e eliminação por incineração: é realizada a queima de componentes orgânicos combustíveis presentes nos resíduos (RAMÍREZ et al., 2008).

Os resíduos orgânicos apresentam-se como solução para alguns problemas, como, por exemplo, o reaproveitamento desses materiais, e contribuem de forma simples e econômica para o aumento da fertilidade dos solos agrícolas.

Na literatura encontra-se diversos benefícios para os solos, resultantes da utilização deste tipo de fertilizantes, como aumento no conteúdo de matéria orgânica

e dos nutrientes do solo, e melhoras nas condições físicas, como a infiltração de água, a porosidade, a agregação e a permeabilidade do meio (SINGH, AGRAWAL, 2008; TSADILAS et al., 2005). Contribui também para diminuir a erosão do solo, sendo possível que assuma um importante papel na regeneração e restauração de solos queimados (LARCHEVÊQUE et al., 2008).

2.3 Fontes de resíduos da indústria canavieira

O Brasil é o maior setor sucroalcooleiro no mundo, segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), sendo responsável por cerca de 40% da produção mundial de etanol (USINA SÃO MARTINHO, 2015). Também é o maior exportador mundial de açúcar refinado (FRAVET et al., 2010).

Dados fornecidos pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) retratam que o Brasil deverá produzir 655,16 milhões de toneladas de cana-de-açúcar numa área de 8,95 milhões de hectares, distribuídos em todos os estados brasileiros de acordo com suas características (ACOMPANHAMENTO..., 2015).

O estado de São Paulo é o maior produtor com 51,8% (4.648, mil hectares) da área plantada, seguida pelo estado de Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 8% (715,3 mil hectares), Mato grosso do Sul com 8% (713,7 mil hectares), Paraná com 6,8% (613,4 mil hectares), Alagoas com 4,2% (380,3 mil hectares), Pernambuco com 3,1% (273,4 hectares) e o estado do Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil hectares). Estes oito estados são responsáveis por 94,7% da produção nacional. Os outros 14 estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 1,4%, totalizando 5,3% da área total do país (ACOMPANHAMENTO..., 2015).

Os dados referentes à safra de 2014/2015 e que contabilizam a produção de cana de açúcar, açúcar e etanol são mostradas na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Produção de cana de açúcar, açúcar e etanol nos estados brasileiro da safra 2013/2014

Estados	Cana de Açúcar (mil toneladas)	Açúcar (mil toneladas)	Etanol total (mil m ³)
Espírito Santo	3.243	107	167
Minas Gerais	59.321	3.626	2.727
Rio de Janeiro	1.586	37	89
São Paulo	337.780	21.909	13.764
Região Centro Sul	571.344	31.987	26.146
Região Norte-Nordeste	60.782	3.560	2.249
Brasil	632.127	35.548	28.394

Fonte: UNICA, 2015.

A análise dos dados fornecidos pela tabela acima demonstra que a agroindústria canavieira, em razão das extensas áreas de produção, é geradora de grandes quantidades de resíduos, os quais, pela natureza orgânica, têm alto valor agregado, podendo ser utilizados como fertilizantes (IVO et al., 2008). Ainda, o setor desenvolveu-se dimensionando a retirada de praticamente todos os resíduos da unidade industrial, pois seria impraticável o armazenamento de todos os resíduos nos períodos de produção (JENDIROBA, 2006).

A busca por alternativas de utilização de resíduos industriais tornando-os subprodutos, no intuito de agregar valor, tornou-se incessante em todas as cadeias produtivas (NOGUEIRA, GARCIA, 2013). Durante o processo fabril na usina de açúcar e álcool se obtém vários resíduos, sendo que os principais são oriundos da própria matéria prima, a *Saccharum spp.*, conhecida popularmente como cana de açúcar. Estes resíduos são considerados como subprodutos, pois sendo tratados ou in natura são totalmente reaproveitados no próprio cultivo da planta. Também ocorre de se fornecer esses resíduos a outras empresas para fabricação de adubos organominerais, para a produção para energia elétrica, entre outros (SILVA, G. A., 2012).

utilizado na fabricação de ração animal, na indústria de celulose, na construção civil, e na produção de biomassa microbiana (SILVA, M. A. S. et al., 2007).

A vinhaça, também chamada de vinhoto ou restilo, é o líquido derivado da destilação do vinho, resultante do caldo de cana de açúcar ou melaço. Aproximadamente 10 a 18 L de vinhaça são obtidos por litro de etanol, e sua composição varia conforme a qualidade da matéria prima e equipamentos utilizados no processo de obtenção do etanol (SILVA, M. A. S. et al., 2007; WADT, 2008).

A fertirrigação é o método de adubação que utiliza água de irrigação para levar nutrientes ao solo cultivado. A Figura 4 mostra os jatos de vinhaça no ar, que caem como chuva na maioria dos canaviais para facilitar a sua aplicação.

A vinhaça pode ser caracterizada com um alto conteúdo de matéria orgânica, elementos minerais como o K, N, Ca, Mg, e possui uma coloração marrom-escura devido a presença de polímeros chamados melanoidinas, e compostos fenólicos (ácido tânico e húmico). Esses compostos são altamente recalcitrantes, ou seja, persistem no solo e ainda possuem propriedades antioxidantes (PRADO, CAIONE, CAMPOS, 2013).

Devido ao seu poder recalcitrante, ela torna-se um potencial poluente. O poder poluente é cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico, e decorre da sua riqueza de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO). A vinhaça também promove alterações no solo, tais como a melhoria na agregação, mas isso culmina na maior infiltração de água, lixiviação de elementos minerais, e contaminação de águas subterrâneas (LAIME et al., 2011; SILVA, A. J. N. et al., 2006).

Figura 4 – Fertirrigação com vinhaça



Fonte: USINA SÃO MARTINHO, 2015.

A cinza oriunda da queima do bagaço da cana nas caldeiras é disposta em áreas de aterro, ou aplicada no solo. São geradas em média 2,06 kg/tonelada de cana. A fuligem gerada no processo de queima nas caldeiras é recolhida a partir de técnicas de lavagem e decantação, direcionada para lagoas de decantação, e sua produção é de aproximadamente 11,76 kg/tonelada de cana, sendo que o seu destino final é a aplicação no solo (GURGEL, 2012; TORRES et al., 2012).

O outro produto que é gerado em grande quantidade é a torta de filtro, que será descrita no próximo item.

2. 3.1 Uso da torta de filtro na produção de cana de açúcar

A torta de filtro é um dos subprodutos do processamento industrial da cana de açúcar. A cada tonelada de cana moída são produzidas de 30 a 40 toneladas de torta de filtro. Esse material é obtido durante o processo de clarificação do caldo de cana de açúcar. Durante este processo é adicionado ao caldo uma suspensão de hidróxido de cálcio que vai promover a precipitação de compostos orgânicos e inorgânicos insolúveis. Contudo este precipitado não possui uma consistência apropriada para ser utilizado, sendo então adicionado ao mesmo, o bagaço de cana moido. Esta mistura é submetida ao processo à filtração à vácuo, dando origem a

torta de filtro (ADORNA, CRUSCIOL, ROSSATO, 2013; ANACLETO, 2014; NUNES JR, 2005).

A torta de filtro tem composição química variável em função da variedade e da maturação da cana, do tipo de solo, do processo de clarificação do caldo e outros (SANTOS, O. et al., 2016; SANTOS, D. H. et al., 2010).

Apresenta altos teores de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio, cálcio, quantidades consideráveis de potássio, magnésio, elevado teor de umidade (NUNES JR., 2008), expressivas quantidades de Fe, Mn, Zn e Cu (CERRI et al., 1988), capacidade de troca maior de cátions (CTC), e redução das concentrações de alumínio trocável (Al^{3+}), o qual é tóxico para as plantas (PRADO, CAIONE, CAMPOS, 2013). Na Tabela 4 é apresentada a composição química de vários estudos de torta de filtro.

Tabela 4 - Concentração da matéria orgânica (MO) e elementos minerais, valores de pH, e taxas de C/N determinadas em torta de filtro foram calculados com base no peso seco. Os dados são extraídos de relatórios de diferentes autores para contrastar condições pedoclimáticas

Variáveis	Torta de Filtro				
	*	Santana et al., 2012.	Khwairakpam & Bhargava, 2009.	Camargo et al., 1984.	Média
MO (%)	29,6	15	-	-	22,3
pH	8,2	-	7,1	-	7,7
N(%)	1,4	4,8	1,6	0,3	2,0
P(%)	1,2	1,8	1,3	0,1	1,1
K (%)	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3
Ca (%)	2,7	1,6	2,5	1,7	2,1
Mg (%)	1,1	0,4	-	0,2	0,6
S (%)	0,2	0,3	-	-	0,25
Taxa C/N	12	-	25	36	24

* Informações do autor não foram mostradas, - valores não foram citados.

Fonte: PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013.

A torta de filtro tem sido utilizada como fertilizante em vários países, incluindo o Brasil, Índia, Austrália, Cuba, Paquistão, Taiwan, África do Sul e Argentina sendo que a forma mais destinada para o uso deste subproduto, é lançamento direto na vala onde a muda será plantada (PRADO, CAIONE, CAMPOS, 2013). A sua utilização não é importante somente pelo grande volume gerado, mas também pela economia de insumos que se obtêm com a pratica do seu aproveitamento como condicionador e fertilizante de solos (SILVA, J. V. H. et al., 2011), e principalmente por ser uma forma de se reduzir a produção deste resíduo.

Vários trabalhos relatam o efeito residual da torta de filtro no incremento de produtividade da cana de açúcar propiciado pela liberação do fósforo e por um processo lento de decomposição da matéria orgânica. Estudos realizados por Nunes Junior (2008), ao estudar 20 clones de cana de açúcar, observaram que a utilização da torta de filtro como fertilizante levou a aumento de 13,4 % de produtividade.

Estudando a aplicação de torta de filtro no sulco em argissolos e seus efeitos agronômicos, Nardim, (2007) verificou que houve melhorias na fertilidade do solo na camada de 20-40 cm, com aumentos significativos de Ca e P. Entretanto, essas melhorias não foram resultadas em ganhos de produtividade no primeiro corte.

Esse resíduo também pode passar por um processo de compostagem para aumentar o teor de matéria orgânica e das taxas de C: N.

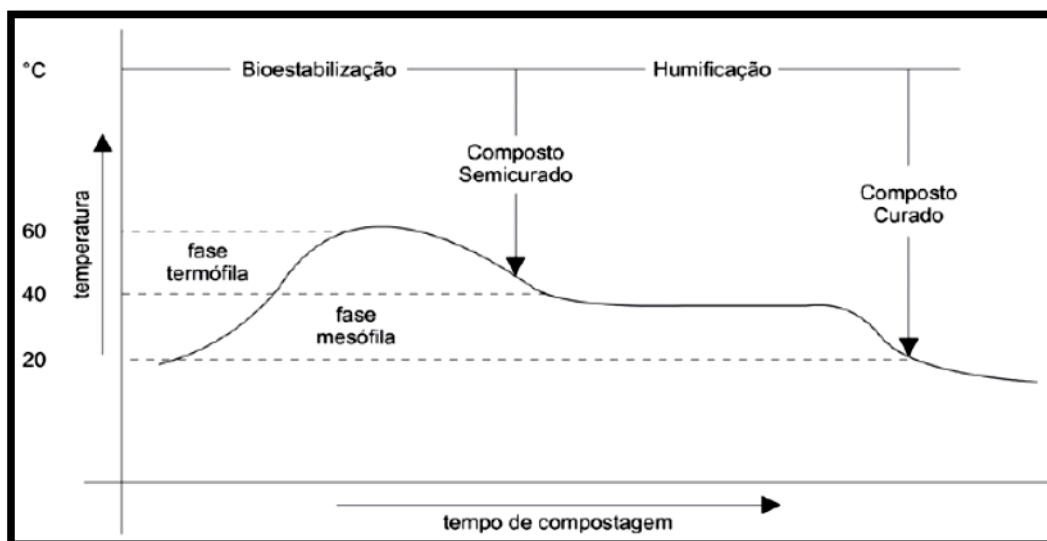
A compostagem pode ser definida como a decomposição controlada, exotérmica e bioxidativa de materiais de origem orgânica por microrganismos autóctones, em um ambiente úmido, aquecido e aeróbio, com produção de dióxido de carbono, água, minerais e uma matéria orgânica estabilizada, definida como composto (latim, componere = mistura) (BERNAL et al., 1998; RODRIGUES, M.S., 2006).

Como resultado da compostagem são gerados sais minerais que contêm nutrientes para as raízes das plantas, e o húmus que atua como condicionador e melhorador das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Ainda em relação aos húmus, determinados autores se referem à matéria orgânica humificada apenas como condicionada do solo, relegando seu importante valor como fornecedora de elementos essenciais a vida vegetal (KIEHL, 2004; PIGATIN, 2011).

A compostagem é influenciada por todos os fatores que comumente afetam a atividade microbiológica, como a umidade, oxigenação, temperatura, concentração

de nutrientes, tamanhos de partículas e pH (PEREIRA NETO, 2007). No processo de compostagem é possível identificar três fases; uma primeira e rápida de composto cru ou imaturo, seguido de uma etapa de semi cura ou bioestabilização, e finalmente uma terceira fase, a humificação, que é acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica (KIEHL, 1998). A Figura 5 mostra as fases da compostagem relacionando a temperatura do composto no tempo.

Figura 5 - Fases da compostagem



Fonte: D'ALMEIDA & VILHENA, 2000.

A fase termofílica é caracterizada pelas temperaturas elevadas entre 40 – 70°C. Nesta fase não existe uma diversidade de microrganismos, havendo uma predominância de bactérias termofílicas. Também nesta fase ocorre a degradação de substratos mais difíceis de serem metabolizados, assim como as gorduras, celulose, hemicelulose e lignina. Ainda na fase em questão ocorre a maior degradação da matéria orgânica (BERNAL et al., 1998).

Na fase mesofílica ocorre a formação da pilha, onde bactérias e fungos estão presentes naturalmente. Com a multiplicação destes microrganismos ocorre a degradação de compostos simples como açúcares, aminoácidos e proteínas, com um consequente aumento gradual da temperatura até 40°C. Por fim, a etapa criófila, onde ocorre o resfriamento do composto semelhante à temperatura da etapa

mesofílica. Entretanto, o seu substrato se apresenta com outra composição química e um aspecto mais escurecido. Este período também se caracteriza pela diversidade de microrganismos provenientes de esporos resistentes, ou que foram reinoculados pelo ambiente, e ainda por um aumento da taxa C: N (KENNER et al., 2000).

Para que todas as etapas sejam concluídas são necessários aproximadamente de 90 a 120 dias após a mistura dos materiais orgânicos (dependendo da relação C: N do resíduo) para se obter um composto geralmente escuro e de textura turfa, utilizado como um composto fertilizante que fornece nutrientes essenciais para o suprimento das plantas (CERRI, 2008). Um composto imaturo pode ocasionar danos ao solo e às plantas, inclusive levando-as à morte (KIEHL, 1998).

No entanto, a aplicação desse tipo de composto aos solos não apresenta apenas benefícios para a produção agrícola. A contaminação com elementos potencialmente tóxicos, como é o caso dos elementos potencialmente tóxicos, é um dos riscos associados à reutilização de resíduos na agricultura. Apesar de todos os benefícios explorados sobre a utilização da torta de filtro como fertilizante, ela é também uma fonte potencialmente poluidora, pois assim como a vinhaça, se usada de forma inadequada, pode provocar danos ambientais graves como a contaminação dos solos e dos cursos de água (ROSSETO et al., 2004).

2.4 Elementos traço em fertilizantes orgânicos

Segundo Pigatin, (2011) os termos fertilizantes e adubos orgânicos são sinônimos, podendo ser usados indistintamente. No texto da legislação brasileira foi adotado o termo fertilizante (KIEHL, 2004).

O uso intensivo e crescente de fertilizantes orgânicos de origem animal ou vegetal, ou de resíduos da indústria na agricultura vem exigindo da pesquisa maior atenção pela busca de soluções que viabilizem o uso seguro desse material (MARCHI et al., 2009). A disposição desses subprodutos é, de fato, uma alternativa viável, tanto ambientalmente como financeiramente, por proporcionar uma reciclagem de nutrientes e de fertilizantes cuja matéria prima tende a ser escassa no futuro.

De acordo com Nriagu e Pacyna (1988), as adições globais de elementos traço em fertilizantes seriam na ordem de 30.000 - 250.000 kg ano⁻¹ de Cd, 50.000-580.000 kg ano⁻¹ de Cu, 30.000 – 380.000 kg ano⁻¹ de Cr, 200.000 – 550.000 kg ano⁻¹ de Ni, 420.000 – 2.300.000 kg ano⁻¹ de Pb e 260.000 – 1.100.000 kg ano⁻¹ de Zn.

Os fertilizantes orgânicos podem apresentar em sua composição uma possível contaminação do ambiente por elementos potencialmente tóxicos (EPTs). O acúmulo de elementos traço, embora gradual, pode resultar em uma acumulação no solo e uma consequente transferência para cadeia alimentar (SCHMIDT, 2013).

No Brasil, várias ocorrências de contaminação no solo por elementos potencialmente tóxico têm sido relatadas (ARTAXO et al., 2000; MAGALHAES, PFEIFFER, 1995; RAMALHO, SOBRINHO, 2000), podendo-se concluir que seus teores são variáveis e dependentes do sistema que é originado.

Galbally et al., (2013) verificaram em seus estudos a diferença existente entre EPTs oriundas de biossólidos e de lodo de efluente de destilaria. Para biossólidos a quantificação total de Cd, Cr, Pb foi de 0,10; 0,10; 1,12 e 0,21 mg/kg⁻¹ respectivamente, enquanto que para o EPTs do lodo do efluente foi de Cd 0,18; Cr 5,8 e Pb 38,1 mg/kg⁻¹.

Já Schmidt e seus colaboradores, (2013), estudando EPTs em adubos orgânicos utilizados em oleícolas, verificaram que das 14 amostras de fertilizantes orgânicos, três apresentaram teor de Cr acima do limite estabelecido de 200 mg kg⁻¹.

A contaminação do solo por elementos traço provocada pela aplicação de fertilizantes orgânicos, apesar de não alcançar valores alarmantes, requer monitoramento, pois seu uso é amplamente disseminado e pode permanecer em formas biodisponíveis e ou bioacessíveis por muitos anos (ALLOWAY, 1990; MENDES, A. M. S. et al., 2010).

2.5 Legislação

2.5.1 Legislação - Elementos potencialmente tóxicos nos solos

Para a poluição do solo não existe uma abordagem internacional padronizada, devido à sua natureza complexa e variável, diferentemente do que

ocorre em relação à questão da poluição do ar e das águas superficiais (CECILIO, 2007).

O conjunto de valores que orienta a qualidade ambiental para o solo utilizado no Brasil e no Estado de São Paulo é formado pela resolução 420/2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e pela Decisão de Diretoria nº 45/14 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2014; CONAMA, 2009).

A Tabela 5 apresenta os atuais valores orientadores de elementos potencialmente tóxicos para solos. Os valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo foram recentemente atualizados em substituição aos valores orientadores de 2005.

Nesta decisão, os valores de referência de qualidade (VRQ) refletem o teor natural médio dos elementos para um solo sob condições naturais, mostrando a não contaminação.

Quando existe a indicação da possibilidade de alteração prejudicial à qualidade dos solos, deveram ser monitorados os impactos que venham a ocorrer, para se tem como base os valores de prevenção (PV). E, por fim, os valores de investigação (VI) que indicam a concentração limite. Os valores acima da medida são indícios de riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana. Quando se excede esses valores a área é considerada contaminada, e deverão ocorrer ações de intervenção para recuperação e mitigação dos efeitos deletérios (ANDRADE, 2014; CETESB, 2014).

Tabela 5 - Valores orientadores dos elementos potencialmente tóxicos da Resolução 420 do CONAMA e da CETESB nº45/14 para solos no Estado de São Paulo.

Elementos potencialmente tóxicos	Referência de Qualidade (VRQ)	Prevenção (VP)	Investigação (VI)		
			Agrícola mg kg ⁻¹	Residencial	Industrial
As	3,5	15	35	55	150
Ba	75	120	500	1300	7300
Cd	<0,5	1,3	3,6	14	160
Cr	40	75	150	300	400
Cu	35	60	760	2100	10000
Hg	0,05	0,5	1,2	0,9	7
Mo	<4	5	11	29	180
Ni	13	30	190	480	3800
Pb	17	72	150	240	4400
Se	0,25	1,2	24	81	640
Zn	60	86	1900	7000	10000

Fonte: CONAMA 2009; CETESB, 2014; ANDRADE, 2014 (com modificações).

2.5.2 Legislação - Elementos potencialmente tóxicos nos fertilizantes orgânicos

No Brasil o composto orgânico está classificado na legislação como fertilizante orgânico.

Para normatizar os fertilizantes orgânicos quanto aos teores de EPTs, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu os limites máximos de concentração do EPTs em função do uso dos fertilizantes através da Instrução Normativa SDA nº 27 de 5 de junho de 2006 (BRASIL, 2006; 2011), com o objetivo de reduzir os riscos de contaminação no solo e a transferência para a cadeia alimentar de elementos

Na Tabela 6 estão separados os fertilizantes orgânicos em relação ao seu uso e seus limites de EPTs correspondentes.

Observa-se que os limites máximos de teores totais se diferem nos fertilizantes quanto ao seu destino. Adicionalmente, pode-se verificar que os teores

de EPTs destinados à produção orgânica certificada apresentam limites de teores de EPTs menores que os demais. Contudo, a legislação não apresenta limite máximo estabelecido em relação aos elementos de Cu e Zn para a agricultura geral ou para o substrato.

Para o uso eficiente de subprodutos orgânicos na agricultura, é de fundamental importância conhecer a composição química desses materiais, avaliar os teores totais, a biodisponibilidade e bioacessibilidade de EPTs essenciais como o Zn, Fe e contaminantes como o As, Cd, Pb, Cr, Hg em fertilizantes orgânicos, já que o teor total dos EPTs não é um bom índice para se estimar a dinâmica e o impacto causado por esses elementos no ambiente.

Tabela 6 - Limite máximo de EPTs na massa seca permitidos nos diferentes fertilizantes orgânicos

Elemento	Substrato ¹	Fertilizante Orgânico	
		Geral ²	Certificada ³
		mg kg ⁻¹	
Arsênio	20	20	20
Cádmio	8	3	0,7
Chumbo	300	150	45
Cromo	500	200	70
Cobre	-	-	70
Mercurio	2,50	-	-
Níquel	175	-	-
Selênio	80	-	-
Zinco	-	-	200

¹Limite máximo admitidos de contaminantes em substratos para plantas e condicionadores de solo (Instrução normativa (IN) 27); ²Limite máximo de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos para uso na produção agrícola em geral (IN 27); ³ Limite máximo de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos destinados a produção orgânica certificada (IN 46) - sem limites estabelecidos.

Fonte: BRASIL (2006, 2011); SCHIMDT, 2013 (com modificações).

A maior parte dos países da União Europeia (UE) aprovaram normas sobre as especificações que o composto orgânico deve obedecer, para que seja aplicada com

fins agrícolas, com especial atenção para os teores de elementos potencialmente tóxicos (RUSSO, 2003).

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações máximas de elementos potencialmente tóxicos nos resíduos orgânicos em diversos países europeus. Nesta tabela fica evidente a diferença entre as várias normas, sendo visível que nos países do norte da Europa (Alemanha, Áustria, Holanda e Bélgica) os limites são mais restritivos que nos países do sul. Os dados ainda mostram uma grande diferença em relação aos teores máximos de elementos potencialmente tóxicos permitidos da Instrução normativa nº 27 do MAPA de 2006.

Tabela 7 – Teores máximos de EPTs nos compostos orgânicos em vários países europeus.

ET's	Alemanha			Áustria		Bélgica		Espanha	França
	Blue Angel	Norma Ral	ONorm S-2022	ONorm Classe 1	s-2200 Classe 2	Agricult	Parques		
mg kg ⁻¹									
Cd	1	1,5	4	0,7	1	5	5	40	8
Cr	100	100	150	70	70	150	200	750	-
Cu	75	100	400	70	100	100	500	1750	-
Ni	50	50	100	42	60	50	100	400	200
Pb	100	150	500	70	50	600	1000	1200	800
Zn	300	400	1000	210	400	1000	1500	4000	-

Fonte: RUSSO, 2003.

2.6 Extração sequencial

Os elementos potencialmente tóxicos que geram contaminação nos solos não devem ser avaliados somente pelo seu teor total, mas pela sua biodisponibilidade. Biodisponibilidade pode ser definida como a fração do metal que está ou que possa estar disponível para ser absorvida e gerar danos nefastos nos organismos (PEIJNENBURG, 2004). Assim, torna-se relevante, do ponto de vista ambiental, a

avaliação da mobilidade e biodisponibilidade dos EPTs em solos que receberam resíduos contendo esses elementos.

Conforme afirma Tessier et al., (1979) os elementos potencialmente tóxicos contidos em um material sólido podem ser fracionados em formas geoquímicas específicas, e podem ser seletivamente extraídos pelo uso de reagentes apropriados, sendo que cada método tem o seu conjunto de reagentes que deve atacar especificamente a forma geoquímica para o qual foi escolhido. Assim, os ataques são cada vez mais fortes em cada uma das frações, que deverão obedecer a uma sequência de ataque.

As extrações sequenciais normalmente utilizam extratores com agressividade crescente (CHANG et al., 1984), permitindo determinar a presença dos elementos potencialmente tóxicos nas formas químicas mais lábeis (solúveis, trocáveis e associados a carbonatos), ou mais estáveis e menos móveis (ligados a óxidos, matéria orgânica e na estrutura de silicatos (RAMOS et al., 1994).

Estudos realizados por Kabata Pendias, Pendias, (1994) mostraram que o fracionamento extrai os elementos potencialmente tóxicos das seguintes frações: 1) solúvel em água; 2) trocável; 3) organicamente ligados; 4) oclusos ou adsorvidos a óxidos de Fe e Mn; 5) compostos definidos (carbonados, sulfetos e fosfatos) e 6) estruturalmente ligados em silicatos.

Embora o processo da extração sequencial use procedimentos trabalhosos, e existam críticas aos métodos de extração sequencial, sobretudo às possibilidades relacionadas à readsorção de elementos potencialmente tóxicos durante as extrações e à falta de comparação entre os resultados, uma vez que eles apresentam importantes variações que dependem o método de extração usado (CANDELARIA; CHANG, 1997; FUENTES et al., 2008), este método permite obter informações detalhadas sobre a origem, o modo de ocorrência, a biodisponibilidade, os fluxos, o potencial de mobilidade e o transporte de elementos potencialmente tóxicos em ambientes naturais (MERLINO, 2010).

Por se tratar de um fracionamento químico, os resultados são dependentes das características de processos como: concentração e pH dos reagentes; relação amostra extrator, tempo de extração e temperatura; método de agitação e separação de formas, entre outros. Apesar de serem amplamente utilizados, ainda não há uma uniformidade entre os procedimentos (SHIOWATANA et al., 2001).

Por muito tempo não existiu uma padronização para esquemas de fracionamento, sendo que cada pesquisador utilizava seu próprio esquema ou modificação de um modelo desenvolvido por outro. Por esta razão, numa tentativa de harmonizar a metodologia e comparar os resultados entre laboratórios, a antiga Community Bureau of Reference (BCR), atual Standards, Measurements and Testing programme of the European Union (SM&T), desenvolveu um novo protocolo de extração sequencial de elementos potencialmente tóxicos.

Este procedimento tem sido aplicado com sucesso para uma variedade de matrizes, incluindo lagos, lagoas, sedimentos marinhos, lodo de esgoto, solo e resíduos industriais que podem contaminar o solo (FUENTES et al., 2008). A maioria dos reagentes utilizados no método BCR são ácidos ou são ajustados para terem seu pH entre 1,5 e 2,0, pois com estes perfis minimiza-se a readsorção dos elementos potencialmente tóxicos (KIM, McBRIDE, 2006; QUEVAUVILLER et al., 1997).

Assim, as técnicas de extração sequencial têm sido utilizadas para a avaliação das frações de elementos potencialmente tóxicos em vários estudos, contribuindo, portanto, para um melhor entendimento sobre a mobilidade e solubilidade dos elementos-traços.

Akkajit, DeSutter, Tongcumpou, (2014) avaliaram as frações de Cd e Zn em solos que tiveram a adição de torta de filtro como adubo orgânico. Para a análise de extração sequencial foi utilizado o método proposto pelo BCR, e concluíram que a maior extração de Cd e Zn ocorreu nas frações trocáveis e reduzíveis, indicando que eles podem ser facilmente mobilizados e potencialmente biodisponíveis. Partes de elementos potencialmente tóxicos em frações trocáveis são fracamente adsorvidos ao coloidal e partículas materiais do solo, e são, portanto, susceptíveis a mudanças de pH (GLEYZES et al., 2002). Esta mudança ocasiona um papel importante na redução da biodisponibilidade de elementos potencialmente tóxicos no solo e, assim, há absorção de elementos potencialmente tóxicos pela planta.

Hadlich, Ucha, (2013) em estudos realizados com solos originários da França por, utilizando o método de Tessier et al., (1979) para a extração sequencial de solos que tiveram aplicação de dejetos suínos, observaram que é favorecido o acúmulo de Cu e Zn em superfície sob frações variadas, como a trocável ligada a óxidos, fosfato, carbonatos ou ligadas à matéria orgânica.

Ao realizar a extração sequencial de lodo de esgoto durante a digestão aeróbica utilizando o método proposto por Tessier et al., (1979), Dong et al., (2013) concluíram que a distribuição dos elementos potencialmente tóxicos não era dependente somente do teor total de elementos potencialmente tóxicos, mas também de parâmetros como alcalinidade, amônia, substâncias húmicas e pH.

A Tabela 8 apresenta diferentes métodos de extração sequencial que têm sido propostos para diferentes matrizes.

Tabela 8 - Métodos de extração sequencial de elementos-traços desenvolvidos por vários autores para diferentes matrizes

Matriz	Frações - Extratores	Referencia
Solo Sedimentos	Trocável KNO_3 1M	Stover, (1976)
	Adsorvida KF 0,5 M	
	Matéria Orgânica: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 M	
	Carbonatos EDTA: 0,1 M	
	Sulfetos: HNO_3 1M	
Solo	Trocável (MgCl_2 , pH 7,0)	Tessier et al., (1979)
	Carbonatos (NaOAc / HOAc , pH 5,0)	
	Óxidos de Fe e Mn ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, pH 2,0)	
	Matéria orgânica ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3$, pH 2,0)	
	Residual (HF/HClO_4)	
Solo Resíduo	Trocável ($\text{Sr}(\text{NO}_3)$) 0, mol L^{-1}	Silveira, (2002)
	Superfície dos óxidos (NaOAc 1,0 mol L^{-1} , pH 5,0)	
	Matéria orgânica (NaOCl 5%, pH 8,5)	
	Óxido de Mn ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 0,05 mol L^{-1} , pH 2,0)	
	Óxido de Fe mal-cristalizado (oxalato de amônio 0,2 mol L^{-1} + ac. Oxálico 0,2 mol L^{-1} , pH 3,0)	
	Óxido de Fe cristalizado (HCl 6 mol L^{-1})	
	Residual (EPA 3052)	
Solo Sedimentos Esgoto	Trocável – Ac acético 0.11M, pH 2.9	Rauret, (1999)
	Reduzível hidroxilamina 0.1M, pH 2,0	
	Oxidável H_2O_2 8,8 M + acetato de amônio, pH 2,0 com NHO_3	
	Residual: HNO_3 + HF	

Fonte: SOUZA, 2009 (com modificações).

Com o advento da biotecnologia tornou-se possível utilizar processos alternativos que incluíam bactérias capazes de oxidar elementos potencialmente tóxicos, minimizando o teor de elementos potencialmente tóxicos totais, corroborando, portanto, com todo um ciclo de processos da agricultura.

2.7 Biolixiviação

No desenvolvimento progressivo das sociedades é fundamental a sustentabilidade ambiental para minimizar a redução de recursos naturais, sendo que as principais áreas de atuação são a gestão e preservação dos recursos ambientais, prevenção e tratamento da poluição, gestão de resíduos e preservação da biodiversidade (MISHRA, RHEE, 2014; VERSTRATE, 2007).

A biotecnologia atualmente tem aplicações em vários setores, incluindo saúde, indústria e agricultura. Os processos biotecnológicos podem contribuir com tecnologias futuras, como o desenvolvimento e síntese de novos fármacos, síntese de novos produtos, redução da poluição e gestão de resíduos (READ et al., 2011).

Um dos efeitos colaterais do consumo e da produção de bens que tende a aumentar com o avanço econômico é a produção de resíduos. Como consequência, produtos tóxicos são produzidos e podem atingir matrizes ambientes como ar, água, solo e sedimento.

Hoje a produção e a gestão são objetos de interesse da comunidade científica (BEOLCHINI et al., 2012). Resíduos contendo elementos traço tornam-se um potencial risco na contaminação de solos, e este fato pode restringir sua aplicação nos solos. Assim, a remoção eficiente desses elementos traço é a principal chave para aplicação de resíduos na agricultura (ZHU et al., 2013).

Várias técnicas químicas e microbianas para a remoção de elementos potencialmente tóxicos, principalmente em lodo, têm sido relatadas (ZHANG, X. et al., 2012). O tratamento químico pode ser realizado utilizando-se vários produtos como oxidantes, redutores, agentes de complexação (PARK, LEE, AHN, 2007), entre outros. No entanto, o alto custo, as dificuldades operacionais, os requisitos intensivos de energia, rendimentos de solubilização insatisfatórios e subprodutos levaram a se considerar outros métodos alternativos (BAYAT, SARI, 2010a; PATHAK et al., 2009; TYAGI E COULLARD, 1989).

Os processos microbiológicos são significantes na determinação da mobilidade do EPTs e possuem uma real potencialidade na aplicação da biorremediação em locais e ou resíduos contaminados por EPTs (UMRANIA, 2006). Estes incluem mecanismos de lixiviação por autotróficos e heterotróficos,

precipitação redutora, redução do sulfato e oxidação de sulfetos metálicos (GADD, 2004).

A biolixiviação de elementos potencialmente tóxicos, a biooxidação de minérios de ouro, a dessulfurização do carvão, a recuperação terciária de óleo e a biosorção de íons metálicos são exemplos da variedade das potenciais e atuais aplicações dos microrganismos na mineração e nas áreas relacionadas (UMRANIA, 2006).

Estudos realizados por Tyagi e seus colaboradores (1988) observaram que a biolixiviação de elementos traço utilizando bactérias oxidantes de enxofre é menos dispendioso do que os métodos tradicionais de lixiviação química utilizando ácidos.

A biolixiviação é um aplicativo comercial da Biohidrometalurgia que tem sido utilizado intensamente em escala industrial nas áreas de metalurgia extrativista para minérios de baixo teor (BAYAT, SARI, 2010a; BEVILAQUA et al., 2002; FANG, ZHOU, 2006). Agora seu uso tem sido estendido para investigar a lixiviação de elementos potencialmente tóxicos contaminantes de sedimentos, resíduos, lodo, solo (CHEN, S. Y. e LIN, 2010; FANG et al., 2011).

Qualidades desejáveis, como a simplicidade do processo, a alta extração dos elementos traço, o consumo baixo de ácido, fizeram da biolixiviação um procedimento escolhido pelos pesquisadores na descontaminação de resíduos.

Em comparação com a tecnologia convencional, a abordagem biológica pode oferecer várias características vantajosas, como os processos mais eficientes. Apesar da sua eficiência não ser sempre de 100% (LOMBARDI e GARCIA JR., 2002), elas são mais simples e ecológicas do que seus homólogos químicos (BEOLCHINI et al., 2012).

Essa técnica baseia-se na capacidade de os microrganismos transformarem EPTs ligados a resíduos sólidos em formas solúveis extraíveis (WEN et al., 2012), ou seja, estas bactérias produzem agentes de lixiviação. Os elementos potencialmente tóxicos dissolvidos podem mais tarde ser recuperados através de métodos convencionais. Por exemplo, no caso de extração de cobre, o sulfeto de cobre é oxidado microbiologicamente a sulfato de cobre, os íons metálicos podem ser concentrados na fase aquosa e os sólidos remanescentes são descartados (MISHRA, RHEE, 2014).

As atividades metabólicas de microrganismos oxidantes de ferro e oxidantes de enxofre produzem um efeito catalítico durante a biolixiviação, que aumenta a

degradação de sulfetos e leva a uma solubilização dos elementos potencialmente tóxicos.

A principal vantagem da biolixiviação, em comparação com técnicas que utilizam produtos químicos de lixiviação, é que os reagentes necessários para a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos são de produção biológica, evidenciando vantagens para a economia do processo e para o impacto ambiental em termos de emissão de carbono (BEOLCHINI et al., 2012).

Os fatores determinantes da eficácia da biolixiviação envolvem fatores químicos e físicos como os materiais contaminados, temperatura, pH, formas dos elementos potencialmente tóxicos, potencial redox, a estirpe bacteriana, a concentração de células e concentração de sólidos totais (BOSECKER, 2006; LOMBARDI e GARCIA JR, 1999).

