



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
Faculdade de Engenharia e Arquitetura  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e  
Ambiental

Bruna Bilhar Dall Agnol

Estabilização e solidificação de Cromo (VI) por  
biocimentação

Passo Fundo  
2018

Bruna Bilhar Dall Agnol

Estabilização e solidificação de Cromo (VI) por  
biocimentação

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para a obtenção do título de Mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Thomé.

Passo Fundo  
2018

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
Faculdade de Engenharia e Arquitetura  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e  
Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo, aprova a dissertação de mestrado “Estabilização e solidificação de Cromo (VI) por biocimentação”, elaborada por Bruna Bilhar Dall Agnol, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data da aprovação: 17 de Abril de 2018.

Membros componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Thomé  
Universidade de Passo Fundo  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciane Maria Colla  
Universidade de Passo Fundo

Prof. Dr. Márcio Felipe Floss  
Universidade de Passo Fundo

Prof. PhD Nilo Cesar Consoli  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Passo Fundo, 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me auxiliar em escolhas difíceis, além disso, por colocar em meu caminho tantas pessoas maravilhosas que deixaram a caminhada menos angustiante.

A minha família, pai, mãe, irmão, por todo apoio ao longo dessa caminhada que não foi nada fácil, vocês deixaram meus dias mais tranquilos e nunca deixaram me faltar nada, principalmente amor.

Ao grupo de pesquisa em geotecnia ambiental que me acolheu desde a graduação, melhorando cada dia que passou minhas habilidades de pesquisadora. Ao meu orientador, Professor Antônio Thomé, que desde a graduação vem acompanhando minha pesquisa.

Aos estagiários do laboratório, todos eles, principalmente a Pietra e o Marcos por toda a ajuda nas análises e vidrarias lavadas, que não foram poucas. Além deles agradeço aos funcionários do CETEC e do laboratório, por toda a ajuda prestada ao longo dessa caminhada.

Aos meus melhores amigos Eloisa e Alan, que me acompanham desde a graduação, com vocês dividi meus melhores momentos e piores, na pesquisa, na graduação, na pós-graduação, na vida. Nada que eu diga aqui pode expressar o amor e orgulho que sinto por vocês. Obrigada por tudo!

Além desses citados, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma se fizeram presentes no trajeto da minha dissertação, cada um de vocês foi importante e não tenho como descrever toda a gratidão que sinto hoje.

*“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants.”*  
Isaac Newton

## RESUMO

A maioria das técnicas de melhoramento de solo que são utilizadas no mundo envolve a adição de energia mecânica e/ou materiais sintéticos, sendo que ambos têm substancial custos de energia associados à sua produção. No entanto, a técnica de biocimentação vem como intuito de melhorar as propriedades mecânicas do solo de forma sustentável. A biocimentação é a formação de material particulado por entre as partículas do solo através do metabolismo de microrganismos presentes. Os inúmeros processos microbiológicos têm o potencial para modificar o comportamento do solo. Muitas bactérias como as espécies: *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus* e *Clostridium* possuem potencial de cimentação biológica. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a precipitação de Carbonato de Cálcio induzida por microrganismos ou biocimentação para a estabilização e solidificação de cromo hexavalente (Cr(VI)) em um solo arenoso. Foram realizados ensaios de teste de atividade urease, ensaio de biocimentação, análise de solo e lixiviado, além de MEV. Os ensaios foram realizados no laboratório de geotecnia ambiental da Universidade de Passo Fundo. Na primeira fase da dissertação, no ensaio de teste de atividade urease não autoclavado foi possível observar a adaptação dos microrganismos nativos do solo às soluções nutrientes adicionadas ao meio. Além disso, no ensaio autoclavado da urease foi possível observar que a atividade pode ser medida na ausência de microrganismos, sendo considerada química. O tempo zero em ambos os ensaios apresentou resultados semelhantes, assim, foi possível calcular a real atividade realizada por microrganismos no ensaio. Foi possível observar também que a solução nutriente C se destacou com maior atividade urease no ensaio não autoclavado com pico de atividade no tempo 10 dias, sendo a utilizada no teste de biocimentação para encapsulamento de cromo hexavalente em solo arenoso, com dois intervalos de alimentação, 2 dias como utilizado em bibliografia e 7 dias, aproximando ao pico de urease encontrado na primeira fase da dissertação. Ao final do ensaio de biocimentação na segunda fase, pode-se observar através da análise realizada no lixiviado coletado que a capacidade de retenção de contaminante é maior pelos corpos de prova alimentados com meio nutriente, aproximadamente 30%, enquanto os corpos de prova alimentados com água apresentaram retenção do contaminante mais baixa, aproximadamente 10%, depois disso com os resultados da análise do solo foi possível observar que houve biocimentação, no entanto, uma baixa concentração ficou retida no biocimento, assim afirmando que em caso de aplicação em campo, a biocimentação pode não ser efetiva, pois nesse estudo aproximadamente 70% do contaminante inserido na moldagem foi lixiviado. Concluiu-se com esse estudo que a biocimentação para solos arenosos não é eficiente com alimentação por percolação, pois o risco de espalhar a pluma de contaminação é alto, reduzindo a eficiência da técnica.

Palavras- Chave: Biocimentação. Solidificação/Estabilização. Cromo(VI).

## ABSTRACT

Most of the soil improvement techniques used in the world involve the addition of mechanical energy and/or synthetic materials, both of which have substantial energy costs associated with their production. However, the technique of biocementation intend to improve the mechanical properties of soil in a sustainable way. Biocementation is the formation of particulate matter through the soil particles through the metabolism of microorganisms present. The numerous microbiological processes have the potential to modify soil behavior. Many bacteria like the species: *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus* and *Clostridium* have potential of biological cementation. Thus, the objective of this work was to perform the precipitation of Calcium Carbonate induced by microorganisms or biocementation for the stabilization and solidification of hexavalent chromium (Cr(VI)) in a sandy soil. We perform tests of urease activity, biocementation test, soil and leachate analysis, and SEM. The tests were carried out in the environmental geotechnics laboratory of the University of Passo Fundo. In the first phase of the dissertation, in the test of non-sterilized urease activity, it was possible to observe the adaptation of the native microorganisms of the soil to the nutrient solutions added to the medium. Moreover, in the sterilized urease assay it was possible to observe that the activity measured in the absence of microorganisms is considered to be chemical. The zero time in both assays presented similar results, so it was possible to calculate the actual activity performed by microorganisms in the assay. It was also possible to observe that the nutrient solution C stood out with greater activity in the non-autoclaved test. The peak of activity in the time 10 days, being the nutrient solution used in the biocementation test to encapsulate hexavalent chromium in sandy soil, with two feeding intervals, 2 days as used in bibliography and 7 days, approaching the peak of urease found in the first phase of the dissertation. At the end of the second phase, it can be observed from the analysis carried out in the collected leachate that the contaminant retention capacity is higher by the nutrient medium fed specimens, approximately 30%. While the test bodies fed with water showed the lowest contaminant retention, approximately 10%. After that with the results of the soil analysis it was possible to observe that there was biocementation, however, a low concentration was retained in the biocement, thus affirming that in case of field application, the biocementation may not be effective, because in this study approximately 70% of the contaminant inserted in the molding was leached. We concluded with this study that the biocimentation for sandy soils is not efficient with percolation feeding, because the risk of spreading the plume of contamination is high, reducing the efficiency of the technique.

Keywords: Biocementation. Solidification/Stabilization. Chromium(VI).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Formação de Calcita a partir da precipitação microbiana de $\text{CaCO}_3$ , (a) Formação de material com aparência gelatinosa (material amorfo); (b) Ampliação de (a), partículas com 100 nm de diâmetro; (c) Início da cristalização de calcita; (d) Calcita bem estruturada.....	16
Figura 2: Fluxograma de execução da dissertação.....	30
Figura 3: Curva granulométrica da areia de Osório.....	31
Figura 4: Primeira fase da dissertação.....	34
Figura 5: Segunda fase da dissertação.....	36
Figura 6: Terceira fase da dissertação.....	38
Figura 7: Ensaio Branco da primeira fase da dissertação.....	39
Figura 8: Ensaio da Atividade urease não autoclavado.....	40
Figura 9: Resultado real de atividade urease realizada por microrganismos no ensaio não autoclavado.....	41
Figura 10: Decaimento da concentração de cromo hexavalente encontrada no lixiviado 2D..	42
Figura 11: Decaimento da concentração de cromo hexavalente encontrada no lixiviado 7D..	43
Figura 12: Concentração remanescente de cromo hexavalente nos corpos de prova 2D encontrada a partir do valor extraído no lixiviado.....	43
Figura 13: Concentração remanescente de cromo hexavalente nos corpos de prova 7D encontrada a partir do valor extraído no lixiviado.....	44
Figura 14: Porcentagem remanescente de cromo hexavalente nos corpos de prova, encontrada a partir da concentração extraída do lixiviado.....	44
Figura 15: Análise estatística do lixiviado coletado.....	45
Figura 16: Concentração de contaminante extraído do solo dos corpos de prova pela digestão alcalina de cromo hexavalente.....	46
Figura 17: Balanço de massa da contaminação inserida no corpo de prova e retirada no lixiviado e análise final dos corpos de prova.....	47
Figura 18: Análise de MEV na Amostra 1 - CONT/ALIM 7D com aumento de 140 vezes. ..	48
Figura 19: Análise de MEV na Amostra 1 - CONT/ALIM 7D com aumento de 1500 vezes. 49	
Figura 20: Análise de MEV na Amostra 1 - CONT/ALIM 7D com aumento de 5000 vezes. 49	
Figura 21: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 1.....	50
Figura 22: Identificação das camadas da composição química da Amostra 1.....	51
Figura 23: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 1.....	52
Figura 24: Análise de MEV na Amostra 2 - CONT/ÁGUA 7D com aumento de 140 vezes. 53	
Figura 25: Análise de MEV na Amostra 2 - CONT/ÁGUA 7D com aumento de 1500 vezes.53	
Figura 26: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 2.....	54
Figura 27: Identificação das camadas da composição química da Amostra 2.....	54
Figura 28: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 2.....	55
Figura 29: Análise de MEV na Amostra 3 - CONT/ÁGUA 2D com aumento de 140 vezes. 56	
Figura 30: Análise de MEV na Amostra 3 - CONT/ÁGUA 2D com aumento de 1500 vezes.56	
Figura 31: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 3.....	57
Figura 32: Identificação das camadas da composição química da Amostra 3.....	57
Figura 33: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 3.....	58
Figura 34: Análise de MEV na Amostra 4 - CONT/ALIM 2D com aumento de 140 vezes. ..	59
Figura 35: Análise de MEV na Amostra 4 - CONT/ALIM 2D com aumento de 1500 vezes. 59	
Figura 36: Análise de MEV na Amostra 4 - CONT/ALIM 2D com aumento de 5000 vezes. 60	
Figura 37: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 4.....	61
Figura 38: Identificação das camadas da composição química da Amostra 4.....	61
Figura 39: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 4.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades químicas do Cromo.....	24
Tabela 2: Características dos principais argilominerais. ....	26
Tabela 3: Índices físicos da areia de Osório. ....	31
Tabela 4: Variação das soluções nutriente utilizadas na dissertação.....	33
Tabela 5: Rotulação das amostras enviadas para o ensaio de MEV/EDX .....	48

## SUMÁRIO

ABSTRACT .....	7
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1 Biocimentação .....	14
2.1.1 Microrganismos aptos a realizar biocimentação .....	18
2.1.2 Fatores que influenciam o processo de biocimentação .....	20
2.1.3 Vantagens e desvantagens .....	22
2.2 Contaminante – Cromo Hexavalente (Cr(VI)) .....	22
3 METODOLOGIA .....	30
3.1 Materiais e equipamentos .....	30
3.1.1 Local da pesquisa.....	30
3.1.2 Solo.....	30
3.2 Métodos e técnicas.....	32
3.2.1 Primeira Fase .....	32
3.2.2 Segunda Fase .....	34
3.2.3 Terceira Fase.....	36
3.2.3.1 MEV – Microscopia eletrônica de varredura .....	36
3.2.4 Tratamento de dados.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	39
4.1 Primeira Fase .....	39
4.2 Segunda Fase .....	41
4.3 Terceira Fase.....	48
4.3.1 Amostra 1 – CONT/ALIM 7D .....	48
4.3.2 Amostra 2 – CONT/ÁGUA 7D.....	52
4.3.3 Amostra 3 – CONT/ÁGUA 2D.....	55
4.3.4 Amostra 4 – CONT/ALIM 2D .....	58
5 CONCLUSÕES .....	63
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
ANEXOS.....	71

# 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda e investimento na área da infraestrutura em áreas costeiras, em paralelo com o aumento populacional possui limitações por conta de fronteiras geográficas, qualidade do solo e disponibilidade sobre o qual se pode construir, que está cada vez menor por conta de contaminação de solos e erosão dessas áreas (MONTROYA, 2012).

As áreas costeiras são consideradas extremamente dinâmicas, isso ocorre por conta da constante mudança acarretada pelos ventos e águas do mar além da atividade antrópica. Essas áreas por serem grandes áreas de recreação, acarretam um aumento da população local e praias lotadas, aumentando a demanda de indústrias para suprir as necessidades do público além de mau uso do solo acarretando impactos ao ambiente. Essa demanda, pode ocasionar contaminações por conta do mau uso dessa área, o que acaba por desabilitar grandes áreas de solo, desvalorizando imóveis e limitando o desenvolvimento urbano. (MARTINS et al., 2004).

Essa contaminação pode ser de variadas fontes, sendo ela principalmente de atividades industriais ou agrícolas envolvendo múltiplos contaminantes, entre eles os metais tóxicos. Os metais ocorrem naturalmente no solo em baixas concentrações e de formas quase não disponíveis para plantas e organismos vivos (RESENDE et al., 2007). Cromo é um metal tóxico muito utilizado por sua capacidade anticorrosiva, quando em conjunto com outros metais ocorre a formação de liga metálicas que possuem característica de ser resistentes a corrosão (CHRISTOFF, 2015).

A utilização de cromo está presente também na fabricação de estruturas para a construção civil e em outros segmentos industriais como curtumes (beneficiamento de couro), composição de tintas e pigmentos, produtos preservantes de madeira e galvanoplastia (recobrimento metálico de materiais) (CETESB, 2012).

Cromo hexavalente é estável quando em condição oxidante, não é facilmente adsorvido, assim, é mais móvel no ambiente e tóxico (CASTRO et al., 2005), fazendo com que áreas para atividades industriais que utilizem esse metal pesado acabem por deixar um passivo ambiental, ocorrendo quando os processos de tratamentos de efluentes são deficientes ou inexistentes contaminando solos, ar e águas (MATOSO et al., 2001).

Nesse contexto surgem estudos e técnicas de remediação e biorremediação capazes para o melhoramento e remoção de contaminantes dessas áreas, possibilitando posteriormente o seu uso para a execução de atividades já desenvolvidas anteriormente, entre outras (REBECHI, 2007).

A técnica escolhida nesse melhoramento deve levar em consideração o melhor custo-benefício, além disso deve observar o impacto ambiental causado. Técnicas utilizando cimento Portland são geralmente empregadas em melhoramento de áreas atingidas por contaminações ou com falhas geotécnicas. A partir disso, nasce a necessidade de encontrar uma técnica sustentável que possa ser empregada na estabilização de contaminantes em solos, sendo que as tradicionais, envolvendo cimento apenas, são altamente nocivas ao meio ambiente (PEDREIRA, 2014).

A biotecnologia oferece tanto na área de engenharia ambiental, assim como engenharia civil soluções como: o controle de processos erosivos, estabilização de solos até encapsulamento de contaminantes. Isso ocorre por conta da atividade microbiana presente no subsolo que tem a capacidade de modificar o comportamento do solo, se tornando uma alternativa na biorremediação de solos (DEJONG et al, 2013).

A biogeotecnologia é um ramo novo na engenharia geotécnica que trabalha principalmente com a aplicação de métodos biológicos para problemas geotécnicos. Essa tecnologia tem como vantagens o baixo custo de investimento e baixo custo de manutenção (KAROL, 2003). Dentre as biogeotecnologias, o uso potencial de microrganismos para essas áreas tem se mostrado eficiente no processo de biocimentação ou MICP (microbially induced carbonate precipitation) para a biorremediação de solos (IVANOV; CHU, 2008), abrindo assim o questionamento quanto a capacidade da biocimentação de realizar a estabilização e solidificação de Cr(VI) em solo arenoso.

A técnica de solidificação e estabilização de contaminantes tem como objetivo limitar a solubilidade dos contaminantes e sua transferência por entre o solo quando em contato com um lixiviado ou água subterrânea, esse procedimento pode ser realizado *in situ* assim como *ex situ*, a partir de escavação e mistura (WILES, 1987).

De acordo com De Muynck et al. (2012) os primeiros usos da biocimentação ou MICP (Precipitação de Calcita Induzida por Microrganismos) foram pelo menos há duas décadas e, desde então, um grande número de pesquisas têm procurado abordagens alternativas para o uso da biorremediação. No campo da biocimentação os estudos tiveram início na década de 90 e se aplicaram mais a engenharia geotécnica como biogeotecnologia para melhorar as propriedades do solo.

A técnica da biocimentação consiste na inserção de nutrientes que induz a precipitação de carbonato de cálcio com microrganismos nativos do solo com o intuito de melhorar as características físicas, químicas e mecânicas do solo. Com esse avanço no desenvolvimento biotecnológico será possível ver a redução do impacto econômico e ambiental de outras

técnicas, além de melhorar a qualidade do solo e ambiente, sendo que vários países do mundo estão sendo afetados por problemas no solo, o que o classifica como um dos problemas ambientais mais importantes atualmente (CHU, 2012).

Podemos afirmar que a biocimentação é uma técnica menos destrutiva ao solo, pois realiza solidificação e estabilização de contaminantes, redução de permeabilidade, contenção de erosão sem a necessidade da inserção de materiais sintéticos ao solo evitando altas concentrações de dióxido de carbono liberado para o ambiente, como é o caso dos materiais tradicionais.

O objetivo geral é utilizar a técnica de biocimentação para a estabilização e solidificação de Cr(VI) em um solo arenoso.

Os objetivos específicos são:

- a) Avaliar a atividade urease dos microrganismos do solo com a adição de diferentes soluções nutrientes;
- b) Avaliar a capacidade de solidificação e estabilização do contaminante aplicando a biocimentação;
- c) Avaliar a morfologia da estrutura após a aplicação da biocimentação;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biocimentação

A precipitação de calcita ou carbonato de cálcio no interior dos solos, também chamada de biocimentação é a utilização do metabolismo microbiano para catalisar reações químicas com alguns substratos, o produto final dessas reações é a precipitação de materiais inorgânicos como a calcita que melhoram as propriedades mecânicas do solo e tem capacidade de remediar contaminantes. A capacidade dessa técnica já vem sendo estudada por De Jong et al. (2006); Whiffin et al. (2007); Thawadi (2008), Ivanov e Chu (2008), e Montoya (2012).

O processo de precipitação de carbonato de cálcio para a formação de calcita pode ser chamado também de MICP (Microbially Induced Carbonate Precipitation). O produto final desse processo não possui sempre a mesma estrutura, isso ocorre por conta dos diferentes microrganismos que podem ser envolvidos além disso, o processo é dependente das condições do meio onde ocorre a precipitação. O MICP é um processo simples e possui quatro principais fatores para a sua ocorrência, são eles: 1) a concentração de cálcio no meio; 2) pH; 3) concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ); e 4) concentração de microrganismos (MUÑETÓN, 2013).

Minerais como o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) têm e solubilidade muito baixa em água, dessa maneira, são considerados minerais termodinamicamente estáveis em ambientes biológicos (MANN, 2001).

A biocimentação é a formação de calcita, que liga as partículas de solo após a adição de microrganismos e substratos específicos. Essa cimentação é considerada bioquímica, pois ocorre a partir de reações químicas entre microrganismo e substratos que realizam precipitação na subsuperfície do solo (IVANOV; CHU, 2008).