2.8 Microrganismos envolvidos no processo

No bioprocessamento está envolvida uma biodiversidade de comunidades microbianas. Parâmetros experimentais, tais como a temperatura, pH e concentração do substrato são variáveis importantes durante o processo de biolixiviação em diferentes ambientes (PATHAK, et al., 2009).

De um modo geral, os microrganismos que são capazes de promover a lixiviação de sulfetos minerais são acidófilos, quimiotróficos, autotróficos, e são classificados de acordo com a temperatura em que se desenvolvem: mesófilos (até 40°C) termófilos moderados (~40 – 55°C) e termófilos extremos (~55 - ~80) (OLIVEIRA, D. M. et al., 2010; SHIPPERS, 2007).

Os microrganismos mais comuns envolvidos nos processos de biomineração são espécies de bactérias do gênero *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*.

Estudos têm sido relatados que em ensaios de biolixiviação de lodo de esgoto são utilizadas culturas puras de *Acidithiobacillus thiooxidans* (*At. thiooxidans*) e *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*At. ferrooxidans*), bem como culturas mistas de *Acidithiobacillus* (LIU, F. et al., 2012; PATHAK et al., 2014). Esses estudos têm utilizado uma variedade de fontes de energia, tais como sulfato ferroso e enxofre elementar para o crescimento adequado da bactéria durante a biolixiviação. Contudo, os três principais grupos de microrganismos envolvidos na biolixiviação de

elementos potencialmente tóxicos são as bactérias autotróficas (por exemplo *Thiobacilli* sp.), bactérias heterotróficas (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp.) e fungos heterotróficos (por exemplo *Aspergillus* sp., *Penicillium* spp.) (SCHINNER, BURGSTALLER, 1989; PANT et al., 2012).

Bactérias mesófilas, oxidantes de ferro e de enxofre, acidofílicas, autotróficas, são capazes de oxidar seu próprio habitat por meio do seu metabolismo (GADD, 2004). *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* têm sido os microrganismos mais significativos associados ao processo de biolixiviação (LIU, F. et al., 2012). Ambos os microrganismos são bactérias aeróbicas, e sua necessidade de carbono é preenchida por CO₂ atmosférico (KO et al., 2013).

Além desses microrganismos citados acima, a lixiviação com arqueobactérias têm sido relatadas, como a *Sulfolobales*, que pertence ao grupo de termófilos extremos, e oxidantes enxofre e ferro, incluindo os gêneros *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* e *Sulfurisphaera* (NORRIS et al., 2000). Recentemente, bactérias archae acidofílicas oxidantes de ferro foram descritos, e a *F. acidiphilum* e *F. acidarmanus*, duas espécies que pertencem ao gênero *Ferroplasma* (JOHNSON, 2008).

A maioria desses acidófilos vive em minas de drenagem ácida, nos efluentes de minas que ocorre naturalmente, e em lagoas próximas as áreas de escavações mineiras. As minas abandonadas que geram efluentes ácidos podem posteriormente misturar com outros corpos naturais de água, aumentando assim a diversidade microbiana (MISHRA, RHEE, 2014).

A ecologia das bactérias acidófilas isoladas da água de drenagem ácida de mina, graças ao desenvolvimento de ferramentas avançadas da biotecnologia molecular, bem como dos processos de reação da biolixiviação, está elucidada e encontram-se na literatura.

2.8.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Trata-se de γ -proteobacteria, autotrófica, acidofílica de natureza quimiolitotrófica, uma vez que utiliza como fonte energética substratos estritamente inorgânicos, como os íons Fe²⁺, enxofre e compostos reduzidos de enxofre (S²⁻, S₂O₃²⁻, S₄O₆²⁻), incluindo os sulfetos minerais (BANDERAS, GUILIANI, 2013).

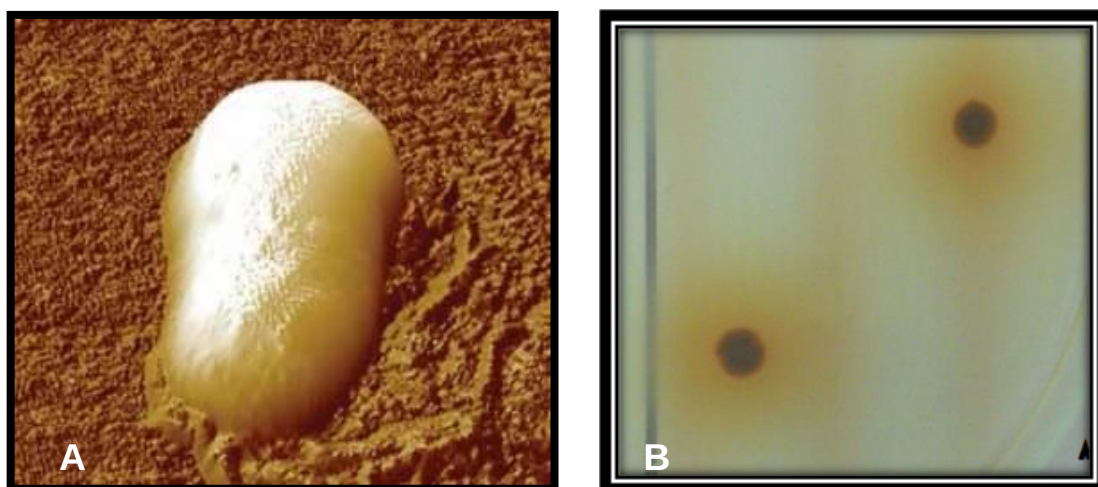
Necessita, além de uma fonte energética de natureza inorgânica, de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (RAWLINGS, 1981; TUOVINEN, PANDA, TSUSHUJA, 1979). A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é utilizada pela espécie para a fixação do CO₂ atmosférico, sua fonte de carbono (LEDUC e FERRONI, 1994).

Este microrganismo não é patogênico e se apresenta como forma de bastonetes gram-negativos, não esporulados, com dimensões médias de 0,5 a 0,6 µm de diâmetro por 1,0 a 2,0 µm de comprimento. Os bastões podem ocorrer sozinhos ou aos pares, e raramente em pequenas cadeias. São móveis e possuem flagelo polar (GARCIA JR, URENHA, 2002).

Por ser uma mesófila, possui temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C. Esta bactéria acidofílica estrita possui pH ótimo situado na faixa em torno de 1.8 a 2.5 (OLIVEIRA, D. M. et al., 2010). A espécie possui uma característica fisiológica marcante, que é a resistência a elevadas concentrações de íons metálicos (NOVO et al., 2000).

At. ferroxidans foi a primeira espécie isolada de regiões mineradoras, e consequentemente tem sido a mais estudada e utilizada em experimentos. Na Figura 6 são apresentadas imagens de *At. ferroxidans* – LR.

Figura 6 - Imagens da topografia microscopia de forças atômicas de *At. ferrooxidans*, linhagem LR na superfície da calcopirita (A) e morfologia da colônia em meio sólido (B).



Fonte: BEVILAQUA, 2003; COSTA, M. A., 2014.

2.8.2 *Acidithiobacillus thiooxidans*

O processo de biolixiviação usando *Acidithiobacillus thiooxidans* tem sido extensivamente pesquisado em estudos publicados (CHEN, Y. X. et al., 2005; ZHANG, P. et al., 2009).

At. thiooxidans é morfologicamente e, sob alguns pontos fisiológicos, semelhante a *At. ferrooxidans*, sendo a principal diferença entre ambas as espécies a incapacidade de *At. thiooxidans* obter energia a partir da oxidação de íon ferroso. Contudo, a linhagem de *At. thiooxidans* possui capacidade de produzir e tolerar concentrações superiores de ácido sulfúrico (LIU, H., LAN, CHEN, 2004). Esta é a razão pela qual este microrganismo é capaz de crescer em ambientes com elevada acidez, sendo que os valores limites de pH para crescimento são entre 0,5 a 5,5 e o pH ótimo está compreendido na faixa de 2,0 a 3,0 (OLIVEIRA, D. M. et al., 2010).

Essa linhagem oxida enxofre a ácido sulfúrico para obter energia a partir dos processos de biolixiviação, provocando a acidificação do meio necessária para a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos. A oxidação e a produção de ácidos por *At. thiooxidans* são ímpetus primários para solubilização de elementos potencialmente tóxicos (ZHANG, P. et al., 2009; WEN et al., 2012).

2.9 Testes de Toxicidade

É extremamente importante a análise química das amostras ambientais para a caracterização de danos em áreas contaminadas. Entretanto, a análise química somente calcula as concentrações de substâncias tóxicas ao ambiente e não reflete a biodisponibilidade destas substâncias químicas para a biota associada. Com isso, a realização dos bioensaios tornaram-se cada vez mais importante, pois podem estabelecer o real impacto dos contaminantes, permitem a observação de efeitos isolados ou combinados de substâncias presentes, sendo complementares as análises das análises físico químicas (CASTRO, 2013; COSTA, C. R. et al., 2008, MAZZEO, et al., 2015; MOREIRA et al., 2008; PLAZA et al., 2005).

Estes testes vêm sendo utilizados para diversos fins, como determinar a toxicidade de efluentes líquidos, compostos químicos, estabelecer limites máximos para lançamentos de descartes de contaminantes, bem como realizar

monitoramento ambiental, por conseguinte, revelar a complexidade dos processos bioquímicos e fisiológicos associados (ROOS, P. H. et al., 2004). A partir da década de 70, as agências ambientais regulatórias europeias, canadenses e norte americanas começaram a utilizar os bioensaios como ferramentas regulatórias de efluentes e poluentes (BLAISE, FERARD, 2005).

Os testes de toxicidade podem ser classificados como agudos e crônicos e estes se diferem, sobretudo, quanto ao tempo de exposição do organismo ao contaminante (ADAMS et al., 2002). O objetivo dos testes de toxicidade aguda é avaliar a ocorrência de efeitos severos e rápidos sobre os organismos, como a mortalidade e/ou imobilidade de 50% dos organismos expostos, uma vez que esse critério é facilmente determinado, apresenta uma importante resposta ecológica e pode ser obtido a curto prazo (ARAGÃO, ARAUJO, 2006). Os testes de toxicidade aguda são ensaios realizados em laboratórios, sob condições específicas e controladas, que visam avaliar a toxicidade de um agente nocivo (COSTA, C. H., 2010).

Os resultados de toxicidade aguda podem ser avaliados por meio dos valores de IC_{50} , concentração de inibição a 50% dos organismos expostos, e CE_{50} , concentração efetiva que causa efeito a 50% dos organismos expostos. Contudo, o fato de uma substância química não produzir efeitos adversos de mortalidade e ou imobilidade não indica necessariamente que a substância não seja tóxica (COSTA, C. R. et al., 2008; MAGALHÃES, FERRÃO FILHO, 2008).

Quando a resposta a um estímulo é prolongada ou contínua por um longo período, podendo abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo, esses resultados correspondem aos ensaios de toxicidade crônica. Carniato et al., (2007) afirma que os resultados obtidos desses testes possibilitam determinar o potencial tóxico de um agente químico ou de uma mistura complexa, sendo que esses efeitos são mensurados através de resposta de organismos vivos que reagem de forma diferente para um mesmo composto.

Vários organismos são recomendados para a realização de ensaios de toxicidade. Esses organismos são dependentes do tipo da avaliação que será realizada. No caso da avaliação ecotoxicológica dos solos, os organismos utilizados podem ser plantas e animais como descritos na Tabela 9 (ENVIRONMENT CANADA, 2005; MENDES, D. D. G., 2011).

Tabela 9 - Exemplos de espécies de animais e de plantas usadas na avaliação ecotoxicológica de solos

Plantas	Animais
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Anelídeo (<i>Eisenia andrei</i>)
Rabanete (<i>Raphanus sativus</i>)	Anelídeo (<i>Eisenia fetida</i>)
Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	Colêmbolo (<i>Folsomia candida</i>)
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Anelídeo (<i>Lumbricus terrestris</i>)
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Escaravelho (<i>Aleochara bilineata</i>)
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	Tatu-bola (<i>Porcellio scaber</i>)

Fonte: ENVIRONMENT CANADA, 2005; MENDES, D. S.G., 2011.

Devido às importantes funções ecológicas que desempenham no meio ambiente, as espécies de plantas são por vezes preferidas em relação às espécies animais (MENDES, D. S, G., 2011).

Para a realização do presente trabalho foi selecionada a alface, por razões que serão descritas a seguir.

2.9.1 Organismo Teste – *Lactuta sativa*

A alface é uma planta dicotiledônea com germinação epígea, cujo tempo necessário para emergência se situa entre os 3 e os 4 dias. Embora possa se desenvolver em solos arenosos, argilosos ou lamacentos, seu desenvolvimento é melhor em solos com elevados teores de matéria orgânica. O pH ótimo para a germinação situa-se entre 6,0 e 8,0 (ENVIRONMENT CANADA, 2005).

Os ensaios de toxicidade realizados com sementes de hortaliças expostas a contaminantes possibilita um estudo posterior dos efeitos causados na germinação e no desenvolvimento do organismo teste.

É durante a germinação que as sementes são mais sensíveis ao estresse ambiental, pois neste período ocorre uma série de processos fisiológicos importantes, e o contato com uma substância contaminante pode influenciar no seu posterior desenvolvimento, resultando em uma série de anomalias, e até mesmo interferindo na sobrevivência da planta (CASTRO, 2013; SOBRERO et al, 2004). De

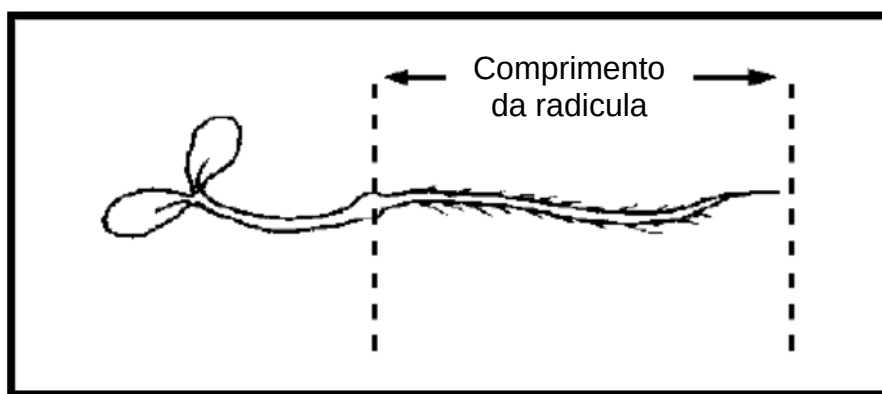
acordo com Vieira (2010), os parâmetros de sobrevivência, germinação e desenvolvimento das alfaces são facilmente avaliados e monitorados.

Este gênero de hortaliça tem sido aplicado em estudos ecotoxicológicos, pois o tempo de ensaio não é longo, elas são sensíveis a substâncias tóxicas como elementos potencialmente tóxicos, pesticidas e fármacos, e ainda podem ser aplicados em testes com água, sedimentos e solo.

L. sativa está entre as 10 espécies de plantas recomendadas pela “US Environmental Protection Agency” (US EPA, 1996b), também é recomendada por outras organizações como teste padrão de toxicidade (ISO, 1995; OCDE, 2003).

A avaliação do efeito tóxico é determinada por meio da germinação das sementes e do desenvolvimento das radículas. Na Figura 7 é representada uma semente germinada com sua radícula desenvolvida.

Figura 7 - Semente germinada de *Lactuca sativa* com sua radícula desenvolvida.



Fonte: CORNELL UNIVERSITY, 2009.

De acordo com Sobrero e seus colaboradores (2004), os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* são ensaios de toxicidade aguda, ou seja, trata-se de uma avaliação dos efeitos letais. Contudo, neste mesmo ensaio podem também ser avaliados os efeitos subletais por meio dos potenciais efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento das radículas.

Nos estudos realizados por Castro, (2013) e Sobrero et. al., (2004), o efeito letal foi avaliado por meio da determinação da concentração que causa inibição sobre a germinação de 50% dos organismos expostos, e o efeito subletal por meio dos valores médios de Concentração de Efeito Não Observado (CENO), e

Concentração de Efeito Observado (CEO), que estão relacionados com o desenvolvimento das radículas das sementes germinadas.

Para assegurar a viabilidade dos resultados obtidos nos ensaios realizados com organismo teste é indicado o uso de substâncias comprovadamente tóxicas como o dicromato de potássio, sulfato de cobre, sulfato de zinco, nitrato de chumbo, entre outros (ZAGATTO, et al., 2008). De acordo com Sobrero (2004), o sulfato de zinco é a substância de referência mais indicada para assegurar a variabilidade e a viabilidade de lotes de sementes empregadas nos ensaios da germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*, devido ao seu potencial tóxico conhecido para este vegetal.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a descontaminação da torta de filtro compostada proveniente de uma indústria sucroalcooleira através da biolixiviação, com fins de minimizar os teores totais de elementos traço presentes na matriz do resíduo.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o potencial agronômico e os EPTs presentes no composto de torta de filtro;
- Verificar as distribuições dos EPTs nos diversos sítios de adsorção das partículas reativas da torta de filtro, fazendo uso da técnica de extração sequencial antes e após o ensaio de biolixiviação;
- Avaliar a remoção dos EPTs através da biolixiviação;
- Avaliar a extração de nutrientes presentes na torta de filtro
- Avaliar a toxicidade do composto de torta de filtro antes e após o tratamento de biolixiviação, através de bioensaios com sementes de *Lactuca sativa* (alface).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Composto da torta de Filtro da usina de açúcar e álcool

Amostras de composto de torta de filtro compostada foram fornecidas pela Usina São Martinho, localizada na cidade de Pradópolis – SP, na safra de 2014 e 2015. A TF utilizada nos ensaios passou pelo processo de compostagem durante 45 dias, sendo que a cama de frango, calcário e gesso estavam incorporados na composição final da torta de filtro (Tabela 10).

Tabela 10 - Composição do composto da torta de filtro

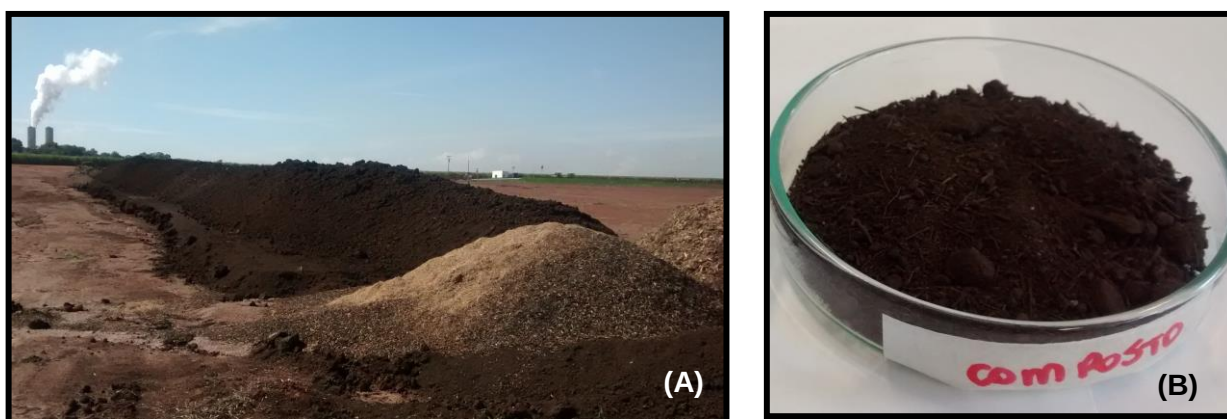
Produto	Quantidade (kg)
Torta de filtro	1000
Cama de frango	150
Calcário	50
Gesso	40

Fonte: USINA SÃO MARTINHO, 2015.

A usina São Martinho é a maior processadora de cana de açúcar do mundo, sendo que a moagem é de aproximadamente 8,5 milhões de toneladas por safra. Esta indústria se destaca não apenas pelo porte, mas também pela excelência em seus processos agroindustriais (USINA SÃO MARTINHO, 2015).

As amostras do composto de torta de filtro (Figura 8) foram coletadas em frascos de polietileno, os quais foram previamente lavados com ácido nítrico 1 molL⁻¹ e posteriormente foram esterilizados com uma solução de formaldeído 5% (v/v) por um tempo de contato de 24h sendo enxaguados posteriormente com água destilada estéril. Após a coleta as amostras foram transportadas até ao laboratório, as amostras foram autoclavadas (20 min à 120°C) e armazenadas a 4°C até sua utilização.

Figura 8 – Pilhas de compostagem de torta de filtro (A) e torta de filtro compostada utilizada na pesquisa (B)



Fonte: Autor

4.2 Caracterização Físico-Química

4.2.1 Caracterização da torta de filtro

Foram realizadas caracterizações dos atributos físico-químicos nas amostras do composto de torta de filtro antes do experimento de biolixiviação.

As análises físico-químicas foram feitas para caracterizar os atributos do potencial agrônômico, conforme Anexo II da Resolução 375 do Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA) de 2006 que define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados (CONAMA, 2006). Nesta resolução, os critérios em relação às análises do potencial agrônômico e de variedade de elementos

potencialmente tóxicos são maiores quando comparadas com a Instrução Normativa SDA nº 27 de 5 de junho de 2006 (BRASIL, 2006), que dispõe sobre os limites máximos admitidos em fertilizantes, corretivos inoculantes e biofertilizantes. Por isso ela foi tomada como base para a caracterização da TF.

As análises do potencial agronômico foram realizadas pelo Programa de Qualidade de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agronômico de Campinas e estão descritos nas Tabelas 11. Enquanto as amostras da TF foram digeridas de acordo com a metodologia proposta pela Environmental Protection Agency (EPA) 3052 (U.S. EPA, 1996a), que promove digestão total da amostra mediante o emprego do forno com radiação micro-ondas. A determinação de elementos potencialmente tóxicos totais foi realizada pela empresa Puriquima.

Para a digestão das amostras da torta de filtro, foi tomada massa de 0,5 g do material, e colocada em reação com 2 ml de H_2O_2 + 9 mL de ácido nítrico concentrado - HNO_3 (65 % v/v) em grau analítico, e + 3 mL de HF após ser colocada para a digestão no micro-ondas.

As concentrações dos EPTs foram determinadas via ICP OES (Varian Vista mpx com vista axial).

4.2.2 Elementos potencialmente tóxicos

A seleção de EPTs que foram analisados durante o trabalho foi realizada tendo por base a caracterização físico-química dos materiais, dados da literatura e a inclusão dos EPTs na Instrução normativa 27 de 2006 do MAPA e Resolução 375 do CONAMA 2006 (BRASIL, 2006; CONAMA, 2006).

4.2.3 Consumo de ácido da amostra de TF da safra de 2015

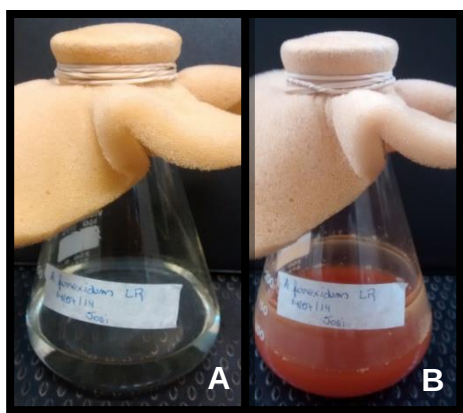
O consumo de ácido pelas amostras de TF foi calculado com a finalidade de quantificar o volume de ácido sulfúrico necessário para manter o valor do pH 2, condições utilizadas nos ensaios de biolixiviação. Para isso, em um béquer foi adicionada 2 g de amostra e 40 ml de água destilada. O pH inicial (6,03) desta suspensão foi ajustado a 2,0 com H_2SO_4 (1 mol L^{-1}).

A suspensão se manteve sob agitação e periodicamente foram realizadas leituras de pH, durante 30 horas. Sempre que necessário o pH foi corrigido para 2,0 com um volume conhecido de H₂SO₄. Após a estabilização do pH em 2,0, o consumo de ácido pela amostra de torta de filtro do resíduo (Kg de ácido/ton resíduo) foi calculado.

4.3 Linhagens bacterianas

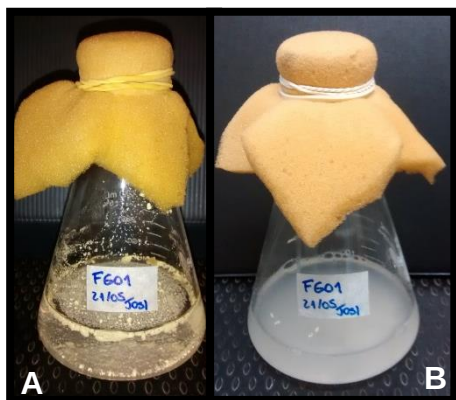
Foram utilizadas as linhagens de *At. ferrooxidans* – LR, (Figura 9) isolada da lixívia ácida de minério de urânio proveniente da Lagoa Real - BA (GARCIA JUNIOR, 1991) e *At. thiooxidans* – FG01, (Figura 10) isolada de um efluente ácido de minério de urânio obtido na cidade de Figueira-PR (GARCIA JUNIOR, 1991).

Figura 9 - Meio de cultura T&K utilizado para o crescimento de bactérias *At. ferrooxidans*. Em (A) início da oxidação do ion Fe²⁺, e (B) após oxidação completa do ion ferroso



Fonte: Autor

Figura 10 - Meio de cultura 9K utilizado para o crescimento de bactérias *At. thiooxidans*. Em (A) início da oxidação do S° e (B) após oxidação completa do S°



Fonte: Autor

4.3.1 Cultivo e manutenção dos microrganismos

Todos os cultivos bacterianos utilizados como inóculo para o processo de biolixiviação foram obtidos após o crescimento em meio específico são descritos a seguir.

4.3.1.1 Meio de cultivo específico para o crescimento e a manutenção da linhagem de *At. ferrooxidans* - LR

O meio de cultivo T&K (TUOVINEN e KELLY, 1973) foi utilizado para o crescimento e manutenção da linhagem de *At. ferrooxidans* - LR. A coloração inicial do meio é verde-clara (característico do íon Fe^{2+}), e após a oxidação completa dos íons ferrosos a coloração apresentada é vermelho-tijolo. Este meio contém sais minerais (Solução A) e sulfato ferroso como fonte de energia (Solução B).

A composição e o modo de preparo do meio de cultivo T&K estão descritos a seguir

Solução A

K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O.....	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5g
Água destilada.....	800 mL
pH.....	1,8

Solução B

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	33,3
Água destilada.....	200 mL
pH.....	1,8

O pH de ambas soluções foram ajustados a 1,8 com ácido sulfúrico 50%. A solução A foi esterilizada em autoclave (120°C, 20 min, 1 atm), e a solução B por filtração em membrana de acetato de celulose (0,45 µm de diâmetro de poro – Millipore – HAWP 04700). No momento do uso as soluções A e B foram misturadas na proporção de quatro partes da solução A para uma parte da solução B.

4.3.1.2 Meio de cultivo específico para crescimento e manutenção das linhagens de *At. thiooxidans* – FG01

O meio de cultivo 9K (SILVERMAN e LUNDGREN, 1959) foi utilizado para o crescimento e manutenção da cultura de *At. thiooxidans* – FG01, sendo que o enxofre elementar foi utilizado como fonte energética.

A oxidação do enxofre elementar produz ácido sulfúrico, e por este motivo o pH do meio foi o parâmetro monitorado semanalmente até o meio adquirir um valor de pH entre 0,5 e 1,0.

A composição e o modo de preparo do meio de cultivo 9K estão descritos a seguir:

Meio de cultivo 9K

K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O.....	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0g
KCl.....	0,1g
S ⁰	10g
Água destilada.....	1000 mL
pH.....	2,8

A solução e o enxofre elementar foram preparados separadamente, sendo a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C por 20 minutos, e o enxofre a 110°C por uma hora. No momento do uso a solução e o enxofre foram misturados.

4.4 Influências das amostras de torta de filtro sob a oxidação dos íons ferrosos e produção de ácido

A influência da composição da amostra sob o processo da biolixiviação foi testada. Para os ensaios foi utilizada uma densidade de polpa de 2% (m/v). Nos experimentos realizados com *At. ferrooxidans* foram utilizados frascos de 250 mL contendo solução A do meio T&K, 120 mmol L⁻¹ de Fe²⁺ e 5% (v/v) de inóculo de *At. ferrooxidans*. Para os ensaios utilizando como inóculo *At. thiooxidans* (5% v/v) foi utilizado meio 9K contendo S⁰ (10 g L⁻¹) como fonte de energia. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas com seus respectivos frascos controles abióticos (Tabela 11).

O controle abiótico consistia em meio de cultura (T&K ou 9K), fonte de energia adicional (Fe²⁺ ou S⁰) sem inóculo bacteriano, e o volume de inóculo foi substituído por formaldeído 10% para assegurar a ausência de atividade bacteriana.

Os frascos controles e os frascos inoculados tiveram seu pH inicial ajustado a 2,0 com ácido sulfúrico (50%). Os ensaios foram incubados em uma mesa agitadora (New Brunswick Scientific Co) a 30°C, 150 rpm, por 22 dias. O volume final dos frascos correspondia a 150 ml.

Com base nos resultados desse experimento, a torta de filtro da safra de 2015 foi adotada nos experimentos de biolixiviação subsequentes.

Tabela 11 - Tratamento experimental do item 4.4.

Densidade de polpa % (m/v)	Microrganismo	Fonte de energia adicional
2	Controle	120 mmol L ⁻¹ FeSO ₄
2	<i>At. ferrooxidans</i>	120 mmol L ⁻¹ FeSO ₄
2	Controle	10 g/L S ⁰
2	<i>At. thiooxidans</i>	10 g/L S ⁰

Fonte: Autor

4.5 Ensaio de biolixiviação na presença de íons ferrosos e enxofre elementar

Com o objetivo de avaliar possíveis diferenças na solubilização dos elementos potencialmente tóxicos foi realizado um ensaio com amostras da torta de filtro da safra de 2015, densidade de polpa de 10 % (m/v) e meio de cultura "9K" ou "T&K". Os frascos bióticos foram inoculados com 5% (v/v) de *At. ferrooxidans* ou *At. thiooxidans*. Todas as condições foram realizadas com fonte de energia suplementar (Tabela 12).

Os controles abióticos consistiam em meio de cultura (T&K ou 9K), fonte de energia adicional (Fe²⁺ ou S⁰) sem inóculo bacteriano, e formaldeído 10%.

Os ensaios foram incubados em uma mesa agitadora (New Brunswick Scientific Co) a 30°C, 150 rpm, por 22 dias. Nesse período foi realizado o monitoramento do pH, Eh e a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos (Al, Cr, Cu, Mg, Pb e Zn).

O aumento na densidade de polpa da torta de filtro (2% para 10%), foi devido a necessidade de obtenção de uma maior quantidade de resíduos tratados para os ensaios posteriores de fitotoxicidade.

Para verificar a fitotoxicidade da amostra biolixiviada foram utilizados os resíduos oriundos dos ensaios inoculados com *At. thiooxidans* – FG01, pois estes resíduos foram submetidos a condições ácidas mais extremas.

Tabela 12 - Tratamento experimental para os experimentos de biolixiviação.

Densidade de polpa % (m/v)	Microrganismo	Fonte de energia adicional
10	Controle	120 mmol L ⁻¹ FeSO ₄
10	<i>At. ferroxidans</i>	120 mmol L ⁻¹ FeSO ₄
10	Controle	10 g/L S°
10	<i>At. thiooxidans</i>	10 g/L S°

Fonte: Autor

4.6 Procedimentos analíticos realizados nos ensaios descritos dos itens 4.4 e 4.5

Todas as soluções empregadas durante os experimentos foram preparadas com água deionizada de alta pureza obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5™, combinado com deionizador Millipore Milli-Q™ academic® (18,2 MΩ cm, Millipore, Bedford, MA, EUA).

Perdas de água por evaporação foram compensadas antes de cada amostragem com adição de água ultrapura estéril. Alíquotas dos frascos foram retiradas periodicamente para análises da fase líquida.

A suspensão foi separada por centrifugação a 4000 rpm, a 22° C por 30 minutos (Centrífuga Eppendorf 5702 R). No sobrenadante foram realizadas medidas de pH, Eh, determinação de Fe²⁺ para ambas as condições e a concentração de H⁺ no meio foi realizada somente para os frascos inoculados com *At. thiooxidans* e o seu respectivo controle abiótico. Uma alíquota (5 mL) das amostras foi armazenada

em ácido nítrico 3M (1:1) para determinação de Al, Cu, Cr, Mn, Pb e Zn total por espectrometria de absorção atômica (Agilent Technologies 200- Series AA). Este ensaio foi realizado em triplicata.

Quando necessário foram realizadas correções ácidas (H_2SO_4 1:1 esterilizado) até a estabilização do pH em um valor próximo a 2,0.

4.6.1 Medidas de pH e potencial redox (Eh)

O pH foi mensurado com o auxílio do pHmetro Corning 430 e o potencial de óxido-redução da solução (Eh) foi medido contra o eletrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}||\text{KCl}(\text{sat})$ em equipamento Micronal B374. Ambas as medidas foram realizadas no sobrenadante das amostras em intervalos de tempo pré-determinados.

4.6.2 Determinação de íons ferrosos (Fe^{2+})

Um dos parâmetros de análise do crescimento bacteriano quando as linhagens utilizam como fonte energética o íon ferroso (Fe^{2+}) é o monitoramento da oxidação desses íons.

A concentração dos íons ferrosos foi determinada por espectrofotometria na região do visível utilizando o método da 1,10-fenantrolina, que consiste na formação do complexo $\text{Fe}(\text{II})$ - fenantrolina, de coloração vermelha (LOVLEY AND PHILLIPS, 1987).

Para a realização do método, foram preparadas as seguintes soluções.

1- Solução de 1,10 – fenantrolina monohidratada 2g/L

Dissolver 2 g de fenantrolina Monohidrato ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{H}_2\text{O}$) em água deionizada, sob aquecimento, e completar o volume final em um balão de 1 L. Essa solução deve ser mantida em frasco âmbar, sem contato com a luz para evitar sua oxidação.

2- Solução de ácido acético/acetato de sódio

As soluções devem ser preparadas separadamente e posteriormente misturadas.

- a) Dissolver 82 g de acetato de sódio anidro (CH_3COONa) em água deionizada e completar o volume final para 500 mL.
- b) Em um balão de 1 L, adicionar mais ou menos 400 mL de água deionizada e acrescentar 114 mL de ácido acético glacial. Acertar o volume final. Finalmente misturar as duas soluções.

3- Solução padrão de sulfato ferroso amoniacal (70 mg/L de Fe^{2+}) para a construção da curva padrão

Em um béquer, dissolver exatamente 0,4914 g de sulfato ferroso amoniacal [$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] com água deionizada acidificada com 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Completar o volume final para 1L com água deionizada.

Para obtenção da curva analítica foram preparadas soluções a partir da solução padrão de Fe^{2+} com concentrações crescentes de Fe^{2+} (0,00; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 1,50 e 5,00 mg L^{-1}). A estas soluções foram adicionadas 5,00 mL de tampão acetato de sódio, 10,00 mL da solução de 1,10 fenantrolina e 100 μL de ácido clorídrico concentrado. Os volumes de todas as soluções foram completados para 25 mL em um balão volumétrico com água deionizada. Foi traçado um gráfico de absorvância em função da concentração de Fe^{2+} .

Análise dos íons ferrosos no meio

Como o objetivo era monitorar o crescimento indireto bacteriano, foi utilizada uma alíquota que variava de 100 μL a 1,0 mL da amostra diluída, com adição de 4,0 mL de solução de 1,10-fenantrolina, 2,0 mL de tampão acetato de sódio, 100 μL de ácido clorídrico concentrado e água ultrapura suficiente para se completar um volume total de 10,0 mL. As leituras das absorvâncias foram efetuadas em espectrofotômetro 600S Femto utilizando um comprimento de onda de 510 nm.

4.6.3 Determinação da concentração de H^+ no meio (produção de ácido)

A determinação da concentração da acidez no meio inoculado com *At. thiooxidans* e em seu respectivo frasco abiótico foi realizada por meio de titulometria de neutralização. Uma alíquota (1,0 mL) de amostra foi diluída a aproximadamente 50 mL com água destilada. A seguir foram adicionadas 2 gotas de indicador fenolftaleína e então a amostra foi titulada com solução padrão (biftalato de potássio PA - Sigma) de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até a primeira coloração rósea permanente (VOGEL, 1981).

4.7 Determinação de Al, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn por espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS)

Um espectrômetro de absorção atômica Agilent 200AAS equipado com lâmpada de catodo oco foi usado para determinação do Al, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn.

As soluções das amostras foram introduzidas no nebulizador pneumático e aspiradas para o interior até a chama na forma de aerossol. Na chama os elementos de interesse foram atomizados. Uma vez atomizados, estes átomos livres foram capazes de absorver energia eletromagnética de uma fonte de radiação externa, sendo que a quantidade de energia absorvida é proporcional à população de átomos na chama. Cabe mencionar ser este o princípio dessa técnica analítica (BROEKAERT, 2001; HOLLER, et al., 2009).

Para atomização do Cr, Cu, Mn, Pb e Zn empregou-se uma chama ar - acetileno como combustível e oxidante, respectivamente. E para determinar o Al foi utilizado o óxido nitroso. O acetileno utilizado para as análises é de alta pureza. Os parâmetros instrumentais, tais como a vazão dos gases combustíveis e oxidantes, e a faixa de trabalho para os comprimentos de onda avaliados são apresentados na Tabela 13. Esses parâmetros foram determinados através de otimização realizada por meio do software do equipamento para maximização das absorbâncias obtidas.