A precipitação de  $\text{CaCO}_3$  ocorre a partir de duas maneiras: a) a partir de microrganismos autotróficos, nos quais a fonte de carbono utilizada é  $\text{CO}_2$  para a produção de matéria orgânica e b) através de processos heterotróficos, os quais ocorrem com mais frequência e podem ser por precipitação passiva ou ativa de  $\text{CaCO}_3$  (CASTANIER et al., 1999). A precipitação passiva é a ocasionada por alterações no meio pelo metabolismo dos microrganismos a partir da degradação da ureia, amonificação, redução de nitratos e de sulfatos, que acarretam a acumulação de íons carbonato e posteriormente a precipitação de

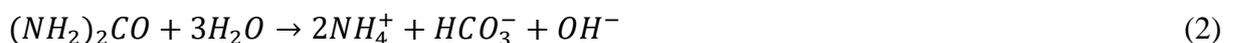
partículas sólidas; já a precipitação considerada ativa não depende do metabolismo e sim das trocas iônicas por meio da membrana celular dos microrganismos.

Os mesmos autores afirmam que o processo de MICP ocorre na fase exponencial do crescimento microbiano, pois durante esse crescimento é observado aumento de pH e acúmulo de carbonatos, sendo que esse processo tem término no início da fase estacionária do crescimento. Além disso, foi observada que a precipitação ativa é a primeira a ocorrer, sendo seguida da precipitação passiva.

De acordo com Montoya (2012), o aprimoramento do solo a partir dessa técnica é realizado a partir de atividade microbiológica. A população microbiana do solo (*in situ*) pode ser “estimulada”, ou seja, é realizada a bioestimulação que consiste na inserção de substratos específicos necessários para a formação do produto desejado. A atividade microbiana a partir do seu metabolismo altera as condições ambientais *in situ*, uma dessas alterações é o aumento de pH, necessário para que as reações de precipitação de calcita ou carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ocorram.

Após a finalização da técnica o solo tratado se torna menos permeável e mais resistente. A biocimentação pode ter variadas aplicações na área de Geotecnia Ambiental, como reforço de fundações, controle de erosão, controle de “piping” (erosão interna) em barragens de terra (VAN PASSEN, 2010).

As pesquisas envolvendo precipitação de  $\text{CaCO}_3$  a partir de microrganismos são realizadas com os microrganismos ureolíticos, ou seja, os que possuem a capacidade de produzir a enzima urease. Essa enzima é responsável por acelerar a hidrólise de ureia e assim, a produção de  $\text{CO}_2$  e amônia, resultando no aumento de pH do meio e concentração de carbonatos (MUÑETÓN, 2013). A reação da hidrólise da ureia está apresentada na Equação 2.



No momento que a ureia presente no meio nutritivo é metabolizada pelos microrganismos *in situ*, são formados cristais de carbonato de cálcio ao redor das suas células, essas células cristalizadas de ligam com as partículas de solo, fazendo com que sua resistência ao cisalhamento seja aumentada (BANG et al., 2001).

No processo de biocimentação, basicamente ocorre a união dos cátions de cálcio com íons de bicarbonato, sendo que segundo Hammes e Vestraete (2002) é necessária a presença

de íons de cálcio solúveis no meio para ocorrer a precipitação, como apresentado nas Equações 3 e 4.



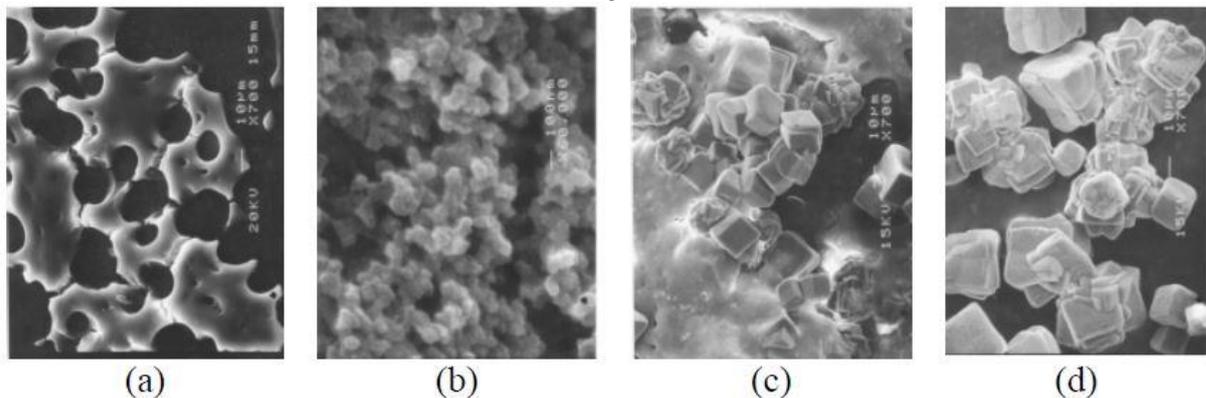
(3)



(4)

O material formado na precipitação de  $\text{CaCO}_3$  é inicialmente amorfo, posteriormente se transforma em material cristalino – Calcita – como apresentado por Sondi e Matijevic (2001). A Figura 1 apresenta a ocorrência da Calcita a partir da precipitação de  $\text{CaCO}_3$ .

Figura 1: Formação de Calcita a partir da precipitação microbiana de  $\text{CaCO}_3$ , (a) Formação de material com aparência gelatinosa (material amorfo); (b) Ampliação de (a), partículas com 100 nm de diâmetro; (c) Início da cristalização de calcita; (d) Calcita bem estruturada.



Fonte: Sondi e Matijevic, 2001.

Stocks-Ficher et al (1999), bioestimularam um solo com um meio nutritivo composto por 20 g de ureia; 3 g de Agar nutriente; 5,6 g de cloreto de cálcio; 10 g de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); 2,12 de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e ainda 12 g de ágar para 1000 ml de água destilada, além disso, utilizaram cultivos de *Bacillus pasteurii* para realização da bioaumentação. Esse estudo foi realizado em solo arenoso e apresentou precipitação de  $\text{CaCO}_3$  em pH entre 8 e 9.

Na pesquisa realizada por Kucharski et al. (2005), os microrganismos hidrolisaram rapidamente a ureia deixando meio alcalino por conta da hidrólise de ureia à amônio e por conta disso foi observada a formação de calcita no solo. A resistência à compressão simples obtida pelo autor foi superior a 5 MPa e ele ainda destaca que vários materiais podem ser tratados ou melhorados mecanicamente com a biocimentação, tais como, areias, calcários,

turfas, argilas e sedimentos. Além disso, o autor diz que os microrganismos capazes de realizar essa função são do gênero *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*.

Whiffin et al. (2007) apresentam como aplicação da biocimentação o aprimoramento da propriedade de permeabilidade do solo utilizando uma matriz polimérica produzida pelos microrganismos já citados a partir de sua metabolização. Essa matriz polimérica formada seria carbonato de cálcio precipitado a partir dos substratos fornecidos aos microrganismos. O fornecimento de substrato seria feito à velocidade constante diretamente no solo, gerando posteriormente a redução na permeabilidade e podendo chegar a impermeabilização dessa coluna de solo onde é feito o fornecimento.

Yang et al. (1993) ainda destaca que essa técnica pode ser empregada em biorremediação, controle de barragens, diminuição da erosão além da estabilização de solos contaminados a longo prazo.

A formação de  $\text{CaCO}_3$  reduz o índice de vazios do solo, assim, barrando o fluxo de água, Ferris et al. (1996) observou em estudo a redução da permeabilidade de 15 a 20% da permeabilidade inicial. Já Whiffin et al. (2007) conseguiram resultados melhores, redução de 22 até 75% da permeabilidade inicial.

Ivanov e Chu (2008) evidenciaram o aumento da rigidez do solo quando submetido à técnica de biocimentação, demonstrando que a técnica pode ser usada para prevenir erosão do solo e minimizar impactos causados pela liquefação de solos, além de auxiliar na compactação de solos.

A biocimentação pode ter sua resistência variada quando finalizado o processo, variando de uma areia fracamente biocimentada a uma rocha biocimentada com resistência a compressão variando de 0,2 a 20 MPa, com quantidades de  $\text{CaCO}_3$  no interior do solo variando de 30 a 600  $\text{kg/m}^3$  (WHIFFIN et al., 2007).

Em um estudo realizado por Stabnikov et al. (2011) foi realizada a análise do uso de biocimentação com cálcio como substrato na formação de uma camada impermeável na subsuperfície de uma areia. Foi aplicado 0,6 g de Ca por  $\text{cm}^2$  de superfície da areia e pode-se observar a redução da permeabilidade do solo de  $10^{-4}$  m/s para  $10^{-7}$  m/s devido a formação da crosta de  $\text{CaCO}_3$  na superfície da areia.

Tratamentos que utilizam a biocimentação microbiana de acordo com Jroundi et al. (2012) são baseados em dois processos: 1º) inoculação de bactérias com capacidade de precipitação de cálcio comprovada e/ou 2º) inserção de meio de cultura capaz de ativar a população microbiana nativa no meio. Segundo o autor o 2º processo demonstrou maior

eficácia, pois não apresenta a necessidade de introduzir microrganismos não nativos ou exógenos.

Em um estudo sobre biocimentação realizado por Cheng e Cord-Ruwisch (2012), foi verificado que com a utilização de cimentação biológica os resultados foram cimentação homogênea ao longo de 1 m de comprimento de coluna de areia.

Apesar de vários estudos já realizados há a necessidade de avanço acerca da técnica de biocimentação na engenharia, principalmente sobre heterogeneidade, estrutura e distribuição dos poros do solo no qual a técnica será aplicada, o fluido em circulação no meio e transporte e além desses, a biodiversidade de microrganismos presentes (MONTROYA, 2012).

A aplicação da técnica com cloreto de cálcio em solos silte-arenoso foi estudada por Lee (2013). Os resultados se mostraram favoráveis para o índice de recompressão, porém não favoráveis para o melhoramento de características como compressibilidade do solo.

### 2.1.1 Microrganismos aptos a realizar biocimentação

A existência de microrganismos no solo é de grande importância, pois são responsáveis por realizar reações bioquímicas no meio e sua interação com a vegetação. Além disso, a distribuição dos microrganismos no solo é diretamente ligada ao pH, aos minerais presentes no meio, ao teor de matéria orgânica, à temperatura e à umidade (MEURER, 2000).

A aplicação de microrganismos para a biogeotecnologia incluem sua seleção e identificação adequando-os para diferentes usos e em diferentes ambientes, além disso, incluem a otimização da atividade *in situ*, rentabilidade, biossegurança da aplicação e estabilidade do solo após a técnica (THAWADI, 2008).

Os processos microbiológicos que ocorrem no solo durante a técnica podem ter ocorrência reduzida pelo transporte de células no interior do solo, pois depende do tamanho das células e as propriedades da superfície delas além do seu estado fisiológico (IVANOV; CHU, 2008). Os microrganismos potencializadores na técnica de biocimentação devem resistir a altas concentrações de cálcio e pH alcalino (GIRINSKY, 2009).

As bactérias ureolíticas ou que hidrolisam a ureia são encontradas no solo, porém, esse solo possui populações microbianas que precisam ser bioestimuladas ou bioaumentadas. Quando as bactérias já estão no solo é necessário aumentar sua população ou sua atividade de urease a partir do fornecimento de substratos indicados para a técnica, assim, utilizam-se microrganismos nativos do solo e não existe a preocupação de adaptar novos microrganismos ao meio (De JONG et al, 2009). Em caso de inexistência desses microrganismos é necessário

o bioaumento, procedimento que tem apresentado bons resultados de acordo com a bibliografia.

De acordo com Stock-Fisher et al. (1999), uma alta população microbiana no meio pode não ser eficiente na precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , isso ocorre, pois a disponibilidade de nutrientes ficaria limitada e a produtividade de  $\text{CaCO}_3$  não seria a esperada.

A partir dos estudos de De Jong et al. (2009), Ivanov e Chu (2008) e Montoya (2012) foi possível destacar os microrganismos que possuem a capacidade de realizar biocimentação. São as espécies: *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*.

As bactérias *Bacillus pasteurii* são conhecidas pela sua resistência contra agentes químicos e físicos. Essa bactéria produz a enzima urease que é a responsável pela hidrólise da ureia presente no substrato fornecido para as reações químicas (KUCHARSKI et al., 2005). Por ser uma bactéria resistente não existe a preocupação de manter um ambiente totalmente estéril. Tal necessidade iria encarecer significativamente a solução.

A *Sporosarcina pasteurii* é uma bactéria não patogêna, com comprimento em forma de haste entre 1-4 microns de diâmetro e respiração aeróbia facultativa. É muito utilizada como fonte de enzima urease na biocimentação, sua produção de urease é intracelular e é próxima de 1% do peso seco da célula, demonstrando grande potencial de utilização (WHIFFIN, 2004).

Girinsky (2009) apresenta a bactéria *Sporosarcina pasteurii* como anaeróbio facultativo, quanto à produção de enzimas, esse microrganismo produz duas enzimas que são importantes no processo, são elas oxidase e nitrato redutase, que auxiliam na alcalinização do meio, além disso, o autor diz que as bactérias *Bacillus* possuem a capacidade de metabolizar ureia, também ajudando na alcalinização do meio.

Chu et al. (2014) estudaram a aplicação de culturas de *Bacillus sp.* ou uma suspensão de células. Os resultados obtidos apresentaram melhores valores na utilização das suspensões de células, cerca de 5 a 8 vezes mais eficientes quando comparados às aplicações sem aplicação de suspensão de células.

No estudo de van Passen et al. (2010) os autores utilizaram uma bactéria com alta capacidade urease, *Sporosarcina pasteurii* DSM 33. Essa cepa foi cultivada aerobiamente em condições estéreis em laboratório a partir de um inóculo de 10 ml até atingir 100 litros de suspensão em um meio nutriente composto por extrato de levedura, cloreto de amônio e cloreto de níquel, utilizada posteriormente para um reator de 5 m<sup>3</sup> contendo solo.

De acordo com Thawadi (2008) os microrganismos do gênero *Bacillus* são bactérias que proporcionam vantagens específicas como maior quantidade da enzima urease e alta produção, maior estabilidade e maior tolerância a amônio.

No estudo realizado por Gómez (2006) se utilizou *Bacillus pasteurii* e *Bacillus subtilis*. Cada microrganismo foi adicionado a um meio de cultivo denominado pelo autor como B4, após isso, essa mistura foi inserida em um solo grosso previamente seco em estufa a fim de evitar a interferência de microrganismos nativos do solo. O objetivo do estudo do autor foi avaliar a variação da rigidez do solo. Nos resultados obtidos pode-se observar que os *Bacillus pasteurii* são mais eficientes no aumento da resistência ao cisalhamento.

Na pesquisa de Bang et al. (2001) foram utilizados microrganismos que produzem a enzima urease: *Escherichia coli* e *Bacillus pasteurii*. Esses microrganismos foram aplicados na recuperação de trincas em concreto, tendo como resultado o aumento da resistência à compressão simples.

Conhecidas por sua resistência a agentes químicos e físicos, as bactérias *Bacillus pasteurii* são as mais indicadas para utilização na técnica de biocimentação em grande escala, ou seja, realizada *in situ* (PEDREIRA, 2014).

Yang et al. (1993) realizaram a imobilização de metais pesados de rejeitos de mineração a partir de biocimentação induzida de *Bacillus firmus* que é uma bactéria com alta capacidade e resistência a altas concentrações de metais pesados. O procedimento para a realização da biocimentação aumentou consideravelmente o pH do rejeito, fazendo com que ocorresse a biocimentação. Avaliação com difração de Raio-X confirmaram a presença de formação de material proveniente da técnica, como a formação de  $\text{CaCO}_3$ .

### 2.1.2 Fatores que influenciam o processo de biocimentação

A biocimentação se dá primeiramente pela fase de crescimento dos microrganismos e depois a fase de cimentação microbiana, fase estacionária do crescimento microbiano, essa ordem é necessária para não ocorrer a precipitação prematura de  $\text{CaCO}_3$ , o que vai fazer com que a cimentação não seja completa (WHIFFIN, 2004).

A cimentação química de solos ocorre devido à precipitação de materiais que ocasionam a ligação de partículas de solo. Essa precipitação é associada a microrganismos quando são encontrados materiais cimentados contendo cálcio, magnésio, ferro, manganês ou alumínio, esses materiais são encontrados em forma de carbonatos, silicatos, fosfatos, sulfetos e hidróxidos de ferro (De JONG et al, 2006).

Segundo Ivanov e Chu (2008) a concentração de cálcio e de carbonato pode ter efeito positivo ou negativo na precipitação ou não ter efeito na produção de  $\text{CaCO}_3$  a partir de microrganismos. Durante a hidrólise da ureia pelos microrganismos, são formados íons de carbonato em uma relação molar de 1:1. Deste modo, com o aumento de ureia é possível aumentar a concentração de carbonatos e facilitar a saturação de  $\text{CaCO}_3$ , se houver disponibilidade de cálcio.

De acordo com Karol (2003), a taxa de precipitação do  $\text{CaCO}_3$  é um dos principais fatores na técnica. Comparados aos processos de cimentação não natural, que possuem alta taxa de precipitação, a biocimentação é em sua maioria lenta, o que pode ser bom para a técnica, pois evita a precipitação rápida e o entupimento da entrada do sistema de injeção, porém, a taxa não deve ser muito baixa, pois assim a técnica não teria um bom tempo resposta.

O aumento do pH pode ser considerado indicação de hidrólise de ureia, é um fator importante no crescimento de bactérias ureolíticas, em um pH 9 tem-se o crescimento ótimo, enquanto em pH abaixo de 6,5, não existe desenvolvimento. Em qualquer pH do meio há a presença de gás amônia ( $\text{NH}_3$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) dissolvido em diferentes concentrações, sendo que maiores concentrações de  $\text{NH}_3$  promovem melhores condições para a precipitação de  $\text{CaCO}_3$  (OKWADHA, 2010).

Esse aumento de pH proporcionado pela atividade microbiana, proporcionam condições necessárias para o início de reações químicas no interior do solo. Quando iniciadas as reações químicas, a produção de um sub produto é obtida através da taxa metabólica do microrganismo, além de ser dependente da disponibilidade de substratos fornecidos (De JONG et al., 2010).

No interior do solo, entre as partículas, os íons de cálcio devem ficar livres para que possam se ligar ao ácido carboxílico liberado pela urease microbiana e formar  $\text{CaCO}_3$ . Para isso é necessário que essa reação ocorra em ambiente alcalino, com pH entre 8 e 10, para que assim, os microrganismos se alimentem da ureia fornecida a eles e precipitem a calcita (De JONG et al, 2010). Fugita et al. (2008), também afirmaram a necessidade de pHs elevados para que ocorra a precipitação da calcita ( $\text{CaCO}_3$ ).

Segundo López (2008) a quantidade de ar dentro dos vazios no interior do solo afeta diretamente a precipitação de  $\text{CaCO}_3$ , pois quanto menor a quantidade de ar, maior a precipitação.

### 2.1.3 Vantagens e desvantagens

Assim como a utilização de outra técnica para a remediação de contaminantes e melhoramento de solo em uma área, a biocimentação também apresenta seus prós e contras em relação as técnicas tradicionais já usadas, como utilização de cimento Portland e técnica de Jet Grouting.

A principal vantagem é que a técnica de biocimentação é de origem natural, não precisa de escavação ou substituição do solo do local a ser remediado, além de não apresentar impactos negativos para o meio ambiente (PEDREIRA, 2014).

De acordo com Pedreira (2014), a permeabilidade dos solos é outra grande vantagem, isso ocorre pois na utilização de técnicas tradicionais como *jet grouting*, é gerada uma barreira impermeável que provocam a alteração do escoamento natural das águas pelo interior do solo. Já na biocimentação ocorre a diminuição da permeabilidade, no entanto, a técnica permite que o ciclo das águas não seja interrompido.

Comparando com outras técnicas, a biocimentação se destaca por ser mais econômica, dependendo dos materiais utilizados, suas concentrações e quantidades os valores da aplicação da biocimentação podem variar de 0,5 a 9 US\$ para cada m<sup>3</sup> de solo, enquanto outras técnicas variam de 2 a 72 US\$ para cada m<sup>3</sup> de solo (NG et al., 2012).

Van Paassen et al., (2008) e Pedreira (2014) afirmam como grande desvantagem ser uma técnica lenta em relação as técnicas tradicionais, o que faz com que ainda não seja tão utilizada. Fazendo assim com que seu estudo se mostre muito importante para a ciência.

Além disso, a técnica apresenta dificuldades para execução em grande escala, pois a o meio nutritivo injetado para a biocimentação, não ficaria totalmente homogêneo no meio. Essa falta de homogeneidade e alcance de maiores profundidades são as principais barreiras para a aplicação in situ da técnica (De MUYNCK et al., 2012).