Tabela 13 - Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de analitos por FAAS

Elemento	λ (nm)	Vazão (L/min)		Intervalo de trabalho (mg L ⁻¹)
		Acetileno	ar	
Al	309,3	6.85	11.00*	10 - 120
Cr	357,9	2.90	13.50	0,100 - 4
Cu	324,8	2.90	13.50	0,075 – 4
Fe	248,3	2.90	13.50	0,125 – 4
Mn	279,5	2.90	13.50	0,050 – 3
Pb	217,0	2.90	13.50	0,100 – 2,5
Zn	213,9	2.90	13.50	0,050 – 0,9

*Oxido nitroso

Fonte: Autor

Para evitar interferências nas análises dos EPTs, todo o material de laboratório utilizado na caracterização química foi previamente deixado em contato com HNO₃ (1mol L⁻¹) por um período de 24 h, e posteriormente foi lavado com água destilada. Materiais plásticos foram acondicionados em HCl (0,1 mol L⁻¹) por 48h, à temperatura ambiente. Esse procedimento também foi utilizado para os materiais utilizados nos ensaios de biolixiviação.

4.8 Distribuições das Espécies Metálicas

A mobilidade e biodisponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos dependem das formas químicas específicas que existem entre os EPTs e a amostra de torta de filtro. O estudo sobre as formas ou frações a que os ions metálicos estão ligados foi realizado nas amostras de torta de filtro antes e após o processo de lixiviação.

O fracionamento químico dos elementos potencialmente tóxicos na TF foi determinado pela utilização do processo de extração sequencial proposto pela “Bureau of Community Reference” (BCR) (URE et al., 1993) e atual Standards, Measurements and Testing programme of the European Union (SM & T). Esta

metodologia tornou-se trivial porque tem boa reprodutibilidade e é adequada para análise de uma grande variedade de matrizes (UNSAL, TUZEN, SOYLAK, 2014).

A extração sequencial padronizada pela BCR determina, em poucas etapas, a mobilidade dos elementos potencialmente tóxicos em condições ambientais (lixiviação por ácido fraco, condições de redução e oxidação), simplificando muito os estudos de extração.

A extração sequencial BCR divide o conteúdo de metal de uma matriz sólida em quatro frações de solução (Tabela 14). Este método não é capaz de determinar a composição química de cada componente sólido separado; em vez disso, ela apenas extrai os conjuntos de compostos sólidos para liberar elementos potencialmente tóxicos móveis no âmbito ambiental específico das condições.

A fração 1 (F1: fração facilmente solúvel) é composta de elementos potencialmente tóxicos trocáveis, associados com os carbonatos, solúveis em água ou que estão sob condições ligeiramente ácidas. Esta fração contém elementos potencialmente tóxicos mais móveis, sendo assim a mais biodisponível e, conseqüentemente, a mais potencialmente perigosa para o ambiente.

As frações 1 e 2 também podem ser uma ameaça para o ambiente, dependendo das condições redox. A fração 2 (F2: fração redutível) é composta de elementos potencialmente tóxicos ligados a oxi-hidróxidos de Fe e Mn que podem ser liberados se as condições ambientais mudam de aeróbicas para anóxicas.

A fração 3 (F3: fração oxidável) extrai os elementos potencialmente tóxicos ligados à matéria orgânica e sulfetos sob condições oxidantes. A soma das primeiras três frações da extração sequencial representa o teor total de metal associado com a fase móvel.

Finalmente, a fração não-móvel, ou fração 4 (F4: fração residual), são os elementos potencialmente tóxicos que estão ligados fortemente nas estruturas de fases amorfas e cristalinas que só são extraídos pela digestão com água régia. Portanto, é pouco provável que os elementos potencialmente tóxicos ligados na F4 sejam liberados, a menos que sejam expostos a condições atmosféricas extremas (McGRATH, CUNLIFFE, 1985).

A extração sequencial foi utilizada para determinar as diferentes formas de ligação dos elementos potencialmente tóxicos (Al, Cu, Cr, Mn, Pb e Zn) presentes na torta de filtro.

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico, e água deionizada foi utilizada para a preparação da solução. As amostras de TF foram moídas num almofariz e peneiradas (peneiro de aço inoxidável com malha de 2 mm) para uma maior homogeneização. Os ensaios foram feitos em triplicata e cerca de 2 g de amostra foi utilizada para a extração sequencial de elementos potencialmente tóxicos.

Tabela 14 - Extração sequencial utilizada para especiação dos elementos potencialmente tóxicos

Etapa	Frações	Extrator	Tempo de agitação e temperatura
F1	Água e ácido fraco – solúvel / trocável	25 mL 0.11 M CH ₃ COOH	16 h à 30°C
F2	Reduzível	25 mL 0.5 M HONH.HCl (pH) 2	16 h à 30°C
F3	Oxidável	10 mL 8.8 M H ₂ O ₂ (pH) 2, amb; adic. 25 mL 1M NH ₄ OAc (pH) 2	1 h em temp. amb. e 1h à 85°C; 16 h à 30°C
R	Residual	20 mL água regia, repetir	Aquecimento em placa até secura

Fonte: Autor

Fração I (solúvel, trocável, ligados a carbonatos): 25,00 mL de ácido acético 0,11 mol L⁻¹ (Mallinckrodt) foi adicionado a 2,00 g de TF em um tubo de centrífuga de 50 mL. A mistura foi agitada (160 rpm) em mesa agitadora a temperatura ambiente (30° C) por 16 horas. O extrato foi então separado do resíduo sólido por centrifugação (3000 rpm) durante 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado utilizando uma seringa de 10mL acoplada a um sistema de filtração com membrana de 0,45µm, e estocado em frasco de polietileno mantido a 4° C para posterior análise por ICP OES.

O resíduo da fração I foi lavado com 20,00 mL de água deionizada por agitação (160 rpm) durante 15 minutos, e então foi centrifugado (3000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado foi empregado para extração da fração redutível.

Fração II (redutível, ligados aos oxi-hidróxidos de Fe e Mn): 25,00 mL de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (J.T. Baker) (acidificado com HNO_3 , J.T. Baker, a pH 2) foi adicionado ao resíduo da fração I no tubo de centrífuga. A mistura foi agitada (150 rpm) em mesa agitadora à temperatura ambiente (30°C) por 16 horas. A retirada do extrato e a lavagem do resíduo foram feitas da mesma maneira descrita para a fração I.

Fração III (oxidável, ligados à matéria orgânica e sulfetos): 10,00 ml de H_2O_2 $8,8 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) (pH 2) foram adicionados ao resíduo da fração II lentamente. A mistura permaneceu por 1 hora à temperatura ambiente (25°C) com eventual agitação manual (aproximadamente a cada 15 minutos). O processo continuou por aquecimento do tubo a 85°C em banho maria por aproximadamente 2 horas, até que o conteúdo líquido do tubo evaporasse e reduzisse o volume inicial a um volume de 1-2 mL.

Uma segunda alíquota de 10,00 mL de H_2O_2 (Merck) foi adicionada e o procedimento foi repetido. Posteriormente, ao resíduo resfriado e úmido foi adicionado 25,00 ml de acetato de amônio (NH_4OAc) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (J.T. Baker) (pH ajustado a 2 com HNO_3 (J.T. Baker)). A mistura foi agitada (160 rpm) em mesa agitadora a temperatura ambiente (25°C) por 16 horas. A retirada do extrato e a lavagem do resíduo foram feitas da mesma maneira descrita para a fração I.

Fração residual: nesta etapa, 5,00 mL de água foi adicionada ao resíduo remanescente, e em seguida 20,00 mL de solução de água-régia foram adicionados ao resíduo. A solução foi evaporada até próximo da secura. Este passo foi repetido uma segunda vez. O resíduo final foi diluído em 25,00 ml de HNO_3 0,5 M, filtrou-se com um papel de filtro de banda azul e dilui-se com água deionizada até 50,00 mL. A solução foi analisada por espectrometria de emissão atômica (ICP-OES).

4.9 Análise da extração sequencial utilizando ICP-OES

As análises dos elementos potencialmente tóxicos presentes nas suspensões obtidas da extração sequencial foram realizadas no Instituto de Pesquisas

Energéticas e Nucleares da USP de São Paulo, em colaboração com a empresa Itatijuca Biotech.

O instrumento utilizado neste estudo foi um ICP-OES modelo Optima™ DV 7000 da PerkinElmer. A medida de cada elemento foi selecionada considerando a sensibilidade e a interferência mútua dos elementos concomitantes após a confirmação da presença ou da ausência de interferência da solução contendo um único elemento, solução correspondente à matriz de teste em branco e solução de amostra. Para cada amostra foram preparadas duas soluções diluídas em meio ácido, usando HNO₃ (Suprapur ®) 5%. No equipamento ICP foram feitas três medições para cada elemento. As condições de medição do ICP-OES são mostradas na Tabela 15.

Tabela 15 - Instrumentos e parâmetros analíticos para ICP-OES

Parâmetros	ICP – OES
Potência de radiofrequência	40 MHz
Vazão do gás principal	15 L/min
Vazão do gás auxiliar	0,3 L/min
Grau de difração	Echelle
Vista de observação	Radial
Detector	CCD
Potência	1300 W
Injetor	Padrão 2mm

Fonte: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP de São Paulo

4.10 Avaliação dos nutrientes após os ensaios de biolixiviação

No final dos ensaios, o resíduo proveniente do ensaio inoculado com uma *At. thiooxidans* foi submetido à análise dos nutrientes fósforo e nitrogênio. Este resíduo foi escolhido para as análises, pois o mesmo foi submetido a condições ácidas mais intensas do que os resíduos inoculados com *At. ferrooxidans*.

O resíduo foi filtrado através de papel de filtro lavando-se exaustivamente com água deionizada a pH 1,8. Em seguida, o resíduo foi seco à temperatura ambiente e posteriormente enviado ao Instituto Agronômico de Campinas SP.

4.11 Análises mineralógicas

Para realizar a caracterização da amostra original e dos resíduos foi utilizada uma combinação de técnicas analíticas, como a difração de raios X (DRX) e FTIR-ATR.

4.11.1 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é uma técnica padrão que tem como objetivo caracterizar a estrutura cristalina dos materiais (MACHADO et al., 2011).

As análises de difratometria de raios X foram realizadas na amostra de torta de filtro original e nos resíduos sólidos de cada tratamento. Antes de serem submetidos às análises, os resíduos foram lavados exaustivamente com água ácida (pH 1,8), filtrados e secos em estufa a 60 °C.

Foi utilizado para a obtenção dos dados um difratômetro de ânodo rotatório de cobre marca Rigaku modelo RINT2000, e o Crystallographica Search-Match (versão 2.1.1.1), respectivamente. Os seguintes parâmetros foram considerados para aumentar a resolução da análise: Potência: 40 kV, 70 mA; Detector linear D/teX Ultra - Rigaku; Fenda de divergência: 0,25°; Abertura horizontal da fenda de divergência: 5 mm; Soller: 2,5°; Região de medida: 5 a 50°(2 θ) passo 0,02°, varredura contínua de 2s.

4.11.2 Análise estrutural por FTIR-ATR

Quando a radiação eletromagnética irradiada possuir frequência de radiação correspondente à frequência de vibração da molécula, a energia de radiação infravermelha é absorvida pela molécula alterando o estado vibracional das ligações da molécula (McMURRY, 2005; SOLOMONS, 2001). Se durante a vibração a molécula sofrer variação, em seu momento dipolar o sinal será captado e observado a partir de um espectro.

A espectroscopia Refletância Total Atenuada (ATR) ou reflexão interna foi utilizada para a análise da torta de filtro, pois o mesmo não é translúcido. A técnica

ATR consiste na passagem do feixe de luz infravermelho por um cristal que está em contato com a amostra, e a variação no sinal pode ser detectada (FERRÃO, 2001).

A técnica de FTIR, além de fornecer informações mineralógicas, pode ser utilizada para reconhecer compostos orgânicos na estrutura da torta de filtro. No entanto, uma das maiores dificuldades relacionadas às amostras de TF analisadas é a trivial sobreposição de bandas orgânicos e inorgânicos (CARDONA, MÁRQUEZ, 2009), bem como acontece com as análises de DRX.

A identificação qualitativa do mineral é possível porque os minerais possuem bandas de absorção características na faixa do infravermelho, números de onda que variam de 4000 a 400 cm^{-1} . No entanto, o espectro de uma amostra natural contém muitos componentes e é significativamente mais difícil de extrair resultados quantitativos (JI, J. et al., 2009).

As análises espectroscópicas no Infravermelho foram feitas no Espectrofotômetro Bruker FT-IR, modelo Vertex 70, detector DLaTGS com o contato direto da amostra sob o cristal (feixe de infravermelho) com resolução espectral de 4 cm^{-1} , 72 scan e limites entre 4000 a 400 cm^{-1} . As medidas foram realizadas no Laboratório de Multiusuários, localizado no Instituto de Química – UNESP-Araraquara/SP.

4.12 Análise fitotóxica

As plantas estão intimamente ligadas ao ambiente onde vivem e seu crescimento é regulado por uma série de fatores ecológicos (luz, nutrientes, poluentes, temperatura) que podem modificar a sua presença, crescimento e disseminação (PIGNATTI et al., 2001). Todas as espécies de plantas possuem, além disso, uma tolerância diferente para cada fator ecológico, e o conjunto de todas as condições determina a homeostase da planta. Qualquer mudança neste estado pode causar efeitos adversos, como toxicidade ou doença (BADERNA et al., 2014).

Os elutriados das amostras de TF antes e após o processo de biolixiviação foram submetidos ao ensaio de toxicidade aguda de germinação e desenvolvimento das radículas, para avaliar os efeitos letais por meio da ausência de germinação das sementes, bem como os efeitos subletais por meio do desenvolvimento das radículas. Para isso, utilizou-se sementes de *Lactuca sativa* da variedade Crespa

Grand Rapids, da Horticeres sementes, lote 14000107, validade 04/2016 (Figura 11).

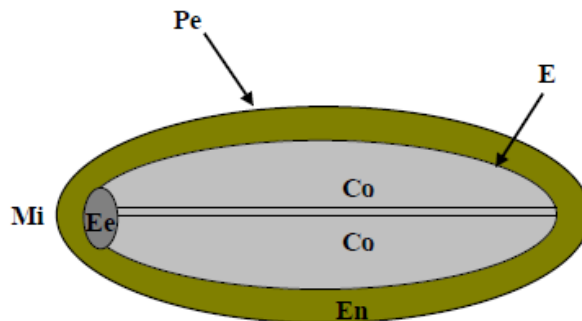
Figura 11 - Sementes de *Lactuta sativa* utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade



Fonte: Autor

A Figura 12 mostra as estruturas presentes nas sementes de alface (*L. sativa*). As sementes possuem uma grande superfície de contato, pequeno tamanho, massa, e, conseqüentemente, uma baixa quantidade de endosperma disponível (ANDRADE, L. F.; DAVIDE, GEDRAITE, 2010; RODRIGUES, L. C. A. et al., 2013). O endosperma possui um mecanismo de resistência da germinação em condições adversas no ambiente, protegendo também o embrião contra a ação tóxica dos elementos potencialmente tóxicos (BISOGNIN et al., 2005; LI et al., 2005).

Figura 12 - Modelo esquemático da composição dos tecidos da semente (aquênio) de alface



Fonte: NASCIMENTO, 2002.

Onde: Pe (pericarpo); En (endosperma); Mi (região da micrópila); E (Embrião) = Co (cotilédono) + Ee (eixo embrionário).

4.12.1 Processamento do composto da torta de filtro para os bioensaios

4.12.2 Cálculo do peso seco das amostras

Para o preparo dos bioensaios, foi necessário estimar primeiramente o peso seco das amostras antes e após biolixiviação. Para isso, foram pesados em balança de precisão 10 g do composto. As amostras foram secas em estufa a 65°C até atingirem peso constante.

O cálculo do conteúdo de água existente foi feito pela diferença dos pesos inicial e final das amostras. Esse procedimento foi feito em triplicata para duas condições. A média de cada triplicado foi considerada como o equivalente de peso seco de cada amostra e este valor foi usado para preparar o elutriato.

4.12.3 Capacidade de campo das amostras

Conhecer o valor da capacidade de campo das amostras é importante porque permite ajustar a umidade ideal para a realização de ensaios com organismos vivos. (MAZZEO, 2013).

Para o cálculo da capacidade de retenção de água, foram pesados 10 g de amostras TF antes e após a biolixiviação, que foram dispostos em um funil coberto com papel de filtro qualitativo. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água deionizada sobre esse funil e sobre outro funil recoberto apenas com papel de filtro, isto é, sem amostra.

Após 24 horas de drenagem da água pelos funis, foram avaliados os volumes finais de água drenada para ambos os funis. Pela diferença de volume entre eles, foi calculada a quantidade de água que ficou retida no substrato.

4.12.4 Obtenção do elutriato - INGERSOLL (1995); ABNT, 2004 – norma NBR 10.006

O processo para obtenção dos elutriatos das amostras de torta de filtro, antes e após a biolixiviação, consistiu-se da dissolução da proporção de uma parte da torta de filtro (referente ao peso seco) por quatro partes de água ultrapura, seguido de agitação contínua a uma velocidade baixa durante 30 min.

As amostras ficaram em repouso por sete dias em frascos cobertos com filme de PVC, em temperatura de 22 °C. Após a decantação do material, a fase líquida da amostra foi filtrada através de uma membrana com 0,45µm de porosidade. Foi utilizado elutriato 100% e as seguintes diluições: 5%, 10%, 25%, 50% e 75%.

Os valores do pH dos elutriatos foram corrigidos entre pH 6 – 6,5 através de uma solução de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio (1mol L⁻¹) (MONTEIRO FILHO et al., 2014).

4.13 Ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*

O experimento foi montado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) contendo 4 placas de Petri de cada tratamento. Em cada placa foram utilizadas 30 sementes de *Lactuca sativa* aparentemente sadias. Elas foram colocadas sobre papel de filtro com 8 mL do elutriato. Posteriormente, as placas foram vedadas com filme plástico e então acondicionadas em mesa sem agitação com temperatura controlada de 22°C.

Na Tabela 16 foi descrito um resumo das condições utilizadas para a realização do ensaio de toxicidade com *L. sativa*.

Nos períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a exposição ao elutriato foi quantificado o número de sementes germinadas, e posteriormente calculou-se a taxa de germinação, germinação relativa, índice de velocidade de germinação, índice de germinação e alongamento da raiz.

Após um período de 120 horas as raízes foram medidas utilizando um paquímetro digital. As médias dos comprimentos obtidos foram utilizadas para obtenção de uma curva de regressão linear (concentração de TF versus crescimento) com base no IC₅₀, concentração na qual ocorrem 50% de inibição no crescimento radicular.

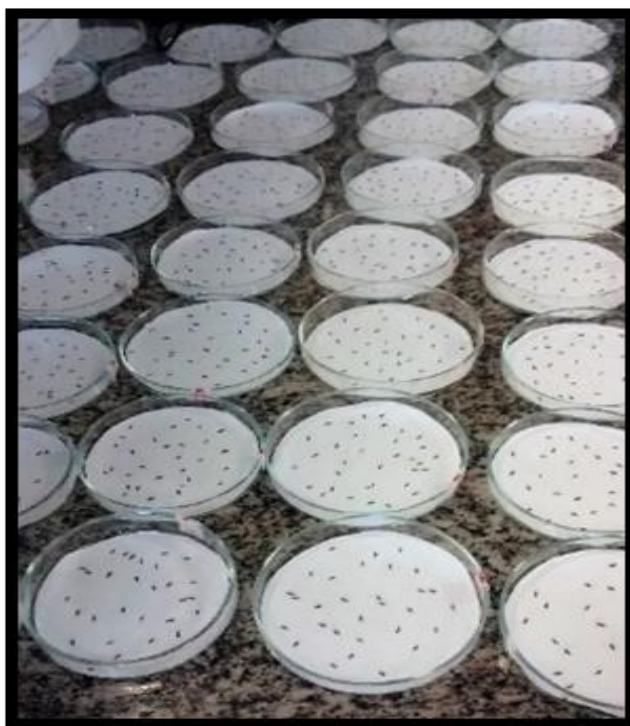
A montagem do experimento e a disposição das sementes na placa de Petri são mostradas na Figura 13.

Tabela 16 - Condições gerais utilizadas no ensaio de germinação e desenvolvimento da *L. sativa*

Organismo teste	<i>Lactuca sativa</i>
Tipo de ensaio	Estático
Número de organismo teste por replica	30 sementes
Número de replicas	4
Volume de amostra do elutriato	8 mL
Água de diluição	Água deionizada
Concentração da amostra do elutriato	100% - 75; 50; 25; 10 e 5%
Substrato	Papel de filtro qualitativo
Recipiente do teste	Placa de Petri
Temperatura	22 ± 2°C
Fotoperíodo	8 horas de luz / 16 horas no escuro
Duração do ensaio	120 horas
Controle negativo	Água deionizada
Controle positivo	Solução de Zn(SO ₄) ₂ 0,04 g L ⁻¹
Efeito avaliado	Número de sementes germinadas e comprimento das radículas
CrITÉRIOS de aceitabilidade	Carta controle, germinação das sementes no controle negativo > 80%, comprimento das radículas ≥ 2 mm.
Resultado final	IC ₅₀ (120h), IG

Fonte: Autor

Figura 13 – Montagem dos experimentos com as sementes de *Lactuca sativa* utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade



Fonte: Autor

4.13.1 Taxa de Germinação das sementes (%)

A taxa de germinação foi calculada de acordo com Labouriau e Valadares (1976), sendo utilizada a Equação 1:

$$G = \frac{N}{A} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde:

G = germinação;

N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

4.13.2 Germinação relativa das sementes (%G)

Para determinação da porcentagem da germinação relativa foi considerada a relação da contagem das sementes germinadas no experimento e no controle

negativo (Equação 2). Foram consideradas como germinadas as medidas iguais ou superiores a 2 mm aos quatro dias após semeadura (LOPES, 2014; LABOURIAU; AGUDO, 1987).

$$\% G = \frac{CGa}{CGc} \times 100 \quad (2)$$

Onde,

SGa = número total de sementes germinadas na amostra analisada;

SGc = número total de sementes germinadas no controle

4.13.3 Índice de velocidade de germinação

O IVG foi calculado pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a de Maguire (1962) (Equação 3).

$$IVG = (G1 / N1) + (G2 / N2) + (G3 / N3) + \dots + (Gn / Nn) \quad (3)$$

Onde IVG = índice de velocidade de germinação;

G1 , G2 , G3 , ..., Gn = número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

N1 , N2 , N3 , ..., Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

4.13.4 Alongamento relativo das radículas

Para a determinação do desenvolvimento de cada plântula, foram efetuadas medidas do tamanho das raízes utilizando-se um paquímetro digital. O cálculo foi efetuado a partir da média do alongamento da raiz nas sementes germinadas em cada condição estudada, e da média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no controle (LABOURIAU e AGUDO, 1987; LOPES, 2014) (Equação 4).

$$\% R = \frac{Mra}{Mrc} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

MRa = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no experimento analisado;

MRC = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no controle.

4.13.5 Índice de germinação (IG)

Para a determinação do índice de germinação combinam-se as medidas de germinação relativa das sementes ao CN (%G) e do alongamento da raiz relativo ao CN (%R) (ENVIRONMENT CANADA, 2005; LANNANA 2008) (Equação 5).

$$IG = \frac{G \times R}{Gc \times Rc} \times 100 \quad (5)$$

Onde: G =

nº de sementes germinadas com tratamentos;

R = comprimento médio da raiz no tratamento;

Gc = nº de sementes germinadas no controle e

Rc = comprimento médio da raiz no controle

4.14 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicada e os valores médios foram utilizados nas análises de dados. O desvio padrão foi calculado e está presente como barras de erro. Os dados foram analisados pelo software OriginPro versão 8.0 e pelo Assistatic 7.7 beta (SILVA, F. A. S., AZEVEDO, 2009).

Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva e testes de normalidade (Shapiro-Wilk) One-way ANOVA foram feitos para analisar a diferença estatística entre a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos nos controles e nos ensaios inoculados. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de confiança de 95%. Quando os dados não se enquadravam dentro da normalidade foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$.

Os coeficientes correlação de Pearson e Spearman (paramétricos e não paramétricos) foram utilizados para verificar se existe correlação entre a eficiência de solubilização de elementos potencialmente tóxicos, pH e Eh. A função de modelo logístico com ajuste de curva não-linear foi usada para o processo de lixiviação do metal de traço.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização inicial da torta de filtro

Na Tabela 17 é apresentada a caracterização inicial das amostras de torta de filtro compostadas coletadas nas safras de 2014 e 2015.

Tabela 17 - Caracterização da torta de filtro das safras de 2014 e 2015

Características	Elementos potencialmente tóxicos				
	(mg kg ⁻¹ seco TF)				
	2014 ¹	2015 ¹		2014 ²	2015 ²
pH (em H ₂ O 1:10)	9	8	Al	34100	30400
Sólidos Totais (%)	64	66	Cu	68	40
Carbono orgânico (g C/kg)	226	142	Cr	20	18
N total (mg N/kg)	12	10	Fe	54300	49700
P Total (g P/kg)	9	7	Mn	327	488
			Pb	25	30
			Zn	160	200

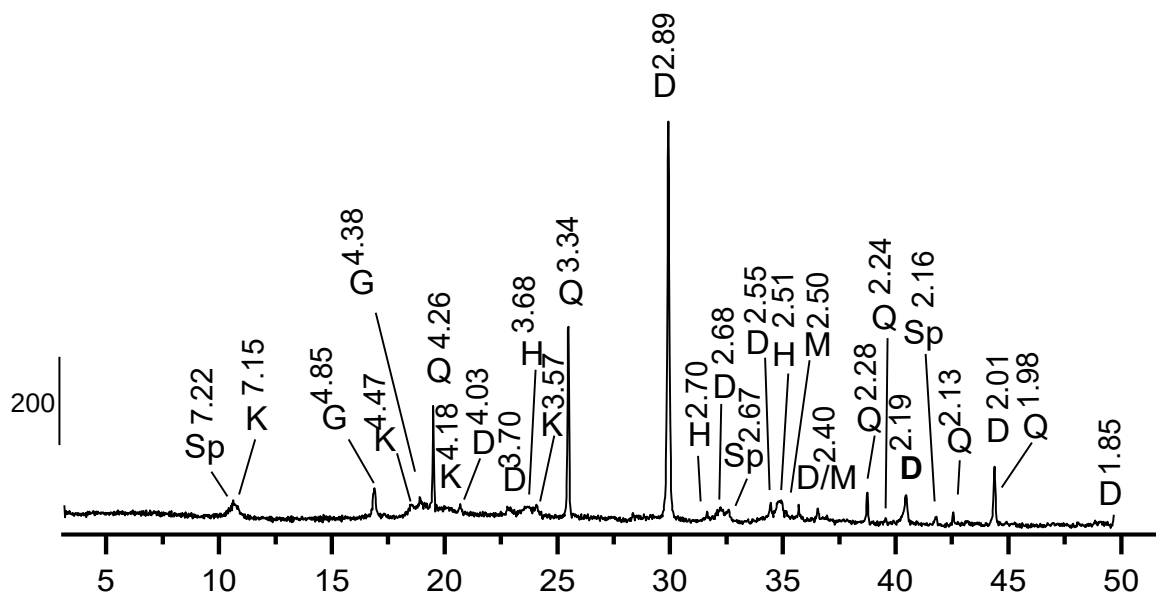
¹ - Caracterização realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas. ² - Caracterização realizada pela empresa Puriquima.

Fonte: Autor

De acordo com a caracterização inicial das amostras de TF pode-se observar que tanto o potencial agronômico quanto a concentração dos elementos potencialmente tóxicos presentes na amostra de TF de 2014, encontram-se em concentrações superiores a amostras coletadas na safra de 2015.

A amostra de TF coletada na safra de 2015 foi submetida à análise de difratometria de raios X sendo apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Difratogramas de raios X da amostra original de torta de filtro. Símbolos: K, caulinita; D, dolomita; Q, quartzo; H, hematita; M, magnetita; G, gibbisita e Sp, spangolita. A barra lateral indica a intensidade dos picos e os números acima da identificação dos picos, indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.



Fonte: Autor

O difratograma da amostra original revelou as formas cristalinas da caulinita $[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4]$; dolomita $[\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2]$; quartzo $[\text{SiO}_2]$; hematita $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$; magnetita $[\text{Fe}_3\text{O}_4]$; gibbisita $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ e spangolita $[\text{Cu}_6\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH})_{12}\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$. Sendo que as principais fases cristalinas encontradas foram a dolomita e o quartzo.

Capítulo 1

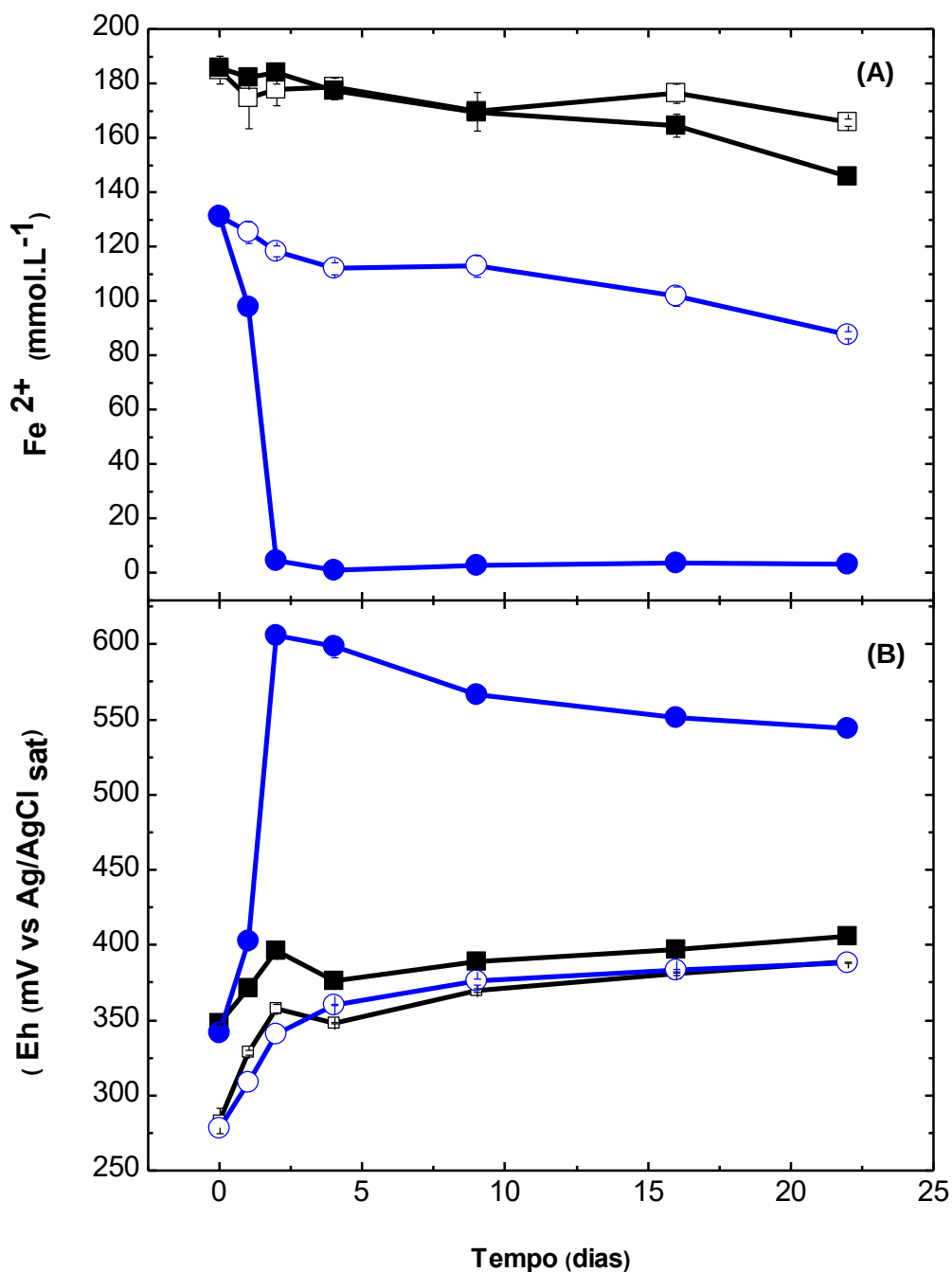
BIORREMEDIÇÃO DOS ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS PRESENTES EM RESÍDUO DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA UTILIZADO COMO CONDICIONADOR DE SOLO

5.2 Influência das amostras de torta de filtro sob a oxidação dos íons ferrosos e produção de ácido

A oxidação dos íons ferrosos e a variação do potencial redox com o tempo para as safras de 2014 e 2015 estão apresentadas na Figura 15.

Pode ser observado que a oxidação de íons ferrosos foi drasticamente diferente para as amostras de 2014 e 2015. Enquanto que a amostra da safra de 2014 oxidou ao final do ensaio cerca de 20%, na amostra da safra de 2015 a oxidação completa (100%) foi observada em 48h (Figura 15A). Este comportamento está refletido diretamente na curva de potencial de oxido-redução (Figura 15B). Este resultado indica a presença de substâncias na amostra de 2014 que inibem o crescimento desses microrganismos. O crescimento de *At. ferrooxidans* é diretamente proporcional à quantidade de íons ferrosos oxidados. O Eh (Figura 13B) da TF da safra de 2014 aumentou lentamente e estabilizou em torno de 400 mV. Enquanto que a Eh na amostra de 2015 aumentou progressivamente e atingiu o valor máximo de aproximadamente 600 mV após 72 h estabilizando em torno de 550 mV.

Figura 15 - Concentração de íons ferrosos dissolvidos (A) e do potencial de óxido redução (B) em ensaios de biolixiviação com densidade de polpa de 2% de amostras de TF coletados nas safras dos anos de 2014 e 2015, utilizando *At. ferrooxidans* - LR (símbolos fechados). Símbolos abertos correspondem aos controles abióticos



(□) Controle abiótico – safra de 2014 (■) *At. ferrooxidans* – safra de 2014
(○) Controle abiótico – safra de 2015 (●) *At. ferrooxidans* – safra de 2015

Fonte: Autor

De acordo com a Equação de Nerst (Equação 6), a mudança na dinâmica do potencial redox está relacionada principalmente a relação do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (BOON, HEIJNEN, 1998; GAN et al., 2015; PENG et al., 2009).

$$E_h = E^\circ + \frac{2,3 * R * T}{n * F} * \log \left(\frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]} \right) \quad (6)$$

Onde:

E_h = potencial redox (V);

E° = potencial padrão de oxidação - redução 0,77V para $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$;

R = constante de gás perfeitos 8,314 J/mol.K;

T = Temperatura (K);

n = número de moles de elétrons trocados na reação;

F = constante de Faraday 96,485 C/mol e^- ;

$[]$ = Concentrações molares das espécies iônicas.

A Figura 16 mostra a variação das concentrações de íons H^+ com o tempo para as safras de 2014 e 2015. A acidez do meio aumentou continuamente durante o tempo de ensaio para a amostra de 2015 atingindo cerca de 6 mmol L^{-1} no fim do ensaio, enquanto a produção de ácido para a amostra de 2014 estabilizou após 48h em cerca de 2 mmol L^{-1} . Os frascos foram inoculados com *At. thiooxidans* e suplementados com enxofre elementar (S^0). A atividade metabólica desta espécie leva a produção de ácido sulfúrico segundo a Equação 7.

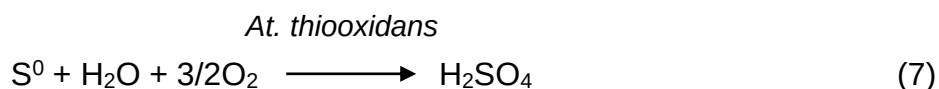
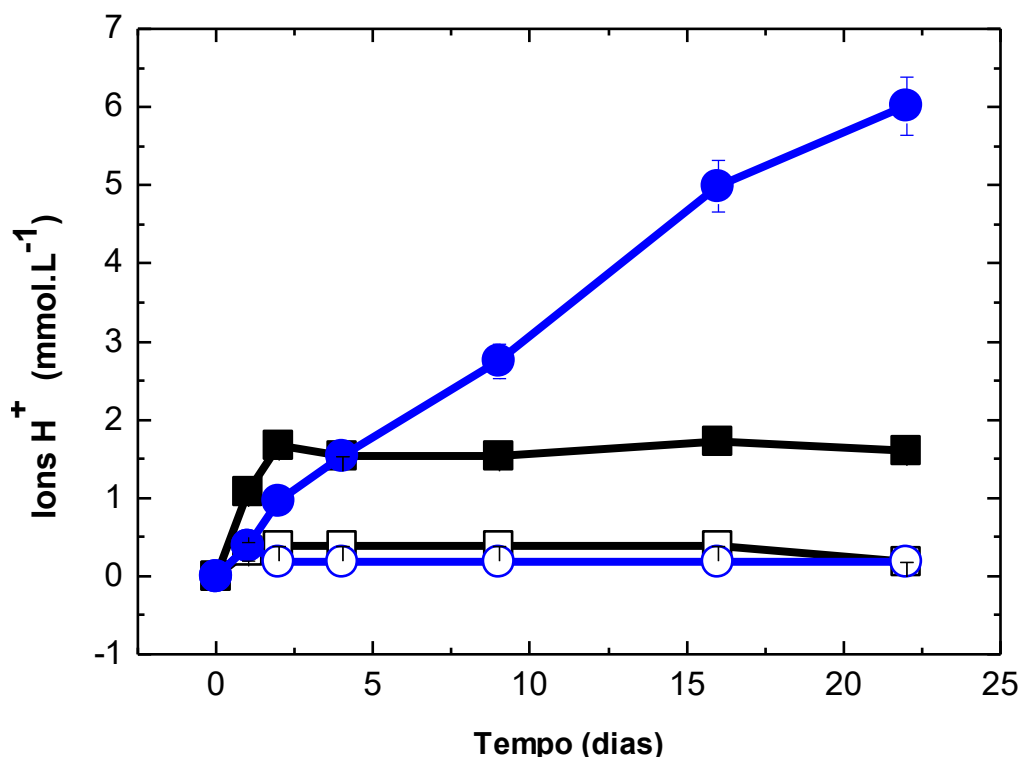


Figura 16 - Concentração de íons H^+ em ensaios de biolixiviação com densidade de polpa de 2% de amostras de TF coletados nas safras dos anos de 2014 e 2015 utilizando *At. thiooxidans* – FG01 (símbolos fechados) suplementado com S^0 . Símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.



(□) Controle abiótico – safra de 2014 (■) *At. thiooxidans* – safra de 2014
(○) Controle abiótico – safra de 2015 (●) *At. thiooxidans* – safra de 2015

Fonte: Autor

Da mesma maneira que observado para os dados de oxidação de íons ferrosos e Eh (Figura 15), a produção de H^+ também foi muito inferior para a amostra de 2014. O que sugere fortemente a presença de agente inibitórios para a atividade bacteriana nesta amostra. Considerando-se a caracterização inicial da amostra (Tabela 19) observa-se uma grande diferença entre o conteúdo de carbono orgânico total e EPTs entre as amostras. Está demonstrado na literatura a elevada resistência a elementos potencialmente tóxicos das espécies utilizadas nestes ensaios, isso nos sugere que parte da inibição observada possa estar relacionada com o conteúdo de carbono orgânico total e com substâncias que não foram identificadas.

Contaminantes orgânicos e inorgânicos são bem conhecidos por induzirem alterações metabólicas que podem resultar em inibição completa ou parcial da atividade microbiana (ESGALHADO et al., 2002).

Estudos demonstraram que as espécies acidófilas foram afetadas pela presença de compostos orgânicos em meio de crescimento mineral e também em lodo de esgoto. Vários compostos, tais como ácidos orgânicos, álcoois primários, proteínas hidrolisadas, açúcares, detergentes aniônicos e tenso ativos catiônicos são tóxicos para *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* (FANG, ZHOU, 2006; GU, WONG, 2004; PICHER et al., 2002; TUOVINEN, NIEMALA, GYLLENBERG, 1971).

Picher et al., (2002) observaram que a toxicidade causada pelo carbono orgânico dissolvido (COD) em lodo de esgoto e resíduos de suínos no crescimento de *At. ferrooxidans* foi provocada quando a concentração do sobrenadante foram superiores a 180 e 500 mg L⁻¹, respectivamente.

Segundo Tuttle e Dugan (1976), as interações químicas dos íons ferrosos com alguns compostos orgânicos fora da célula podem contribuir para a inibição da oxidação de ferro dependendo do composto orgânico usado.

Ao utilizar o lodo de indústrias da fabricação de papel, Rebhun e Manka, (1971) observaram que a celulose era o principal fator inibitório desses microrganismos e não os compostos orgânicos. O efeito inibidor foi observado por um aumento da fase lag de crescimento dos microrganismos.

Com esses resultados pode-se concluir que as amostras coletadas na safra de 2014 continham substâncias não identificadas que inibiam as atividades microbianas dos acidofílicos utilizados nesse ensaio. Com isso, optou-se por utilizar somente as amostras de torta de filtro do ano de 2015 para desenvolver os demais experimentos propostos.

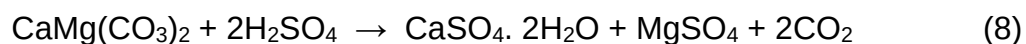
5.3 Consumo ácido da amostra

O difratograma de raio X da amostra original (Figura 14) revelou a presença de várias fases cristalinas, entre elas, dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), um mineral que consome ácido.

Conforme observado pela Figura 17, houve um consumo de ácido nas primeiras horas. Mas com o decorrer do tempo o consumo contínuo do ácido

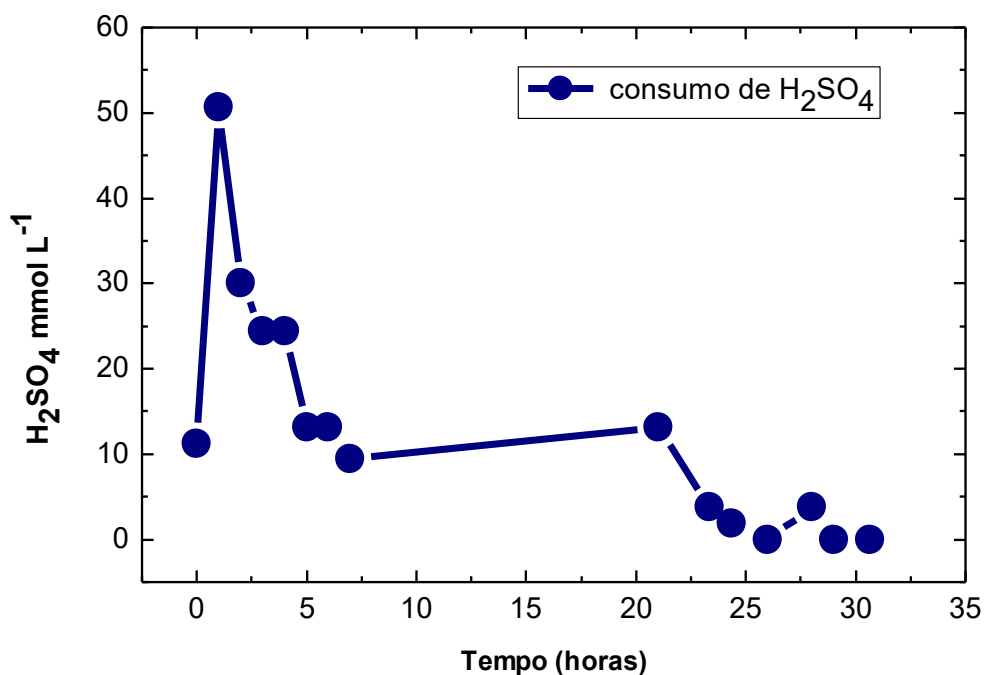
sulfúrico diminuiu e se estabilizou no pH desejado (2,0). Esse consumo de ácido representou um total de 48 kg_{H₂SO₄} ton⁻¹.

Durante o ajuste do pH inicial a dolomita reagiu de acordo com a seguinte reação química (Equação 8).



Como resultado da dissolução ácida da dolomita ocorre a formação de sulfato de cálcio hidratado (CaSO₄ · 2H₂O), gesso. A análise dos resíduos das várias condições de estudo será apresentada posteriormente (item 5.8) e foram observados a formação desta nova fase cristalina nos resíduos lixiviados.

Figura 17 - Concentração de ácido sulfúrico 1 mol.L⁻¹ consumido pela amostra para manutenção do pH a 2.0. Valor do pH inicial da amostra = 8,57

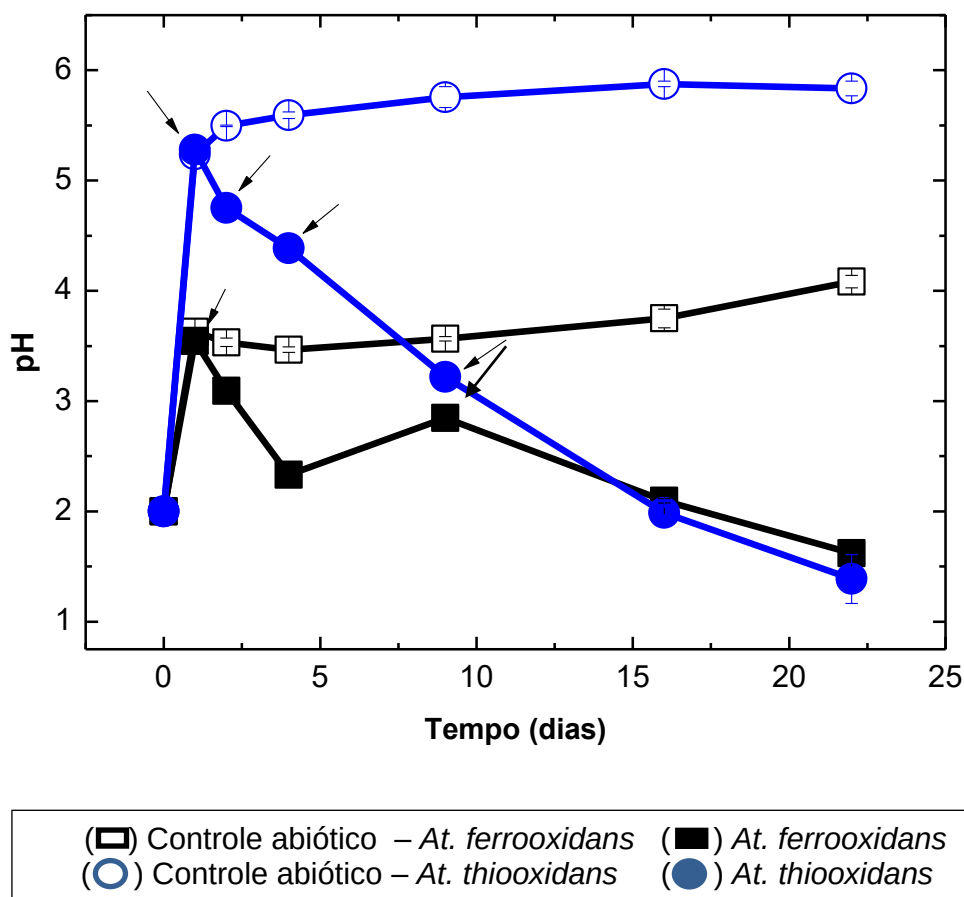


Fonte: Autor

5.4 Ensaio de biolixiviação com 10% de densidade de polpa de TF na presença de íons ferrosos e enxofre elementar com a amostra da safra de 2015.

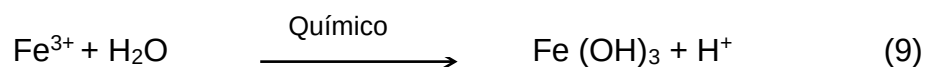
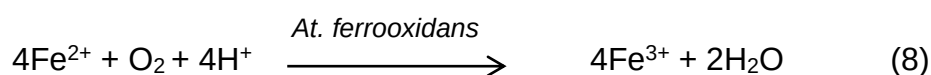
As variações de pH e Eh em frascos agitados durante o processo de biolixiviação (22 dias) com densidade de polpa de 10% de TF utilizando *At. ferrooxidans* – LR e *At. thiooxidans* - FG01 são mostrados na Figura 18 e Figura 19, respectivamente.

Figura 18 - Variação do pH (a) em ensaios de biolixiviação utilizando 10% TF e *At. ferrooxidans* – LR suplementado com íons ferrosos e *At. thiooxidans* - FG01 suplementado com S^0 (símbolos fechados). Os símbolos abertos correspondem ao controle abiótico. A seta ($\longrightarrow$) indica correções nos valores do pH do meio.



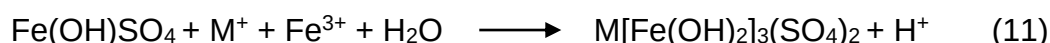
Fonte: Autor

Houve um aumento no pH inicial em todas as condições estudadas, incluindo os frascos inoculados com *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*. O consumo de ácido para o frasco inoculado com *At. ferrooxidans* foi consideravelmente maior que para o frasco inoculado com *At. thiooxidans*, sendo necessárias correções ácidas até o nono dia de ensaio. Deve-se considerar que no ensaio inoculado com *At. ferrooxidans* foi utilizado o meio T&K suplementado com 120 mmol L^{-1} de Fe^{2+} , e como mostrado na Equação (8) a oxidação dos íons ferrosos pelas bactérias também consome ácido. A produção de ácido também ocorre devido à hidrólise subsequente do íon férrico (Equação 9) (LOMBARDI, GARCIA, MENEZES, 2006; NAZARI et al., 2014).



As correções ácidas foram efetuadas para manter as condições ótimas para as atividades bacterianas, evitando assim a maior precipitação dos íons férricos que favorecem a precipitação de jarosita ($[\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ (Equação 5) e de hidróxi-sulfatos férricos que influenciam na dissolução dos elementos potencialmente tóxicos de interesse (WATLING, 2006).

A formação da jarosita é facilitada a altas temperaturas e em valores de pH entre 2 e 3. O íon férrico que foi produzido na fase aquosa (Equação 8) pode ser hidrolisado para hidróxido de íon férrico (Equação 9), após o qual combina com sulfato para produzir hidróxi-sulfato de ferro (Equação 10). Na presença de cátions, o hidróxi-sulfato de ferro é convertido à jarosita (Equação 11). (AHONEN, TUOVINEN, 1992; CORDOBA et al., 2008; DING et al., 2007; DAOUD, KARAMANEV 2006; NAZARI et al., 2014; NEMATİ et al., 1998).



Onde: $\text{M} = \text{K}^+, \text{Na}^+, \text{H}_3\text{O}^+$ ou NH_4^+

Segundo Nazari et al., (2014), pode-se observar a precipitação do íon férrico com valores de pH em 1,3; 1,35; 1,4 e 1,55, e concentrações de 10, 50 g/L de sulfato ferroso a temperaturas de 32 e 37°C, respectivamente.

A diminuição dos valores de pH após o período de correção ácida (até 10 dias) é atribuída à atividade metabólica. Os frascos inoculados com *At. thiooxidans* obtiveram um valor de pH final de 1,39, enquanto que nos frascos inoculados com *At. ferrooxidans* o pH foi de 1,62. Embora ambas as culturas sejam acidófilas, *At. thiooxidans*, devido ao seu metabolismo, pode tolerar valores de pH mais baixos do que *At. ferrooxidans*. KO et al., (2013) também observaram que nos ensaios

realizados com culturas *At. thiooxidans* o pH final alcançado foi menor do que nos ensaios com *At. ferrooxidans*.

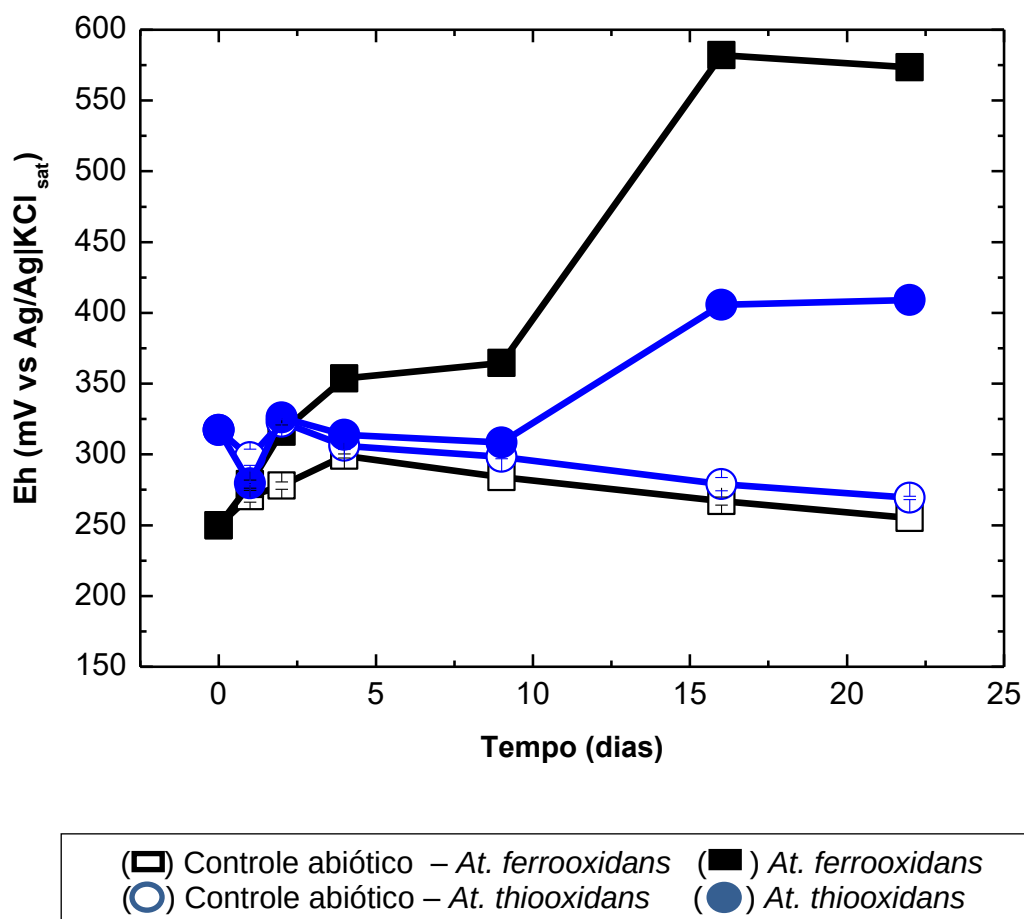
Chen, S. e Lin, (2001) observaram uma limitação dos valores de pH para a biolixiviação de sedimentos numa faixa de 1,10 a 1,64. O valor de pH muito baixo pode levar a uma inibição do crescimento bacteriano devido à solubilização dos elementos potencialmente tóxicos durante o processo (LIU, Y. et al., 2007; SHI et al., 2015).

Deve-se ressaltar que somente em frascos inoculados foram realizados os ajustes de pH durante os ensaios. Em frascos de controle abiótico foi realizado um ajuste inicial. Observou-se neste caso que em ambos os tratamentos abióticos os valores de pH se elevaram com o decorrer dos ensaios. Nesse caso, a acidificação inicial do ambiente foi insignificante, e a taxa de consumo de ácido pelo carbonato excedeu a taxa de ácido que estava presente no ensaio, conforme também observado por Nazari et al., (2014).

O Eh é outro fator importante que influencia o processo de solubilização dos elementos potencialmente tóxicos e permite inferir, bem como o pH, a atividade metabólica bacteriana, como discutido anteriormente.

Os valores de potencial na presença de *At. ferrooxidans* são superiores aos valores alcançados na presença *At. thiooxidans* (Figura 19). Esse resultado é condizente com a atividade metabólica de cada uma dessas espécies. A *At. thiooxidans* não utiliza íons ferrosos como fonte de energia e portanto, a sua atividade metabólica não afeta esse parâmetro. Ao contrário da *At. ferrooxidans* que além de oxidar enxofre oxida também íons ferrosos, afetando diretamente os valores de Eh, como discutido anteriormente. As condições abióticas não apresentaram diferenças significativas entre elas, mantendo-se ao redor de 300 mV.

Figura 19 - Variação do Eh em ensaios de biolixiviação utilizando 10% TF e *At. ferrooxidans* - LR e *At. thiooxidans* - FG01 (símbolos fechados). Os símbolos abertos correspondem ao controle abiótico



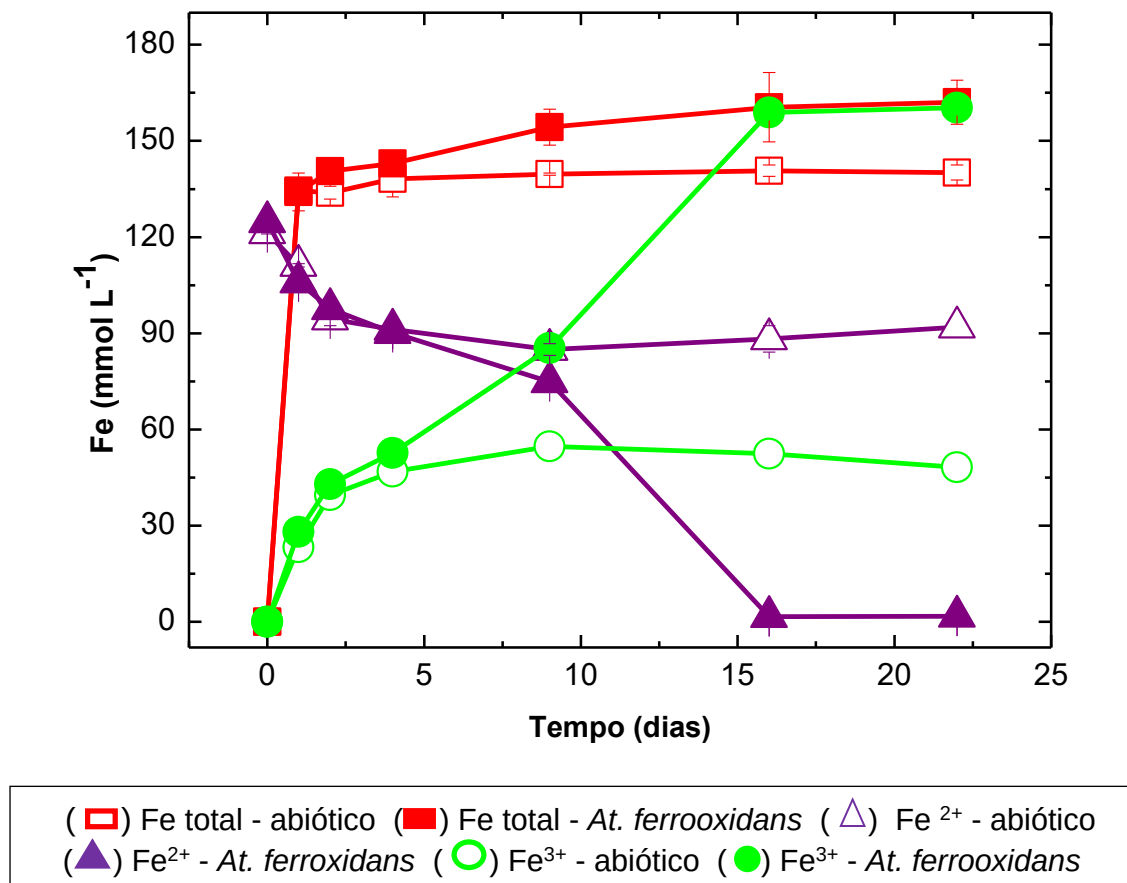
Fonte: Autor

A variação da concentração do ferro total, dos íons ferroso e férricos está mostrada na Figura 20.

Na condição inoculada observou-se uma continua oxidação dos íons ferrosos atingindo 100% após duas semanas de ensaio. O aumento da concentração de íons férricos ocorreu como uma consequência da atividade bacteriana. No controle abiótico a concentração de íons ferrosos manteve-se praticamente constante. Os valores de ferro total representam a soma da concentração dos íons ferrosos e férricos.

Pathak et al., (2014) obtiveram uma taxa de oxidação semelhante em ensaios realizados com lodo de esgoto utilizando *At. ferrooxidans*.

Figura 20 - Variação da concentração de ferro total, Fe^{2+} e Fe^{3+} por *At. ferrooxidans* - LR nos ensaios de biolixiviação com 10% TF. Símbolos fechados correspondem aos frascos inoculados e símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.



Fonte: Autor

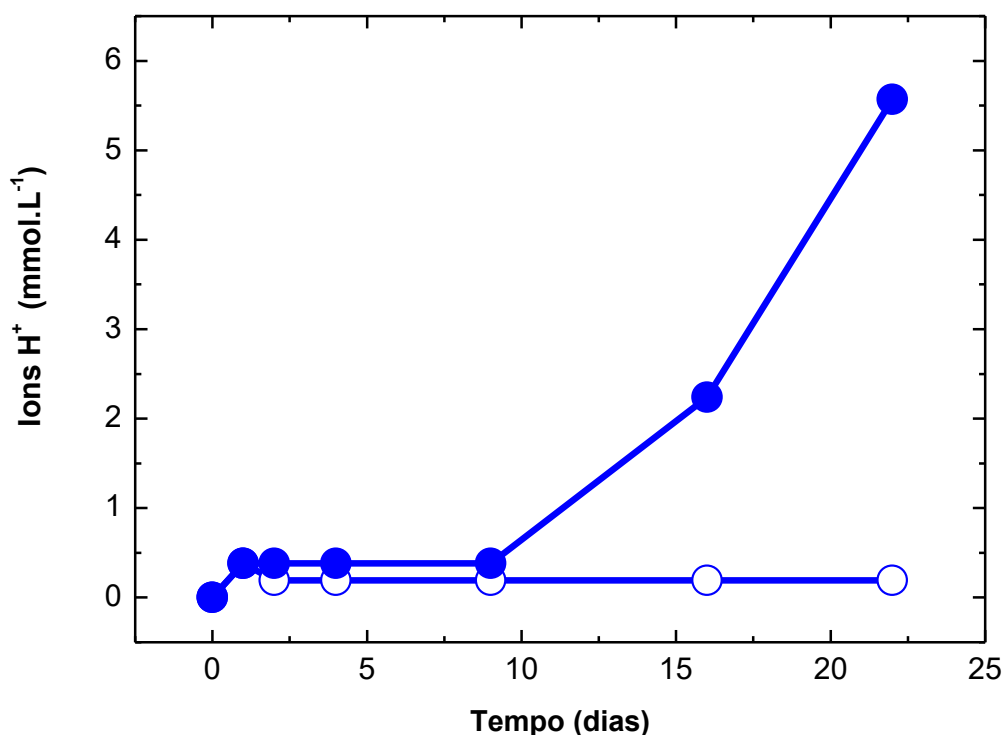
A oxidação do íon Fe^{2+} pode ocorrer naturalmente na presença do O_2 do ar ou ser catalisada biologicamente como descrito anteriormente. Em valores de $\text{pH} < 3,5$ e na ausência da bactéria, o íon ferroso é estável e a lixiviação devida ao íon férrico é lenta (CHARTIER; COUILLARD, 1997). A presença de *At. ferrooxidans* promove uma oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} em taxas 5×10^5 a 1×10^6 vezes mais rápidas, se comparadas com processos abióticos (HERBERT JR, 1999).

Os íons férricos produzidos bacterianamente atuam como um poderoso agente oxidante para a dissolução de metal a partir dos resíduos.

A produção de ácido por *At. thiooxidans* está mostrada na Figura 21A oxidação do enxofre elementar a sulfato provocou um aumento na concentração de íons H^+ na solução, o que está relacionado com a atividade microbiana com uma consequente geração de ácido sulfúrico.

Muitos pesquisadores utilizam como monitoramento a oxidação do enxofre elementar a sulfato. Segundo Akinci, Guven (2011), a produção de sulfato pode ser correlacionada com a diminuição do pH. Esta correlação também pode ser feita em relação ao aumento da concentração de íons H^+ apresentada neste ensaio.

Figura 21 - Variação da concentração de íons H^+ utilizando *At. thiooxidans* - FG01 nos ensaios de biolixiviação com 10% TF. Símbolos fechados correspondem aos frascos inoculados e símbolos abertos correspondem aos controles abióticos.



(○) Controle abiótico – *At. thiooxidans* (●) *At. thiooxidans*

Fonte: Autor

5.5 Distribuição das espécies químicas dos EPTs

Os ensaios de extração sequencial apresentaram uma recuperação superior a 88%. A concentração total dos EPTs remanescentes presentes no resíduo após a biolixiviação está apresentada na Tabela 18.

Tabela 18 - Concentração total do Al, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn remanescentes na amostra da torta de filtro após o processo de biolixiviação

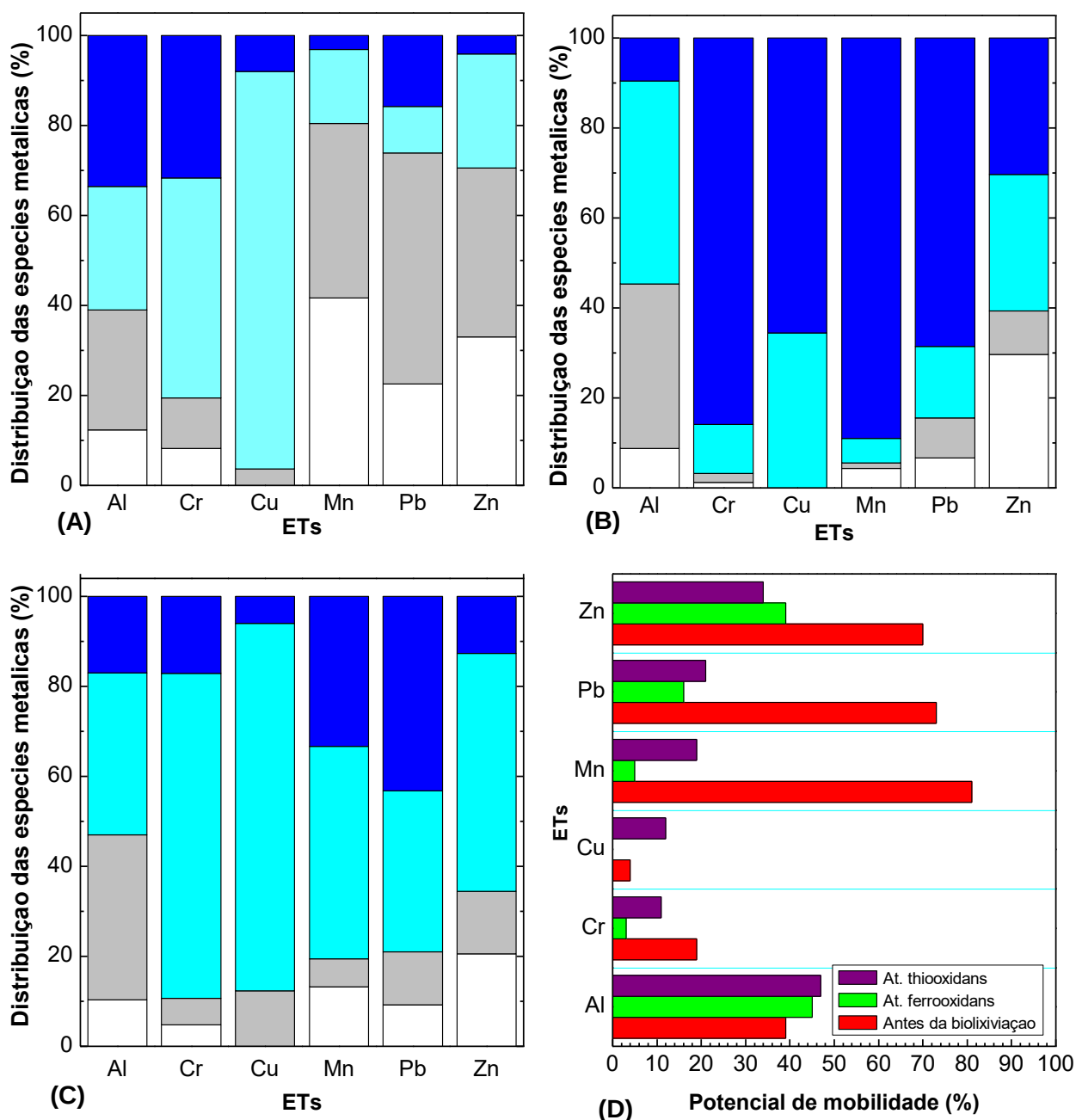
Amostra	Alumínio	Cromo	Cobre	Chumbo	Manganês	Zinco
mg kg ⁻¹						
TF original	30400	18	40	30	488	200
<i>At. ferrooxidans</i>	20064	12	31	17	44	70
<i>At. thiooxidans</i>	19760	11	30	19	34	76

Fonte: Autor

De acordo com a Tabela 18 descrita acima pode-se observar que o processo de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* contribuiu para minimizar os teores de elementos potencialmente tóxicos presentes na amostra de torta de filtro compostada.

As frações trocáveis, reduzíveis, oxidáveis e residuais dos EPTs antes e após a biolixiviação está mostrada na Figura 22.

Figura 22 - Potencial mobilidade das espécies metálicas da torta de filtro antes (A) e após o processo de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* (B), *At. thiooxidans* (C) e potencial mobilidade dos elementos potencialmente tóxicos (D).



() F1 - trocável () F2 - reduzível () F3 oxidável () F4 - residual

Fonte: Autor

As formas lábeis dos EPTs Al, Cr, Cu Mn, Pb e Zn representavam inicialmente (%) 38, 19, 3, 79, 73 e 70, respectivamente. Por esses dados o Cu apresentou-se como o EPTs mais estável, enquanto o Mn o menos estável, consequentemente o potencial da mobilidade Mn é alto (Figura 22 - D). A seguinte ordem decrescente pode, portanto, ser estabelecida: Mn > Pb > Zn > Al > Cr > Cu.

A tendência de Cu em se associar com frações oxidáveis e redutíveis foi reportada por vários autores. A estabilidade do Cu observada neste estudo está associada à fração a que ele está ligado.

Este resultado reflete a afinidade que o elemento tem com a matéria orgânica, em conformidade com a constante de estabilidade elevada do complexo de cobre com a matéria orgânica (ALONSO et al., 2006).

Os EPTs ligados à fração 3 podem também ser parcialmente solubilizados durante os ensaios de biolixiviação (PATHAK et al., 2014; TSAI et al., 2003). Assim, as frações iniciais dos EPTs mais estáveis, tais como Cu e Cr, podem exibir alterações significativas nas formas de ligação durante o processo de biolixiviação.

A formação do $PbSO_4$ como resultado da biolixiviação resultou no aumento do Pb na forma residual, como relatado também por Chen, S. Y., Lin, (2010).

Após o processo de biolixiviação, uma mudança foi observada nas frações de ligações dos elementos potencialmente tóxicos. Os íons metálicos Cr, Mn, Pb, Zn após biolixiviação com ambas bactérias e Cu após biolixiviação com *At. ferrooxidans* tiveram uma redução significativa entre as frações presentes nas formas trocáveis, dados que se mostram consistentes com a literatura (BEOLCHINI et al., 2009). As exceções foram o Al em ambos os processos de biolixiviação e o Cu com *At. thiooxidans* (Figura. - 22C), provocaram um aumento na fração trocável.

A biolixiviação modificou a ligação do Cu e Al com as frações mais estáveis deixando-as mais lábeis. Esta mudança pode estar relacionada com as condições de extrema acidez resultantes do bioprocessos, e, portanto, precisam ser monitoradas caso o resíduo venha ser utilizado na agricultura.

Estes resultados demonstraram a eficácia do processo de biolixiviação, tanto do ponto de vista da solubilização dos EPTs, como na mudança do estado de ligação dos elementos potencialmente tóxicos na matriz.

Os íons metálicos do Cr, Cu, Mn, Pb e Zn, após os ensaios de biolixiviação com *At. ferrooxidans*, e Mn, Pb e Zn nos testes com *At. thiooxidans* mostraram um aumento nas frações residuais que são altamente insolúveis.

5.6 Solubilização de elementos potencialmente tóxicos

A solubilização dos EPTs está apresentada a seguir (Figura 23 A, B, C, D, E e F).