É possível a utilização de métodos geofísicos para se estimar a zona tratada e o aumento de resistência do solo em processo de biocimentação, porém o crescimento microbiano e a formação de CaCO<sub>3</sub> não apresentam a mesma facilidade. Por ser uma técnica jovem, não se existe uma aplicação prática com idade para estudo de durabilidade do processo. Não existe um comportamento padrão da técnica a longo prazo como pode ser apresentado por técnicas tradicionais (PEDREIRA, 2014).

## 2.2 Contaminante – Cromo Hexavalente (Cr(VI))

Segundo Guilherme e Marchi (2007) e Reis et al. (2007), os metais no solo são provenientes do intemperismo principalmente de rochas ricas em sulfetos, óxidos, silicatos, fosfatos e carbonatos. De acordo com Resende et al. (2007), a maioria dos metais ocorre naturalmente no solo, porém em baixas concentrações e em formas pouco disponíveis para as plantas e organismos vivos. Porém, por conta da intensificação das atividades de indústrias e agricultura é possível observar maior disponibilidade e maiores concentrações de metais tóxicos nos diversos compartimentos ambientais.

O cromo é o sétimo metal em maior quantidade na Terra, não é encontrado em sua forma livre na natureza, apenas em compostos, é um metal de coloração cinza aço com forma cristalina cúbica, não possui odor e é bastante resistente a corrosão (SILVA; PEDROZO, 2001).

É um elemento de grande importância ambiental, no meio ambiente ocorre nas formas de cromo (III) e cromo (VI). Suas funções bioquímicas são definidas de acordo com o seu estado químico de oxidação pois enquanto o cromo (VI) é tóxico por ser um agente carcinogênico, o cromo (III) é considerado um nutriente essencial para o organismo humano. O Cromo (VI) tem como principal fonte as atividades antropogênicas, como indústrias têxteis e galvanizações, sendo liberado no ambiente por descartes de efluentes. Já o cromo (III) é encontrado diretamente na natureza em compostos (SUSSULINI; ARRUDA, 2006).

Na natureza é possível encontrar o cromo como mistura de diversos isótopos  $^{50}\text{Cr}$  (4,31%),  $^{52}\text{Cr}$  (83,76%),  $^{53}\text{Cr}$  (9,55%) e  $^{54}\text{Cr}$  (2,38%). Os estados químicos mais comuns do cromo são +2, +3 e +6, sendo que é mais estável na forma trivalente e hexavalente. Quando não está na forma elementar aparece em compostos como óxidos, sulfatos, cromatos, dicromatos e sais básicos, enquanto na forma elementar aparece em recobrimento de peças metálicas e plásticas (SILVA; PEDROZO, 2001).

De acordo com Russel (1981), a principal forma de extração do cromo na natureza é através de processos térmicos ou eletrolíticos, sendo que quando extraído ele está em forma de cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), com coloração amarelada. A cromita é o material que mais contém cromo em sua composição (40-50%), já as concentrações em solo variam de 2 a 60 mg/kg, sendo consideradas baixas. No ar e água para um ambiente não contaminado, as concentrações são respectivamente  $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  e  $1 \mu\text{g}/\text{L}$  (CETESB, 2012).

As formas solúveis de cromo presentes no solo são geralmente associadas as concentrações do metal nas plantas. O cromo pode facilmente penetrar através da membrana celular quando na forma hexavalente, possui ação tóxica pois nessa forma é um agente oxidante. Já o Cr (III) (forma trivalente), somente é solúvel quando em baixos valores de pH,

assim, nessa forma a absorção pelas plantas ocorre de maneira diferente. A absorção do Cr (VI) ocorre de forma ativa, sendo a forma mais tóxica para as plantas. Já a absorção de Cr (III) ocorre de forma passiva (osmose) apresentando efeito tóxico em meios com pH muito baixo e não apresentando biodisponibilidade em pH superior a 5 (RICHARD; BOURG, 1991).

A concentração de cromo hexavalente e trivalente é regulada por reações de oxirredução. Em condições oxidantes o cromo se apresenta como  $\text{HCrO}_4^-$  ou  $\text{CrO}_4^{2-}$ , dependendo do pH. O oxigênio dissolvido realiza a oxidação do Cr (III) para Cr (VI), porém como a taxa de oxidação é baixa a temperatura ambiente, o Cr (III) acaba participando de reações de precipitação.

O cromo pode ocorrer nos estados de oxidação de -2 até +6, no entanto os estados de valência zero, dois, três e seis são os mais comuns. O Cr (II) é oxidado a Cr (III) pelo ar e com relação a toxicidade para o organismo, os mais importantes são o Cr (III) e o Cr (VI). O número de compostos que envolvem cromo é alto. A velocidade de ligação desses compostos é lenta em relação a outros elementos de transição, sendo a maioria dessas ligações de Cr(III) que são consideradas cineticamente mais estáveis em solução (SILVA; PEDROZO, 2001).

De acordo com Mahan (2003) os sais formados pelo cromo formam soluções de cores variadas,  $\text{Cr}^{+2}$  ou Cr (II) e Cr (III) apresentam coloração verde e violeta, dependendo do meio de reação. O dicromato apresenta coloração alaranjada e o cromato apresenta coloração amarelada, isso pois nesses compostos está o Cr (VI). O cromo é um metal que sofre reações de oxirredução facilmente, assim formando compostos tanto com comportamento básico como com comportamento ácido.

A Tabela 1 apresentada a seguir mostra algumas características químicas do cromo como elemento e alguns compostos.

Tabela 1: Propriedades químicas do Cromo.

<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>	<b>Cromo Metálico</b>	<b>Ácido Crômico</b>	<b>Cromato de sódio</b>	<b>Óxido de Cromo</b>
<b>Família química</b>	Cromo elemento	Óxido metálico	Sal de cromato	Compostos de Cr(III) e óxido
<b>Fórmula molecular</b>	Cr	$\text{CrO}_3$	$\text{Na}_2\text{CrO}_4$	$\text{Cr}_2\text{O}_3$
<b>Massa molecular</b>	51,996	100	161,97	151,99
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	1.900	197	Não avaliado	2.435
<b>Ponto de ebulição (°C)</b>	2.672	250	792	3.000

<b>Densidade relativa (20°C) (H<sub>2</sub>O=1)</b>	7,2	2,7 a 20°C	Não avaliada	5,22 a 25°C
<b>Solubilidade em H<sub>2</sub>O</b>	Insolúvel	63 g/100 ml de água	Parcialmente solúvel	Insolúvel
<b>Solubilidade em outros líquidos</b>	Solúvel em Ác. Nítrico conc.	Solúvel em etanol, éter etílico, ácidos sulfúrico e nítrico	Parcialmente solúvel em metanol	Solúvel em ácidos e bases concentradas, insolúvel em etanol e outros álcoois e em acetona
<b>Pressão de vapor</b>	Praticamente zero a temperatura ambiente	Muito baixa	Não avaliada	Não aplicável

Fonte: Adaptado de Silva e Pedrozo, 2001.

O cromo é muito utilizado por sua capacidade anticorrosiva, dessa maneira quando em conjunto com outros metais ocorre a formação de liga metálicas, na ligação com aço o cromo forma o aço inoxidável que tem característica de ser resistente a corrosão, esse tipo de aço inoxidável pode ser encontrado em talheres e utensílios domésticos como painéis (CHRISTOFF, 2015).

Sua utilização está presente também na fabricação de estruturas para a construção civil, pois apresenta resistência a oxidação e desgaste do material. Além disso, se encontra em outros segmentos industriais como curtumes (beneficiamento de couro), composição de tintas e pigmentos, produtos preservantes de madeira e galvanoplastia (recobrimento metálico de materiais) (CETESB, 2012).

O Cr (VI) é estável quando em condição oxidante, não é facilmente adsorvido, assim, é mais móvel no ambiente e tóxico. Assim como o Cr (VI) o Cr (III) também é estável em condição intermediária oxidante, é insolúvel em pH neutro e alcalino e solúvel em condição ácida, ao contrário do Cr (III) é facilmente adsorvido (CASTRO et al., 2005).

Em pH adequado, o Cr (III) precipita como hidróxido de cromo (Cr(OH)<sub>3</sub>) ou com moléculas orgânicas. Por outro lado, o Cr (VI) apresenta maior mobilidade pois seus ânions são facilmente transportados através do solo na forma de cromato (CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) ou cromato ácido (HCrO<sub>4</sub><sup>-</sup>), formas solúveis e tóxicas para os organismos vivos (ATSDR, 2012).

A mineralogia das argilas é um fator importante influenciando o transporte de contaminantes, uma vez que as propriedades das argilas são função dos argilominerais. As diversas espécies de argilominerais influenciam no comportamento dos solos, no que diz respeito à capacidade de adsorção, CTC (capacidade de troca catiônica) e condutividade

hidráulica. As espécies de argilominerais que determinam os extremos das propriedades dos solos são a caulinita (argila de baixa atividade) e a montmorilonita (argila de alta atividade). Assim, solos com predominância de caulinita possuem menor CTC, menor atividade e maior condutividade hidráulica do que solos com montmorilonita. A Tabela 2 mostra a área específica e o valor de CTC para os principais argilominerais (CASTRO et al., 2005).

Tabela 2: Características dos principais argilominerais.

<b>Mineral</b>	<b>Área específica (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>CTC (me/100 g)</b>
Caulinita	10-20	1
Ilita	80-100	150
Montmorilonita	800	100
Vermiculita	5-400	150

Fonte: Adaptado de Castro et al., 2005.

Segundo Castro et al. (2005) a variação do pH da solução apresenta diferentes efeitos no transporte de contaminantes, dentre os quais podem-se citar: a alteração da capacidade de troca iônica e a precipitação de compostos, além da dissolução de componentes do solo. Como a troca iônica é, em geral, o principal mecanismo de adsorção, é natural que a capacidade de adsorção dos solos seja também influenciada pelo pH da solução do meio. Normalmente, a adsorção de cátions inorgânicos aumenta com o aumento do pH. Ao contrário do que ocorre com os cátions, a adsorção de ânions é geralmente estimulada em ambientes ácidos. Para valores de pH maiores que oito, a capacidade de troca catiônica é consideravelmente maior, enquanto que, para valores abaixo de quatro, a troca de ânions pode ser significativa. A variação da temperatura pode ter três efeitos básicos na retenção de substâncias: alterar a permeabilidade do solo, alterar a velocidade dos processos de transferência e propiciar a ocorrência de reações que não se processam à temperatura ambiente.

Padrões de migração vertical do cromo no solo mostram que após um período inicial de mobilidade, o cromo forma complexos insolúveis dificultando a lixiviação. Em geral, o transporte de massa possui como fatores principais, o tipo de contaminante e as condições ambientais encontradas. O destino do cromo no ambiente subterrâneo é dependente principalmente da especiação do metal, que ocorre em função do potencial de oxidação e do pH do solo (HELENE, 2016).

Na natureza se pode observar a adsorção de Cr(III) por minerais do solo. A montmorilolita, por exemplo, consegue adsorver de forma quase irreversível estes íons. A caulinita também possui comportamento semelhante (CASTRO et al., 2005).

O transporte de substâncias no solo ocorrerá em função do tipo, características físico-químicas, concentração do contaminante, granulometria, concentração de matéria orgânica, teor de vazios, CTC, grau de saturação do meio poroso e as condições ambientais. O transporte pode ocorrer através de reações químicas e bio-físico-químicas. Nos processos físicos estão incluídos a dispersão hidrodinâmica e a advecção. Já a degradação ou decaimento e retardamento ou aceleração são considerados processos bio-físico-químicos. A seguir serão apresentados os principais mecanismos associados ao transporte do cromo no solo e seu respectivo valor. Os principais mecanismos envolvidos no transporte de um soluto em um meio poroso são: advecção, dispersão mecânica, difusão, reações químicas entre o soluto e os sólidos e ainda, as reações químicas do próprio soluto (BOSCOV, 2008).

A distribuição e biodisponibilidade do Cr nos solos dependem de três tipos de reações: oxidação/redução, precipitação/dissolução, e adsorção/dessorção. Estas reações basicamente estão ligadas à capacidade de transformação e biodisponibilidade do material (SALEH et al., 1989).

O principal ensaio para obtenção de valores de parâmetro de transporte de contaminantes do solo é o equipamento de coluna. Nesse ensaio o corpo de prova é confinado através da inundação do reservatório no qual ele se encontra e a solução com contaminante é forçada a percolar através dele, sendo coletado o percolado para posterior análise. Esses parâmetros podem ser físicos, químicos ou biológicos, dentre os físicos podem ser: advecção que é o processo onde os solutos são transportados pelo fluido ou solvente em consequência de um gradiente na carga hidráulica total. Quanto maior for o valor de advecção, mais rápida é a circulação da pluma de contaminação e, conseqüentemente, maior o volume de água afetado (SHACKELFORD, 1993). Essa velocidade de percolação ( $V_s$ ) é obtida através da equação da lei de Darcy, dependente da condutividade hidráulica, gradiente hidráulico e porosidade efetiva do meio. O valor da condutividade hidráulica ( $k$ ) varia para cada tipo de solo. A condutividade hidráulica é um importante parâmetro do transporte de contaminantes pois representa a resistência que o meio oferece à percolação de água, bem como os contaminantes que nela estão dissolvidos (MACHADO, 2003). De forma mais simplificada a saturação do solo representa uma menor condutividade hidráulica, apresentando uma menor velocidade de escoamento da água (SOARES, 2005).

A dispersão hidrodinâmica que é o mecanismo responsável pelo espalhamento do poluente em um meio poroso onde o poluente passa a ocupar um volume maior do que na migração por advecção, resultando no aumento da velocidade em que a frente de contaminação é movimentada e no decréscimo do pico da concentração (ROWE, 2001). Nos parâmetros bio-físico-químicos tem-se a adsorção que são modelos físico-químicos que podem auxiliar na compreensão do comportamento de um metal no solo (SODRÉ et al., 2001). As isotermas de adsorção reproduzem a relação gráfica entre a concentração de metal adsorvida pela fase sólida e a solução do solo e podem disponibilizar informações sobre a capacidade de retenção e a força pela qual o adsorvato está preso ao solo (MOREIRA, 2004), permitindo a modelagem de transporte para avaliação da mobilidade dos elementos neste meio (HINZ, 2001). A adsorção pode ser mensurada através da determinação do parâmetro de distribuição ( $K_d$ ): um termo genérico, usado para descrever a distribuição dos constituintes entre as fases sólida e líquida do solo. Os valores de  $K_d$  para um determinado metal possuem uma elevada variabilidade quando determinado em diferentes locais, podendo alcançar uma magnitude de até 1000 vezes (VAN BEELEN et al., 2003), uma vez que o coeficiente de distribuição depende das propriedades do metal, dos atributos do solo e das condições experimentais.

Além da adsorção tem-se o fator de retardamento ( $R_d$ ) que é o que afere a adsorção. Tal efeito é denominado fator de retardamento ( $R_d$  ou  $R$ ) (FETTER, 1993). Desta forma é importante considerar na sorção o transporte em termos de retardamento dos contaminantes, que é representado pela razão entre a velocidade do fluido e a velocidade de transporte para o centro de massa do soluto reativo (FREEZE et al., 1979). Fator adimensional, que pode representar ainda, uma medida de capacidade de atenuação do solo em relação ao contaminante.

A técnica de solidificação e estabilização de contaminantes tem como objetivo limitar a solubilidade dos contaminantes e sua transferência por entre o solo quando em contato com um lixiviado, esse procedimento pode ser realizado *in situ* assim como *ex situ*, a partir de escavação e mistura (WILES, 1987).

A Federal Remediation Technologies Roundtable (FRTR, 2006) demonstra que a técnica de solidificação e estabilização tem como principal vantagem a transformação de um solo contaminado em um novo material com elevada resistência, o que possibilita seu emprego em obras de engenharia geotécnica.

A técnica quando realizada *ex situ*, envolve a escavação do solo, mistura do reagente com o solo, cura do solo, aterro ou reaterro do solo tratado. Já o processo *in situ* envolve a

injeção de materiais estabilizantes no solo para imobilizar os contaminantes evitando sua chegada no lençol freático (ROJAS, 2007).

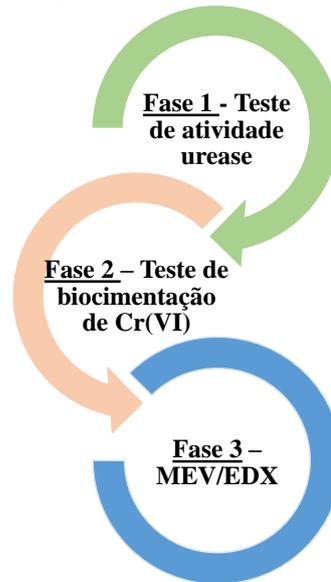
Os materiais usuais para o procedimento são cimento Portland e cal. O cimento geralmente apresenta resposta em um intervalo de tempo bem menor que a cal, visto que a sua cura se dá em menos tempo. Quimicamente, ambos agem de forma a alcalinizar o ambiente, elevando o pH e assim diminuindo a solubilidade dos contaminante e fisicamente, a cimentação das partículas do solo ocorre causando diminuição da mobilidade do contaminante do solo, não deixando migrar para o lençol freático (HEINECK et al, 2007).

Esse procedimento apresenta a grande vantagem de melhoramento da resistência dos solos, possibilitando usos futuros. No entanto, como desvantagem está o uso de quantidades elevadas de material para um bom resultado da técnica.

### 3 METODOLOGIA

A Figura 2 apresenta o fluxograma de execução da parte experimental da dissertação. Cada fase está explicada separadamente em itens.

Figura 2: Fluxograma de execução da dissertação.



#### 3.1 Materiais e equipamentos

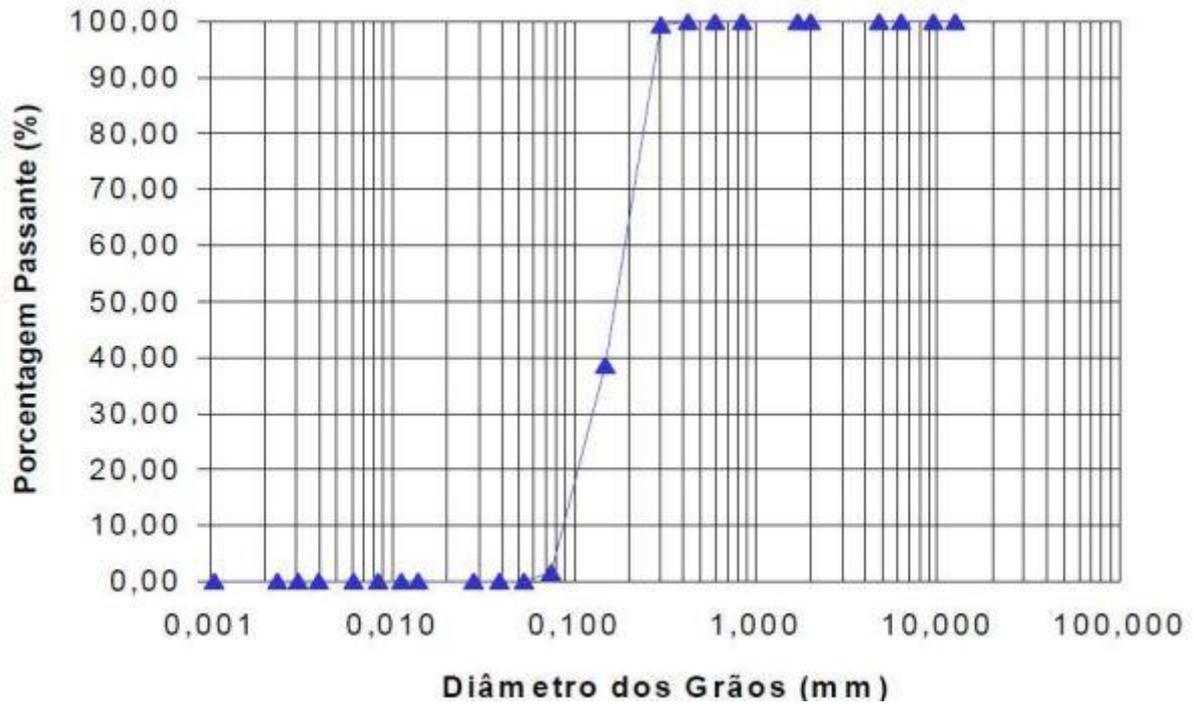
##### 3.1.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada nos Laboratório de Geotecnia Ambiental e Saneamento Ambiental no Centro Tecnológico (CETEC) e nos Laboratórios de Ensino de Engenharia Ambiental na Universidade de Passo Fundo, Campus I.