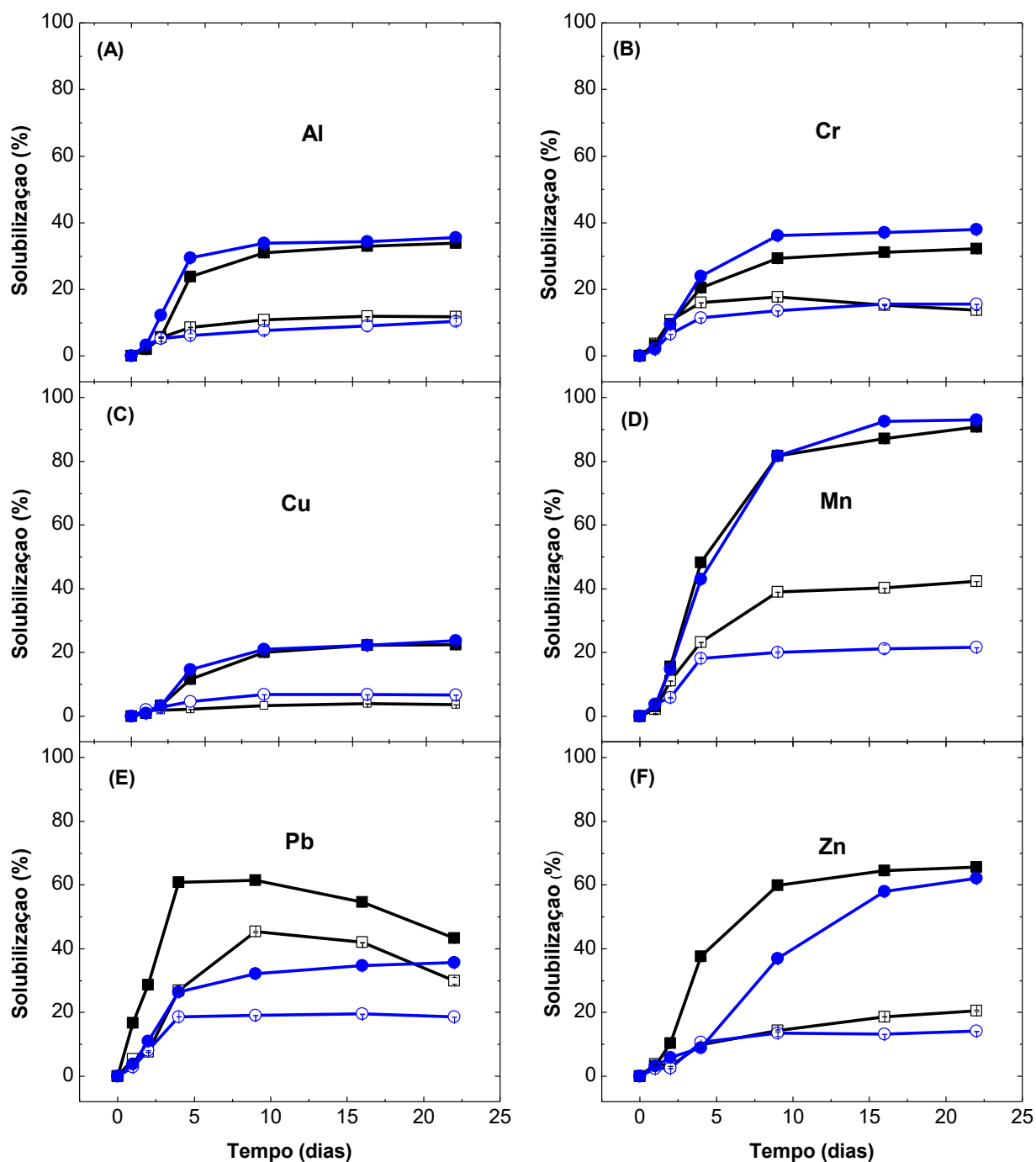
As solubilizações dos EPTs durante a biolixiviação apresentaram a seguinte ordem decrescente de solubilização: 91% de Mn, 65% de Zn, 43% de Pb, 34% de Al, 32% de Cr e 22% de Cu em frascos inoculados com *At. ferrooxidans*, e solubilização de 93% de Mn, 62% de Zn, 38% de Cr, 35% de Al, 35% de Pb, e 24% de Cu nos frascos inoculados com *At. thiooxidans* (Figura 23).

Pode ser observado um aumento na solubilização durante os primeiros dias, seguido de estabilização para todos os EPTs ao redor do nono dia, com exceção do Pb que após esse período apresentou uma diminuição na solubilização.

Todos os tratamentos inoculados apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos abióticos. Os tratamentos inoculados não apresentaram diferenças significativas entre eles (*At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*) com exceção dos elementos potencialmente tóxicos Pb e Cr.

Entre todos os ensaios, as lixiviações dos EPTs nos frascos abióticos foram mais baixas e significativamente menores quando comparadas com os ensaios inoculados. Os controles abióticos mostraram lixiviação de 42% de Mn, 30% de Al, 30% de Pb, 20% de Zn, 13% de Cr e 4% de Cu, correspondentes aos ensaios com *At. ferrooxidans*, e de 21% de Mn, 19% de Al, 19% de Pb, 16% Cr, 14% de Zn e 3,5% Cu nos frascos abióticos correspondente a *At. thiooxidans*. Esta solubilização pode ser devido ao ajuste inicial do pH à 2,0 realizado em todas as condições. Contudo, após essa solubilização inicial, a condição abiótica manteve-se praticamente inalterada com o tempo, homólogas ao aumento dos valores pH nos frascos controle.

Figura 23 - Solubilização dos elementos potencialmente tóxicos (A) Al, (B) Cr, (C) Cu, (D) Mn, (E) Pb e (F) Zn durante os ensaios de biolixiviação, utilizando as bactérias *At. ferrooxidans* – LR (■) e *At. thiooxidans* – FG01 (●) (símbolos fechados) e seus respectivos controles (símbolos abertos) com uma concentração de 10% de densidade de polpa de TF.



Fonte: Autor

A remoção praticamente total do teor de manganês da torta de filtro pode ser atribuída à ocorrência das suas formas químicas, que estavam ligadas, em sua maior parte, às formas móveis extraíveis (trocáveis) e redutíveis (ligados aos oxihidróxidos de Fe e Mn) (Figura 22).

Essas frações são bem conhecidas por serem responsáveis pela liberação dos EPTs em vários estudos (WEN et al., 2012). Embora a eficiência de remoção de manganês tenha sido maior na amostra inoculada com *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*, a solubilização dos elementos nos controles abióticos foi relativamente elevadas (42 e 21%).

Contudo, os outros íons metálicos analisados após o quarto dia de ensaio mostraram uma solubilização muito diferente entre as amostras inoculadas e os respectivos controles, indicando, portanto, a importância da atividade bacteriana para se obter uma maior solubilização dos EPTs de interesse (KUMAR, NAGENDRAN 2007).

O zinco geralmente está associado à forma lábil, podendo ser facilmente solubilizado a baixos valores de pH, o que também foi observado neste estudo. A solubilização de Zn pode ser atribuída à falta de interações desse metal com a superfície do resíduo (DENG et al., 2012).

O chumbo, apesar de estar associado às frações com potencial de biodisponibilidade, apresentou uma solubilização de 61% após nove dias com a *At. ferrooxidans*, mas na continuidade dos ensaios a sua solubilização apresentou uma queda. Em amostras inoculadas com *At. thiooxidans*, a solubilização aumentou gradativamente e terminou com 36% no 22º dia. A baixa solubilidade de chumbo também foi observada por outros pesquisadores (HUANG et al., 2015).

A resistência do Pb à biolixiviação pode ser explicada pela presença de quantidades elevadas de PbSO₄ (anglesita), que se precipita devido à baixa solubilidade ($K_{ps} = 1,62 \times 10^{-8}$) (ZHANG, P. et al., 2009).

Tal observação é compartilhada no presente trabalho, e pode ser amparada pelo seguinte fato: como todo o ensaio foi conduzido em meio ácido, não seria possível o Pb ter precipitado sob a forma de hidróxido, carbonato, óxido ou fosfato, pois a precipitação de tais formas somente ocorreria em condições alcalinas (pH>7).

Foi obtida uma baixa eficiência na solubilização de Cr, 32% e 38%, em amostras inoculadas com *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*, respectivamente. A

baixa solubilização pode ter se dado devido à formação de complexos de cromo com a matéria orgânica do resíduo (PATHAK, et al., 2009). De acordo com Pathak et al., (2014), para uma solubilização eficaz do Cr é necessário ter condições altamente ácidas ($\text{pH} < 1$), sendo que os valores de condição ácida necessários não foram atingidos na presente pesquisa.

Bayat e Sari, (2010b) observaram diferenças significativas na solubilização de Cr por *At. ferrooxidans* para distintas densidades de polpa de lodo de galvanoplastia (2, 8, 14, 18, 24 % (m/v)). Essas diferenças foram atribuídas à capacidade tamponante do material utilizado que dificultou a diminuição e manutenção do pH, retardando a taxa de solubilização do metal.

Por sua vez, a prevalência do Cu nessa amostra estava fortemente associada com as frações ligadas à matéria orgânica, frações residuais e sulfetos, que são as formas mais estáveis, resultando, portanto, numa baixa solubilização do EPTs.

Villar e Garcia Junior, (2006) demonstraram que a solubilização de Cu em ensaios com suplementação de S^0 foi maior que 60% somente em condições de pH inferiores a 1,5. Barreira, (2006) obteve uma taxa de solubilização de Cu de 80 %, utilizando meio T&K suplementado com Fe^{2+} , em lodo anaeróbio e *At. ferrooxidans* como inóculo. Apesar dos valores de pH alcançados no presente trabalho terem sido inferiores a 1,5 a solubilização do Cu não foi tão eficiente quanto a encontrada pelos pesquisadores citados, provavelmente pela associação do Cu com frações mais estáveis.

O Al, para ser solubilizado, necessita um valor de pH inferior a 3,20 e Eh superior a 300 mV (LOMBARDI, GARCIA, MENEZES, 2006). No presente estudo, estes valores foram obtidos no processo após nove dias de ensaio, e após este período a taxa de solubilização do Al permaneceu constante. Lombardi, Garcia, Menezes, (2006) utilizaram amostras de lodo de esgoto, e com as mesmas cepas (LR e FG01) e suplementos de energia utilizadas neste trabalho e obtiveram uma solubilização de 3,5% e 40% de Al, respectivamente.

A solubilização de todos os elementos potencialmente tóxicos estudados (Al, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn) tornou-se insignificante após 16º dia, demonstrando que biolixiviação prolongada traz pouco benefícios para a solubilização dos íons metálicos.

Diante do exposto ficou evidente que o grau de solubilização de cada elemento traço depende do tipo de metal, da fração a que ele está associado, do pH, do meio de cultivo utilizado (suplementado com Fe^{2+} ou S^0) e dos microrganismos. Esta relação também foi observada em trabalhos realizados por Shanableh e Ginige (2000) e por Chen, S. e Lin (2001).

A solubilização dos EPTs durante o processo de biolixiviação segundo o modelo logístico está representado na Figura 24. A diminuição dos valores de pH é concomitante com o aumento da solubilização dos EPTs. A relação entre a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos e o tempo de lixiviação pode ser representada pelo modelo logístico (Figura 24 A - B) – Equação 12.

As curvas e parâmetros do modelo Logístico puderam ser comparadas com o processo de biolixiviação, pois foi possível prever a eficiência de solubilização do metal, determinar o estágio em que o processo de biolixiviação se encontrava e o ponto final da solubilização (GAN et al., 2015). Os ajustes foram superiores a 99% (Tabela 19).

$$y = A_1 - A_2 / 1 + (X / X_0)^p + A_2 \quad (12)$$

Onde:

y= solubilização dos elementos potencialmente tóxicos

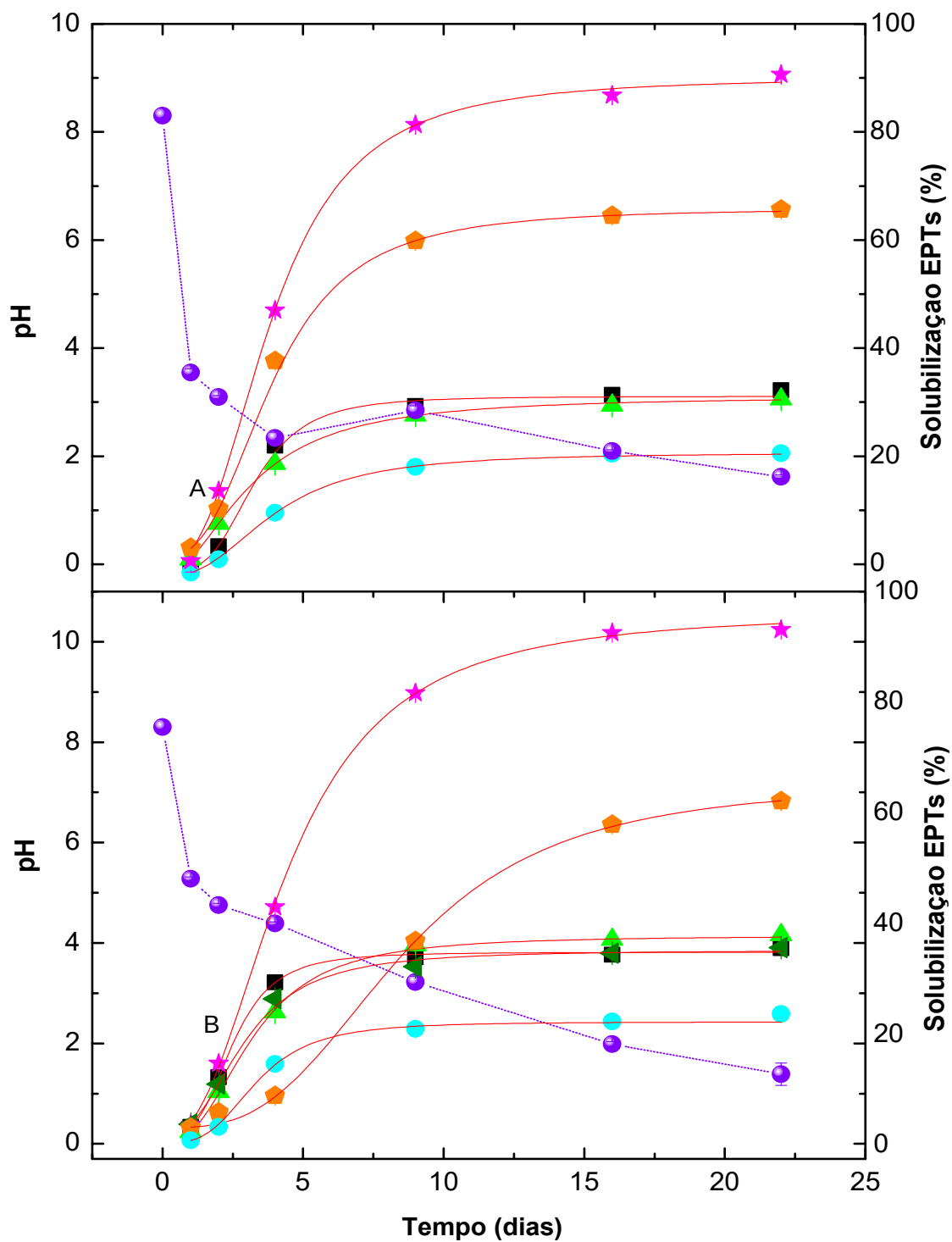
A1 = solubilização inicial

A2 = solubilização máxima

X = o tempo que leva para chegar à metade do valor máximo

p = constante

Figura 24 - Solubilização dos elementos potencialmente tóxicos durante os ensaios de biolixiviação utilizando *At. ferrooxidans* – LR (a) and *At. thiooxidans* – FG01 (b). Os pontos representam as solubilizações do Al (■), Cr (●), Cu (▲), Mn (★), Pb (◄) e Zn (◆). As linhas vermelhas representam o cálculo do modelo Logístico e a linha (---●---) os valores do pH.



Fonte: Autor

Tabela 19 - Ajuste da curva segundo modelo logístico

	A1	A2	t0	p value	R-squared
<i>At. ferroxidans</i>					
Al	1,16	32,71	3,25	3,60	0,99
Erro padrão	2,17	0,85	0,30	0,81	-
Cu	0,16	22,53	3,93	2,53	0,99
Erro padrão	0,21	0,34	0,07	0,15	-
Cr	0,14	32,71	3,09	1,98	0,9
Erro padrão	0,83	0,27	0,09	0,13	-
Mn	2,54	90,33	3,87	2,63	0,99
Erro padrão	3,42	1,36	0,16	0,22	-
Zn	1,44	65,87	3,91	2,74	0,99
Erro padrão	0,85	0,29	0,08	0,07	-
<i>At. thiooxidans</i>					
Al	1,93	34,84	2,51	3,46	0,99
Erro padrão	0,43	0,42	0,06	0,25	-
Cu	0,41	22,26	3,34	3,29	0,99
Erro padrão	0,75	0,82	0,20	0,79	-
Cr	0,48	37,82	3,17	2,54	0,99
Erro padrão	0,77	0,77	0,12	0,26	-
Mn	1,39	96,25	4,38	2,37	0,99
Erro padrão	1,79	1,20	0,14	0,15	-
Pb	1,62	35,18	2,8	2,54	0,99
Erro padrão	1,22	0,63	0,16	0,48	-
Zn	3,15	65,41	8,52	3,07	0,99
Erro padrão	0,33	1,66	0,10	0,49	

Fonte: Autor

5.7 Estudo do coeficiente de correlação entre a eficiência da solubilização com pH e Eh

Para verificar o coeficiente de correlação entre esses parâmetros foram utilizados os coeficientes de Pearson e Spearman (Tabela 20).

Nos ensaios inoculados com *At. ferrooxidans* LR - o coeficiente de correlação de Pearson entre a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos e os valores de pH foram superiores a 82%. A correlação de Spearman foi superior a 94%. Ambos os coeficientes utilizados mostraram uma forte correlação negativa, com exceção de Pb, que mostrou uma correlação moderada com o pH e Eh. A baixa correlação de Pb pode ser relacionado com a formação $PbSO_4$ observada nos resultados anteriores.

O Eh mostrou uma forte correlação positiva, superior a 80%, com a solubilização de elementos potencialmente tóxicos utilizando o coeficiente de Pearson, e acima de 94% com o coeficiente de correlação de Spearman.

Os ensaios inoculados com *At. thiooxidans* mostraram um coeficiente de correlação de Pearson que variou de uma correlação forte (83%) a uma correlação muito forte (94%). O coeficiente de Spearman encontrou um coeficiente de correlação negativamente perfeito (100%), ou seja, quando diminui uma variável (pH) aumenta sobre a outra variável (solubilização). A exceção foi o Zn, que apresentou uma correlação moderada (69%).

No que diz respeito ao Eh, os dois coeficientes mostraram que existe uma forte correlação entre as variáveis. Os estudos de Gan et al., (2015) mostraram que o coeficiente de correlação de Spearman e Pearson entre a solubilização de elementos potencialmente tóxicos e o pH era superior a 93%. No entanto, o coeficiente de correlação entre a solubilização de elementos potencialmente tóxicos e variação do Eh apresentou uma baixa correlação, sendo superior a 24%.

O grupo de dados de pH - Eh é de extrema importância para o processo de biolixiviação. A acidificação do lodo não é suficiente para a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos, sendo necessário um aumento simultâneo dos valores de Eh do meio para que o binômio pH-Eh desloque o equilíbrio para a forma de íons livres (HAYES et al., 1979).

Tabela 20 - Análise do coeficiente de correlação de Pearson e Spearman dos ensaios de biolixiviação

	Al	Cu	Cr	Mn	Pb	Zn
<i>At. ferroxidans</i>						
Correlação Pearson (pH)	-0,85	-0,82	-0,85	-0,83	-0,59	-0,83
Significância	0,03	0,04	0,03	0,04	0,22	0,04
Correlação Spearman (pH)	-0,94	-0,94	-0,94	-0,94	-0,43	-0,94
Significância	0	0	0	0	0,40	0
Correlação Pearson (Eh)	0,79	0,84	0,82	0,83	0,41	0,82
Significância	0,06	0,03	0,04	0,04	0,42	0,04
Correlação Spearman (Eh)	0,94	0,94	0,94	0,94	0,54	0,94
Significância	0	0	0	0	0,27	0
<i>At. thiooxidans</i>						
Correlação Pearson (pH)	-0,84	-0,91	-0,90	-0,95	-0,88	-0,69
Significância	0,04	0,01	0,01	0	0,02	0,09
Correlação Spearman (pH)	-1	-1	-1	-1	-1	-0,64
Significância	-	-	-	-	-	0,12
Correlação Pearson (Eh)	0,66	0,71	0,71	0,76	0,71	0,87
Significância	0,15	0,11	0,11	0,08	0,11	0,02
Correlação Spearman (Eh)	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
Significância	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07

Fonte: Autor

5.8 Avaliação dos nutrientes após o processo de biolixiviação

5.8.1 Extração de nutrientes (N, P)

A Tabela 21 apresenta a extração dos nutrientes após o ensaio de biolixiviação descrito no item 5.4 e discutidos nas Figura 23 e 24.

Tabela 21 – Extração dos nutrientes (N e P) durante o processo de biolixiviação em amostras inoculadas com *At. thiooxidans* - FG01

Nutriente	Antes	Após	Solubilização
	mg/kg	mg/kg	%
Nitrogênio	10	4	63
Fósforo	7	2	73

Fonte: Autor

Os baixos valores de pH e ambiente altamente oxidante são as condições presentes durante o processo de biolixiviação. Essas condições levam a oxidação da matéria orgânica e podem causar a dissolução dos nutrientes contidos no resíduo (CHEN, S. Y., PAN, 2010; PATHAK et al., 2014), o que acaba reduzindo o valor fertilizante da torta de filtro.

A degradação da matéria orgânica pode promover a liberação dos nutrientes no meio (KUMAR, NAGENDRAN, 2008). A liberação de nutrientes foi observada durante ensaios de biolixiviação realizados com lodo de águas residuais e lodo de esgoto (SHANABLEH, OMAR, 2003).

Os resíduos finais dos frascos inoculados apresentaram 63% de extração do N e 73% de P com um pH final de 1,38 da solução (Figura 18). Esses valores encontrados são comparáveis aos da literatura (KUMAR, NAGENDRAN, 2008; SHANABLEH, GINIGE, 1999).

Os dados da extração de nutrientes após o processo de biolixiviação por microrganismos oxidantes de enxofre mostraram queda na concentração de N e P no resíduo final da torta de filtro, em conjunto com os elementos potencialmente tóxicostraço de interesse.

As lixiviações indesejadas dos nutrientes requerem estratégias operacionais para minimizar essas perdas sem prejudicar o processo de remoção de elementos potencialmente tóxicos de interesse ou a carga orgânica do resíduo.

Capítulo 2

5.9 Caracterizações Mineralógicas dos resíduos finais da biolixiviação

5.9.1 Análise DRX

Os difratogramas de raios - X da amostra de TF original e os resíduos dos tratamentos foram analisados e uma tabela com as fases cristalinas presentes nas amostras está a seguir.

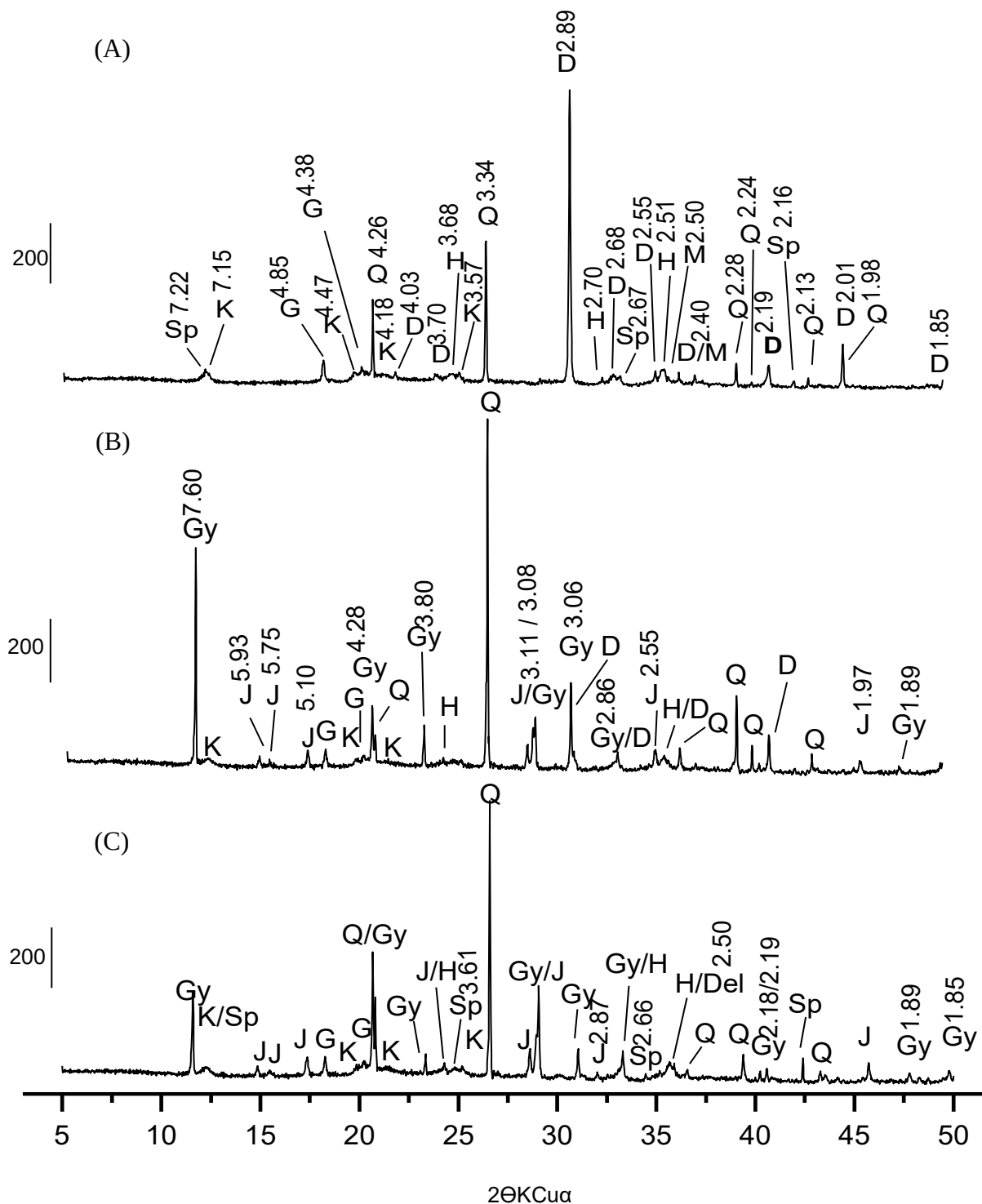
Tabela 22 – Minerais identificados através das fases cristalinas mostradas na Figura 25 e 26

PDF nº	Nome do composto	Fórmula química
73-2409	dolomita	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$
78-1996	caulinita	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
70-2038	gibbsita	$\text{Al}(\text{OH})_3$
83-539	quartzo	SiO_2
85-599	hematita	Fe_2O_3
75-449	magnetita	Fe_3O_4
81-1424	spangolita	$\text{Cu}_6\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}_{12})\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
70-982	gipsita	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
78-1889	enxofre elementar	S^0
81-1424	delafossita	CuFeO_2
	jarosita	$\text{X}^*(\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2 (\text{OH})_6)$

Sendo que X pode ser: K^+ , Na^+ , H_3O^+ ou NH_4^+

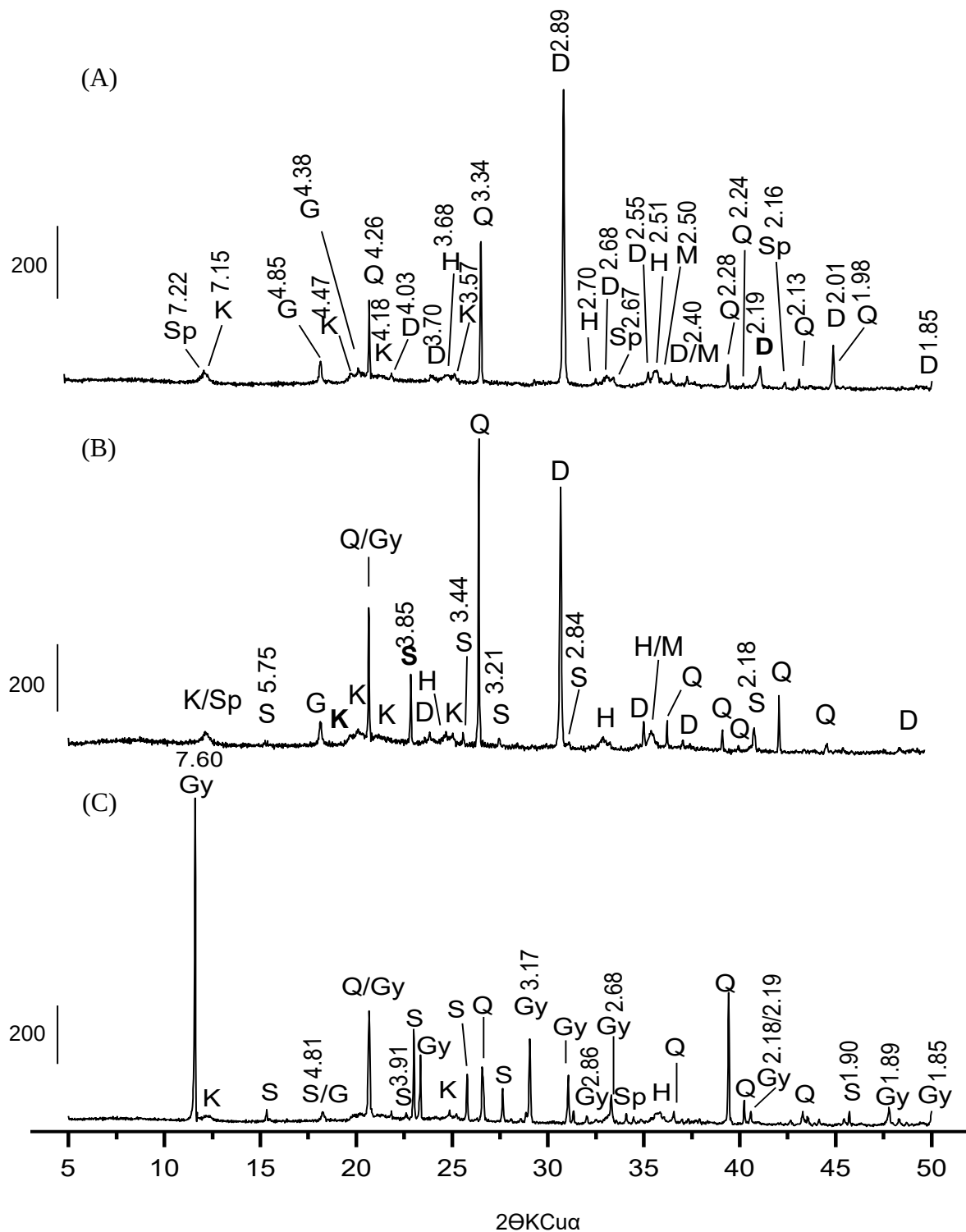
Fonte: Autor

Figura 25 – Difratogramas de raios X da amostra original de torta de filtro (A) e dos resíduos finais do ensaio de biolixiviação no controle abiótico + Fe^{2+} (B), e no frasco inoculado com *At. ferrooxidans* (C). Símbolos: K, caulinita; J, jarosita; D, dolomita; Q, quartzo; H, hematita; M, magnetita; G, gibbsita; Gy, gipsita; Sp, spangolita e Del, delafossita. A barra lateral indica a intensidade dos sinais e os números acima da identificação dos sinais, indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina.



Fonte: Autor

Figura 26 - Difratogramas de raios X da amostra original de torta de filtro (A) e dos resíduos finais do ensaio de biolixiviação sob vários tratamentos: controle abiótico + S^0 (B), *At. thiooxidans* (C). Símbolos: K, caulinita; S, enxofre; D, dolomita; Q, quartzo; H, hematita; M, magnetita; G, gibbsita; Gy, gipsita; Sp, spangolita e Del, delafossita. A barra lateral indica a intensidade dos sinais e os números acima da identificação dos sinais, indica a distância “d” (em Ångstrons) característica de cada fase cristalina



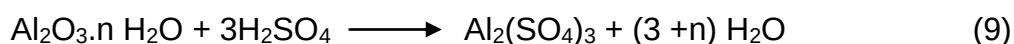
Fonte: Autor

Todas as amostras apresentaram bandas características de material amorfo.

O quartzo e a caulinita foram as principais fases minerais contidas na amostra de TF. O quartzo, por ser um mineral resistente tanto ao ataque químico, quanto ao ataque físico, mostrou-se inerte à lixiviação bacteriana. Ao passo que a caulinita, derivada principalmente pelas alterações de alumínio-silicato foi parcialmente consumida durante o processo de lixiviação em relação a amostra original (Figura 26A). Pode ser observado a formação de novas fases cristalinas nos resíduos, tanto inoculado quanto abiótico (Figuras 25B, 25C 26B e 26C), como jarosita, gipsita e traços de delafossita (Tabela 24).

Os picos de difração da dolomita estavam ausentes nos resíduos da lixiviação em todos os tratamentos inoculados. Nos resíduos dos frascos abióticos foi detectada a presença de dolomita, porém em intensidade inferior à amostra original. Esta alteração na intensidade do pico pode ter sido ocasionada pelo ajuste inicial no valor do pH, que provocou uma dissolução parcial deste mineral. Este ajuste do pH inicial das suspensões com H₂SO₄ e a manutenção das mesmas com baixos valores de pH resultaram na formação da gipsita (gesso) (CaSO₄.2H₂O) nos resíduos de todos os tratamentos

A gibbsita, presente na amostra original manteve-se presente em todas as outras amostras analisadas. Ela forma-se a partir da dissolução de qualquer alumino-silicato em ambientes de forte intemperização (SCHULZE, 1989). No entanto, houve uma redução da gibbsita nos resíduos provenientes dos ensaios com *At. thiooxidans*. Esta redução está associada com o menor valor de pH alcançada nessa condição. Conforme a Equação 9 descrita abaixo, o ácido sulfúrico reage com a gibbsita e forma sulfato de alumínio, um coagulante utilizado no tratamento de água (MARTINEZ et al., 2006).



A hematita, outra fase mineral presente na amostra original, é um óxido de ferro responsável pela coloração avermelhada dos solos. É formada a partir do seu precursor, a ferrihidrita, e ocorre preferencialmente em ambientes secos (COSTA, A. C. S., BIGHAM, 2009). As análises do DRX mostraram poucas variações nos picos da hematita, e isso se deve ao fato da hematita ser termodinamicamente mais

estável em condições oxidantes (GUIMARÃES, 2007). Traços da magnetita (Fe_3O_4) presentes na amostra original da torta de filtro não foram mais detectados nos resíduos após o tratamento com *At. thiooxidans* (Figura 26C). Mostrando, portanto, que a condição ácida foi a responsável pela dissolução deste mineral, como também observado por Kaksonen et al., (2016).

Nos tratamentos com adição de íons ferrosos foi observado a formação de jarositas como nova fase mineral. Como discutido anteriormente no Item 5.3, existem vários tipos de jarositas, podendo ser K^+ (potássio jarosita), Na^+ (natro jarosita), H_3O^+ (hidrônio jarosita), NH_4^+ (amônio jarosita) (BEVILAQUA et al., 2002; DAOUD, KARAMANEV, 2006).

No resíduo da amostra inoculada com *At. ferrooxidans* observou-se a formação de outra fase, delafossita (CuFeO_2), um tipo de ferrita também observada por Estrella et al., (2009) e Lanteigne et al., (2012).

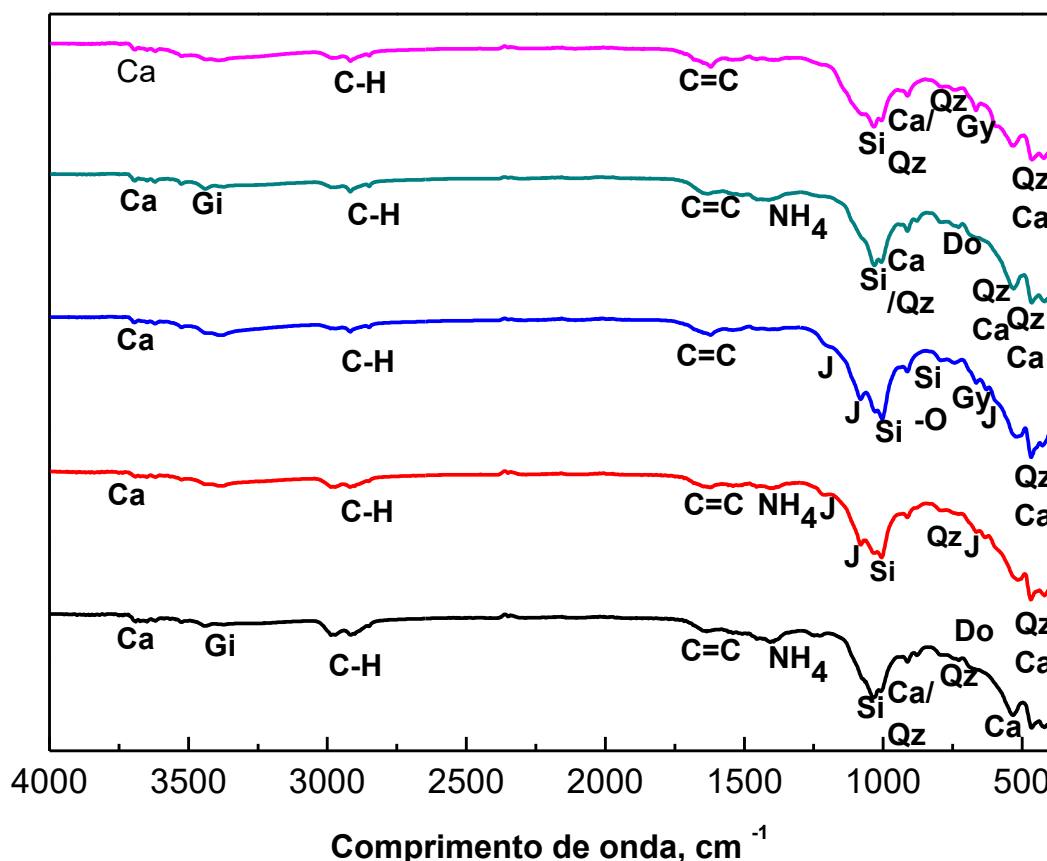
O enxofre detectado nos amostra provenientes do ensaio abiótico e inoculado com *At. thiooxidans* é proveniente da adição do mesmo como fonte de energia, e não podemos concluir que houve a formação dessa fase.

5.9.2 ATR – FTIR

Os espectros de ATR- FTIR das amostras de resíduos da TF são mostradas na Figura 27.