##### 3.1.2 Solo

O solo arenoso utilizado na pesquisa é proveniente da região costeira do Estado, do Município de Osório – RS. Segundo Spinelli (1999), é classificado como areia fina quartzosa. É caracterizado por ser uma areia fina (NBR 6502 – ABNT, 1995; ASTM D 2487, 1993) e de granulometria uniforme como apresentado na Figura 3. Além de apresentar baixo teor de matéria orgânica, sua composição mineralógica é de 99% de quartzo principalmente sendo o 1% composto de glauconita, ilmenita, turmalina e magnetita (SPINELLI, 1999).

Figura 3: Curva granulométrica da areia de Osório.



Fonte: CRUZ, 2008.

Na Tabela 3 abaixo estão apresentados os índices físicos do solo arenoso do Município de Osório como densidade dos grãos e índices de vazios de acordo com Fonini (2008).

Tabela 3: Índices físicos da areia de Osório.

<i>ÍNDICES FÍSICOS</i>	<i>AREIA DE OSÓRIO</i>
Densidade real dos grãos ( $\gamma_s$ )	26,3 kN/m <sup>3</sup>
Coefficiente de uniformidade ( $C_u$ )	2,1
Coefficiente de curvatura ( $C_c$ )	1,0
Diâmetro efetivo (D10)	0,09 mm
Índice de vazios ( $e$ máximo)	0,9
Índice de vazios ( $e$ mínimo)	0,6

Fonte: FONINI, 2008.

## 3.2 Métodos e técnicas

### 3.2.1 Primeira Fase

Na primeira fase do experimento foi realizada a avaliação da atividade urease no solo quando inseridas três diferentes soluções nutrientes no solo. Foram feitas 8 observações: duas com a Solução A, duas com a Solução B, duas com a Solução C e duas Controle, sem adição de meio nutriente. O Tempo 0 do ensaio não possui necessidade de reator, assim, resultando em 24 corpos de prova, 8 em cada tempo de observação (Tempos: 0, 5, 10, 15). Outros 24 corpos de prova foram montados, autoclavados e mantidos em ambiente estéril para avaliar se a atividade urease foi realizada biologicamente ou não, sendo esses resultados utilizados como Brancos. A variável de controle foi a composição das soluções nutrientes, já a variável de resposta foi o resultado da avaliação da atividade urease.

O ensaio foi realizado a partir de um protocolo criado por Steve Alisson em 2001 após várias tentativas sem resultados com outras metodologias conhecidas na bibliografia, como Tabatabai; Bremner (1972), May; Douglas (1975), Kandler; Gerber (1988) e Klose; Tabatabai (1999).

O protocolo utilizado baseia-se em duas metodologias para melhor adaptação do procedimento à amostras ambientais. As amostras são retiradas dos reatores e colocadas em frascos com solução tampão, depois são agitadas por pelo menos um minuto, são retiradas alíquotas e misturadas com solução de ureia e incubadas em mesa agitadora por duas horas a temperatura ambiente. Após as amostras são centrifugadas e misturadas com uma solução reagente de salicilato de sódio e dicloro que da cor a amostra na presença de  $\text{NH}_4^+$ . Depois disso as amostras devem ficar em repouso até desenvolver cor (30 min) para depois serem lidas em espectrofotômetro a 690 nm. A curva padrão é realizada a partir de um padrão de  $\text{NH}_4$  de 1000 ug/mL.

Nesta fase a variável de controle de ambos os ensaios foi a composição dos meios nutrientes utilizados para a bioestimulação e esterilização do ensaio ou não, já a variável de resposta foi a atividade urease medida em ug  $\text{NH}_4$ /h/g solo. Tem como objetivo principal medir a atividade urease em amostras ambientais como solo, amostra usada no estudo. Na metodologia tem-se descrito o preparo dos reagentes utilizados para a execução do método assim como o procedimento e os cálculos a serem realizados para encontrar a atividade de urease dos microrganismos na amostra.

A concentração de cálcio e ureia, como já apresentado, são fatores interferentes no processo de biocimentação. Gómez et al. (2013) utilizaram em seu estudo de campo, respectivamente 15 g/L e 13,875 g/L de ureia e cloreto de cálcio.

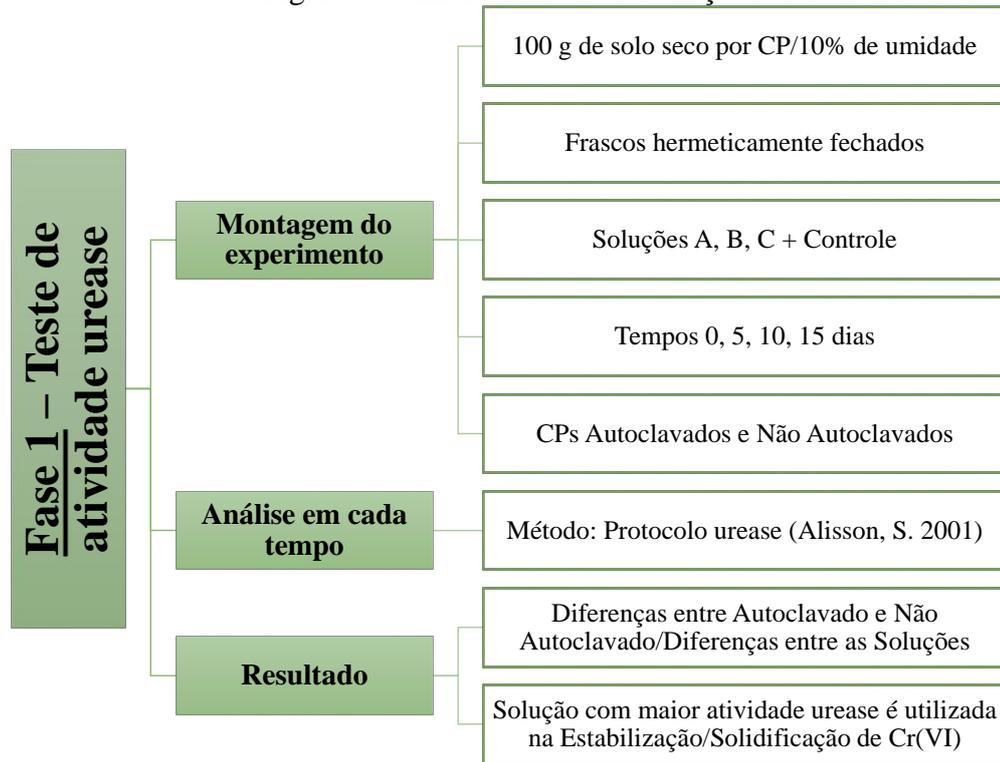
Foram utilizadas três soluções nutriente a base de ureia e o cloreto de cálcio como reagentes da reação de precipitação do carbonato de cálcio, nutrientes indispensáveis no processo. A composição das soluções nutrientes com as variações das quantidades de cloreto de cálcio e ureia estão apresentadas na Tabela 4. Foram utilizadas três soluções nutrientes, a Solução A já utilizada por Gómez et al. (2013) com bons resultados de biocimentação, a Solução B e C com diferenças apenas na concentração de cloreto de cálcio e ureia. A solução C já foi utilizada no Grupo de Pesquisa por Garbin (2016) e Pacheco (2016). Como o consumo de produtos químicos foi elevado na solução C, foi proposta sua modificação na Solução B com metade da concentração de cloreto de cálcio e ureia.

Tabela 4: Variação das soluções nutriente utilizadas na dissertação.

<b>SOLUÇÃO A - Gómez et al., 2013</b>	<b>SOLUÇÃO B - Garbin, 2016 MODIFICADO</b>	<b>SOLUÇÃO C - Garbin, 2016</b>
	10 g/L Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	10 g/L Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)
58,7 mg/L Caldo de nutrientes	2 g/L Peptona	2 g/L Peptona
	1 g/L Extrato de levedura	1 g/L Extrato de levedura
	2,12 g/L Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	2,12 g/L Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )
15 g/L Ureia [(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO]	15 g/L Ureia [(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO]	30 g/L Ureia [(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO]
13,875 g/L Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	28 g/L Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	56 g/L Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )

A Figura 4 apresenta de maneira resumida o que foi realizado e o andamento da primeira fase.

Figura 4: Primeira fase da dissertação.



### 3.2.2 Segunda Fase

A segunda fase da dissertação é a realização da biocimentação com o intuito de avaliar o encapsulamento de Cr(VI) no carbonato de cálcio precipitado. A solução nutriente a ser utilizada foi a que apresentou melhor resultado na primeira fase. Os corpos de prova foram moldados com 10 cm de altura e 5 cm de diâmetro com solo arenoso com índice de vazios de 0,75; densidade relativa de 50% e umidade inicial de 10%. Os reatores usados foram tubos de PVC com altura acima do corpo de prova por conta da alimentação de solução nutriente e água destilada. Além disso foi colocada uma geomanta no fundo do reator para evitar que a parte inferior do corpo de prova fosse carregada com a alimentação.

A contaminação realizada no solo para posterior aplicação da técnica de biocimentação foi de 10 mg/kg de solo seco de cromo hexavalente valor de intervenção (VI) para áreas industriais de acordo com os Valores orientadores para solo e água subterrânea da CETESB (2014).

Essa contaminação foi realizada no momento da moldagem dos corpos de prova com finalidade de deixar a contaminação homogênea para posterior aplicação da técnica de biocimentação. A umidade utilizada para a moldagem dos corpos de prova foi de 10% do valor total do peso de solo seco, ou seja, se o corpo de prova tivesse 100 g de solo seco, 10 g

de água seriam necessárias para a moldagem, nesse caso, água contaminada com cromo hexavalente.

Os corpos de prova passaram por alimentações intervaladas de 7 e 2 dias por percolação. Foram realizados 4 tratamentos com diferença na alimentação e intervalo entre alimentações, sendo eles: 1) Alimentado com água com intervalo de dois dias; 2) Alimentado com água com intervalo de 7 dias; 3) Alimentado com a solução nutriente C com intervalo de alimentação de dois dias e 4) Alimentado com solução nutriente C com intervalo de alimentação de sete dias. Após 28 dias, os corpos de prova foram retirados dos reatores e submetidos a análises de digestão alcalina de cromo hexavalente e análise colorimétrica de cromo hexavalente, tanto nos corpos de prova como nos lixiviados coletados durante o período de ensaio.

Durante o ensaio no dia após a alimentação dos corpos de prova, o lixiviado passado pelo corpo de prova foi coletado para análise de cromo hexavalente pelo método da EPA 7196a para o acompanhamento da concentração de cromo hexavalente lixiviada durante o processo de biocimentação para que ao final do ensaio pudesse ser realizado o cálculo de retenção do contaminante pelo carbonato de cálcio precipitado.

Na Figura 5 está apresentado um esquema da montagem do experimento de biocimentação, o qual ficou instalado na bancada do laboratório de Geotecnia Ambiental do CETEC na Universidade de Passo Fundo com temperatura controlada de 25°C.

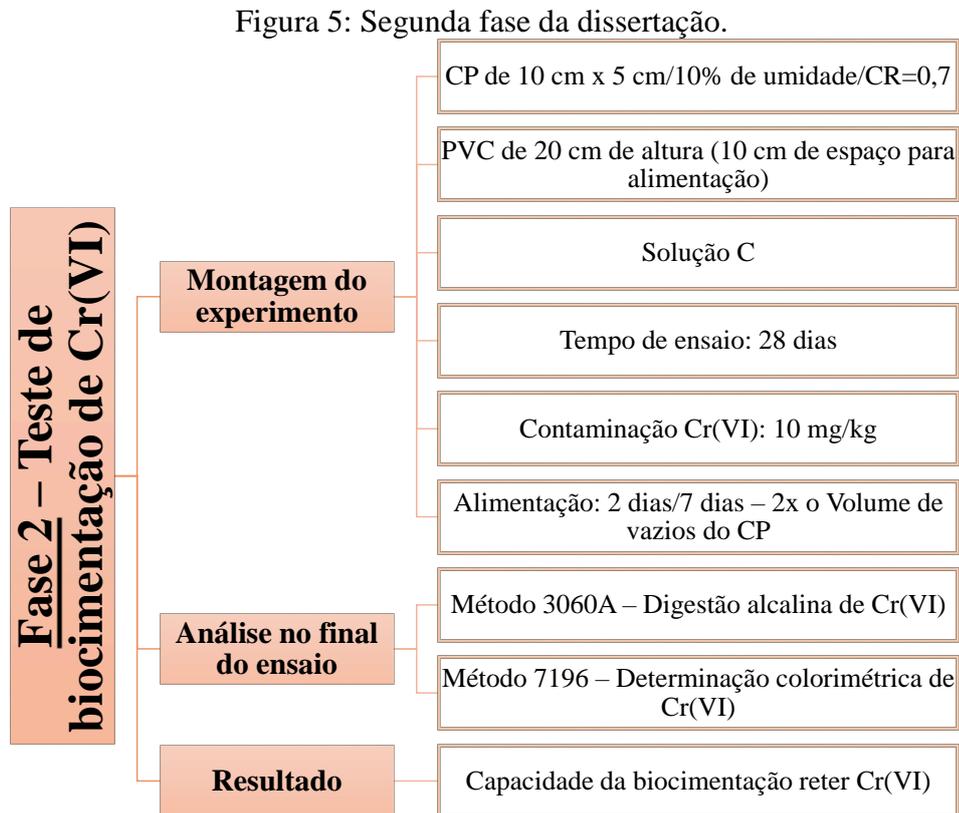
Após o final da aplicação da técnica de biocimentação foi realizado ensaio de digestão alcalina de cromo hexavalente com amostras retiradas dos corpos de prova com o intuito de avaliar a capacidade de solidificação e estabilização do contaminante através da concentração remanescente no corpo de prova.

Esse ensaio é realizado seguindo o Método 3060a da EPA. O método consiste na retirada de 2,5 g de solo do corpo de prova, essa retirada de amostra foi realizada em triplicata para cada corpo de prova. Após isso foi feita a digestão da amostra com solução digestora e aquecimento por um determinado tempo. Quando as amostras atingem temperatura ambiente, são filtradas, acidificadas, filtradas novamente e tem-se a digestão extraída. Depois de extraídas as digestões, foi realizado o ensaio de determinação colorimétrica de Cr(VI) a partir do método da EPA 7196a.

Foi realizada também a determinação de Cr(VI) a partir do método da EPA 7196a. Esta Norma descreve o método colorimétrico para determinação de Cr (VI) para amostras com concentrações maiores de 0,5 até 50 mg Cr<sup>6+</sup>/L. Esse método foi utilizado na determinação de cromo hexavalente nas amostras finais da digestão alcalina de cromo

hexavalente realizado no solo dos corpos de prova. Além disso, esse método foi utilizado também na análise do lixiviado coletado no decorrer do ensaio de biocimentação.

A segunda fase está apresentada esquematicamente na Figura 5.



### 3.2.3 Terceira Fase

Já a terceira fase foi a avaliação morfológica do solo posterior ao ensaio de biocimentação. O solo foi preparado e encaminhado para a leitura em MEV/EDX na Universidade de Passo Fundo.

#### 3.2.3.1 MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento utilizado para análise micro estrutural de materiais sólidos. Apesar de ser um equipamento complexo, fornece resultados bons e de fácil interpretação. Esses resultados são imagens de alta resolução que são captadas por um computador ligado a ele. O aumento máximo desse microscópio pode chegar de 2 a 5 nm com alta resolução da imagem obtida.

As amostras enviadas para o MEV foram retiradas do corpo de prova após a finalização do ensaio de biocimentação e ensaio de lixiviação e solubilização, as amostras devem estar desestruturadas, mede-se 1 g desse solo coloca-se em cápsulas e se coloca em estufa para secar por 72 h a 40°C. Essa secagem é necessária para que a tensão superficial da amostra seja igual a zero e não interfira na leitura da amostra.

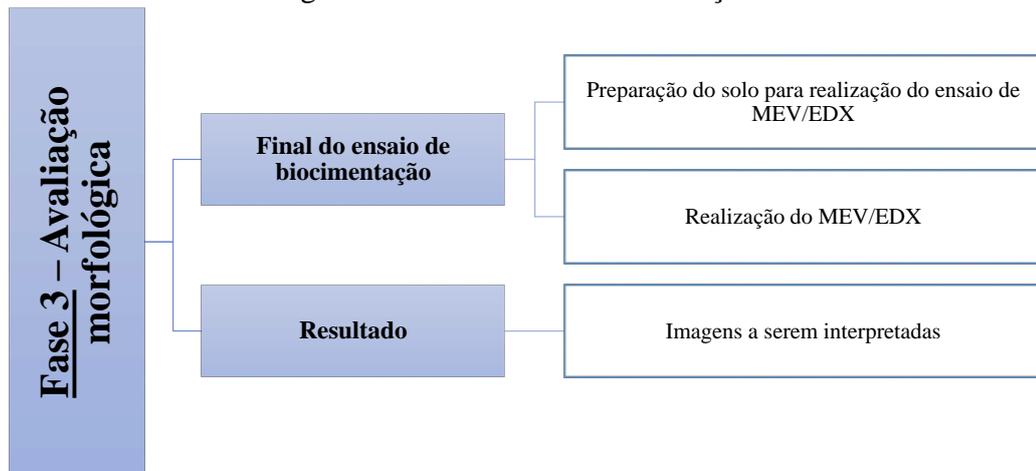
Depois de secas as amostras elas foram encaminhadas ao laboratório de MEV (Microscopia eletrônica de varredura) para leitura. Anteriormente à leitura em MEV/EDX, as amostras devem serem recobertas com íons de ouro para melhor condutividade e precisão na leitura dos elementos contidos na amostra. Esse recobrimento é realizado com um Sistema de revestimento automático com bomba rotativa, equipamento da Quorum Technologies.

Depois de finalizado o revestimento das amostras com ouro, essas amostras são posicionadas na câmara do equipamento de leitura de MEV e EDX. O modelo do equipamento encontrado na Universidade de Passo Fundo é o VEGA3 da TESCAN. Esse equipamento oferece rápida aquisição de imagens e sistema de varredura ultrarrápido de elementos. Cada amostra passa pelo MEV primeiramente, análise da estrutura da amostra, posteriormente é realizada a varredura de EDX para que se possam ser identificados os elementos na amostra. O resultado obtido desse ensaio são imagens ampliadas da amostra, além disso, mapas de composição de elementos, apresentados a seguir. Um empecilho encontrado nessa análise é que o equipamento não realiza leitura de elementos com massa atômica menor que 12, dificultando visualização de carbonato.

O uso em conjunto do EDX com o MEV é de grande importância para caracterização qualitativa de compostos em um material. Enquanto o MEV proporciona nítidas imagens, o EDX permite sua imediata identificação. Além da identificação mineral, o equipamento ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando mapas composicionais de elementos desejados (DEDAVID, 2007).

A terceira fase da dissertação está descrita na Figura 6.

Figura 6: Terceira fase da dissertação.



#### 3.2.4 Tratamento de dados

Os dados obtidos serão analisados através de Análise de Variância (ANOVA) e depois será feito teste comparativo Tukey, trabalhando com  $\alpha \geq 95\%$  ( $p < 0,05$ ), para comparar as médias entre os tratamentos sendo utilizado o software Statistica.

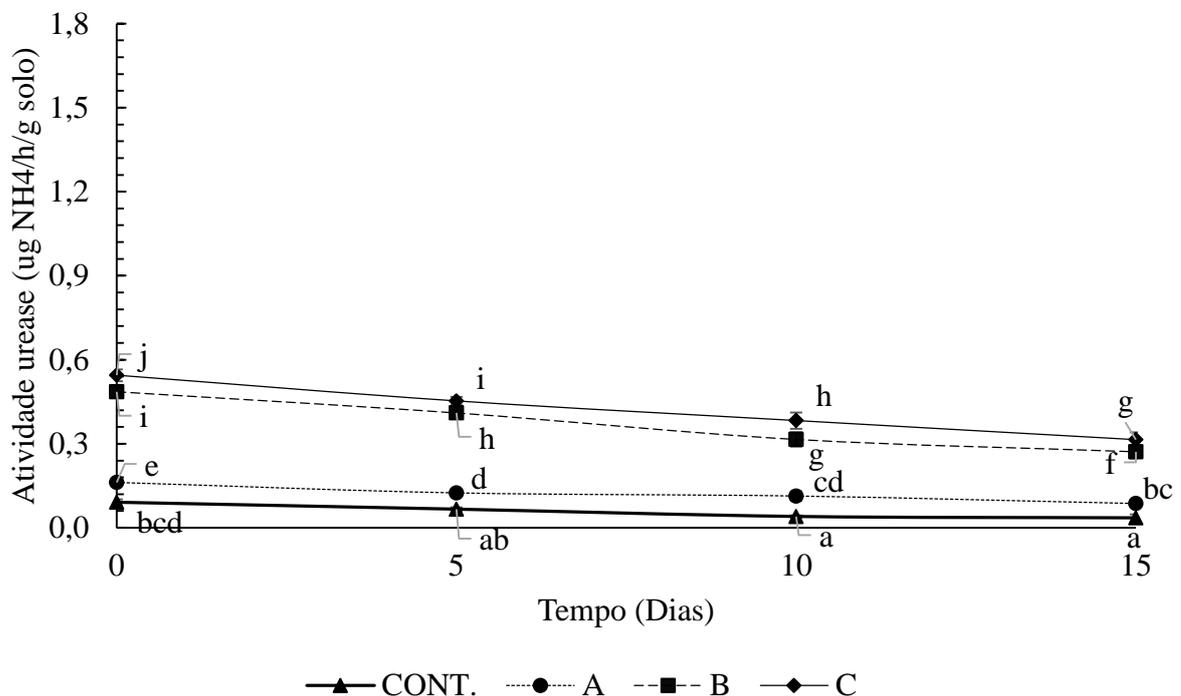
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Primeira Fase

Após o acompanhamento pelos Tempo de ensaio (15 dias) foi possível saber se a biocimentação foi realizada a partir de microrganismos, ou se foi um processo puramente químico no interior dos corpos de prova, além disso, mostrou qual das soluções nutriente utilizadas apresentou maior atividade urease sendo a melhor para ser utilizada para processos de biocimentação.

Na Figura 7 estão representados os valores da atividade urease para o ensaio autoclavado, considerado como Branco para a primeira fase da dissertação, como o ambiente é estéril significa que não existem microrganismos ali, então não existe atividade microbiana. Esse ensaio teve todo o material esterilizado em autoclave, além disso, foi montado em capela de fluxo laminar com finalidade de evitar contaminação cruzada de microrganismos exógenos, não nativos.

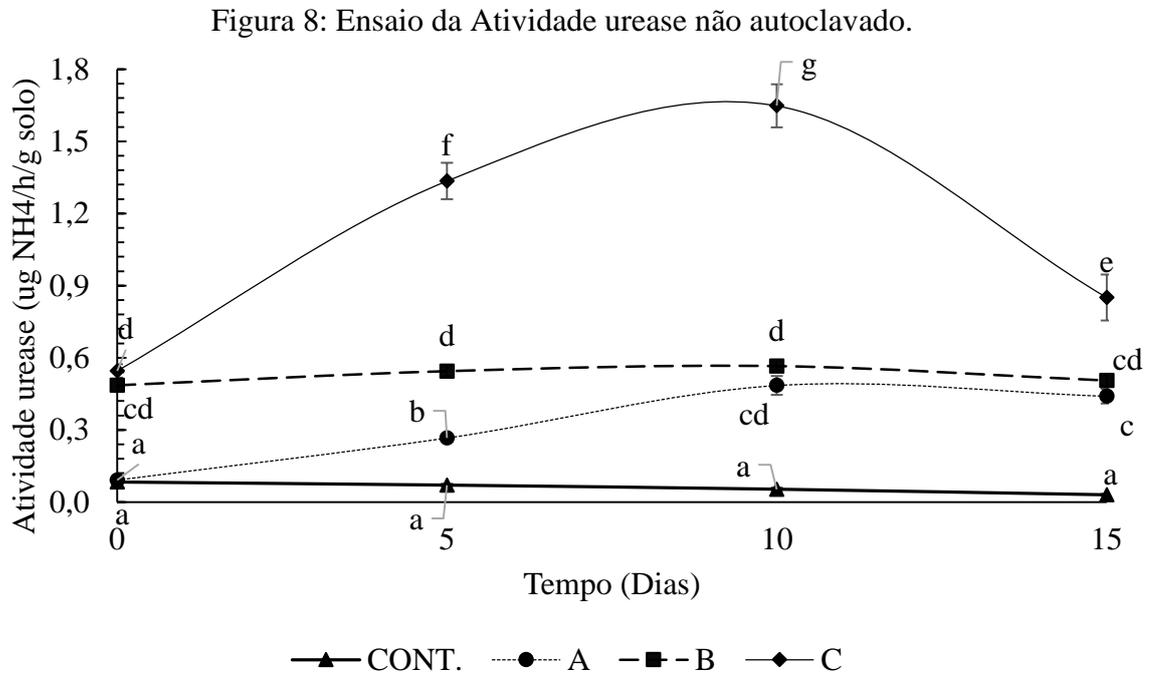
Figura 7: Ensaio Branco da primeira fase da dissertação.



Letras iguais apresentam igualdade estatística entre os resultados. Análise estatística foi realizada pelo teste Tukey no software Statistica com intervalo de confiança de 95%.

Pode-se observar a partir da Figura 7, o decaimento de  $\text{NH}_4$  medido ao longo do tempo. Considera-se essa atividade como sendo química.

Na Figura 8 estão apresentados os resultados para a atividade urease do ensaio não autoclavado, ou seja, com a presença de microrganismos nativos e moldado em bancada diferente do ensaio autoclavado.



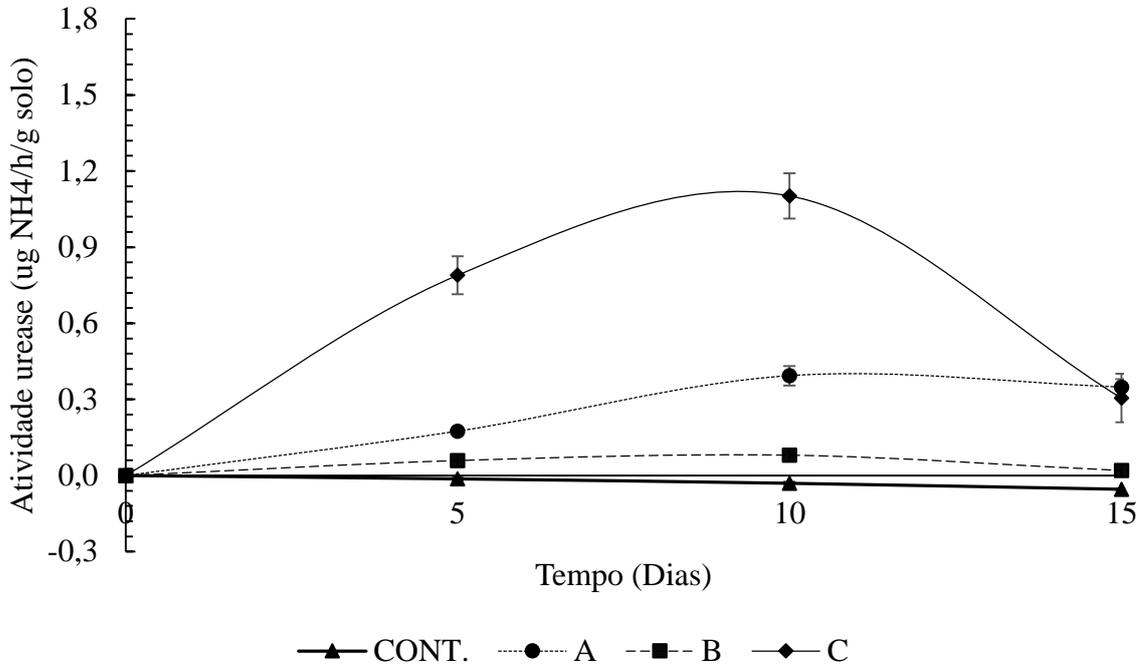
Letras iguais apresentam igualdade estatística entre resultados. A análise foi realizada por teste Tukey no software Statistica com intervalo de confiança de 95%.

Na Figura 8 pode se observar que assim como no ensaio Branco a solução nutriente C se destacou, seguida da solução nutriente B, solução A e Controle. Os corpos de prova Controle apresentaram o mesmo comportamento do ensaio autoclavado, mostrando a necessidade de inserção de substrato específico para a realização de hidrólise da ureia pelos microrganismos nativos, necessária para que posteriormente ocorra a biocimentação. A solução nutriente B apresenta comportamento de atividade constante em todo o tempo de ensaio, enquanto isso, as soluções A e C apresentam pico de atividade no tempo dez dias. No entanto, a solução C apresenta maior atividade, sendo considerada a solução mais eficiente nesse estudo para a realização da biocimentação.

Comparando com os resultados do ensaio autoclavado, pode-se observar que os resultados possuem valores semelhantes no tempo 0 dias, levando a crer que a atividade medida nesse tempo é totalmente química, não auxiliada por microrganismos. Assim, para o ensaio não autoclavado, foram subtraídos os valores encontrados para o restante do ensaio

pelo tempo 0 dias, para assim obter a real atividade urease realizada a partir de microrganismos. A Figura 10 apresenta esses resultados.

Figura 9: Resultado real de atividade urease realizada por microrganismos no ensaio não autoclavado.



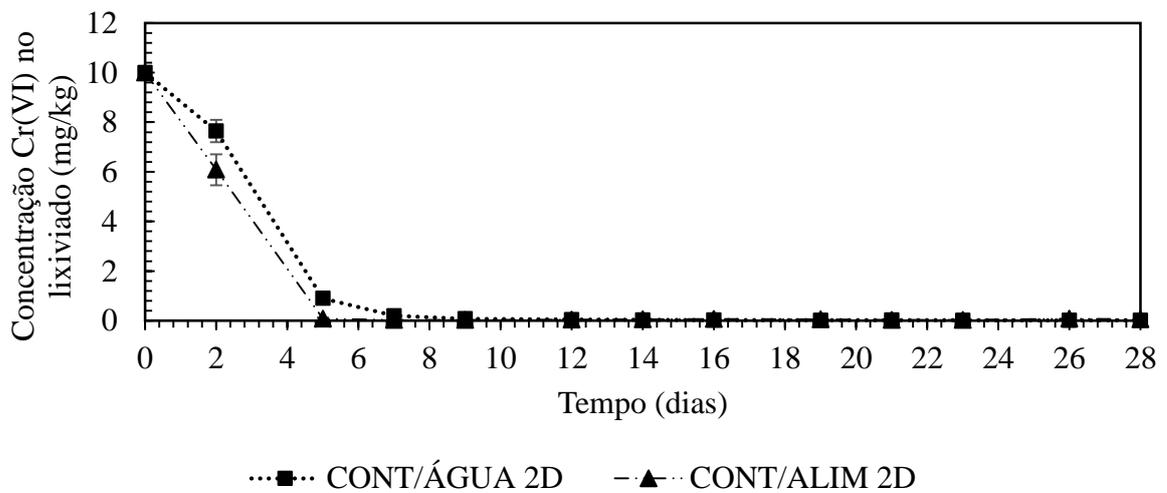
Além de ter se mostrado como a solução mais eficiente para biocimentação nesse estudo por ter maior atividade comparada com as outras soluções, a solução C apresentou pico de atividade urease no tempo 10 dias. Isso implica diretamente no intervalo de alimentação de nutrientes aos corpos de prova na biocimentação. Se observa que o resultado da atividade urease em tempo 2 dias no ensaio não autoclavado, sua atividade é muito mais baixa do que a atividade encontrada no tempo 10 dias. Dessa maneira, a partir desses dados pode-se afirmar que teoricamente a biocimentação não precisa de intervalos de alimentação muito curtos, o que poderia comprometer os microrganismos (IVANOV; CHU, 2008), interferindo no processo de biocimentação. Foram adotados para a segunda fase da dissertação intervalos de alimentação de 2 dias (2D), mesmo intervalo utilizado por Garbin (2016) e 7 dias (7D) ficando próximo do pico de atividade urease da solução nutriente C.

## 4.2 Segunda Fase

Nas Figuras 10 e 11 estão apresentados os decaimentos da concentração de cromo hexavalente nos lixiviados coletados durante o ensaio de biocimentação. Na Figura 10 estão

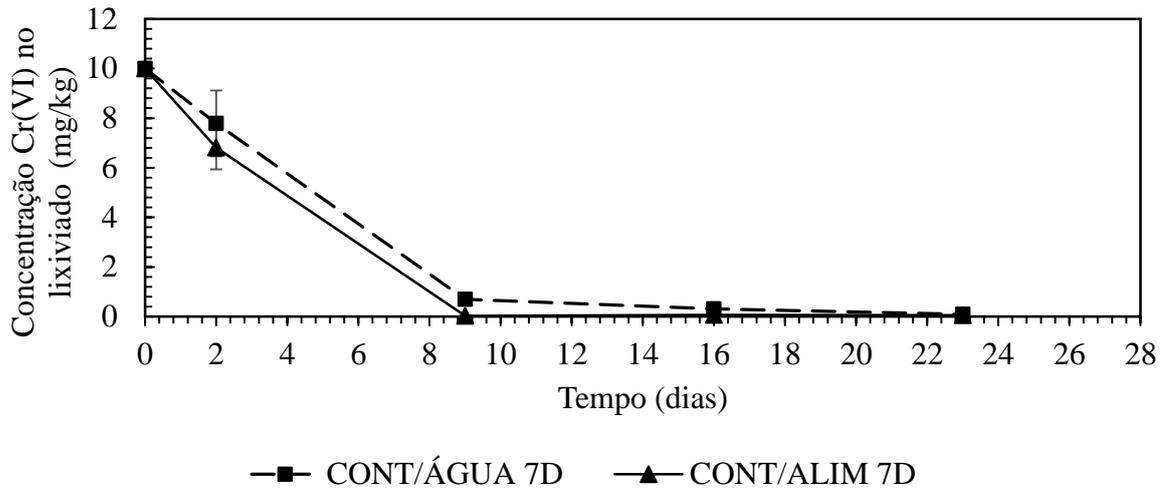
representados os decaimentos para os corpos de prova com intervalo de alimentação de 2 dias, tanto para água destilada quanto para alimentação com solução nutriente. Pode-se observar que a partir da segunda alimentação a concentração de cromo hexavalente encontrada no lixiviado passa a ser abaixo de 1 mg/kg e é constante até o final do ensaio de biocimentação. As concentrações foram convertidas para mg/kg para melhor observação da concentração de contaminação inserida no corpo de prova e contaminação lixiviada.

Figura 10: Decaimento da concentração de cromo hexavalente encontrada no lixiviado 2D.



Na Figura 11 estão apresentados os decaimentos da concentração de cromo hexavalente para os corpos de prova com intervalos de alimentação de 7 dias. Pode-se observar comportamento semelhante de decaimento aos corpos de prova 2D (dois dias de intervalo), ou seja, a partir da segunda alimentação a concentração já se encontra abaixo de 1 mg/kg e permanece constante até o final do ensaio. Para os corpos de prova com intervalo de alimentação de 7 dias (7D), essa concentração abaixo de 1 mg/kg se encontra entre os tempos 8 e 10 dias, enquanto nos corpos de prova 2D, se encontra no intervalo de tempo 4 a 6 dias.

Figura 11: Decaimento da concentração de cromo hexavalente encontrada no lixiviado 7D.



A partir dos resultados de concentração do lixiviado coletado durante o ensaio (Figuras 10 e 11), e o valor inicial de concentração foi possível calcular a concentração de cromo hexavalente remanescente no corpo de prova com o decorrer das alimentações no ensaio. Nas Figuras 12 e 13 estão apresentados os gráficos de concentração de cromo hexavalente remanescente nos corpos de prova após a análise dos lixiviados.

Figura 12: Concentração remanescente de cromo hexavalente nos corpos de prova 2D encontrada a partir do valor extraído no lixiviado.

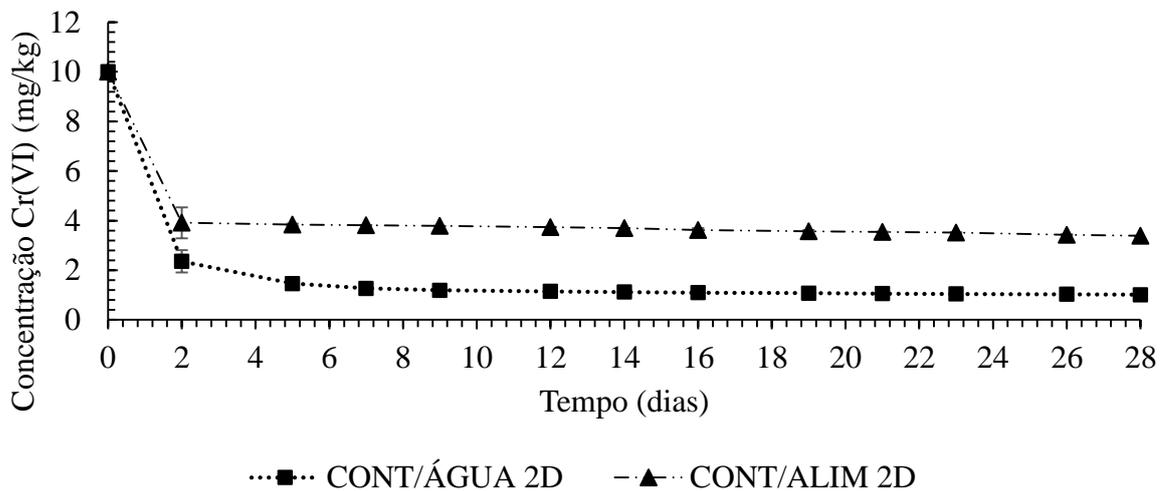
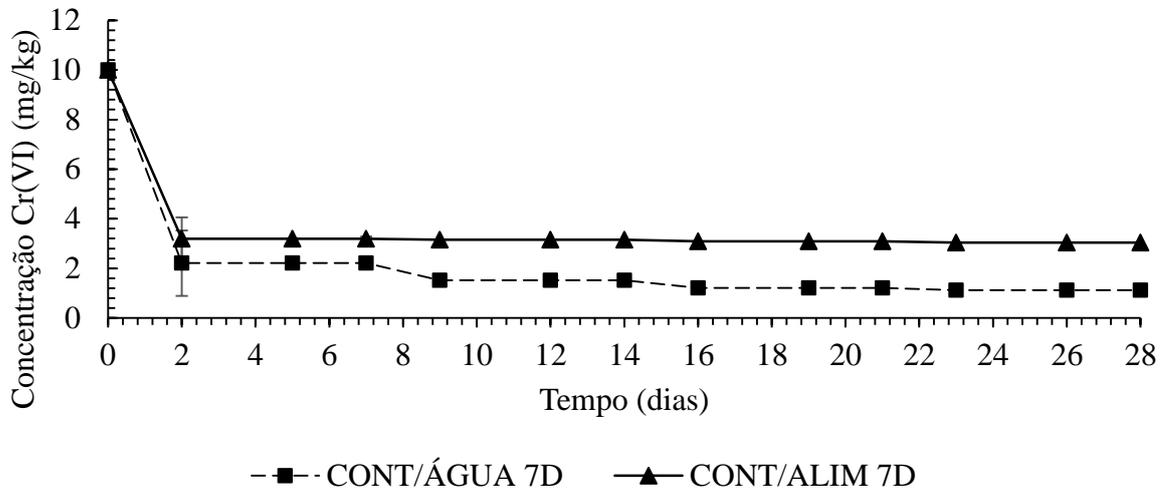
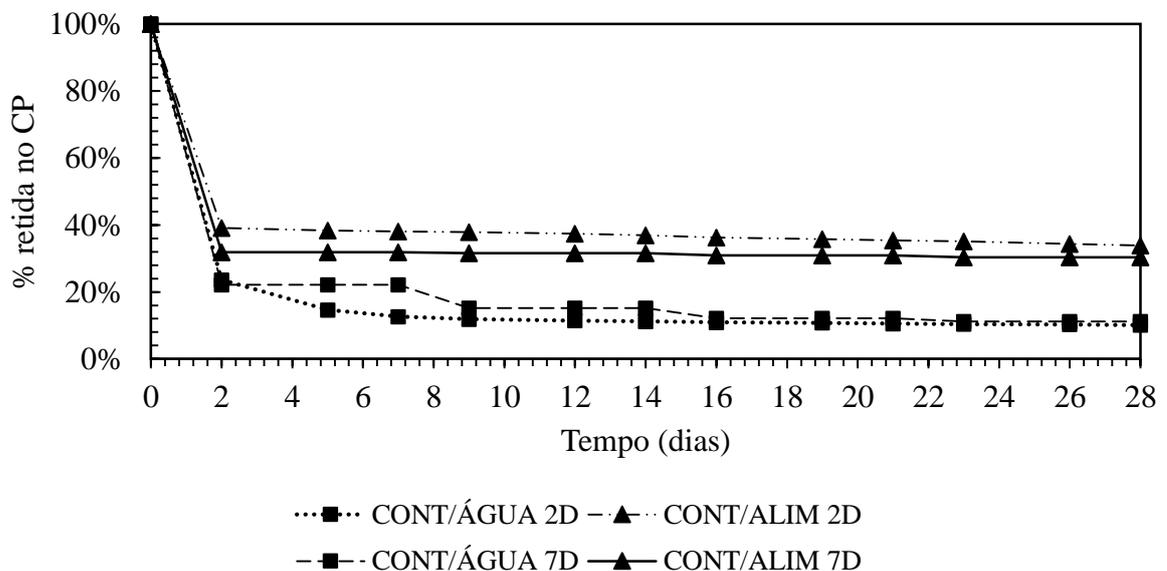


Figura 13: Concentração remanescente de cromo hexavalente nos corpos de prova 7D encontrada a partir do valor extraído no lixiviado.