Observou-se que de forma geral todos os espectros de FTIR são muito semelhantes, apresentando pequenas mudanças nas intensidades de bandas relacionadas com minerais, e poucas correspondendo a compostos orgânicos da TF. Em todas as amostras foram observadas bandas de referentes à presença de matéria orgânica dos grupos C-H, sendo identificados na região de 2.922 e 2850 cm^{-1} . Também foi observada uma em 1650 cm^{-1} , sendo correspondente à ligação C=C (PALMIERI, 2012).

Figura 27 - Espectros de ATR-FTIR de amostras de TF antes e após o processo de biolixiviação



(—)resíduo original de TF (—) controle abiótico de *At. ferrooxidans* (—) resíduo *At. ferrooxidans* (—) controle abiótico de *At. thiooxidans* (—) resíduo *At. thiooxidans*

Fonte: Autor

Todas as amostras mostraram bandas em $3690 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$, 3650 , $3620 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$. Estas bandas estão relacionadas com a caulinita (Al-O-H), segundo Dick et al., (2008). Adicionalmente, bandas foram relacionadas a Si-O em 1033 , 1036 , 1009 , 915 , e uma banda em $796 \pm \text{cm}^{-1}$ relacionada ao quartzo e caulinita foram identificadas nos espectros, sendo também descrita por vários autores (DICK et al., 2008; MEJIA, et al., 2015; STRYRIAKOVA et al., 2012). As bandas a $3600\text{-}3800 \text{ cm}^{-1}$, 471 cm^{-1} e 536 cm^{-1} e 670 cm^{-1} foram detectadas e segundo Farmer, (1974) correspondem ao quartzo e caulinita e a ultima a gipsita.

A banda relacionada à gipsita foi detectada para todas as condições avaliadas, o que reforça os dados obtidos pela difração de raio - X.

Adicionalmente, uma outra banda detectada em torno de 3340 cm^{-1} refere-se a estrutura da gibbsita, segundo Beutelspacher e Van der Parel, (1976).

Para os resíduos oriundos dos ensaios com *At. ferroxidans*, bem como seu controle abiótico, observou-se um aumento gradual na intensidade das bandas a 1190 cm^{-1} , 1188 cm^{-1} , 1083 cm^{-1} e $629 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ (MEJIA et al., 2009), sendo estas relacionadas com a jarosita, corroborando com os dados da difração de raios X.

Segundo Ji, J. et al, 2009 os sinais de adsorção em 730 cm^{-1} observados na amostra original e em resíduos dos controles abióticos são característicos da dolomita.

Uma banda foi observada em 1408 cm^{-1} e pode ser relacionada ao íon NH_4^+ (CARDONA, MÁRQUEZ, 2009). Conforme os espectros obtidos, o íon amônio está presente em maior intensidade na amostra original do composto da torta de filtro, enquanto que nos ensaios com os tratamentos biológicos este sinal teve uma intensidade inferior. Deve-se ressaltar que o composto utilizado nos ensaios era formado pela associação entre a torta de filtro e a cama de frango.

Com o fim dos ensaios percebeu-se que o odor presente no início dos ensaios cessou, mostrando portando um decréscimo do nitrogênio na forma amoniacal. A queda do íon NH_4^+ foi causada pelas condições ácidas que envolvem os processos de biolixiviação. Esta observação na diminuição do odor do material utilizado vem ao encontro dos espectros obtidos pela análise de ATR – FTIR. Blais, Tyagi, Auclair, (1992) afirmaram que baixo valor do pH contribuíram para redução da matéria orgânica volátil no lodo.

A amônia é uma forma química do nitrogênio dominante nos esterco das aves. Se for aplicada na superfície de solos com pH básico e determinadas condições de umidade pode provocar a perda do nitrogênio na forma de amoníaco (gás amônia NH_3) pelo processo de volatilização. Esse gás é percebido pelo seu forte odor e pode representar danos ao meio ambiente e à saúde dos seres humanos (MARIM, 2011; GREENWOOD, EARNshaw, 2005; KIEHL, 2002).

Os espectros não mostraram grandes diferenças entre os resíduos biolixiviados. Foi observado um aumento na intensidade das bandas que

representam a jarosita, a gipsita, bem como o desaparecimento da banda da dolomita em resíduos inoculados.

Capítulo 3

5.10 Estudo fitotóxico dos resíduos

5.10.1 Peso seco das amostras

O cálculo do peso seco das amostras de torta de filtro antes e após da biolixiviação foram efetuados para determinar a massa das partículas presentes, isenta de qualquer umidade. O valor obtido é usado para calcular corretamente a quantidade de material necessário para obtenção do solubilizado (extrato aquoso). Os resultados obtidos para ambas as amostras podem ser observados na Tabela 23.

Pode-se observar que antes do processo de biolixiviação, a torta de filtro ainda reteve certa umidade (30%), sendo o composto formado por mais de 69% de material sólido (partículas sólidas).

Após os ensaios de biolixiviação, foi observado um aumento nos valores de peso seco para 96,8%.

Tabela 23 - Média e desvio padrão do peso seco da torta de filtro antes e após o processo de biolixiviação

Amostra	Peso seco (% m/m)
Antes da biolixiviação	69,60 (0,06)
Após a biolixiviação	96,80 (0,11)

Fonte: Autor

5.10.2 Capacidade de campo das amostras

A capacidade de campo das amostras antes de após a biolixiviação foram de 79% e 70%, respectivamente (Tabela 24).

Tabela 24 - Média e desvio padrão da capacidade de campo das amostras antes e após o processo de biolixiviação

Amostra	Capacidade de campo (%)
Antes da biolixiviação	79,0% (0,3)
Após a biolixiviação	70,0% (0,1)

Fonte: Autor

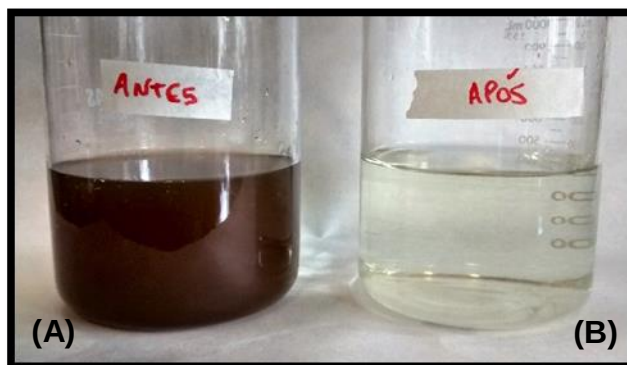
Esta alteração pode estar relacionada com a diminuição da matéria orgânica provocada pela biolixiviação. A matéria orgânica é fortemente higrófila em função das suas cargas negativas e da sua alta superfície, o que faz que o seu poder de retenção de água seja maior (MAIA, MORAES e MEDEIROS, 2005). Com isso, uma diminuição no teor da matéria orgânica acarretaria uma menor retenção de água pela TF e a sua consequente diminuição da capacidade de campo.

De acordo com Veihmeyer e Hendrickson (1931), capacidade de campo é o volume máximo de água que um solo bem drenado pode armazenar por longos períodos sem evapotranspiração, depois que o excesso de água tenha sido drenado.

5.10.3 Obtenção dos elutriatos

A partir da obtenção dos elutriatos, foi possível observar uma mudança significativa no padrão de coloração e transparência entre os solubilizados antes e após a biolixiviação (Figura 28) e após a filtração. O solubilizado da amostra após a biolixiviação mostrou uma transparência muito superior quando comparada com a amostra inicial após filtração.

Figura 28 - Elutriatos das amostras antes (A) e após a biolixiviação (B)



Fonte: Autor

A transparência da solução pode estar associada à formação do sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) durante o processo de biolixiviação, que promoveu a redução da cor e turbidez da suspensão. Esse sal foi detectado nas análises de difração de raio - X (Figura 25 e 26).

A recuperação do coagulante por via ácida começou a ser estudada no final do século retrasado. Em 1974 surgiu o processo de Fulton de recuperação de coagulante do lodo de estação de tratamento da água contendo alumínio. Este processo consiste na adição de ácido ao lodo mantendo um pH baixo (em torno de 2), de maneira a transformar os hidróxidos de alumínio presentes no lodo em espécies químicas solúveis de alumínio. (DE-JULIO et al., 2009, PIOTTO et al., 1999).

O extrato aquoso do resíduo obtido antes e após a biolixiviação foram analisados quanto aos teores de EPTs presentes e quanto aos valores do pH. Os resultados são mostrados nas Tabelas 25 e 26, respectivamente.

Tabela 25 – Concentração de EPTs no elutriato antes e após a biolixiviação (em mg L⁻¹)

	Al	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
Antes	57,42	3,65	11,67	97,37	7,78	0,16	63,5
Depois	24,74	0,31	0,13	5,86	0,28	nd	0,5

Fonte: Autor

Tabela 26 – Correção dos valores de pH no elutriato utilizados nos ensaios de fitotoxicidade

Tratam. pH	Controle -	Controle +	5%	10%	25%	50%	75%	100%
	% TF							
Antes	6,00	6,00	6,20	6,27	6,31	6,39	6,34	6,41
Depois	6,00	6,00	6,40	6,29	6,23	6,10	6,00	6,10

Fonte: Autor

É evidente que o processo de biolixiviação contribuiu para minimizar os teores de EPTs que estariam prontamente disponíveis ao meio ambiente (Tabela 26).

Os valores de pH foram ajustados próximos a neutralidade (Tabela 27). É importante o ajuste no valor do pH, pois o mesmo proporciona efeito indireto na solubilidade dos nutrientes. Em elevados valores do pH podem ocorrer formação de precipitados de alguns elementos, tais como: cálcio, fósforo, ferro e manganês, que deixam de estar disponíveis às plantas (GOMES et al., 2011).

O valor inicial do pH da torta de filtro (Tabela 17) mostra que o material é de natureza básica. Portanto, esse resíduo possui um elevado potencial lixiviante em condições ácidas, como, por exemplo, em solos degradados ou em regiões com elevada atividade industrial. Para limitar a transferência de parte dos elementos potencialmente tóxicos para a cadeia alimentar é necessário manter o pH em níveis relativamente elevados, entre 6 a 6,5 (SIMS et al., 1997).

5.11 Testes de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*

Durante os ensaios de germinação foi possível verificar visualmente alterações no padrão de germinação das sementes, de acordo com o solubilizado utilizado. A Figura 29 mostra a taxa de germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas aos extratos da TF em diferentes proporções. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos e o controle negativo (água deionizada).

O solubilizado das amostras antes do processo de biolixiviação induziu a uma leve inibição das sementes nas placas, principalmente nas primeiras horas, quando comparado com sementes onde foi utilizado o solubilizado do resíduo após a biolixiviação. Após 120 horas, na concentração de 5% foi observada uma germinação total de 75% nas sementes tratadas com o elutriado sem tratamento, e de 85% nas sementes germinadas com o elutriado obtido dos resíduos da biolixiviação. Ao passo que na maior concentração do elutriado (100%), a germinação foi de 56% e 67%, respectivamente.

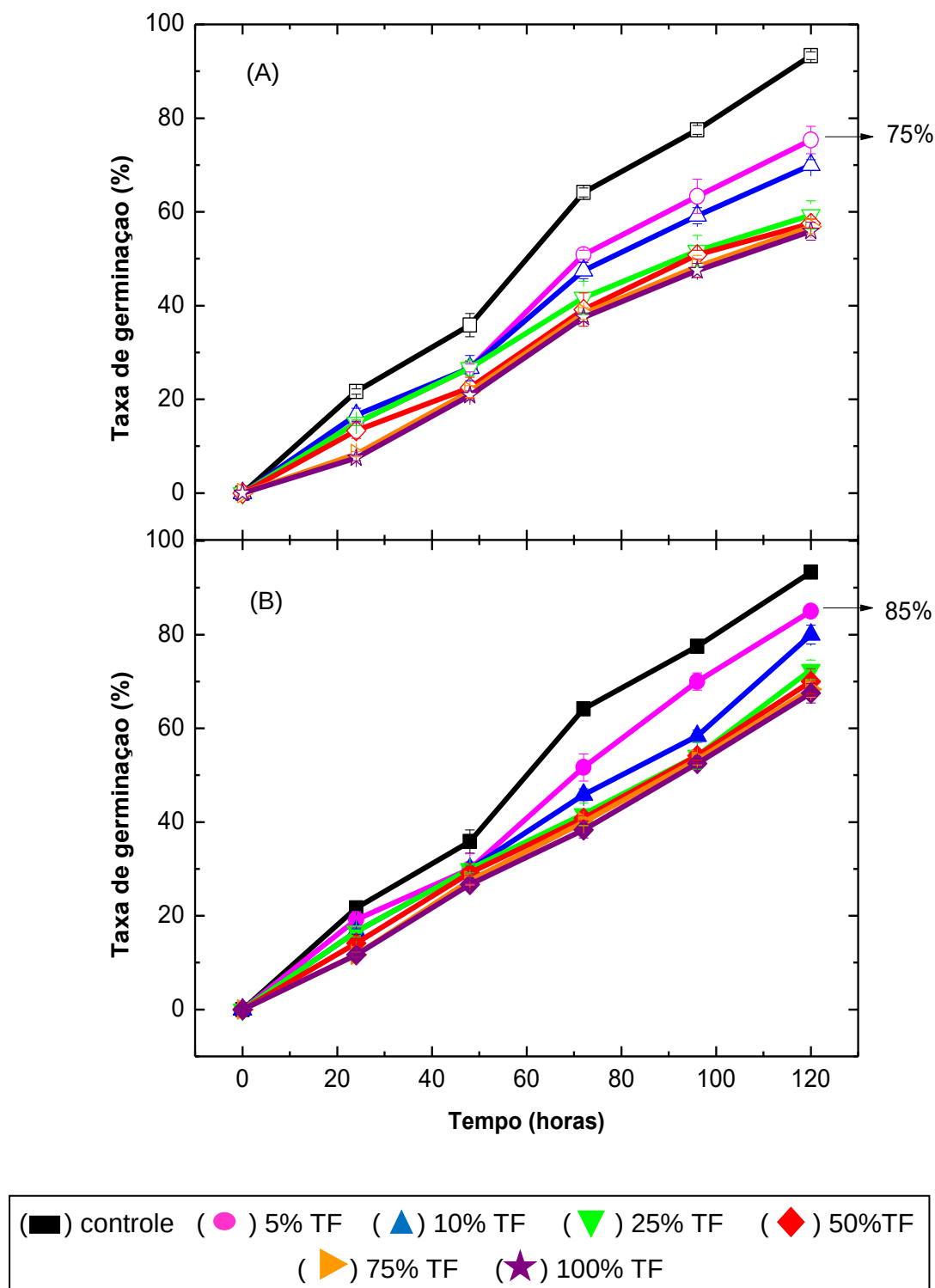
Ao se transpor essa condição encontrada nos ensaios para o meio ambiente, pode-se representar um crescimento retardado, e até mesmo a não germinação das espécies vegetais.

A diminuição na taxa de germinação das sementes pode ser explicada pela sensibilidade do processo germinativo aos aleloquímicos ou à toxidez dos compostos (AUMONDE et al., 2013; ZHANG, D. et al., 2010). Ácidos orgânicos, fenóis, alcalóides, aldeídos, cetonas, aminoácidos, bem como elevada concentração de matéria orgânica são conhecidos por possuírem um potencial efeito fitotóxico sobre a germinação de sementes (El FELLS et al., 2014).

Para Silva, E. A. et al., (2008), quanto mais rápido ocorrer a germinação das sementes e a imediata emergência das plântulas, menos tempo as mesmas ficarão sob condições adversas, passando pelos estádios iniciais de forma mais acelerada. As condições adversas citadas podem ser a redução da umidade próxima à semente necessária para a germinação.

Ao se analisar os valores finais da germinação (120 horas), observa-se uma tendência na diminuição da germinação conforme aumentam a concentração de TF.

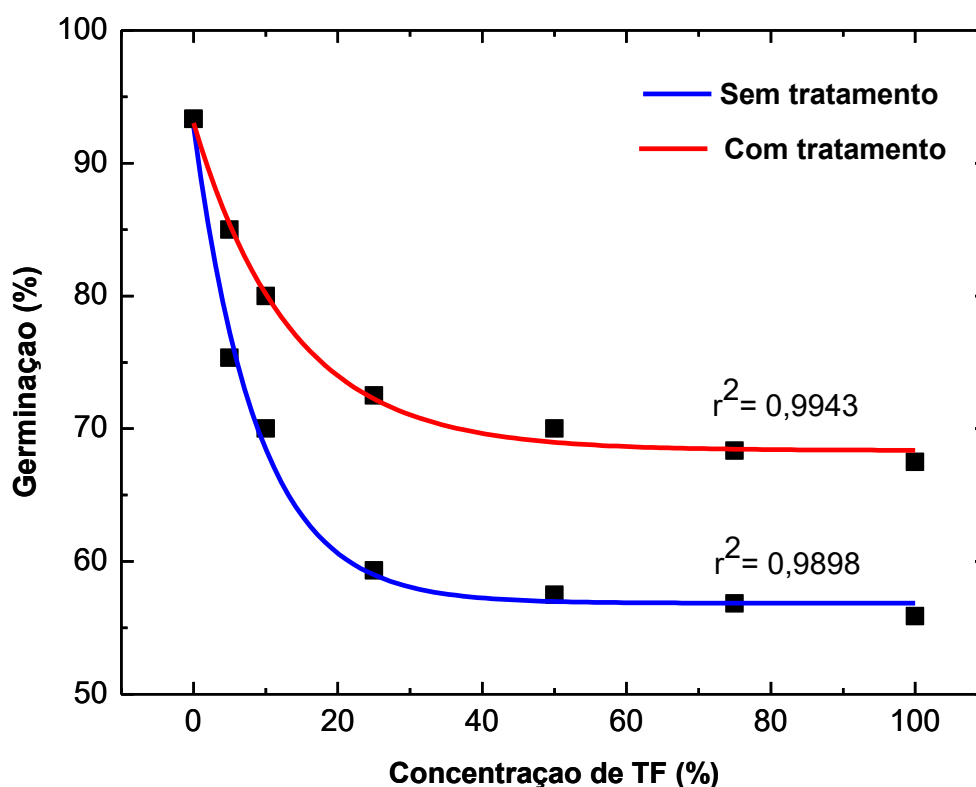
Figura 29 – Taxa de germinação das sementes de *Lactuca sativa* expostas ao elutriato de TF em diferentes concentrações. Em (A) antes do processo de biolixiviação. Simbolos abertos. Em (B) após o processo de biolixiviação. Simbolos fechados.



Fonte: Autor

A Figura 30 apresenta em ambas as condições uma relação exponencial entre a taxa de germinação e a porcentagem de TF, mostrando que o aumento “x” de TF ocasiona uma diminuição gradual da germinação das sementes teste. Resultados semelhantes foram obtido por Pinto, (2012) em bioensaios utilizando resíduos de lodo galvânico.

Figura 30 – Curva da taxa de germinação após 120 horas de exposição em função ao teor de TF.



Fonte: Autor

Com esse resultado, afirma-se que o experimento simula as condições normais de germinação em solo convencional, pois ao analisar a porcentagem de germinação para o controle negativo (0% TF), a germinação é de aproximadamente 94%, valor bem próximo aos 95% informado pelo fornecedor das sementes de *Lactuca sativa*.

5.11.1 Germinação relativa

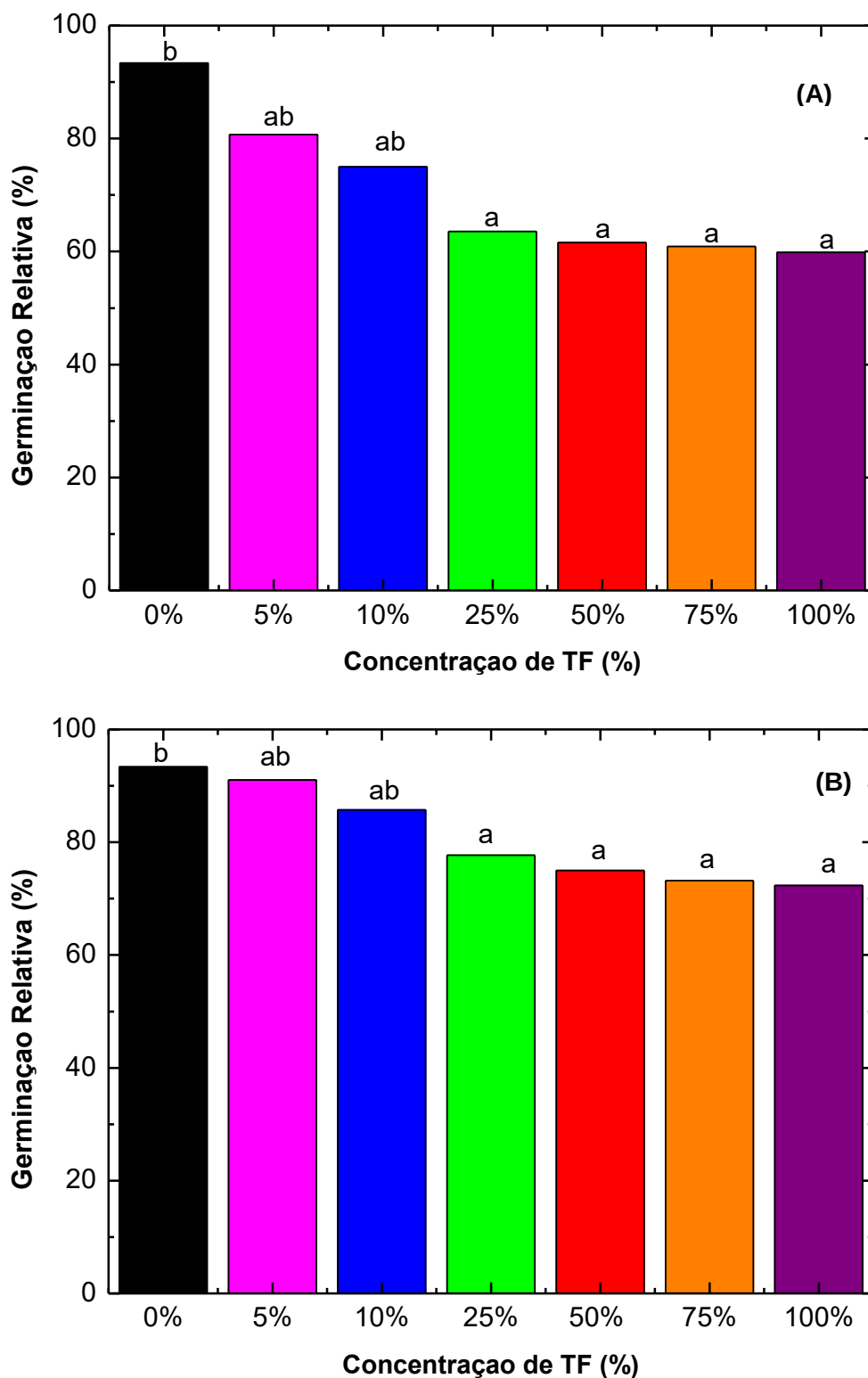
A medida da germinação relativa representa, em porcentagem, a relação entre a contagem das sementes germinadas na amostra e no controle negativo.

Com relação à germinação relativa (Figura 31), analisou-se que as concentrações de 5 e 10% foram favoráveis a germinação. A porcentagem da germinação relativa em ensaios utilizando elutriato das amostras após a biolixiviação mostraram as melhores respostas, com valores superiores ao resíduo contaminado.

Resultados obtidos por Charles et al., (2011) em bioensaios realizados com sementes de alfaces para avaliar a toxicidade de vários tipos de efluentes industriais observaram que as germinações das sementes diminuíram, e a toxicidade variou com o tipo de efluente e com a concentração de elementos potencialmente tóxicos como o ferro, cobre, alumínio, fluoreto e o boro presentes nos efluentes. No entanto, quando se utiliza soluções isoladas sintéticas dos elementos potencialmente tóxicos Fe, B e Al sob ensaios de toxicidade, estes apresentam pequeno efeito sobre a germinação da alface (*L. sativa*), com resultados superiores a 90% de germinação (CHARLES et al., 2011).

Os micronutrientes ferro, zinco, manganês e cobre são essenciais, mas podem ser tóxicos à germinação de sementes se presentes em elevadas concentrações (MUNZUROGLU, GECKIL, 2002).

Figura 31 – Germinação relativa para amostras com diferentes proporções de TF. Em (A) antes do processo de biolixiviação e (B) após o processo de biolixiviação



*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade $p < 0,05$.

5.11.2 Índice de velocidade de germinação (IVG)

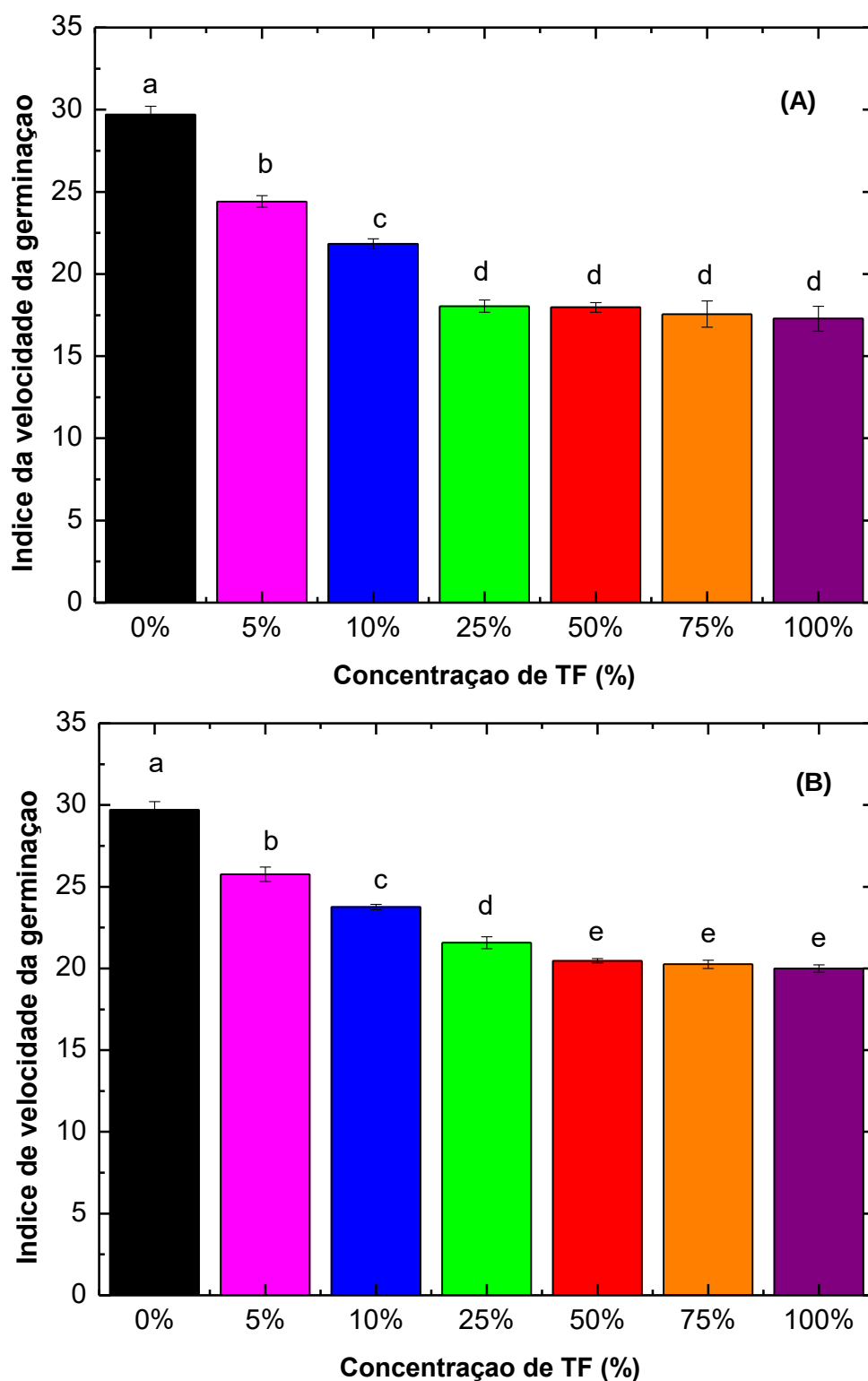
Os índices de velocidade de germinação são mostrados na Figura 32 (A – B). Ao analisarmos a Figura (A) percebe-se a formação de quatro grupos diferentes (a, b,c,d), e pela a Figura (B) foram formados cinco grupos distintos (a,b,c,d,e), sendo que as letras iguais não se diferem estatisticamente entre si.

Antes da biolixiviação as concentrações de TF de 25 a 100% não apresentaram diferenças entre elas. Após a biolixiviação apenas 50 a 100% não apresentaram diferenças.

Os valores de IVG seguiram a mesma tendência em ambas amostras. O aumento na porcentagem da TF provocou uma diminuição do IVG. Isso indica a capacidade que a TF tem em retardar a germinação, o crescimento e o desenvolvimento de raízes.

A fim de obter uma melhor compreensão desses resultados foi construída a Figura 33, que mostra os valores de logaritmo do IVG das amostras em função da concentração de TF.

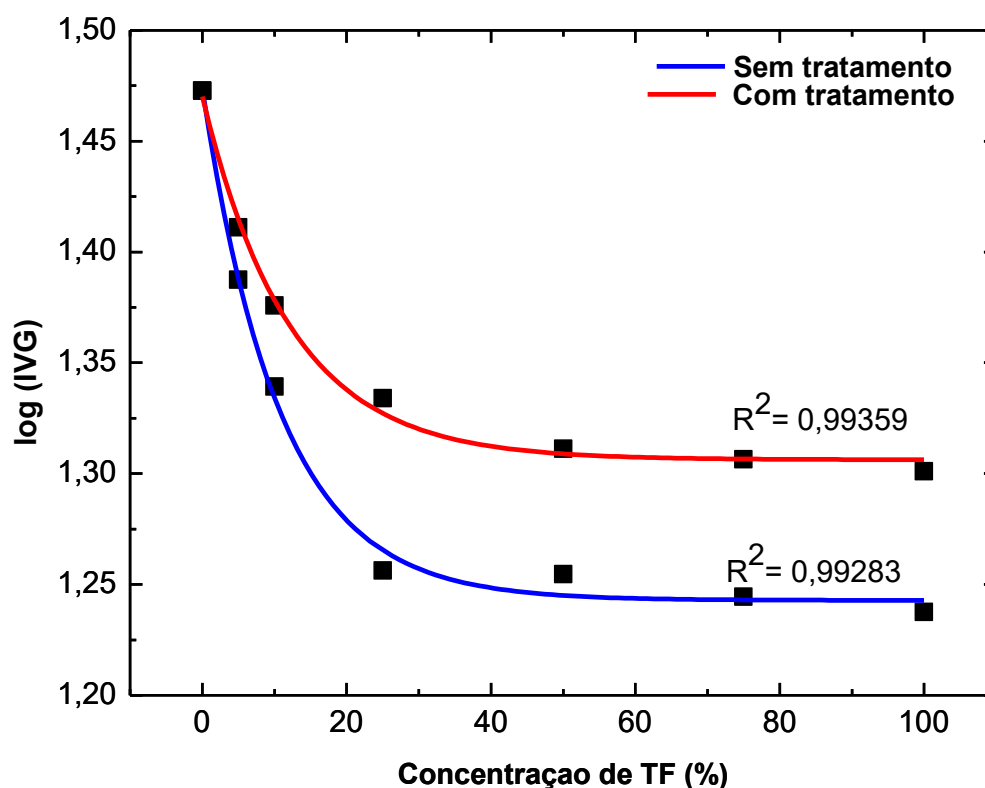
Figura 32 – Índice de velocidade da germinação para amostras com diferentes proporções de TF. Em (A) antes do processo de biolixiviação (B) após o processo de biolixiviação



*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade $p < 0,05$.

Fonte: Autor

Figura 33 - Logaritmo do índice de velocidade da germinação das sementes de alface para amostras com diferentes porcentagens de TF.



Fonte: Autor

Percebe-se que uma relação logarítmica entre o IVG e a porcentagem da TF mostrando que o aumento da porcentagem de TF ocasiona uma diminuição de 10^x na velocidade de germinação das sementes de alface. Pinto (2012) obteve resultados semelhantes ao encontrado nesta pesquisa.

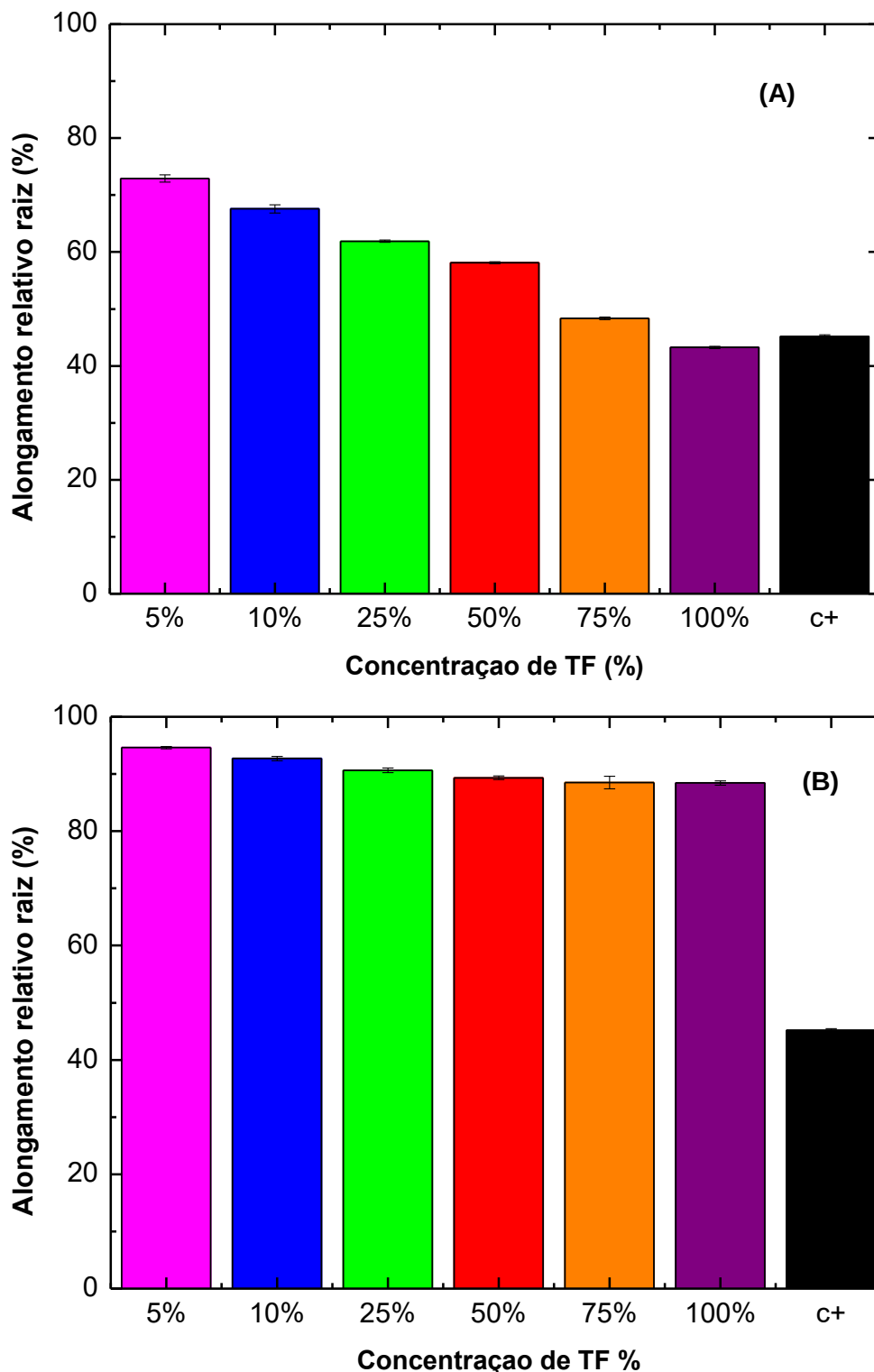
Com esse resultado verificou-se o quanto que a TF pode retardar, ou até mesmo impedir, a germinação das sementes, como observado nos ensaios com a TF sem o tratamento da biolixiviação.

5.11.3 Alongamento relativo das Radículas

As análises estatísticas dos dados obtidos por meio dos ensaios do desenvolvimento das radículas foram analisadas para avaliar se os elutriatos foram significativamente diferentes ou não quando comparados com o controle negativo,

indicando a toxicidade aguda da amostra por meio do teste t de Tukey com nível de significância de 0,05% (Figura 34).

Figura 34 – Alongamento relativo das radículas para amostras com diferentes proporções de TF. Em (A) antes do processo de biolixiviação (B) após o processo de biolixiviação.



Fonte: Autor

Foi observada uma queda progressiva no comprimento das radículas, chegando a uma redução superior a 50% nos ensaios realizados com o elutriato sem tratamento Figura 34A. O controle positivo no ensaio (c+ - solução de $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$ 0,04 g L⁻¹) pode ser considerado aceitável, pois as suas médias não mostraram diferenças estatísticas em relação a concentração de 100% do elutriato obtido da amostra sem tratamento.

De acordo com Pereira et al., (2013), essa redução pode afetar o crescimento de toda a plântula por restringir a absorção de água e nutrientes. Além disso, a raiz está relacionada com a ancoragem da planta, a produção hormonal, e com a interação que acontece entre plantas e bactérias do solo (YAO et al., 2002).