Com base nos resultados apresentados podemos afirmar que independente do tempo de ensaio, as maiores concentrações remanescentes são nos corpos de prova alimentados com solução nutriente. Para melhor comparação a Figura 14 mostra todos os tratamentos com a concentração remanescente em porcentagem após a análise dos lixiviados, sendo a porcentagem final retida de contaminante no corpo de prova para cada tratamento: CONT/ÁGUA 2D: 10,11%; CONT/ALIM 2D: 33,83%; CONT/ÁGUA 7D: 11,16% e CONT/ALIM 7D: 30,37%.

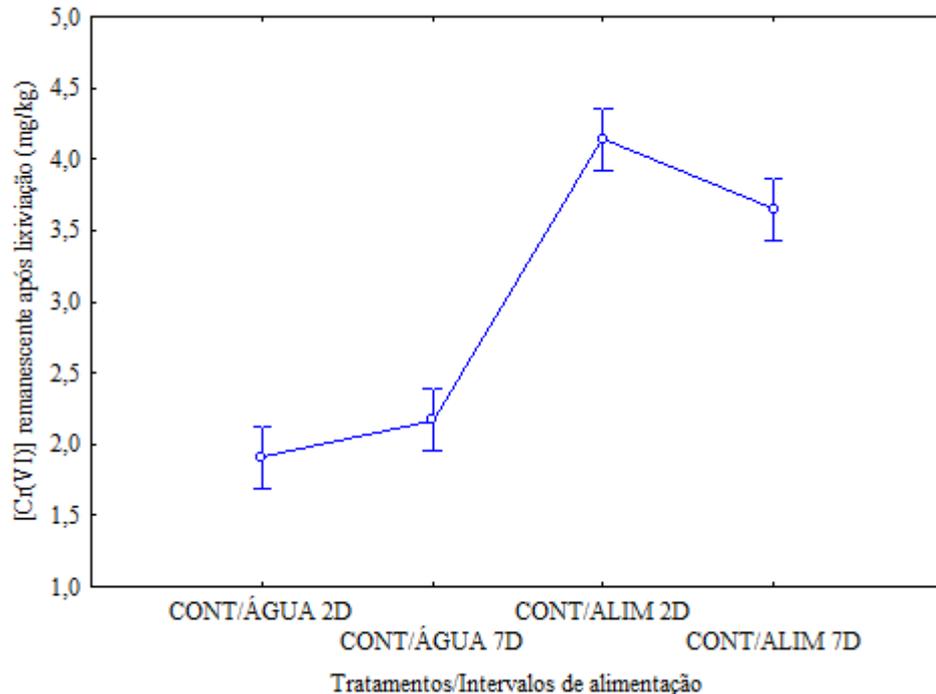
Figura 14: Porcentagem remanescente de cromo hexavalente nos corpos de prova, encontrada a partir da concentração extraída do lixiviado.



Baseado nisso pode-se afirmar que os corpos de prova alimentados com solução nutriente e com intervalo de 2D (2 dias) são mais eficientes na retenção de cromo hexavalente, retendo aproximadamente os valores de intervenção para área residencial de acordo com os Valores orientadores para solo e água da CETESB (2014), enquanto os corpos de prova alimentados com água retiveram valores próximos de 1 mg/kg, o que nos mostra que a contaminação foi carreada nas alimentações.

As concentrações finais na análise de lixiviação nos mostram que em cada tratamento teve como concentração remanescente final no corpo de prova para o CONT/ÁGUA 2D: 1,01 mg/kg; CONT/ÁGUA 7D: 1,12 mg/kg; CONT/ALIM 2D: 3,38 mg/kg e para o tratamento CONT/ALIM 7D: 3,04 mg/kg.

Figura 15: Análise estatística do lixiviado coletado.



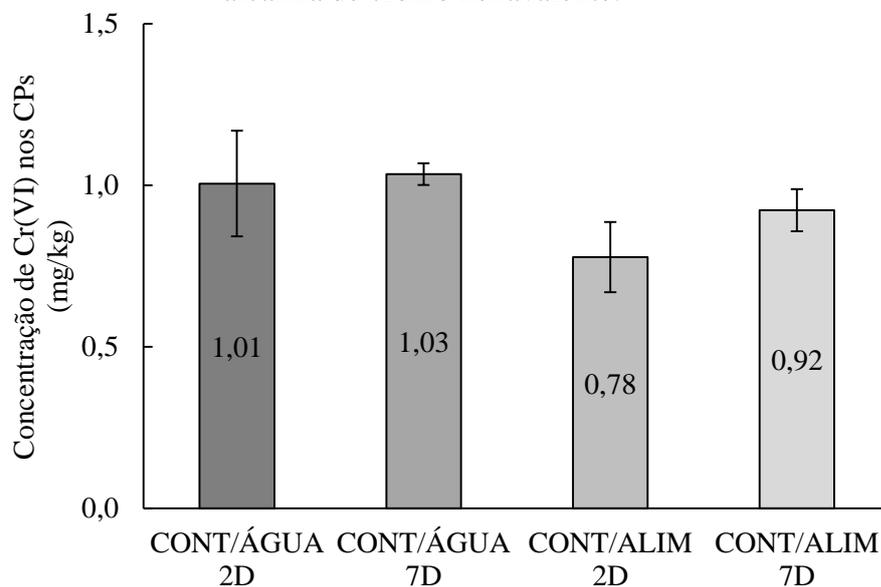
A Figura 15 apresenta a análise estatística realizada ao final das análises do lixiviado, com os resultados de concentração de contaminação remanescente nos corpos de prova. A partir dela podemos observar que os tratamentos alimentados com água, independente do intervalo de alimentação são considerados estatisticamente iguais. Já os tratamentos com alimentação por solução nutriente apesar de muito próximos, são considerados estatisticamente diferentes. Pode-se observar que o tratamento com alimentação por solução nutriente com intervalo de 2 dias é melhor em resultados comparando com o tratamento com intervalo de 7 dias. Isso pode ter ocorrido por conta da concentração acumulada de solução

nutriente no corpo de prova. No entanto, como existe um acúmulo maior de solução nutriente no corpo de prova, a precipitação de carbonato de cálcio pode ter sido de origem química apenas.

Ainda como resultados da segunda fase, foi realizada análise de cromo hexavalente no solo dos corpos de prova a partir da digestão alcalina e colorimetria. Esses resultados nos mostram quanto do contaminante que está no solo. A partir desse e com os valores das concentrações remanescentes encontradas na análise dos lixiviados é possível estabelecer um balanço de massa para descobrir o que foi encapsulado pela biocimentação ou precipitação de carbonato de cálcio.

Na Figura 16 estão apresentadas as concentrações extraídas dos corpos de prova a partir de digestão alcalina. Nesse processo, o contaminante retido na biocimentação não é extraído, pois a digestão alcalina não quebra a formação de biocimento no corpo de prova, assim, o que é extraído, é o contaminante que se encontra livre no corpo de prova. A partir disso, realizando um balanço de massa pode-se observar o que foi lixiviado, o que ficou livre no corpo de prova, além disso o que ficou contido na biocimentação.

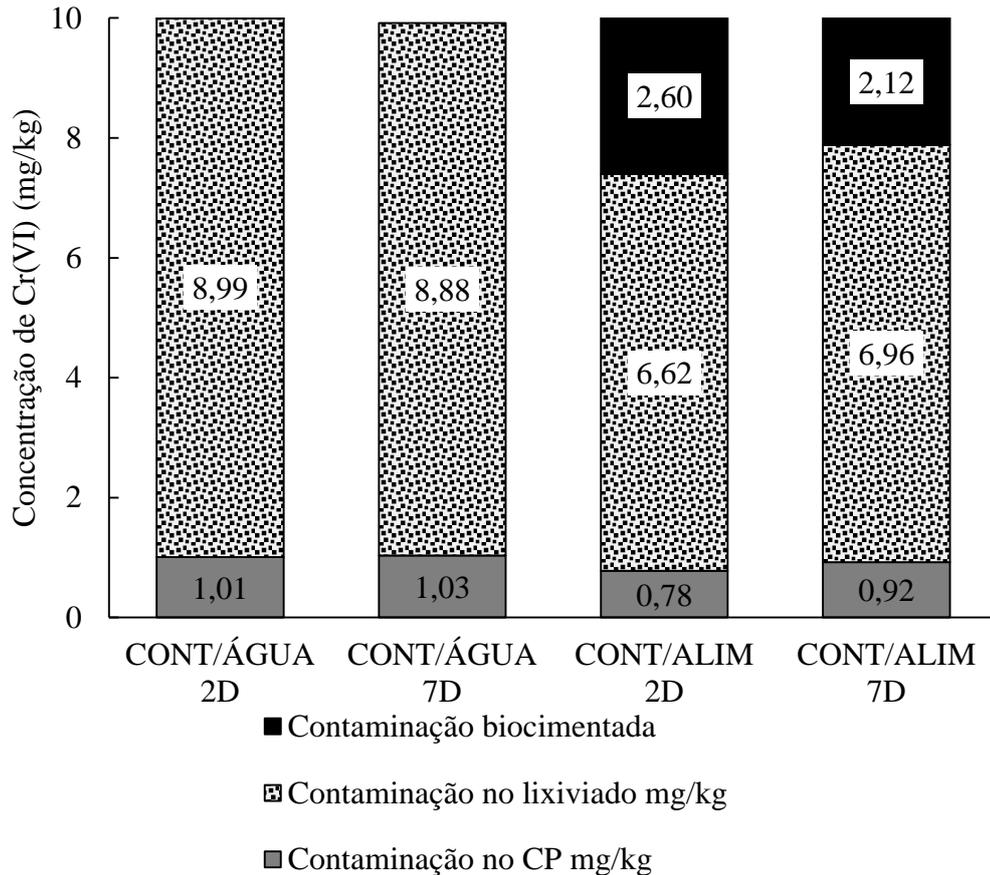
Figura 16: Concentração de contaminante extraído do solo dos corpos de prova pela digestão alcalina de cromo hexavalente.



Pode-se observar que os valores encontrados para os tratamentos alimentados com água são muito próximos, além disso, esses valores ficaram muito próximo do estimado a partir dos valores encontrados na análise do lixiviado, enquanto os valores finais encontrados para os corpos de prova alimentados com solução nutriente ficaram distintos, assim,

considerando que essas concentrações se encontram retidas na biocimentação, já que temos os valores encontrados no lixiviado e no corpo de prova. A partir desses valores foi possível realizar o balanço de massa apresentado a seguir.

Figura 17: Balanço de massa da contaminação inserida no corpo de prova e retirada no lixiviado e análise final dos corpos de prova.



Nesse balanço pode-se afirmar que a porção não extraída na análise de digestão alcalina foi encapsulada pelo biocimento. Apesar de no tratamento com alimentação com água em intervalo de 7 dias se observar uma porção não extraída, é muito baixa e pode ser considerada perda no decorrer do ensaio.

Apesar de ter ocorrido o encapsulamento de contaminante por biocimentação, tanto nos corpos de prova alimentados em intervalos de 2 dias, assim como os de 7 dias, a concentração retida foi baixa, enquanto a maior taxa de concentração foi lixiviada, apontando a baixa eficiência de biocimentação com alimentação dos corpos de prova por percolação, fazendo com que, em caso aumento de escala, a pluma de contaminação seja espalhada com a alimentação e não biocimentada.

### 4.3 Terceira Fase

Ao final do ensaio de biocimentação realizado na segunda fase do experimento, além dos ensaios realizados no laboratório para obter concentrações de cromo hexavalente (contaminante) nas amostras, foi realizado o ensaio de MEV/EDX.

A Tabela 5 mostra a rotulação das amostras colocada pelo laboratorista de MEV/EDX, para facilitar a identificação das amostras no equipamento utilizado, no entanto, não ficaram na ordem de apresentação utilizada no trabalho.

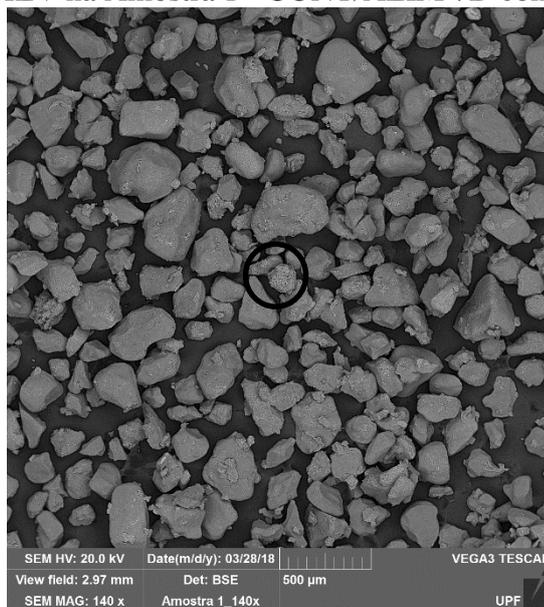
Tabela 5: Rotulação das amostras enviadas para o ensaio de MEV/EDX

Nome da amostra no MEV	Nome real da amostra
Amostra 1	CONT/ALIM 7D
Amostra 2	CONT/ÁGUA 7D
Amostra 3	CONT/ÁGUA 2D
Amostra 4	CONT/ALIM 2D

#### 4.3.1 Amostra 1 – CONT/ALIM 7D

A primeira amostra a ser observada foi a CONT/ALIM 7D. A seguir estão apresentadas as imagens obtidas na ampliação da amostra, nas legendas estão apresentadas a quantidade de vezes que a amostra foi ampliada.

Figura 18: Análise de MEV na Amostra 1 - CONT/ALIM 7D com aumento de 140 vezes.



O círculo preto na Figura 18 mostra o local onde foi feito o aumento em 1500 vezes, apresentado a seguir.

Figura 19: Análise de MEV na Amostra 1 - CONT/ALIM 7D com aumento de 1500 vezes.

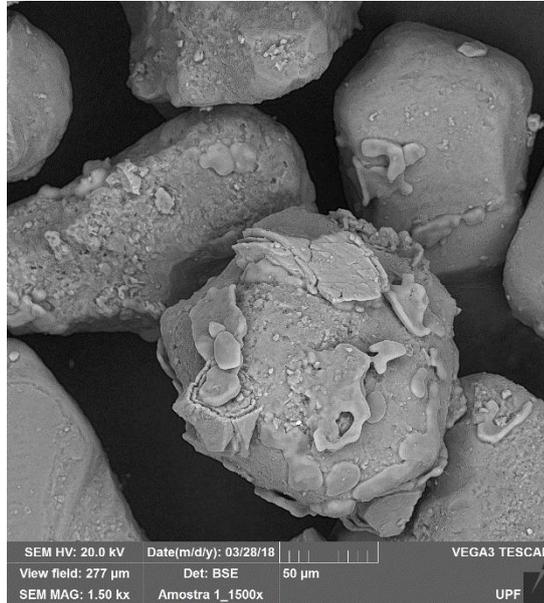


Figura 20: Análise de MEV na Amostra 1 - CONT/ALIM 7D com aumento de 5000 vezes.



As Figuras 18 a 20 apresentaram os resultados de imagem de MEV para a amostra CONT/ALIM 7D. A partir delas podemos observar formação de uma crosta ao redor da partícula de areia que pode ser atribuída a formação de carbonato de cálcio precipitado no

corpo de prova. Pode-se observar a partir da primeira análise com aumento de 140 vezes (Figura 19), a formação de pequenos grumos na superfície das partículas de areia, essa formação fica mais evidente com o aumento da imagem.

Nas Figuras 21 e 22 estão apresentados os resultados encontrados com o EDX, componente do MEV que identifica a composição química da amostra. São apresentados primeiramente o mapa de composição e cada camada e depois o espectro de soma desses mapas, para cada elemento.

Figura 21: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 1.