O elutriato (100%) e suas respectivas diluições dos resíduos sem tratamento foram significativamente diferentes do controle, apresentando potencial para causar efeito ao crescimento e desenvolvimento das radículas, indicando que elementos tóxicos presentes na TF foram lixiviados ao elutriato. Entretanto, o fato dos elutrios obtidos dos resíduos biolixiviados não causarem toxicidade aguda no organismo teste não indica necessariamente que os elementos metálicos e substâncias presentes não possam causar toxicidade crônica às sementes de alface, já que neste trabalho a toxicidade crônica não foi avaliada.

As barras dos resultados obtidos pelos tratamentos antes da biolixiviação mostram parâmetros importantes, como o limiar de inibição observável. Como citada, para tal concentração essa inibição se deu a partir da concentração de 5%.

O crescimento da raiz é o parâmetro com a maior sensibilidade na avaliação da toxicidade utilizando espécies vegetais (KLAUCK et al., 2015). Estudos realizados por Zaltauskaite e Cypaite, (2008) mostraram uma inibição no crescimento da raiz de alface de 80%, quando comparada com o controle. No entanto, após passar por um tratamento biológico, o lixiviado mostrou ser tóxico apenas para a espécie *Allium cepa* (cebola). As diferenças sobre as espécies testadas poderiam ser atribuídas a diferenças inerentes entre as espécies, tais como a permeabilidade dos tecidos, a absorção e o metabolismo diferencial (CUTILLO et al., 2003).

Além de EPTs, vários contaminantes com potencial fitotóxico podem ser encontrados, como, por exemplo, os ácidos orgânicos de cadeia curta, fenóis,

cetonas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), compostos organoclorados e outros poluentes orgânicos (GARCIA et al., 2009).

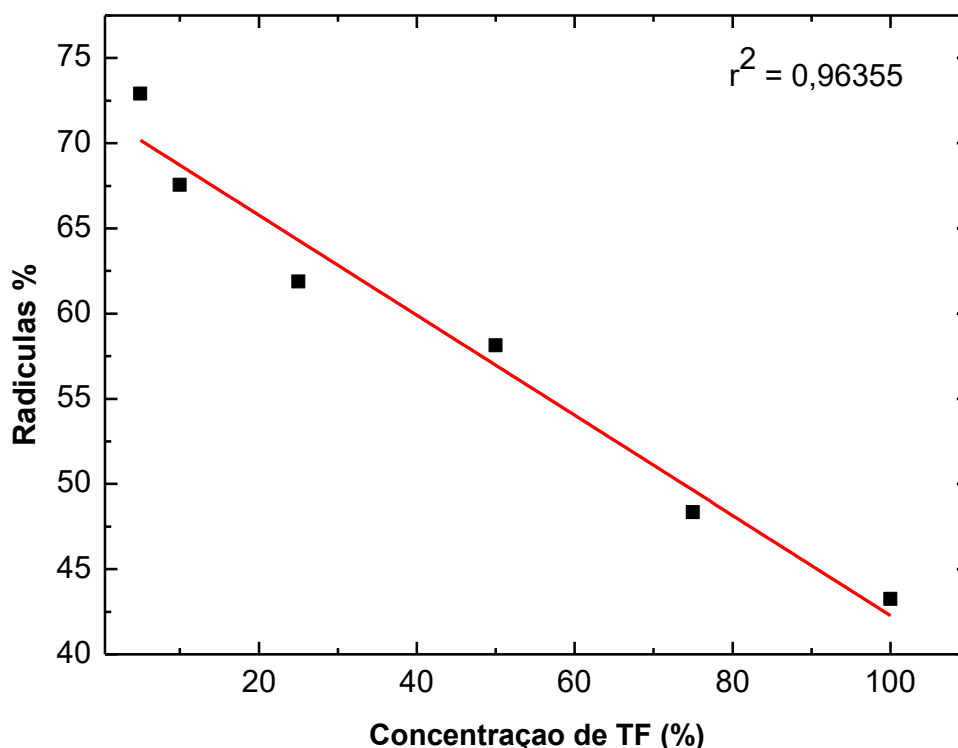
De acordo com Christofolletti et al., (2013), os elementos potencialmente tóxicos pesados são considerados potencialmente mutagênicos e estão intimamente associados com a poluição ambiental. Estudos mostraram que alterações nas estruturas dos cromossomos, no número, e distúrbios no aparelho mitótico podem ser induzidas pelos elementos potencialmente tóxicos (MINISSI, LOMB, 1997).

Elementos potencialmente tóxicos como alumínio, ferro, manganês e zinco possuem ação fitotóxica inibitória do crescimento radicular (KRANNER, COLVILLE, 2011), e podem ter sido os protagonistas na inibição do crescimento radicular, principalmente o alumínio. Este metal pode estar relacionado à redução da proliferação celular quando se aloca no simplasto (MATSUMOTO, 2000).

O chumbo é um elemento que não apresenta função no organismo das plantas, sendo o precursor de estresse em qualquer quantidade. Este metal também potencializa a diminuição do tamanho das radículas (El FELS et al., 2014; GALTER et al., 2013).

Outro parâmetro importante obtido a partir dos dados do crescimento radicular é o IC 50 (menor concentração necessária para obter 50% de inibição no crescimento radicular de *L. sativa*). A Figura 35 ilustra a regressão linear obtida com os valores médios em porcentagem do crescimento radicular para as amostras sem tratamento, pois as mesmas apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle negativo.

Figura 35 – Regressão linear obtida a partir do tratamento de sementes de alface com elutriato de TF com diferentes proporções de TF antes do processo de biolixiviação



Fonte: Autor

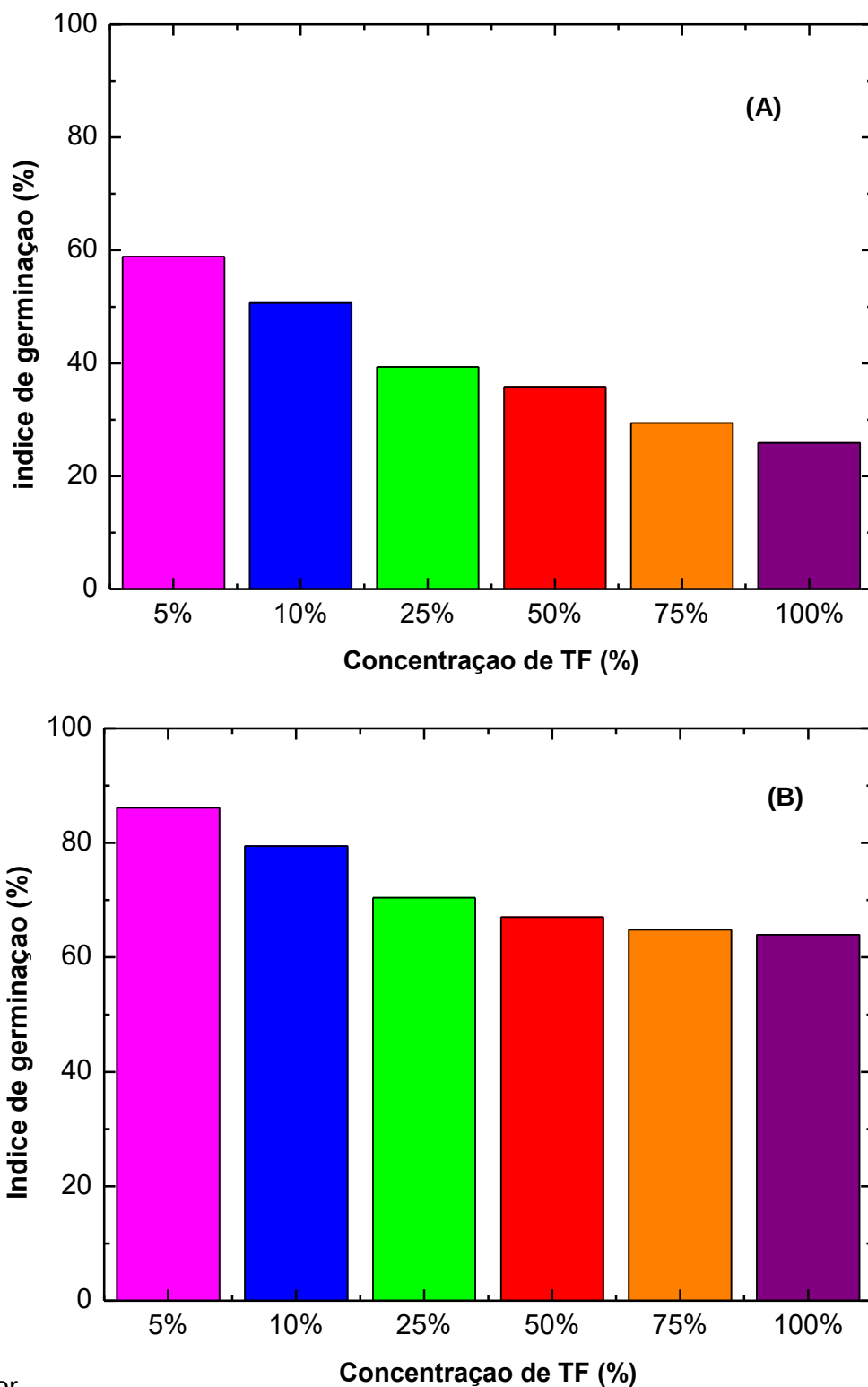
Com esses dados foi possível calcular o ponto onde a concentração do elutriato se relaciona com o tamanho das raízes do modelo vegetal 50% menor do que as raízes do tratamento controle. Através da equação de regressão ($y = -0,293x + 71,64$), calculada a partir das observações da Figura anterior, observa-se que a concentração IC_{50} é 73,71%. O r^2 da curva obtida foi igual a 0,96355, demonstrando que ela foi altamente representativa, e que os valores obtidos através de estimativas baseadas nela são consideravelmente confiáveis.

5.11.4 Índice de germinação

O índice de germinação foi calculado de acordo com a Equação descrita nos materiais e métodos no item 4.13.14, tomando-se como base os dados obtidos pela

germinação das sementes e pelo tamanho das radículas. Na Figura 36 são apresentados os valores obtidos do índice de germinação nas várias proporções.

Figura 36 – Índice de germinação para amostras com diferentes proporções de TF. Em (A) antes do processo de biolixiviação (B) após o processo de biolixiviação



Fonte: Autor

Na Figura 36 (A), observa-se um índice de germinação maior nas concentrações de 5 e 10%, que variaram de 59 e 51%, ao passo que as concentrações de 75 e 100% apresentaram índices de germinação bem inferiores, de 29 e 26% respectivamente.

Os índices de germinação para os ensaios realizados com o elutriado do resíduo biolixiviado foram superiores a 63%. Isso mostra que essas condições utilizadas apresentam menor potencial em provocar danos à germinação e ao desenvolvimento das radículas do organismo teste, quando comparada com o resíduo não biolixiviado. No entanto, apesar desses resultados serem superiores ao resíduo não tratado, dependendo do critério de classificação utilizado, os resultados podem mostrar um alerta de possível toxicidade (BADERNA et al., 2015).

Esses resultados podem ainda ser comparados com dois critérios de classificação: um proposto por Martignon, (2009) e um adaptado por Kapustka et al., (2006), conforme Tabela 27.

Tabela 27 – Classificação de toxicidade proposta por Martignon e Kapustka

Índice de Germinação (%)	Classificação
> 90	não tóxico
> 75 – 90	baixa toxicidade
51 a 75	toxicidade moderada
26 a 50	alta toxicidade
< 25	severa

A partir desses valores, podemos classificar os resultados na Figura 36 (A) como apresentando de alta toxicidade a toxicidade moderada, enquanto que nos resíduos biolixiviados (Figura 36 (B)) esta classificação varia de toxicidade moderada a baixa toxicidade.

Tem sido relatado que a alta concentração de lodo é supressiva para os hormônios do crescimento vegetal (auxina e giberelina) que são os responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento de plantas (MISRA e BEHERA, 1991). A redução do crescimento da planta na presença de altas concentrações de lodo de

destilaria pode ter ocorrido devido à entrada de elementos traço no protoplasma resultando na perda de metabólitos que são essenciais para continuação do crescimento e desenvolvimento das plantas (SUBRAMANI et al., 1997). Estes resultados estão em concordância com os resultados encontrados.

Ao observar o efeito do lodo de destilaria sobre a germinação e crescimento de pêras, Chandra, Yadav e Mohan (2008) relataram que houve uma indução do crescimento das plantas em concentrações ≤ 10 %. Isto pode ser devido à indução de hormônio de crescimento vegetal, enquanto que em concentrações mais elevadas de lodo uma diminuição no crescimento da planta foi observada.

Os resultados dos bioensaios são confiáveis, pois de acordo com Cruz et al., (2013) a condição estabelecida para a confiabilidade do teste de fitotoxicidade com hortaliças, de acordo com a U.S. EPA, é que a germinação deve ocorrer acima de 65% das sementes do controle negativo. Nos ensaios realizados com a alface foi obtido um valor de 94%, muito superior ao estipulado pela EPA.

A alface mostrou ser sensível aos contaminantes presentes na TF, e a sensibilidade da alface, em comparação com outras espécies, já foi observada em estudos anteriores (BADERNA et al., 2014; CHARLES et al., 2011; KLAUCK, et al., 2015). Os ensaios de fitotoxicidade com plantas vasculares são ferramentas versáteis para avaliar sucesso dos processos de biorremediação, permitindo a identificação do efeito dos poluentes (CHIOCHETTA et al., 2014; VANGRONSVELD et al. 2009).

Os testes de germinação e crescimento radicular utilizados neste estudo, ao serem empregados conjuntamente com análises químicas, se mostraram eficazes para demonstrar o potencial efeito tóxico de resíduos derivados de processo industrial.

Os resultados obtidos mostram que embora os elementos potencialmente tóxicos estejam presentes em concentrações inferiores àsquelas permitidas pela CETESB e CONAMA, esses elementos mostraram efeito fitotóxico em sementes de alface, demonstrando a importância de se utilizar tecnologias para minimizar os teores de elementos potencialmente tóxicos, bem como realizar bioensaios complementares para monitorar o efeito fitotóxico desses resíduos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados experimentais do presente estudo demonstraram que as concentrações de carbono orgânico presentes no composto de torta de filtro, bem como outras substâncias que não foram identificadas possuíram efeito significativo sob a inibição sob a atividade microbiana de *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*, sobretudo na safra de 2014.

A solubilização dos EPTs para ensaios inoculados com *At. ferrooxidans* - LR foi de 91% de Mn, 65% de Zn, 43% de Pb, 34% de Al, 32% de Cr, 22% de Cu, enquanto que nos frascos inoculados com *At. thiooxidans* - FG 01 a solubilização foi de 93% de Mn, 62% de Zn, Cr de 38%, 35% de Al, 35% de Pb e 24% de Cu. Apenas a solubilidade do Cr e Pb demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as culturas.

As análises de correlação revelaram que a solubilidade dos elementos potencialmente tóxicos foi correlacionada negativamente com a variação do pH, enquanto que com o Eh foi correlacionada positivamente. O modelo logístico aplicado no ajuste das curvas de solubilização dos elementos potencialmente tóxicos foram superiores a 99%, podendo, portanto, ser utilizados para prever o processo para a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos.

O estudo relacionado ao fracionamento dos elementos potencialmente tóxicos mostrou que a biolixiviação modificou as frações dos EPTs à frações mais estáveis, com exceção do Al e do Cu.

A análise por difratometria de raios X revelou a cristalinidade das amostras de torta de filtro e dos resíduos sólidos. Foram detectadas, principalmente, jarosita e gipsita como novas fases cristalinas, sendo que a primeira foi observada apenas nos tratamentos abióticos e nos inoculados com *At. ferrooxidans*, e a segunda foi detectada em todos os tratamentos abióticos e inoculados.

As análises dos espectros do ATR e FTIR foram condizentes com as análises obtidas pelos difratogramas de raios-X. Foram ainda capazes de demonstrar a queda na intensidade do sinal de ondas referentes ao íon NH_4^+ , um dos responsáveis pelo odor presente na amostra bruta.

A toxicidade do elutriado do composto da torta de filtro para com o organismo teste *Lactuca sativa*, “alface”, foi elevada para amostra sem o tratamento da

biolixiviação. O aumento da porcentagem da TF no elutriato promoveu um retardo na germinação das sementes, bem como no seu crescimento radicular.

O elutriato obtido da amostra biolixiviada não apresentou potencial para causar efeitos adversos à germinação das sementes e ao desenvolvimento das radículas. Isso indica que a solubilização dos elementos potencialmente tóxicos presentes na TF diminuiu a toxicidade do resíduo industrial.

Demonstramos neste estudo, que o processo de biolixiviação aplicado no composto de torta de filtro foi capaz de reduzir os elementos potencialmente tóxicos nele presentes. Assim, sugerimos que a biolixiviação empregando *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*, pode ser utilizado como uma ferramenta de biorremediação de resíduos sólidos contaminados com elementos potencialmente tóxicos para uma posterior aplicação ao solo.

REFERENCIAS

- ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA: cana-de-açúcar. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, v. 2, n. 2, ago. 2015. 33 p. Safra 2015/16. Segundo levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_13_15_58_44_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2015.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic toxicology test methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. Jr.; CAIRNS, J. Jr. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. 2nd ed. Washington, DC: Lewis Publishers, 2002. p. 32-58.
- ADORNA, J.; CRUSCIOL, C.; ROSSATO, O. Fertilization with filter cake and micronutrients in plant cane. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 649-657, 2013.
- AHONEN, L.; TUOVINEN, O. Alterations in surfaces and textures of minerals during the bacterial leaching of a complex sulfide ore. **Geomicrobiology Journal**, v. 10, n. 3/4, p. 207-217, 1992.
- AKINCI, G.; GUVEN, D. E. Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. **Desalination**, v. 268, p. 221-226, 2011.
- AKKAJIT, P.; DeSUTTER, T.; TONGCUMPOU, C. Effects of sugarcane waste-products on Cd and Zn fractionation and their uptake by sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental Science Process Impacts**, v. 16, n. 1, p. 88-93, 2014.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 339 p.
- ALLOWAY, B. J. Soil processes and the behavior of heavy metals. In: _____. **Heavy metals in soils**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1995. p. 11-37.
- ALLOWAY, B. J. **The origin of heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 239 p.
- ALONSO, E.; VILLAR, P.; SANTOS, A.; APARICIO, I. Fractionation of heavy metals in sludge from anaerobic wastewater stabilization ponds in southern Spain. **Waste Management**, v. 26, n. 11, p. 1270-1276, 2006.
- ANACLETO, L. R. **Avaliação ecotoxicogenética da torta de filtro, obtido do beneficiamento da cana-de-açúcar, antes e após processo de biodegradação**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 626-631, 2010.

ANDRADE, M. G.; LIMA, A. S. T.; MELO, W. J.; SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B. Elementos-traço em dois latossolos após aplicações anuais de lodo de esgoto por treze anos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 135-148, 2014.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 117-147.

ARTAXO, P.; CAMPOS, R. C.; FERNANDES, E. T.; MARTINS, J. V.; XIAO, Z.; LINDQVIST, O.; FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M. T.; MAENHAUT, W. Large scale mercury and trace element measurements in the Amazon basin. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 24, p. 4085-4096, 2000.

ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, p. 1-15, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10006**: procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004. 7 p.

AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; MORAES, D. M. Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface submetidas ao extrato de *Philodendron bipinnatifidum*. **Ciências Agrárias**, v. 46, p. 3181-3192, 2013.

BABEL, S.; DACERA, D. Heavy metal removal from contaminated sludge for land application: a review. **Waste Management**, v. 26, n. 9, p. 988-1004, 2006.

BADERNA, D. A.; COLOMBO, M. R.; CAMBRIA, F.; TEOLDI, F.; LODI, M.; DIOMEDE, L.; BENFENATI, E. Soil quality in the Lomellina area using in vitro models and ecotoxicological assays. **Environmental Research**, v. 133, p. 220-231, 2014.

BADERNA, D. A.; LOMAZZI, E.; PASSONI, A.; POGLIAGHI, A.; PETOUMENOU, M. I.; BAGNATI, R.; LODI, M.; VIARENGO, A.; SFORZINI, S.; BENFENATI, E.; FANELLI, R. Chemical characterization and ecotoxicity of three soil foaming agents used in mechanized tunneling. **Journal of Hazardous Materials**, v. 296, p. 210-220, 2015.

BAKER, A. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy-metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, n. 1/4, p. 643-654, 1981.

BANDERAS, A.; GUILIANI, N. Bioinformatic prediction of gene functions regulated by quorum sensing in the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16901-16916, 2013.

BARREIRA, R. P. R. **Estudo da biolixiviação de elementos potencialmente tóxicos de lodo de esgoto da ETE -Araraquara**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

BAYAT, B.; SARI, B. Bioleaching of dewatered metal plating sludge by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using shake flask and completely mixed batch reactor. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 44, p. 7504-7512, 2010.

BAYAT, B.; SARI, B. Comparative evaluation of microbial and chemical leaching processes for heavy metal removal from dewatered metal plating sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, n. 1/3, p. 763-769, 2010.

BEOLCHINI, F.; DELL'ANNO, A.; DE PROPRIIS, L.; UBALDINI, S. Auto- and heterotrophic acidophilic bacteria enhance the bioremediation efficiency of sediments contaminated by heavy metals. **Chemosphere**, v. 74, n. 10, p. 1321-1326, 2009.

BEOLCHINI F.; FONTI, V.; DELL'ANNO, A.; ROCCHETTI, L.; VEGLIÒ, F. Assessment of biotechnological strategies for the valorization of metal bearing wastes. **Waste Management**, v. 32, p. 949-956, 2012.

BERNAL, M.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; PAREDES, C.; ROIG, A. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 69, n. 3, p. 175-189, 1998.

BEVILAQUA, D. **Estudo da interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS₂) e bornita (Cu₅FeS₄)**. 2003. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 587-592, 2002.

BEVILAQUA, D.; SUEGAMA, P. H.; GARCIA JÚNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Electrochemical studies of sulphide minerals in the presence and absence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: SOBRAL, L. G.; OLIVEIRA, D. M.; SOUZA, C. E. G. (Ed.) **Biohydrometallurgy processes: a practical approach**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2011. Chap 8, p. 133-167.

BEUTELSPACHER, H.; VAN der MAREL, H. W. **Atlas of infrared spectroscopy of clay minerals and their admixtures**. Amsterdam: Elsevier, 1976. 396 p.

BISOGNIN, D. A.; VELASQUEZ, L.; WIDDERS, I. Cucumber seedling dependence on cotyledonary leaves for early growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 531-539, 2005.

BLAIS, J. F.; TYAGI, R. D.; AUCLAIR, J. C. Bioleaching of metals from sewage sludge by sulphur-oxidizing bacteria. **Journal of Environmental Engineering**, v. 118, n. 5, p. 690-707, 1992.

BLAISE, C.; FÉRARD, J. F. (Ed.). **Small-scale freshwater toxicity investigations**. Dordrecht: Springer Science, 2005. v. 1, 1551 p.

BOLAN, N.; ADRIANO, D.; NAIDU, R. Role of phosphorus in (im)mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 177, p. 1-44, 2003.

BOLAN, N.; NAIDU, R.; SYERS, J. K.; TILLMAN, R. W. Surface charge and solute interactions in soils. **Advances in Agronomy**, v. 67, p. 87-140, 1999.

BOLAN, N.; CHOPPALA, G.; KUNHIKRISHNAN, A.; PARK, J. H.; NAIDU, R. Microbial transformation of trace elements in soils in relation to bioavailability and remediation. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 225, p. 1-56, 2013.

BOLAN, N.; KUNHIKRISHNAN, A.; THANGARAJAN, R.; KUMPIENE, J.; PARK, J.; MAKINO, T.; KIRKHAM, M. B.; SCHECKEL, K. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils - to mobilize or to immobilize? **Journal of Hazardous Materials**, v. 266, p. 141-166, 2014.

BOON, M.; HEIJNEN, J. Chemical oxidation kinetics of pyrite in bioleaching processes. **Hydrometallurgy**, v. 48, n. 1, p. 27-41, 1998.

BOSECKER, K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3/4, p. 591-604, 2006.

BRADL, H. B. Adsorption of heavy metals ions on soil and soils constituents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 277, n. 1, p. 1-18, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 06 de outubro de 2011. Regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal e listas de substâncias permitidas para uso nos sistemas orgânicos de produção animal e vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 194, 6 out. 2011. Seção 1, p. 4-11.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 27, de 05 de junho de 2006. Dispõe sobre a importação ou comercialização, para produção, de fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 jun. 2006. Seção 1, p. 15-16.

BROEKAERT, J. A. C. Atomic absorption spectrometry. In: _____. **Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas**. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. p. 148-190.

BURAK, D. L.; ANDRADE, F. V.; FONTES, M. P. F.; FERNANDES, R. B. A. Elementos potencialmente tóxicos pesados em solo: aspectos gerais. In:

POLANCZYK, R. A.; CECÍLIO, R. A.; MATTA, F. P.; SOARES, T. C. B.; PEZZOPANE, J. E. M.; CAMPANHARO, W. A.; OLIVEIRA, M. C. C. (Org.). **Estudos avançados em produção vegetal**. Vitória: UFES, 2008. v. 2, p. 571-592.

CAMARGO, O. A.; BERTON, R. S.; GERALDI, R. N.; VALADARES, J. M. A. S. Alterações de características químicas de um latossolo roxo distrófico incubado com resíduos da indústria álcool-açucareira. **Bragantia**, v. 43, n. 1, p. 125-139, 1984.

CAMARGO, O. A.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B. van.; ABREU, C. A. de (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. Cap. 5, p. 89-124.

CAMILOTTI, F. MARQUES, M. O.; ANDRIOLI, I.; SILVA, A. R.; TASSO JUNIOR, L. C.; NOBILE, F. O. Acúmulo de elementos potencialmente tóxicos pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. 1, p. 284-293, 2007.

CANDELARIA, L. M.; CHANG, A. C.; AMRHEIN, C. Measuring cadmium ion activities in sludge-amended soil. **Soil Science**, v. 159, p. 162-175, 1997.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana de açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexanoetanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007, Natal. **Trabalhos...** Natal: Associação Brasileira de Química, Seção regional do Rio Grande do Norte, 2007. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/11/11-570-713.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

CARDONA, I. C.; MÁRQUEZ, M. A. Biodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 9, p. 1099-1106, 2009.

CARNIATO, J. G.; GERALDO, S. M. Avaliação da toxicidade de percolado de resíduos sólidos pós tratamento biológico e fotocatalítico. **Engenharia Ambiental**, v. 4, n. 2, p. 92-101, 2007.

CASTRO, F. J. **Avaliação ecotoxicológica dos percolados das colunas de cinzas de carvão e de solos com cinzas de carvão utilizando *Lactuca sativa* e *Daphnia similis* como organismo teste**. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CECÍLIO, A. A. **Disponibilização de elementos potencialmente tóxicos ambientalmente impactantes em solo tratado com composto de resíduos sólidos urbanos**. 2007. 152 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CERRI, C. C.; POLO, A.; ANDREAUX, F.; LOBO, M. C.; EDUARDO, B. P. Resíduos orgânicos da agroindústria canaveira: características físicas e químicas. **STAB: Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 6, p. 34-37, 1988.

CERRI, C. E. P.; OLIVEIRA, E. C. A. de; SARTORI, R. H.; GARCES, T. B. **Compostagem**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Quieroz, 2008. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Compostagem_000fhc8nfqz02wyiv80efhb2adn37yaw.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2015.

CHANDRA, R.; YADAV, S.; MOHAN, D. Effect of distillery sludge on seed germination and growth parameters of green gram (*Phaseolus mungo* L.). **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 1, p. 431-439, 2008.

CHANG, A.; WARNEKE, J. W.; PAGE, A. L. Accumulation of heavy-metals in sewage-sludge treated soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 13, n. 1, p. 87-91, 1984.

CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P. M.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRIN, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 2057-2064, 2011.

CHARTIER, M.; COUILLARD, D. Biological processes: the effects of initial pH, percentage inoculum and nutrient enrichment on the solubilization of sediment bound metals. **Water Air and Soil Pollution**, v. 96, n. 1/4, p. 249-267, 1997.

CHEN, S.; LIN, J. Effect of substrate concentration on bioleaching of metal-contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 82, n. 1, p. 77-89, 2001.

CHEN, S.; LIN, P. Optimization of operating parameters for the metal bioleaching process of contaminated soil. **Separation and Purification Technology**, v. 71, n. 2, p. 178-185, 2010.

CHEN, S. Y.; PAN, S. H. Simultaneous metal leaching and sludge digestion by thermophilic microorganisms: effect of solids content. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1/3, p. 340-347, 2010.

CHEN, Y.-X.; HUA, Y.- M.; ZHANG, S.- H.; TIAN, G.-M. Transformation of heavy metal forms during sewage sludge bioleaching. **Journal of Hazardous Materials**, v. 123, n. 1/3, p. 196-202, 2005.

CHIBUIKE, G. U.; OBIRA, S. C. Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2014, n. 1, 2014. doi:10.1155/2014/752708.

CHIOCHETTA, C. G.; GOETTEN, L. C.; ALMEIDA, S. M.; QUARANTA, G.; COTELLE, S.; RADEPTSKI, C. M. Leachates from solid wastes: chemical and eco(geno)toxicological differences between leachates obtained from fresh and stabilized industrial organic sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 2, p. 1090-1098, 2014.

CHOPIN, E.; MARIN, B.; MKOUNGAFOKO, R.; RIGAUX, A.; HOPGOOD, M.; DELANNOY, E.; CANCE, B.; LAURAIN, M. Factors affecting distribution and mobility of trace elements (Cu, Pb, Zn) in a perennial grapevine (*Vitis vinifera* L.) in the Champagne region of France. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1092-1098, 2008.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water Air and Soil Pollution**, v. 224, 2013. doi:10.1007/s11270-013-1523-3.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Decisão de Diretoria nº 045/2014/E/CI, de 20 de fevereiro de 2014. Dispõe sobre a aprovação dos valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo – 2014, em substituição aos valores orientadores de 2005 e dá outras providências. **Diário Oficial**, Poder Executivo, São Paulo, v. 124, n. 36, 21 fev. 2014. Seção 1, p. 53. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/solo/wp-content/uploads/sites/34/2013/12/VO-2014.pdf>>. Acesso em: 14 mar. de 2015.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 167, 29 ago. 2006. Seção 1, p. 141-146.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental das áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da República**, Brasília, DF, n. 249, 28 dez. 2009. p. 81-84.

CORDOBA, E. M.; MUNOZ, J. A.; BLAZQUEZ, M. L.; GONZALEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: general aspects. **Hydrometallurgy**, v. 93, n. 3/4, p. 81-87, 2008.

CORNELL UNIVERSITY. **Environmental inquiry**: authentic scientific research for high school students. 2009. Disponível em: <<http://ei.cornell.edu/index.html>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

COSTA, A. C. S.; BIGHAM, J. M. Óxidos de ferro. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo**: conceitos básicos. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v. 1, p. 505-573.

COSTA, C. H. **Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

COSTA, C. N. **Biodisponibilidade de elementos potencialmente tóxicos pesados em solos do Rio Grande do Sul**. 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A.; BOTTA, C. M. R.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, M. A. **Obtenção e avaliação de mutantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* quanto à capacidade de lixiviar minérios de cobre**. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CRUZ, J. M.; LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; TAMADA, I. S.; SILVA, N. M. M. G.; BIDOIA, E. D. Toxicity assessment of contaminated soil using seeds as bioindicators. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 1, p. 1-10, 2013.

CUTILLO, F.; D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; DI MARINO, C.; GOLINO, A.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seeds germination and plant growth. **Phytochemistry**, v. 64, n. 8, p. 1381-1387, 2003.

D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A. **Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado**. 2. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas : CEMPRE, 2000. 370 p.

DAOUD, J.; KARAMANEV, D. Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**, v. 19, n. 9, p. 960-967, 2006.

DE JULIO, M.; SANTOS, M. N. O.; OROSKI, F. I. Regeneração por via ácida do coagulante presente no lodo da estação de tratamento de água Pitangui operada pela Sanepar de Ponta Grossa/PR. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2009.

DENG, X.; CHAI, L.; YANG, Z.; TANG, C.; WANG, Y.; SHI, Y. Bioleaching of heavy metals from a contaminated soil using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233/234, p. 25-32, 2012.

DICK, D. P.; MARTINAZZO, R.; DALMOLIN, R. S. D.; JACQUES, A. V. Á.; MIELNICZUK, J.; ROSA, A. S. Impacto da queima nos atributos químicos e na composição química da matéria orgânica do solo e na vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 633-640, 2008.

DING, J.; GAO, J.; WU, X. L.; ZHANG, C. G.; WANG, D. Z.; QIU, G. Z. Jarosite-type precipitates mediated by YN22, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, and their influences on strain. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 17, n. 5, p. 1038-1044, 2007.

DONG, B.; LIU, X.; DAI, L.; DAI, X. Changes of heavy metal speciation during high-solid anaerobic digestion of sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 152-158, 2013.

EL FELS, L.; ZAMAMA, M.; EL ASLI, A.; HAFIDI, M. Assessment of biotransformation of organic matter during co-composting of sewage sludge-lignocellulosic waste by chemical, FTIR analyses, and phytotoxicity tests. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 128-137, Feb. 2014.

ENVIRONMENT CANADA. **Biological test method**: test for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil. Ottawa, 2005. EPS 1/RM/45. Disponível em: <<http://publications.gc.ca/site/eng/461234/publication.html>>. Acesso em: 13 out. 2014.

ESGALHADO, M.; CALDEIRA, A. T.; ROSEIRO, J. C.; EMERY, A. N. Sublethal acid stress and uncoupling effects on cell growth and product formation in *Xanthomonas campestris* cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 3, p. 181-192, 2002.

ESTRELLA, M.; BARRIO, L.; ZHOU, G.; WANG, X.; WANG, Q.; WEN, W.; HANSON, J. C.; FRENKEL, A. I.; RODRIGUEZ, A. J. In situ characterization of CuFe_2O_4 and $\text{Cu/Fe}_3\text{O}_4$ water-gas shift catalysts. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 32, p. 14411-14417, 2009.

FADIGAS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Proposição de valores de referência para a concentração natural de elementos potencialmente tóxicos pesados em solos brasileiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 699-705, 2006.

FANG, D.; ZHOU, L. Effect of sludge dissolved organic matter on oxidation of ferrous iron and sulfur by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Water Air and Soil Pollution**, v. 171, n. 1/4, p. 81-94, 2006.

FANG, D.; ZHANG, R.; ZHOU, L.; LI, J. A combination of bioleaching and bioprecipitation for deep removal of contaminating metals from dredged sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 1, p. 226-233, 2011.

FARMER, V. C. (Ed.). **The infrared spectra of minerals**. London: Mineralogical Society, 1974. (Mineralogical Society monograph, 4).

FENGER, J. Air pollution in the last 50 years - from local to global. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 13-22, 2009.

FERRÃO, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecno-lógica**, v. 5, n. 1, p. 63-85, 2001.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 235-244, 2005.

FRAVET, P. R. F.; SOARES, R. A. B.; LANA, R. M. Q.; LANA, A. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana de açúcar. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 618-624, 2010.

FUENTES, A.; LLORÉNS, M.; SÁEZ, J.; AGUILAR, M. I.; ORTUNO, J. F.; MESEGUER, V. F. Comparative study of six different sludges by sequential speciation of heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 517-525, 2008.

GADD, G. Metals and microorganisms - a problem of definition. **Fems Microbiology Letters**, v. 100, n. 1/3, p. 197-203, 1992.

GADD, G. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, n. 2/4, p. 109-119, 2004.

GADD, G.; GRIFFITHS, A. Microorganisms and heavy-metal toxicity. **Microbial Ecology**, v. 4, n. 4, p. 303-317, 1978.

GALBALLY, P.; RYAN, D.; FAGAN, C.; FINNAN, J.; GRANT, J.; McDONNELL, K. Biosolid and distillery effluent amendments to Irish short rotation coppiced willow plantations: impacts on groundwater quality and soil. **Agricultural Water Management**, v. 116, p. 193-203, 2013.

GALTER, I. N.; BARBOSA, R. M.; ARAGÃO, F. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Efeito do spl no crescimento radicular de *Lactuca sativa*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 1.; CONGRESSO NACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2.; SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 6., 2013, Recife. **Resumos expandidos...** Recife: Universidade Católica de Pernambuco, 2013. v. 2. Disponível em: <<http://www.unicap.br/simcbio/wp-content/uploads/2014/09/EFEITO-DO-SPL-NO-CRESCIMENTO-RADICULAR-DE-Lactuca-sativa.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

GAN, M.; ZHOU, S.; LI, M.; ZHU, J.; LIU, X.; CHAI, L. Bioleaching of multiple heavy metals from contaminated sediment by mesophile consortium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5807-5816, 2015.

GARCIA, J. C.; SIMIONATO, J. I.; ALMEIDA, V. C.; PALÁCIO, S. M.; ROSSI, F. L.; SCHNEIDER, M. V.; SOUZA, N. E. Evolutive follow up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO₂ and TiO₂/H₂O₂ systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1589-1597, 2009.

GARCIA JÚNIOR, O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 1991.

GARCIA JÚNIOR, O.; BEVILAQUA, D. Micro-organismos, minerais e elementos potencialmente tóxicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 3, p. 49 - 81.

GARCIA JÚNIOR, O.; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. In: LIMA, U. L. et al. (Coord.). **Processos fermentativos enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 22, p. 485- 512. (Biotecnologia industrial, v. 3).

GHANI, A. Toxic effects of heavy metals on plant growth and metal accumulation in maize (*Zea mays* L.). **Iranian Journal of Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 325-334, 2010.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **Plant Journal**, v. 13, n. 5, p. 591-602, 1998.

GLEYZES, C.; TELLIER, S.; ASTRUC, M. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6/7, p. 451-467, 2002.

GLÓRIA, N. A. Uso agrônômico de resíduos. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20., 1992, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargil, 1992. p. 195-212.

GOMES, L. S.; MARTINS, C. A. S.; NOGUEIRA, N. O.; LOPES, F. S.; XAVIER, T. M. T.; CARDOSO, L. C. M. Efeito de diferentes valores de pH da solução nutritiva no desenvolvimento de variedades de melão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, p. 73-78, 2011.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, E. A. **Chemistry of the elements**. 2nd ed. Oxford: Buttererworth-Heinemann, Elsevier, 1997. 1600 p.

GU, X.; WONG, J. Identification of inhibitory substances affecting bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 10, p. 2934-2939, 2004.

GUIMARÃES, I. A. **Utilização de óxidos de ferro naturais e sintéticos na degradação de compostos orgânicos**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GURGEL, M. N. A. **Tecnologia para o aproveitamento de resíduos de agroindústria sucroalcooleira como biofertilizantes organomineral granulado**. 2012. 130 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

HADLICH, G. M.; UCHA, J. M. Extração EDTA e fracionamento sequencial de cobre e de zinco em solos adubados com dejetos de suínos e fertilizantes minerais. **Cadernos de Geociências**, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2013.

HARTER, R.; NAIDU, R. An assessment of environmental and solution parameter impact on trace-metal sequestration by soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, n. 3, p. 597-612, 2001.

HEBERT, R. B. Jr. **Sulfide oxidation in mine waste deposits**: a review with emphasis on dysoxic weathering. Stockholm: MiMi, 1999. 51 p.

HODGSON, J. F. Chemistry of the micronutrient elements in soils. **Advances in Agronomy**, v. 15, p. 119-159, 1963.

HOLLER, F. J. et al. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 72 p.

HOOD, S. P. **Trace elements in soils**. London: Wiley, 2010. 618 p.

HSEU, Z.; SU, S. W.; LAI, H. Y.; GUO, H. Y.; CHEN, T. C.; CHEN, Z. S. Remediation techniques and heavy metal uptake by different rice varieties in metal-contaminated soils of Taiwan: new aspects for food safety regulation and sustainable agriculture. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 31-52, 2010.

HUANG, Q.; YU, Z.; PANG, Y. A.; WANG, Y.; CAI, Z. Coupling bioleaching and electrokinetics to remediate heavy metal contaminated soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 519-524, 2015.

INGERSOLL, C. G. Sediment tests. In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate, and risk assessment. Washington, DC: Taylor and Francis, 1995. p. 231-255.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cana de açúcar, café e laranja aumentam valor de safra em 2,9%**. 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11269-2:2012**: soil quality - determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: effects of chemicals on the emergence of higher plants. Geneve, 1995. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=22315>. Acesso em: 31 mar. 2016.

JENDIROBA, E. Questões ambientais no manejo da agroindústria canavieira. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. de S.; JENDIROBA, E.; NOBREGA, J. C. M. de (Org). **Atualização em produção de cana de açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. v. 1, cap. 2, p. 347-357.

JL, G. L.; LI, H. Y. Electrostatic adsorption of cations. In: YU, T. R. (Ed.). **Chemistry of variable charge soils**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 64-111.

JI, J.; GE, Y.; BALSAM, W.; DAMUTH, J. E.; CHEN, J. Rapid identification of dolomite using a fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR): a fast method for identifying Heinrich events in IODP Site U1308. **Marine Geology**, v. 258, n. 1/4, p. 60-68, 2009.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and interactions of acidophiles: key to understanding and optimizing microbial processes of ores and concentrates. **Transactions Nonferrous Metals Society of China**, v. 18, p. 1367-1373, 2008.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413 p.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer-Verlag, 2007. 550 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Soil constituents. In: _____. **Trace elements in soil and plants**. 3rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. Chap. 4, p. 49-64.

KAKSONEN, A. H.; SÄRKIJÄRVI, S.; PUHAKKA, J. A.; PEURANIEMI, E.; JUNNIKKALA, S.; TUOVINEN, O. H. Chemical and bacterial leaching of metals from a smelter slag in acid solutions. **Hydrometallurgy**, v. 159, p. 46-53, 2016.

KAPUSTKA, L. A.; ESKEW, D.; YOCUM, J. M. Plant toxicity testing to derive ecological screening levels for cobalt and nickel. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 865-874, 2006.

KEENER, H.; ELWELL, D.; MONNIN, M. Procedures and equations for sizing of structures and windrows for composting animal mortalities. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 16, n. 6, p. 681-692, 2000.

KHWAIRAKPAM, M.; BHARGAVA, R. Bioconversion of filter mud using vermicomposting employing two exotic and one local earthworm species. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5846-5852, 2009.

KIEHL, E. J. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade do composto. Piracicaba: Edmar José Kiehl, 1998. 172 p.

KIEHL, E. J. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade do composto. Piracicaba: Edmar José Kiehl, 2002. 171 p.

KIEHL, E. J. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade do composto. Piracicaba: Edmar José Kiehl, 2004. 173 p.

KIM, B.; McBRIDE, M. B. A test of sequential extractions for determining metal speciation in sewage sludge-amended soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, n. 2, p. 475-482, 2006.

KLAUCK, C. R.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of phytotoxicity of municipal landfill leachate before and after biological treatment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 57-62, 2015.

KO, M.; PARK, H. S.; KIM, K. W.; LEE, J. U. The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in arsenic bioleaching from soil. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 35, n. 6, p. 727-733, 2013.

KRANNER, I.; COLVILLE, L. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 93-105, 2011.

KUMAR, R. N.; NAGENDRAN, R. Changes in nutrient profile of soil subjected to bioleaching for removal of heavy metals using *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, p. 102-107, 2008.

KUMAR, R.; NAGENDRAN, R. Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1775-1781, 2007.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 37-56, 1987.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 1-16, 2011.

LAKE, D. L. Sludge disposal to land. In: LESTER, J. N. (Ed.). **Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 2, chap 5, p. 91-130.

LALLANA, M. C.; ELIZALDE, J. H.; BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L.): determinación de calidad de agua en represas para riego. **Revista FCA UNCuyo**, v. 40, n. 1, p. 29-38, 2008.

LANTEIGNE, S.; SCHINDLER, M.; McDONALD, A. M.; SKERIES, K.; ABDU, Y.; MANTHA, N. M.; MURAYAMA, M.; HAWTHORNE, F. C.; HOCELLA, M. F. Jr. Mineralogy and weathering of smelter derived spherical particles in soils: implications for the mobility of Ni and Cu in the surficial environment. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 223, p. 3619-3641, 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531 p.

LARCHEVÊQUE, M.; MONTÈS, N.; BALODY, V.; BALLINI, C. Can compost improve *Quercus pubescens* Willd establishment in a Mediterranean post fire shrubland. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3754-3764, 2008.

LEDUC, L.; FERRONI, G. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 103-119, 1994.

LEMELY, A. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 1, p. 44-56, 2004.

LI, W.; KHAN, M. A.; YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 45-50, 2005.

LIU, F.; ZHOU, J.; ZHOU, L.; SONG, X.; WANG, D. Improvement of sludge dewaterability and removal of sludge-borne metals by bioleaching at optimum pH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221, p. 170-177, 2012.

LIU, H.; LAN, Y.; CHENG, Y. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1953-1961, 2004.

LIU, Y.; ZHOU, M.; ZENG, G. M.; LI, X.; XU, W. H.; FAN, T. Effect of solids concentration on removal of heavy metals from mine tailings via bioleaching. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 1, p. 202-208, 2007.

LOGANATHAN, P.; HEDLEY, M. J.; GRACE, N. D. Pasture soils contaminated with fertilizer derived cadmium and fluoride: livestock effects. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 192, p. 29-66, 2008.

LOMBARDI, A.; GARCIA, O. An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludges. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 275-288, 1999.

LOMBARDI, A.; GARCIA, O. Biological leaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in an anaerobic sewage sludge effectuated by *Thiobacillus ferrooxidans* and its effect on metal partitioning. **Water Research**, v. 36, n. 13, p. 3193-3202, 2002.

LOMBARDI, A.; GARCIA, O.; MENEZES, W. The effects of bacterial leaching on metal partitioning in sewage sludge. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1013-1019, 2006.

LOPES, P. R. M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções surfactantes químicos e biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa***. 2014. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

LOVLEY, D.; PHILLIPS, E. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1536-1540, 1987.

LUNDGREN, D. G.; ANDERSON, K. J.; REMSEN, C. C.; MAHONEY, R. P. Culture, structure and physiology of the chemoautotroph *Ferrobacillus ferrooxidans*. Det's. industrial. **Microbiology**, v. 6, p. 250-259, 1964.

MACHADO, A. S.; MEXIAS, A. S.; VILELA, A. C. F.; OSÓRIO, E. Quantificação por DRX dos componentes carbonosos presentes no pó de balão do alto-forno. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 8, n. 4, p. 254-260, 2011.

MAGALHÃES, D. de P.; FERRÃO FILHO, A. da S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.

MAGALHÃES, V. F.; PFEIFFER, W. C. Arsenic concentration in sediments near a metallurgical plant (Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 52, p. 175-181, 1995.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAHIMAIRAJA, S.; BOLAN, N. S.; ADRIANO D. C.; ROBINSON, B. Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. **Advances in Agronomy**, v. 86, p. 1-82, 2005.

MAIA, C. E.; MORAIS, E. R. C.; MEDEIROS J. F. Capacidade de campo, ponto de murcha permanente e água disponível para as plantas em função de doses de vermicomposto. **Caatinga**, v. 18, n. 3, p. 195-199, 2005.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e elementos potencialmente tóxicos pesados: mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Petroquímica, 1994. 153 p.

MARCHI, G. et al. **Elementos-traço e sua relação com a qualidade e inocuidade de fertilizantes, corretivos agrícolas e resíduos orgânicos no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009. 45 p. (Documentos, 252).

MARTIGNON, G. **Linee guida per la misura della tossicità dei suoli**: test di fitotossicità per il suolo. Milano: CESI RICERCA, 2009. Rapport SER 09000808. Disponível em: <<http://doc.rse-web.it/doc/docsfoglia/09000808-1996/09000808-1996.2009.html>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

MARTINS, C. A. da S.; NOGUEIRA, N. O.; RIBEIRO, P. H.; RIGO, M. M.; CANDIDO, A. de O. A dinâmica dos elementos potencialmente tóxicos traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, p. 383-391, 2011.

MARÍN, O. L. Z. **Caracterização e avaliação do potencial fertilizante e poluente de distintas camas de frango submetidas a reusos sequenciais na zona da mata do estado de Minas Gerais**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MARTÍNEZ, J. P. S.; ESPINA J. A.; COQUE, M. P.; FERNÁNDEZ, G. P. B.; COSTALES, A. D. **Journal of the Minerals, Metals & Materials Society**, v. 58, n. 8, p. 58-62, 2006.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, v. 200, p. 1-46, 2000.

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios**. 2013. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60-69, 2015.

McLEAN, J. E.; BLEDSOE, B. E. Behavior of metals in soils. In: BOULDING, J. R. (Ed.). **EPA environmental assessment sourcebook**. Washington, DC: Ann Arbor Press, 1992. Chap. 3, p. 19-57.

McGRATH, S. P.; CUNLIFF, C. H. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Ni, Pb, Cr, Co, Mn from soils and sewage sludge. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 794-798, 1985.

McMURRY, J. Determinação de estruturas: espectrometria de massas e espectrometria da região do infravermelho. In: _____. **Química orgânica**. 6. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005. v. 1, cap. 12, p. 388-418.

MEJÍA, E. R.; OSPINA, J. D.; OSORNO, L.; MÁRQUEZ, M. A.; MORALES, L. Mineralogical characterization of chalcopyrite bioleaching. In: SALIH, I. S. (Ed.). **Fourier transform: signal processing and physical sciences**. Rijeka: InTech, 2015. Chap. 8. doi:10.5772/59489. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/fourier-transform-signal-processing-and-physical-sciences/mineralogical-characterization-of-chalcopyrite-bioleaching>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

MEJÍA, E. R.; OSPINA, J. D.; MÁRQUEZ, M. A.; MORALES, A. L. Oxidation of chalcopyrite (CuFeS_2) by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* like bacterium in shake flasks. **Advanced Materials Research**, v. 71, n. 73, p. 385-388. 2009.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; SILVA, F. C.; BOARETTO, A. E. Uso de resíduos sólidos urbanos na agricultura e impactos ambientais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997.

MENDES, A. M. S.; OLSZEWSKI, N.; SILVA, F. N.; MENDES, R. L.; BRITO, L. T. L. Impactos ambientais causados pelo uso de fertilizantes agrícolas. In: BRITO, L. T. L.; MELO, R. F.; GIONGO, V. (Ed.). **Impactos ambientais causados pela agricultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Cap. 3, p. 55-99.

MENDES, D. S. G. **Avaliação ecotoxicológica de solos contaminados por ibuprofeno**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Politécnico do Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2011.

MERLINO, L. C. S. **Bário, cádmio, cromo e chumbo em plantas de milho e em latossolo que recebeu lodo de esgoto por onze anos consecutivos**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

MEUER, J. E. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Gênese, 2000. 174 p.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v. 393, p. 17-21, 1997.

MISHRA, D.; RHEE, Y. Microbial leaching of metals from solid industrial wastes. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 2014.

MISRA, R.; BEHERA, P. The effect of paper-industry effluent on growth, pigments, carbohydrates and proteins of rice seedlings. **Environmental Pollution**, v. 72, n. 2, p. 159-167, 1991.

MONTEIRO FILHO, A. F.; PEREIRA, G. L.; AZEVEDO, M. R. Q. A.; FERNANDES, J. D.; AZEVEDO, C. A. V. Cultivo hidropônico de cultivares de alface em soluções nutritivas organominerais otimizadas com a ferramenta Solver. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 417-424, 2014.

MOREIRA, R.; SOUSA, J. P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8382-8389, 2008.

MUNZUROGLU, O.; GECKIL, H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 203-213, 2002.

NAIDU, R.; JORJANI, E.; HANI, H.; MANAFI, Z.; RIAHI, A. Ionic strength and pH effects on the adsorption of cadmium and the surface charge of soils. **European Journal of Soil Science**, v. 45, n. 4, p. 419-429, 1994.

NARDIN, R. R. **Torta de filtro aplicada em argissolo e seus efeitos agrônômicos em duas variedades de cana de açúcar colhidas em duas épocas**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo, Campinas, 2007.

NASCIMENTO, W. M. **Germinação de sementes de alface**. Brasília, DF: Embrapa. Brasília, 2002. (Circular técnica, 29).

NAZARI, B.; JORJANI, E.; HANI, H.; MANAFI, Z.; RIAHI, A. Formation of jarosite and its effect on important ions for *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 24, n. 4, p. 1152-1160, 2014.

NEMATI, M.; HARRISON, S. T. L.; HANSFORD, G. S.; WEBB, C. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, n. 3, p. 171-190, 1998.

NOGUEIRA, M. A. F. S.; GARCIA, M. S. Gestão dos resíduos do setor industrial sucroenergético: estudo de caso de uma usina no município de Rio Brilhante, Mato Grosso do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 17, p. 3275-3283, 2013.

NOGUEIROL, R. C. **Extração sequencial e especiação de elementos potencialmente tóxicos pesados, e emissão de gases do efeito estufa em neossolo litólico contaminado com resíduo rico em Ba, Cu, Ni, Pb e ZN**. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

NORRIS, P.; BURTON, N.; FOULIS, N. Acidophiles in bioreactor mineral processing. **Extremophiles**, v. 4, n. 2, p. 71-76, 2000.

NOVO, M. T. M.; SILVA, A. C.; MORETO, R.; CABRAL, P. C. P.; COSTACURTA, A.; GARCIA JUNIOR, O.; OTTOBONI, L. M. M. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 187-195, 2000.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. **Nature**, v. 333, p. 134-139, 1988.

NUNES JUNIOR, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. **Revista Idea News**, v. 8, n. 92, p. 23-30, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; SERVULO, E. F. C.; SOBRAL, L. G. C.; PEIXOTO, G. H. C. **Biolixiviação**: utilização de micro-organismos na extração de elementos potencialmente tóxicos. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. 40 p. (Série tecnologia ambiental, n. 53). Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/series_sta/sta-53.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2014.

OLIVEIRA, T. S. **Elementos potencialmente tóxicos pesados como indicadores de materias de origem de solos**. 1996. 128 f. Tese (Doutorado em Solos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT.

Terrestrial plant test: 208: seedling emergence and seedling growth test. 2003. 19 p. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

PALMIERI, M. J. **Análise comparativa do efeito citotóxico do spent pot linear (SPL) e seus principais componentes fracionais em células vegetais e humanas.** 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PANT, D.; JOSHI, D.; UPRETI, M. K.; KOTNAL, R. K. Chemical and biological extraction of metals present in E waste: a hybrid technology. **Waste Management**, v. 32, p. 979-990, 2012.

PARK, H. S.; LEE, J. U.; AHN, J. W. The effects of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on the leaching of cobalt and strontium adsorbed onto soil particles. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 29, p. 303-312, 2007.

PATHAK, A.; DASTIDAR, M.; SREEKRISHNAN, T. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing microorganisms using ammonium ferrous sulfate and ferrous sulfate as energy sources: a comparative study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1/3, p. 273-278, 2009.

PATHAK, A.; KOTHARI, R.; DASTIDAR, M. G.; SREEKRISHNAN, T. R.; KIM, D. J. Comparison of bioleaching of heavy metals from municipal sludge using indigenous sulfur and iron-oxidizing microorganisms: continuous stirred tank reactor studies. **Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 49, n. 1, p. 93-100, 2014.

PEIJNENBURG, W. Fate of contaminants in soil. In: DOELMAN, P.; PEIJSACKERS, H. J. P. (Ed.). **Vital soil, function, values and properties.** Amsterdam: Elsevier, 2004. Chap. 9, p. 245-280.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals matrix issues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 63-77, 2003.

PENG, J.; SONG, Y. H.; YUAN, P.; CUI, X. Y. The remediation of heavy metals contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2/3, p. 633-640, 2009.

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial da alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 7, p. 36-43, 2013.

PEREIRA, S. I. A. **Efeitos da toxicidade por elementos potencialmente tóxicos pesados em *Rhizobium leguminosarum* bv.** 2010. 248 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

PEREIRA NETO, J. T. **Manual de compostagem**: processo de baixo custo. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

PICHER, S.; DROGUI, P.; GUAY, R.; BLAIS, J. F. Wastewater sludge and pig manure used as culture media for bioleaching of metal sulphides. **Hydrometallurgy**, v. 65, n. 2/3, p. 177-186, 2002.

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 313 p.

PIGATIN, L. B. F. **Compostos orgânicos de origem agroindustrial e urbana aplicada à produção vegetal e fertilidade do solo**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

PIGNATTI, S.; BIANCO, P. M.; FANELLI, G.; PAGLIA, S.; PIETROSANTI, S.; TESCAROLLO, P. **Le piante come indicatori ambientali**: manuale tecnico-scientifico. Roma: Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, 2011. 116 p. Disponível em: <https://www.sinanet.apat.it/it/strumenti/catalogo/search_template?document_type=6&b_start:int=3&testo=&metadata_lookup=2>. Acesso em: 20 de fev. 2016.

PINTO, F. M. **Resíduo galvânico**: caracterização, tratamento e recuperação e reuso. 2012. 131 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PIOTTO, Z.; BARRETO, E.; GONÇALVES, R. F.; BRANDÃO, J. Recuperação de coagulantes de lodos de estações de tratamento de águas. In: REALI, M. A. P. (Coord.). **Noções gerais do tratamento e disposição final do lodo de estação de tratamento de água**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 203-224.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, p. 289-296, 2005.

PRADO, R. de M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/581984.

QUEVAUVILLER, P. H.; RAURET, G.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F.; RUBIO, R.; URE, A.; MUNTAU, H. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. **The Science of the Total Environment**, v. 205, p. 223-234, 1997.

RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1991. 343 p.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com elementos potencialmente tóxicos pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1289-303, 2000.

RAMIREZ, W.; DOMENE, X.; ORTIZ, O.; ALCANIZ, J. M. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7168-7175, 2008.

RAMOS, L.; HERNANDEZ, L. M.; GONZALEZ, M. J. Sequential fractionation of copper lead, cadmium and zinc in soils from or near Doñana National Park. **Journal of Environmental Quality**, v. 23, p. 50-57, 1994.

RAURET, G.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F.; SAHUQUILLO, A.; BARAHONA, E.; LACHICA, M.; URE, A. M.; DAVIDSON, C. M.; GOMEZ, A.; LUCK, D.; BACON, J.; YLI- HALLA, M.; MUNTAU, H.; QUEVAUVILLER, P. H. Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 2, p. 228-233, 1999.

RAWLINGS, D. E. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 51, p. 267-275, 1981.

READ, S.; MARZORATI, M.; GUIMARÃES, B. C. N.; BOON, N. Microbial resources management revisited successful parameters and new concepts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, p. 861-871, 2011.

REBHUN, M.; MANKA, J. Classification of organics in secondary effluents. **Environmental Science & Technology**, v. 5, n. 7, p. 606-609, 1971.

RIEUWERTS, J.; THORNTON, I.; FARAGO, M.; ASHMORE, M. Quantifying the influence of soil properties on the solubility of metals by predictive modelling of secondary data. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 10, n. 3, p. 83-94, 1998.

RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; PAZIN, M.; MASELLI, B. S.; BEIJO, L. A.; KUMMROW, F. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1099-1108, 2013.

RODRIGUES, M. S.; SILVA, F. C.; BARREIRA, L. P.; KOVACS, A. Compostagem: reciclagem de resíduos sólidos orgânicos. In: SPADOTTO, C. A.; RIBEIRO, W. C.(Ed.). **Gestão de resíduos na agricultura e agroindústria**. Botucatu: FEPAF, 2006. p. 63-94.

ROOS, P. H.; TSCHIRBS, S.; PFEIFER, F.; WELGE, P.; HACKC, A.; WILHELM, M.; BOLT, H. M. Risk potentials for humans of original and remediated PAH-contaminated soils: application of biomarkers of effect. **Toxicology**, v. 205, p. 181-194, 2004.

ROSS, S. M. Retention transformation and mobility of toxicity metals in soil plant systems. In: _____. **Toxic metals in soil plant systems**. Chichester: Jonh Wiley, 1994. p. 63-152.

ROSSETTO, R.; SPIRONELLO, A.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Calagem para a cana de açúcar e sua interação com a adubação potássica. **Bragantia**, v. 63, p. 105-119, 2004.

RUSSO, M. A. T. **Tratamento de resíduos de sólidos**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2003. Disponível em: <http://www1.ci.uc.pt/mhidro/edicoes_antigas/Tratamentos_Residuos_Solidos.pdf>. Acesso em: 10 jan. de 2016.

SANDERS, J.; McGRATH, S.; ADAMS, T. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, n. 10, p. 961-968, 1986.

SANTANA, C. T. C.; SANTI, A.; DALLACORT, R.; SANTOS, M. L.; MENEZES, C. B. Desempenho de cultivares de alface americana em resposta a diferentes doses de torta de filtro. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 22-99, 2012.

SANTIAGO, A. D.; IVO, W. M. P. de M.; BARBOSA, G. V. de S.; ROSSETO, R. Impulsionando a produção e a produtividade da cana de açúcar no Brasil. In: ALBURQUERQUE, A. S.; SILVA, A. G. da (Ed.). **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 1, cap. 1, p. 673-716.

SANTOS, D. H.; TIRITAN, S. C.; FOLONI, J. S. S.; FABRIS, L. B. Produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 40, p. 454-461, 2010.

SANTOS, O.; MENDONÇA, A. G.; SANTOS, J. C.; SILVA, A. P.; COSTA, S. S.; OLIVEIRA, L. C.; CARMO, J. B.; BOTERO, W. G. The use of sugar and alcohol industry waste in the adsorption of potentially toxic metals. **Environmental Technology**, v. 37, n. 2, p. 279-291, 2016.

SCHINNER, F.; BURGSTALLER, W. Extraction of zinc from industrial waste by *Penicillium* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1153-1156, 1989.

SCHIPPERS, A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: DONATI, E. R.; SAND, W. (Ed.). **Microbial processing of metal sulfides**. Dordrecht: Springer, 2007. Chap. 1, p. 3-33.

SCHMIDT, R. O.; MEURER, E. J.; TORNQUIST, C. G.; BIASSUSI, M.; BIANCHIN, L. Elementos-traço em fertilizantes orgânicos utilizados em áreas de produção oléícola. **Caderno de Agroecologia**, v. 8, n. 2, p. 1-5, 2013.

SCHULZE, D. G. An introduction to soil mineralogy. In: DIXON, J. B.; WEED, S. B. (Ed.). **Minerals in soil environments**. 2nd ed. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p. 1-34.

SENESIL, G.; BALDASSARRE, G.; SENESI, N.; RADINA, B. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. **Chemosphere**, v. 39, n. 2, p. 343-377, 1999.

SHANABLEH, A.; GINGE, P. Acid bioleaching of heavy metals from Sewage Sludge. **Journal of Materials Cycles and Waste Management**, v. 2, p. 43-50, 2000.

SHANABLEH, A.; GINIGE, P. Impact of metal bioleaching on the nutrient value of biological nutrient removal biosolids. **Water Science Technology**, v. 39, p. 175-181, 1999.

SHANABLEH, A.; OMAR, M. Bioacidification and leaching of metals, nitrogen and phosphorus from soil and sludge mixture. **Soils and Sediment Contamination: an International Journal**, v. 12, p. 565-589, 2003.

SHI, C.; ZHU, N.; SHANG, R.; KANG, N.; WU, P. Simultaneous heavy metals removal and municipal sewage sludge dewaterability improvement in bioleaching processes by various inoculums. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1719-1728, 2015.

SHIOWATANA, J.; TANTIDANAI, N.; NOOKABKAEW, S.; NACAPRICHA, D. A flow system for the determination of metal speciation in soil by sequential extraction. **Environment International**, v. 26, n. 5/6, p. 381-387, 2001.

SILVA, A. J. N.; CABEDA, M. S. V.; CARVALHO, F. G.; LIMA, J. F. W. F. Alterações físicas e químicas de um Argissolo amarelo sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 76-83, 2006.

SILVA, C. A. Uso de resíduos orgânicos na agricultura. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008a. p. 597-621.

SILVA, E. A. da.; MENDONÇA, V.; TOSTA, M. da S.; OLIVEIRA, A. C. de; REIS, L. L. dos; BARDIVIESSO, D. M. Germinação da semente e produção de mudas de cultivares de alface em diferentes substratos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 245-254, 2008b.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES, 7th, 2009, Reno.

Proceedings... Nevada: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. 4 p.

SILVA, G. A. **Avaliação das tecnologias de disposição de vinhaça de cana-de-açúcar quanto ao seu aspecto de desenvolvimento ambiental e econômico.** 2012. 208 f. (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SILVA, J. V. H. da; BITTAR, A. P.; SERRA, J. C. V.; ZUKOWISKI JUNIOR, J. C. Diagnóstico do reaproveitamento de resíduos com potencial energético no município de Palmas-TO. **Engenharia Ambiental**, v. 8, p. 226-233, 2011.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 108-114, 2007.

SILVEIRA, M. L. A. **Extração sequencial e especiação iônica de zinco, cobre e cádmio em latossolos tratados com bio sólido.** 2002. 166 f. Dissertação (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVERMAN, M.; LUNDGREN, D. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: an improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of Bacteriology**, v. 77, n. 5, p. 642-647, 1959.

SIMS, J. T.; CUNNINGHAM, S. D.; SUMNER, M. E. Assessing soil quality for environmental purposes: roles and challenges for soil scientists. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, p. 20-25, 1997.

SINGH, R.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v. 28, n. 2, p. 347-358, 2008.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidade aguda com semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). In: CASTILLO MORALES, G. (Ed.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2004. p. 63-72.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Compostos de carbono representativos: grupos funcionais, forças intermoleculares e espectroscopia de infravermelho (IV). In: _____. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. v. 1, cap. 2, p. 43-75.

SOUSA, A.; PEREIRA, R.; ANTUNES, S. C.; CACHADA, A.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C.; GONÇALVES, F. Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 661-670, 2008.

SOUZA, R. A. **Elementos potencialmente tóxicos pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em solos após dois anos de aplicação de composto de lixo e lodo de esgoto**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2003. 352 p.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. Oxford: Oxford University Press, 1989. 276 p.

SPOSITO, G. The future of an illusion - ion activities in soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 48, n. 3, p. 531-536, 1984.

SPOSITO, G.; LUND, L.; CHANG, A. Trace-metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage-sludge: fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid-phases. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, n. 2, p. 260-264, 1982.

STOHS, S.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

STOVER, R. C.; SOMMERS, L. E.; SILVIERA, D. J. Evaluation of metals in wastewater sludge. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, p. 2165-2175, 1976.

STYRIAKOVÁ, I.; MOCKOVČIAKOVÁ, A.; ŠTYRIAK, I.; KRAUS, I.; UHLÍK, P.; MADEJOVÁ, J.; OROLÍNOVÁ, Z. Bioleaching of clays and iron oxide coatings from quartz sands. **Applied Clay Science**, v. 61, p. 1-7, 2012.

SUBRAMANI, A.; SARAVANAN, S.; TAMIZHINIYAN, P.; LAKSHMANACHARY, A. S. Influence of heavy metals on germination and early seedling growth of *Vigna mungo* L. **Pollution Resources**, v. 16, p. 29-31, 1997.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace-metals. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 844-851, 1979.

TORRES, N. H.; SARTORI, S. B.; AMÉRICO, J. H. P.; FERREIRA, L. F. R. Indústria sucroalcooleira: gestão de subprodutos. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 10, p. 225-236, 2012.

TSADILAS, C.; MITSIOS, I.; GOLIA, E. Influence of biosolids application on some soil physical properties. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 36, n. 4/6, p. 709-716, 2005.

TSAI, L.; YU, K. C.; CHEN, S. F.; KUNG, P. Y.; CHANG, C. Y.; LIN, C. H. Partitioning variation of heavy metals in contaminated river sediment via bioleaching: effect of sulfur added to total solids ratio. **Water Research**, v. 37, n. 19, p. 4623-4630, 2003.

TUOVINEN, O.; KELLY, D. Studies on growth of thiobacillus-ferrooxidans: use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with c-14-fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives Fur Mikrobiologie**, v. 88, n. 4, p. 285-298, 1973.

TUOVINEN, O.; NIEMELA, S.; GYLLENBE, H. G. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 37, n. 4, p. 489-496, 1971.

TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A.; TSUSHUJA, H. M. Nitrogen requirements of ironoxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, p. 954-958, 1979.

TUTTLE, J.; DUGAN, P. Inhibition of growth, iron, and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 719-730, 1976.

TYAGI, R. D.; COUILLARD D. Bacterial leaching of metals from sludge. In: CHEREMISINOFF, P. E. (Ed.) **Encyclopedia of environmental control technology**. 3rd ed. Houston: Gulf Publishing, 1989. p. 557-591.

TYAGI, R. D.; COUILLARD, D.; TRAN, F. T. Heavy metal removal from anaerobically digested sludge by a chemical and microbiological methods. **Environmental Pollution**, v. 50, p. 295-316, 1988.

UKIWE, L. N.; ALLINOR, J. I.; EJELE, A. E.; ANYADIEGWU, C. I. C.; IBENEME, S. I. Chemical and biological leaching methods to remove heavy metals from sewage sludge: a review. **Journal of Advances in Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 509-517, 2013.

UMRANIA, V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1237-1242, 2006.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2014/2015**. 2015. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-emoagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1617&safra=2014%2F2015&estado=SP>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Municipal and Industrial Solid Waste Division. Office of Solid Waste. **Biosolids generation, use, and disposal in the United States**. Washington, DC, 1999b. EPA 530- R-99-009. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/biosolids_generation_use_disposal_in_u.s_1999.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Solid Waste. **SW-846**: test method 3052: Microwave-assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Washington, DC, 1996a. Disponível em: <<https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3052-microwave-assisted-acid-digestion-siliceous-and-organically-based>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. OPPTS 850.4200: seed germination/root elongation toxicity test. In: _____. **Ecological effects test guidelines**. Washington, DC, v. 1, 1996b. EPA 712-C-96-154.

UNSAL, Y.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Sequential extraction procedure for the determination of some trace elements in fertilizer samples. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 4, p. 1034-1038, 2014.

URE, A. M.; QUERAUVILLER, P. H.; MUNTAU, H.; GRIEPINK, B. Speciation of heavy metal in soils and sediments: an account of the improvement and harmonisation of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 51, p. 135-151, 1993.

USINA SÃO MARTINHO. **Processos produtivos**: reutilização de resíduos, 2015. Disponível em: <<http://www.saomartinho.ind.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

VALADARES, J. M. A. S. Zinco em solos do estado de São Paulo. I. zinco total. **Bragantia**, v. 34, p. 133-139, 1975.

VALLE, L. A. R. **Avaliação de elementos traço em fertilizantes e corretivos**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Ambientais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

VALLS, M.; DE LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **Fems Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 327-338, 2002.

VANGRONSVELD, J.; HERZIG, R.; WEYENS, N.; BOULET, J.; ADRIAENSEN, K.; RUTTENS, A.; THEWYS, T.; VASSILEV, A.; MEERS, E.; NEHNEVAJOVA, E. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. **Environmental Science Pollution Research**, v. 16, p. 765-794, 2009.

VEIHMEYER, F. J.; HENDRICKSON, A. H. The moisture equivalent as a measure of the field capacity of soils. **Soil Science**, v. 32, p. 181-193, 1931.

VERSTRAETE, W. Microbial ecology and environmental biotechnology. **Isme Journal**, v. 1, n. 1, p. 4-8, 2007.

VIEIRA, G. **Avaliação ecotoxicológica da fração solúvel do biodiesel de soja**. 2010. 85 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

VILLAR, L.; GARCIA, O. Effect of anaerobic digestion and initial pH on metal bioleaching from sewage sludge. **Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 41, n. 2, p. 211-222, 2006.

VOGEL, A. I. Colorimetria e espectrofotometria. In: _____. **Análise inorgânica quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara 2, 1981. p. 552-553.

WADT, L. C. **Cultivo de *Pleurotus* ssp em vinhaça visando a produção de biomassa e expolissacarídeos**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WATLING, H. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, n. 1/2, p. 81-108, 2006.

WEN, Y.; WANG, Q. P.; TANG, C.; CHEN, Z. L. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge by *Acidithiobacillus thiooxidans* - a comparative study. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, n. 6, p. 900-908, 2012.

WIGHTWICK, A.; SALZMAN, S. A.; REICHMAN, S. M.; ALLINSON, G.; MENZIES, N. W. Inter-regional variability in environmental availability of fungicide derived copper in vineyard soils: an australian case study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 449-457, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva, 1996. 361 p.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals in contaminated soil: a review of sources chemistry, risks and best available strategies for remediation. **International Scholarly Research Notices Ecology**, v. 2011, 2011. doi:10.5402/2011/402647.

YAO, S. G.; TAKETA, S.; ICHII, M. A novel short-root gene that affects specifically early root development in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**. v. 163, p. 207-215, 2002.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2008. p. 3-15.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; ČYPAITĖ, A. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. **Environmental Research Engineering and Management**, v. 4, p. 42-47, 2008.

ZHANG, D.; ZHANG, J.; YANG, W.; WU, F. Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. **Ecological Research**, v. 25, n. 1, p. 13-23, 2010.

ZHANG, P.; ZHU, Y.; ZHANG, G.; ZOU, S.; ZENG, G.; WU, Z. Sewage sludge bioleaching by indigenous sulfur-oxidizing bacteria: effects of ratio of substrate dosage to solid content. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1394-1398, 2009.

ZHANG, X.; TIAN, Y.; WANG, Q.; CHEN, L.; WANG, X. Heavy metal distribution and speciation during sludge reduction using aquatic worms. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 41-47, 2012.

ZHANG, X. P.; DENG, W.; YANG, X. M. The background concentrations of 13 soil trace elements and their relationships to parent materials and vegetations in Xizang (Tibet). Beijing, China: **Journal of Asian Science**, v. 21, p. 167-174, 2002.

ZHOU, X. Z. L.; HE, Z. L.; LIANG, Z. B.; STOFFELLA, P. J.; FAN, J.; YANG, Y. G. Long term use of copeer containing fungicide affects microbial properties of citrus grove soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 75 p. 898-906, 2011.

ZHU, Y.; ZENG, G.; ZHANG, P.; ZHANG, C.; REN, M.; ZHANG, J.; CHEN, M. Feasibility of bioleaching combined with fenton-like reaction to remove heavy metals from sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 530-534, 2013.