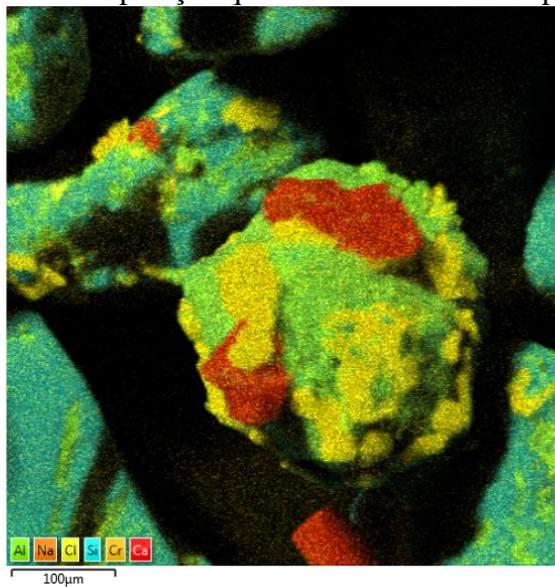
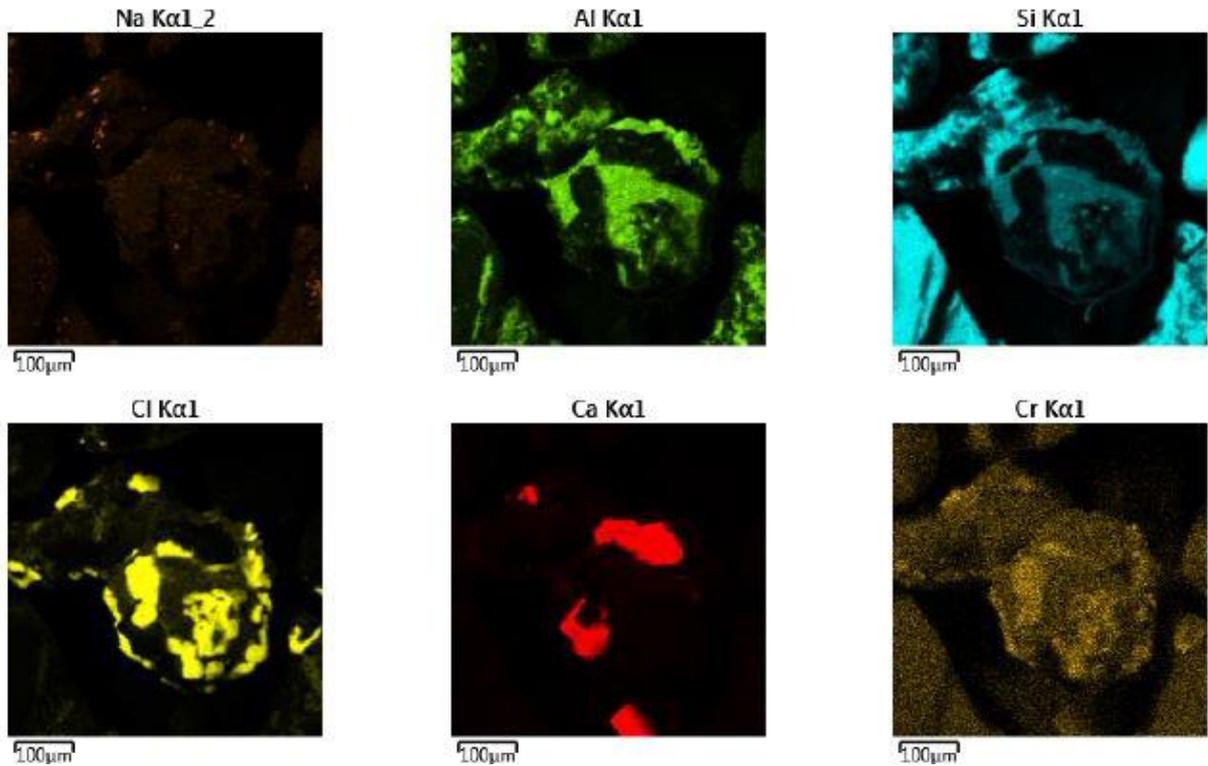
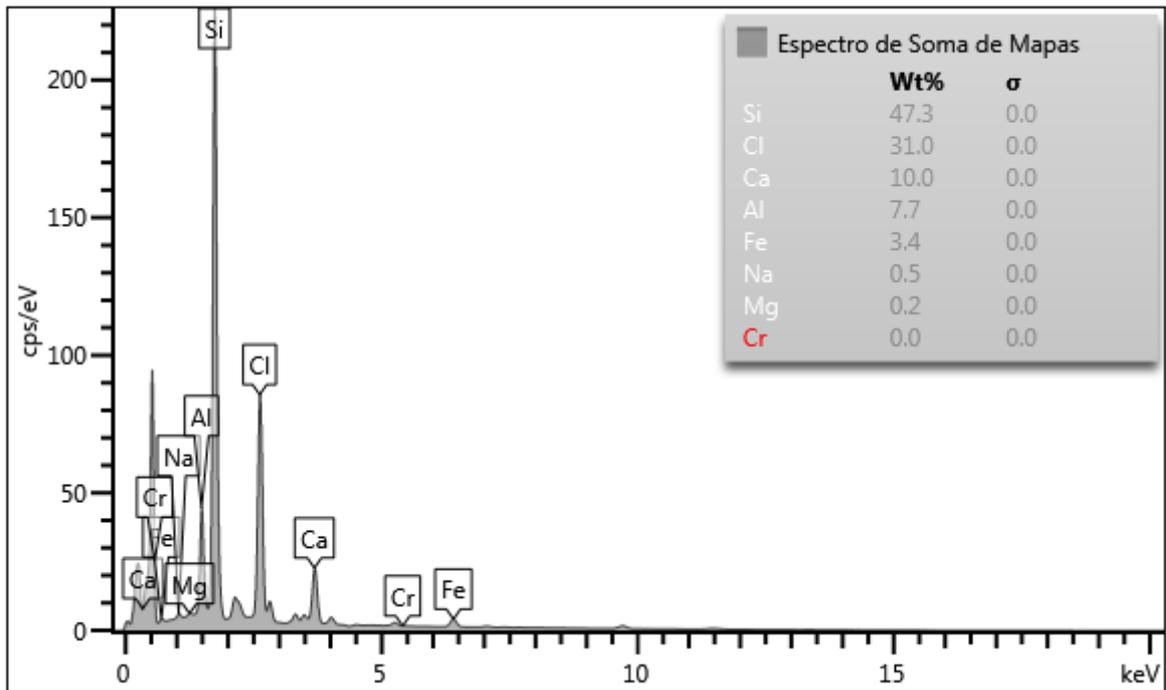


Figura 22: Identificação das camadas da composição química da Amostra 1.



A partir das Figuras 21 e 22 pode-se observar que visualmente existe cromo na amostra, além disso, apesar de o equipamento não identificar carbono e oxigênio, é possível observar cálcio na amostra, produto da biocimentação que foi inserido como componente na solução nutriente.

Figura 23: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 1.

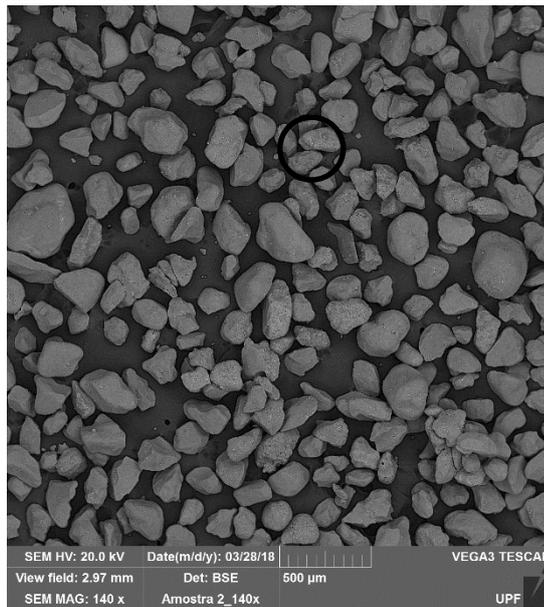


Na Figura 23 está apresentado o espectro de soma do elementos, ou seja, a partir da análise o equipamento calcula em porcentagem, aproximadamente o que está contido na amostra. Apesar de ser observado nas camadas do mapa, o cromo não tem porcentagem na amostra, podendo ser um erro, ou por se apresentar encoberto na amostra por outros elementos.

#### 4.3.2 Amostra 2 – CONT/ÁGUA 7D

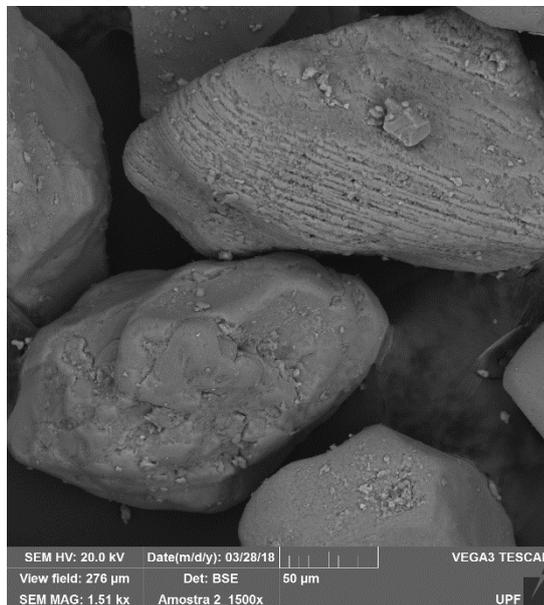
A segunda amostra a ser observada foi a CONT/ÁGUA 7D. Estão apresentadas nesse item as imagens obtidas na ampliação da amostra, além da quantidade de vezes que foi ampliada.

Figura 24: Análise de MEV na Amostra 2 - CONT/ÁGUA 7D com aumento de 140 vezes.



O círculo preto na Figura 24 mostra o local onde foi feito o aumento em 1500 vezes, apresentado a seguir.

Figura 25: Análise de MEV na Amostra 2 - CONT/ÁGUA 7D com aumento de 1500 vezes.



As Figuras 24 e 25 apresentaram os resultados de imagem de MEV para a amostra CONT/ÁGUA 7D. A partir delas podemos observar que não existe formação de crosta em nenhuma das imagens, ao contrário da Amostra 1, alimentada com solução nutriente.

A seguir estão apresentados os resultados encontrados com o EDX. São apresentados primeiramente o mapa de composição e cada camada e depois o espectro de soma desses mapas, para cada elemento encontrado na Amostra 2.

Figura 26: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 2.

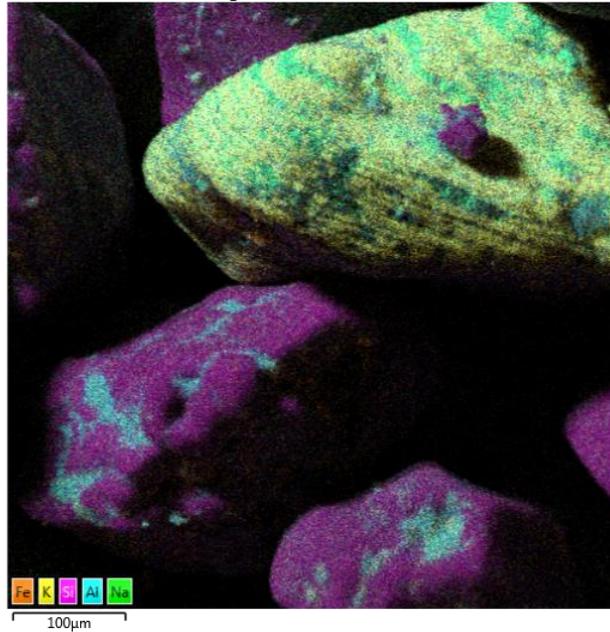
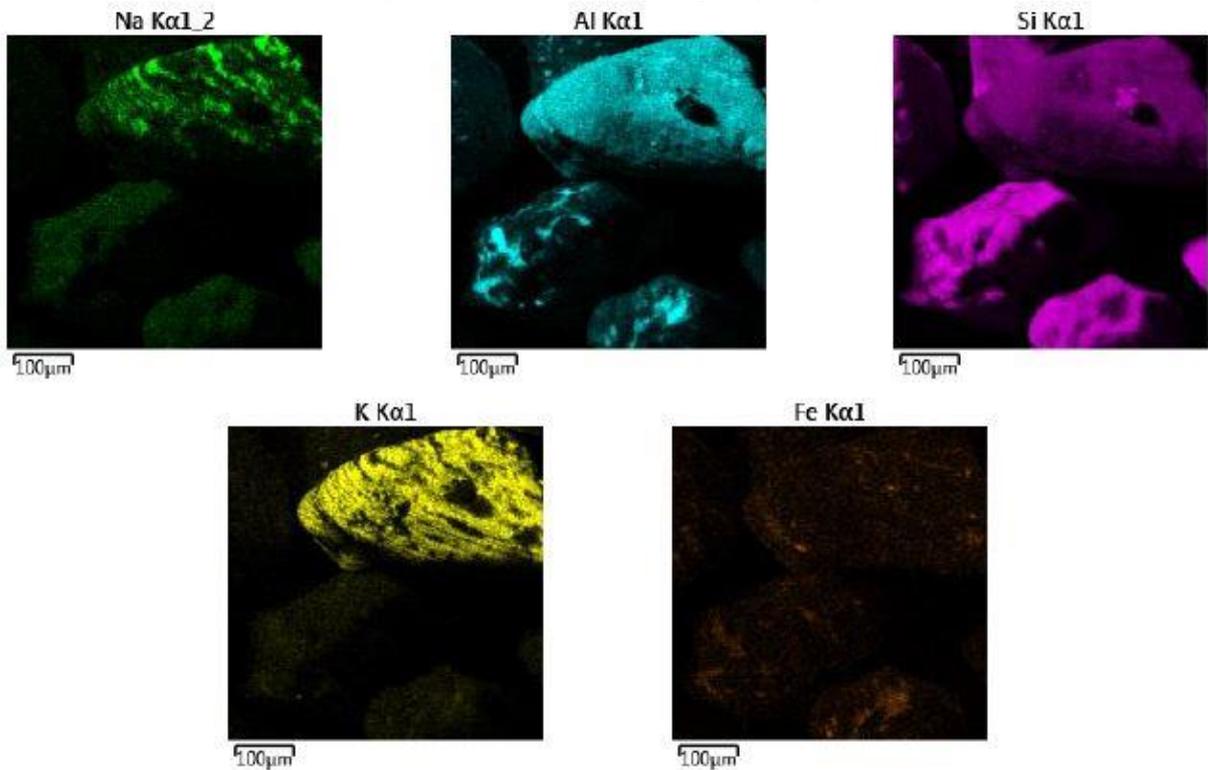
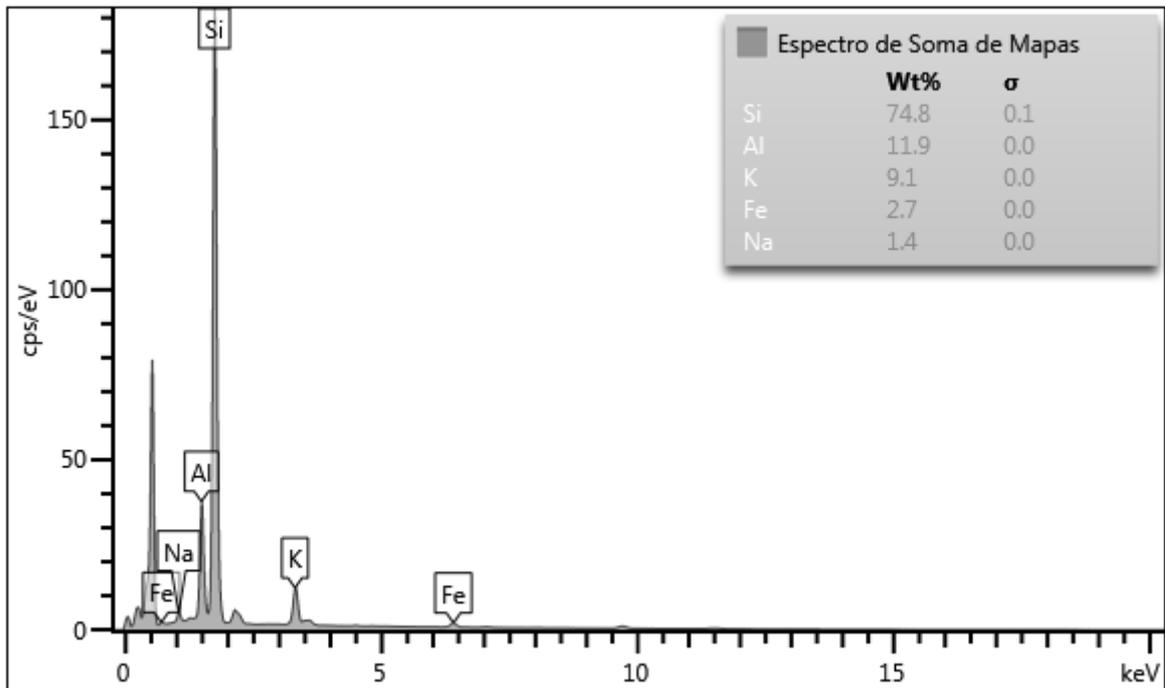


Figura 27: Identificação das camadas da composição química da Amostra 2.



Nas Figuras 26 e 27 não se observa cromo na amostra, isso ocorre pois a partir dos resultados encontrados na segunda fase da dissertação, os corpos de prova alimentados com água, possuem baixa retenção do contaminante inserido no meio, além disso, a concentração de cromo no solo do corpo de prova encontrada a partir de digestão alcalina foi baixa (1,03 mg/kg). Nessas amostras não existe presença de cálcio pois são alimentadas com água.

Figura 28: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 2.

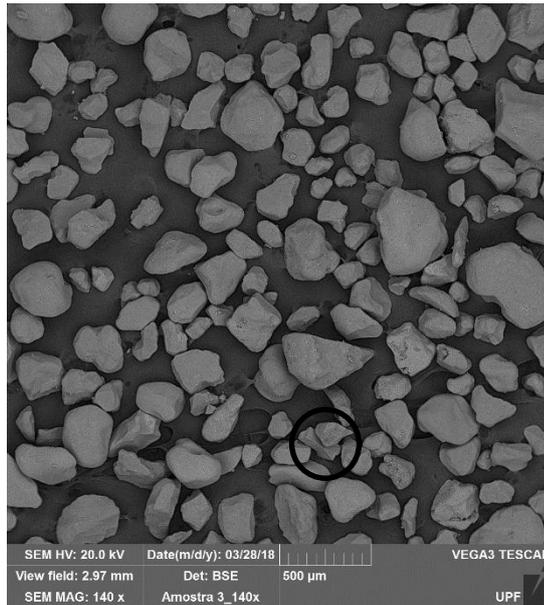


Na Figura 28 está apresentado o espectro de soma dos elementos da Amostra 2, ou, as porcentagens aproximadas dos elementos contidos na amostra. Nessa amostra o cromo não foi quantificado no MEV ou no EDX. Afirmando que os elementos constituintes da amostra são todos provenientes da areia.

#### 4.3.3 Amostra 3 – CONT/ÁGUA 2D

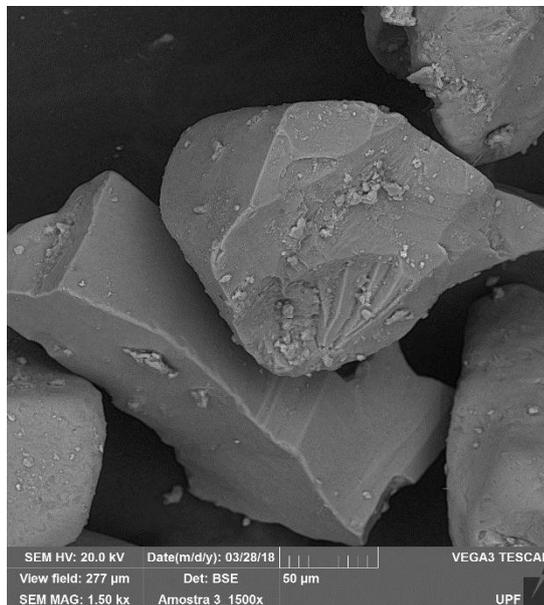
A terceira amostra a ser analisada foi a CONT/ÁGUA 2D. Assim como a Amostra 2, ela pode ser utilizada como uma forma de controle, na comparação entre amostras alimentadas com água e solução nutriente. A seguir estão apresentadas as imagens obtidas na ampliação da amostra, além da quantidade de vezes que foi ampliada.

Figura 29: Análise de MEV na Amostra 3 - CONT/ÁGUA 2D com aumento de 140 vezes.



O círculo preto na Figura 29 é onde foi feito o aumento em 1500 vezes, apresentado a seguir.

Figura 30: Análise de MEV na Amostra 3 - CONT/ÁGUA 2D com aumento de 1500 vezes.



As Figuras 29 e 30 apresentaram os resultados de imagem de MEV para a amostra CONT/ÁGUA 2D. A partir delas podemos observar que não existe formação de crosta, o mesmo ocorre com a Amostra 2, diferente da Amostra 1, alimentada com solução nutriente.

A seguir estão apresentados os resultados encontrados com o EDX. São apresentados primeiramente o mapa de composição e cada camada e depois o espectro de soma desses mapas, para cada elemento encontrado na Amostra 3.

Figura 31: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 3.

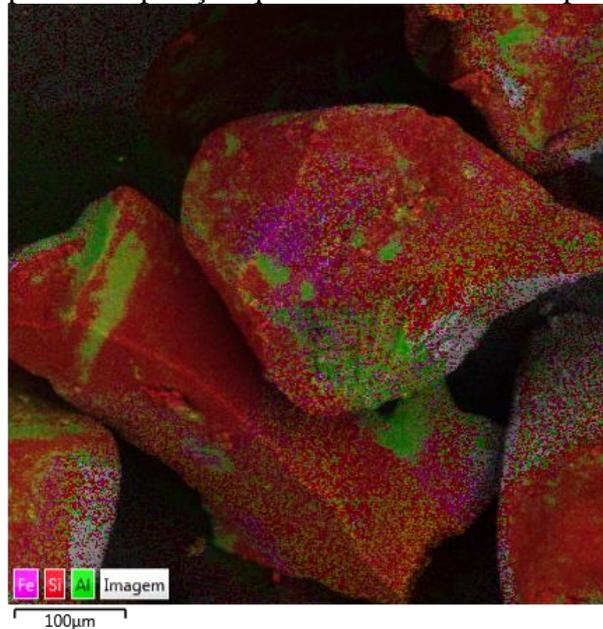
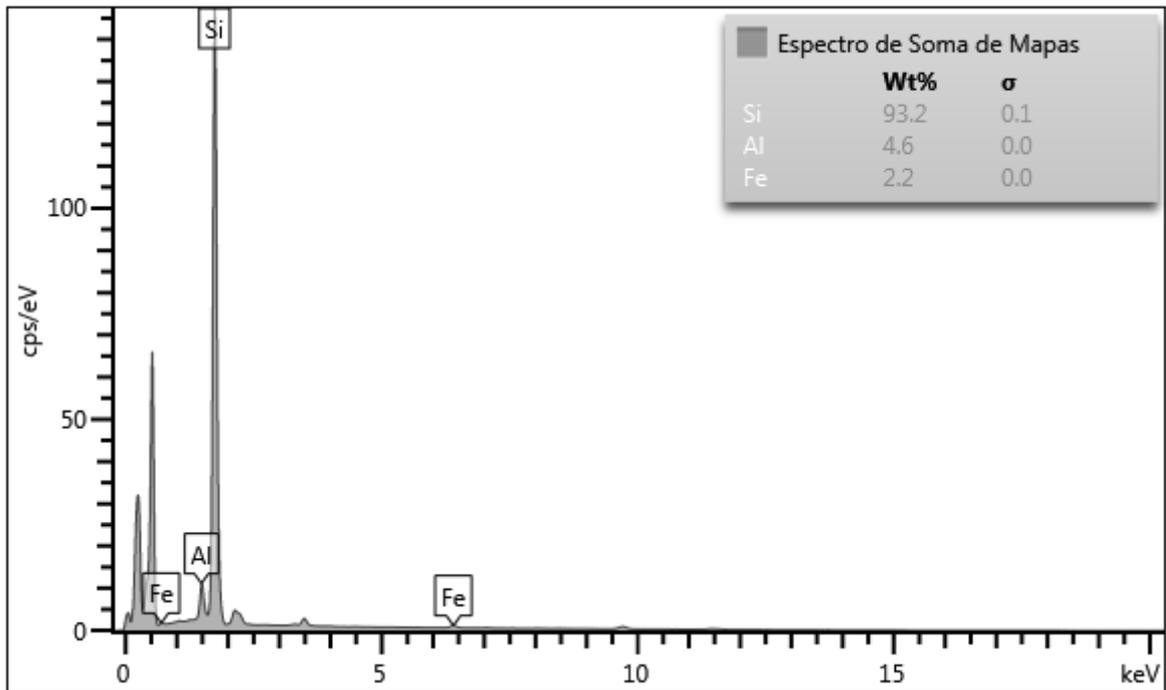


Figura 32: Identificação das camadas da composição química da Amostra 3.



Nas Figuras 31 e 32 não se observa cromo na amostra visualmente, isso ocorre pois a partir dos resultados encontrados na segunda fase da dissertação, os corpos de prova alimentados com água, possuem baixa retenção do contaminante inserido no meio como já apresentado na Amostra 2, além disso, a concentração de cromo no solo do corpo de prova encontrada a partir de digestão alcalina foi baixa (1,01 mg/kg). Nessas amostras não existe presença de cálcio pois são alimentadas com água.

Figura 33: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 3.

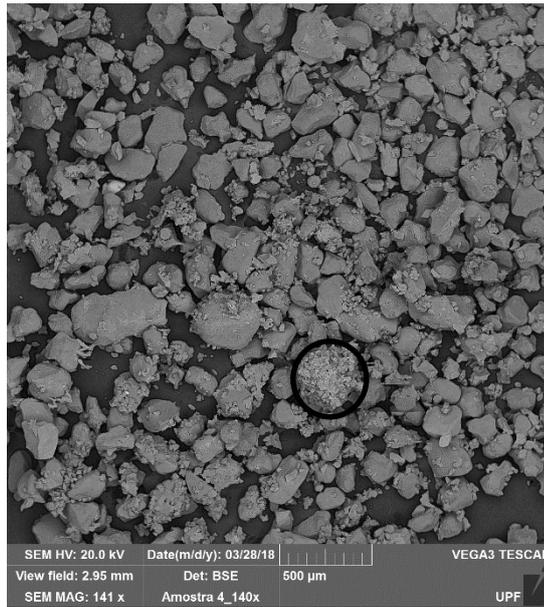


Na Figura 33 está apresentado o espectro de soma dos elementos da Amostra 3, com as porcentagens aproximadas dos elementos contidos na amostra. Assim como na Amostra 2, nessa amostra o cromo não foi quantificado no MEV ou no EDX. Afirmando que os elementos constituintes da amostra são todos provenientes da areia.

#### 4.3.4 Amostra 4 – CONT/ALIM 2D

A última amostra a ser analisada foi a CONT/ALIM 2D, amostra alimentada com solução nutriente com intervalo de 2 dias entre alimentações. A seguir estão apresentadas as imagens obtidas na ampliação da amostra no MEV, nas legendas estão apresentadas a quantidade de vezes que a amostra foi ampliada.

Figura 34: Análise de MEV na Amostra 4 - CONT/ALIM 2D com aumento de 140 vezes.



O círculo preto na Figura 34 mostra o local onde foi feito o aumento em 1500 vezes, apresentado a seguir.

Figura 35: Análise de MEV na Amostra 4 - CONT/ALIM 2D com aumento de 1500 vezes.

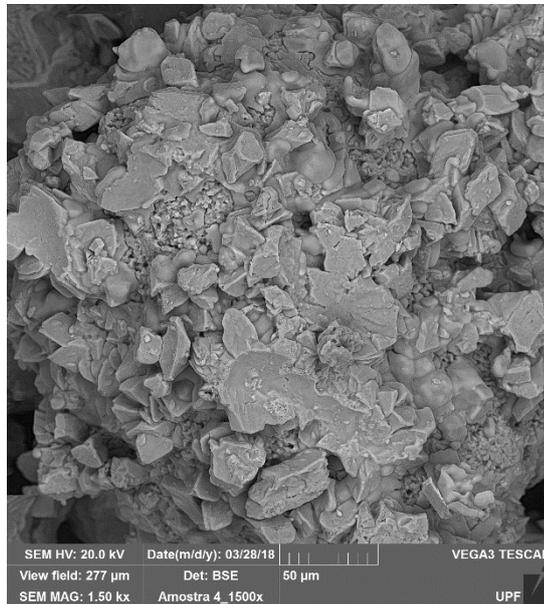
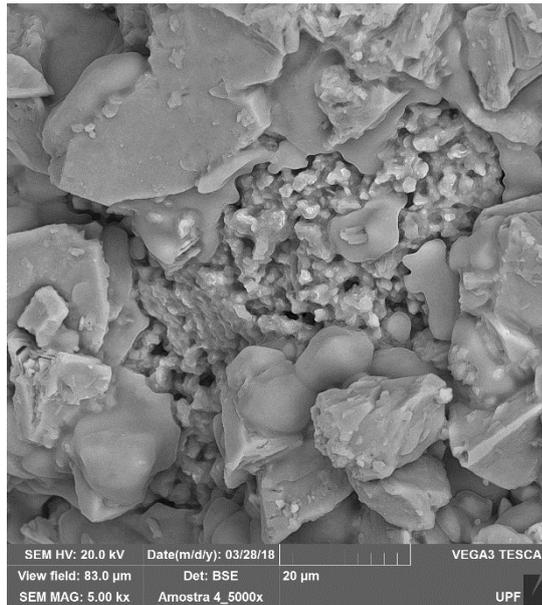


Figura 36: Análise de MEV na Amostra 4 - CONT/ALIM 2D com aumento de 5000 vezes.



As Figuras 34 a 36 apresentaram os resultados de imagem de MEV para a amostra CONT/ALIM 2D. A partir delas podemos observar formação de uma crosta ao redor da partícula de areia que pode ser atribuída a formação de carbonato de cálcio precipitado no corpo de prova, assim como na Amostra 1. Diferentemente da Amostra 1, a Amostra 4 apresenta maior formação de crosta nas imagens obtidas no MEV, relacionada diretamente com o intervalo de alimentação, ou seja, a Amostra 4 foi alimentada mais vezes, então possui maior concentração de solução nutriente no meio, conseqüentemente, precipitando maior quantidade de carbonato de cálcio.

A seguir estão apresentados os resultados encontrados com o EDX que realiza a identificação da composição química da amostra. São apresentados primeiramente o mapa de composição e cada camada de elementos e depois o espectro de soma desses mapas, além das porcentagens para cada elemento.

Figura 37: Mapa de composição química obtido no EDX para a Amostra 4.

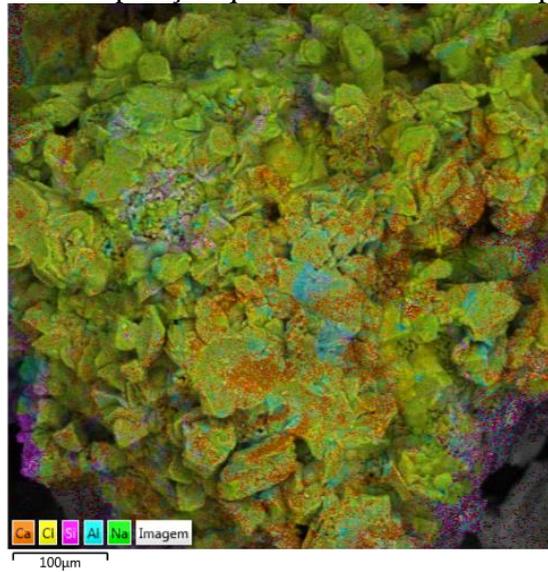
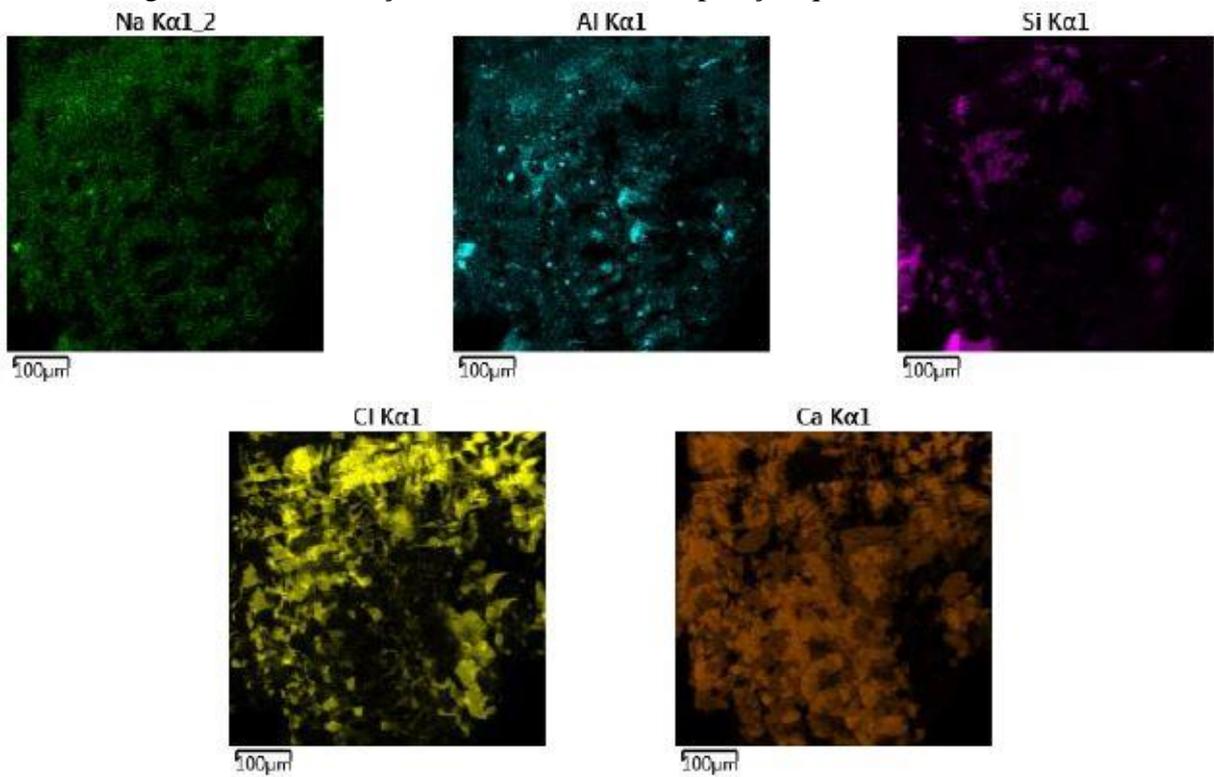
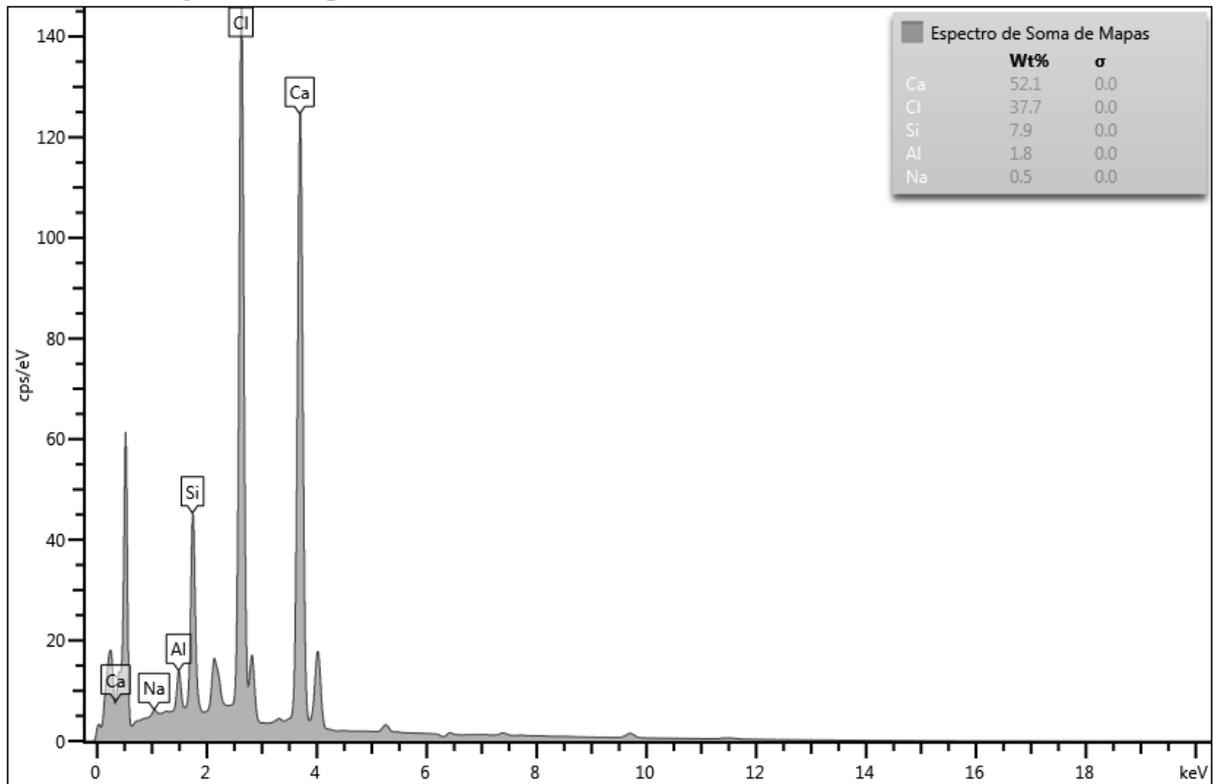


Figura 38: Identificação das camadas da composição química da Amostra 4.



A partir das Figuras 37 e 38 pode-se observar que na análise visual, não existe a presença de cromo. No entanto é possível observar cálcio e cloro na amostra, inserido como componente na solução nutritiva, além de outros elementos, encontrados em todas as outras amostras.

Figura 39: Espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 4.



Na Figura 39 está apresentado o espectro de soma dos elementos encontrados na Amostra 4. O elemento cromo, utilizado como contaminante nesse estudo, não foi encontrado na Amostra 4 visualmente pelo MEV e não foi quantificado pelo EDX, dessa maneira pode-se afirmar que o cromo contido na amostra pode ter sido encapsulado pelo carbonato de cálcio precipitado nas partículas de solo da amostra.

A partir dos resultados de MEV/EDX realizado em todas as amostras, é possível afirmar que o cromo remanescente nas amostras alimentadas com solução nutriente está confinado no biocimento precipitado em forma de carbonato de cálcio. No entanto, não é possível avaliar a sua concentração a partir dessa análise. Seria necessária uma análise diferente para obter valores de concentração retida.

## 5 CONCLUSÕES

- A partir da avaliação da atividade urease é possível afirmar que existem microrganismos que sintetizam urease no solo arenoso de Osório – RS. A solução nutriente C foi o melhor bioestimulante entre os estudados.
- As análises após o ensaio de biocimentação nos mostraram que a solução nutriente adicionada ao corpo de prova em alimentações intervaladas apresentou retenção de aproximadamente 30% do contaminante inserido, independente do intervalo de alimentação, enquanto os corpos de prova alimentados com água, apresentaram retenção de aproximadamente 10%.
- A análise estatística mostra maior eficiência de retenção do contaminante no corpo de prova com alimentação com solução nutriente em intervalo de 2 dias, seguido do tratamento com solução nutriente com intervalo de 7 dias.
- O balanço de massa deixa aparente que foi possível estabilizar e solidificar cromo hexavalente a partir de biocimentação, em baixas concentrações, por conta da alta lixiviação do contaminante no solo estudado.
- A biocimentação com alimentação realizada por percolação não é indicada para solo arenoso, pois como a lixiviação de contaminante foi muito alta para esse estudo, em uma aplicação a campo, a pluma seria espalhada e não biocimentada.
- A análise de MEV/EDX não apresenta eficiência na análise, pois o equipamento possui restrições de análise quanto a elementos que compõem o biocimento, dificultando a determinação de elementos através de EDX. No entanto, a análise visual através do MEV é eficiente apontando as diferenças de solos alimentados com água ou solução nutriente.
- Apesar de apresentar biocimentação ao final do estudo, as taxas de encapsulamento do contaminante foram muito baixas, além disso, a técnica se mostrou falha em relação a alimentação, não apresentando vantagem para uso como técnica de remediação de solo contaminado com cromo hexavalente.

## RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de diferentes tempos no ensaio de atividade urease. A adaptação dos microrganismos a solução nutriente inserida no meio pode ser mais demorada que o utilizado neste trabalho;
- Realização de biocimentação de contaminantes em maior escala afim de observar melhor o comportamento do contaminante e da técnica em si;
- Avaliar o comportamento em maior escala e a longo prazo do contaminante quando submetido a biocimentação com alimentação por percolação;
- Execução da técnica de biocimentação através de injeção do meio nutriente, não por percolação;
- Análise da biocimentação no corpo de prova, com finalidade de conferir a concentração retida no carbonato de cálcio precipitado;
- Realização de MEV/EDX nas amostras anterior a aplicação de biocimentação com finalidade de comparação com as amostras finais;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. *Associação Brasileira de Normas Técnicas*. Rochas e solos. Análise Granulométrica – Rochas e Solos. NBR 6502. Rio de Janeiro, 1995.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Chromium. Atlanta, Georgia, 592 p. 2012.
- AL QABANY, A. and SOGA, K. *Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils*. 2013.
- AL QABANY, A.; SOGA, K. and SANTAMARINA, C. *Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering. 2012.
- ALISSON, S. *Urease protocol*. Based on Sinsabaugh, 2000 and Kandeler and Gerber 1988. 2001.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Classification of Soils for Engineering Purposes: D 2487*. Philadelphia, p.11, 1993.
- BANG, S. S, GALINAT, J. K, RAMAKRISHMN, V. *Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized Bacillus pasteurri*. Enzyme and Microbial Technology 28(4-5):404-409. 2001.
- BOSCOV, M.E.G. *Geotecnologia Ambiental*. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.
- CASTANIER, S., Le METAYER-LEVREL, G., PERTHUISOT, J.P. *Carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view*. Sediment Geol, 126:9–23. 1999.
- CASTRO, M. C. A. A.; WENDLAND, Edson Cezar; SCHALCH, Valdir. *Estudo da Atenuação dos Contaminantes de Líquidos percolados no Solo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo. 2005.
- CETESB (Companhia ambiental do Estado de São Paulo). *Decisão de diretoria N° 045/2014/E/C/I: Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo*. São Paulo. 2014.
- CETESB (Companhia ambiental do Estado de São Paulo). *Índices de qualidade das águas*. São Paulo: CETESB, 2012.
- CHENG L, CORD-RUWISCH R. *In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation*. Ecol Eng 42:64–72. 2012.
- CHRISTOFF, Paulo. *Química Geral*. Livro Eletrônico. Curitiba: Intersaberes. 1ªEd. 2015.
- CHU, J., IVANOV, V., NAEIMI, M., STABNIKOV, V., LIU, H. *Optimization of calcium-based bioclogging and biocementation of sand*. Acta Geotechnica (2014) 9:277–285. 2014.

CHU, Jian. *Bio-cement and bio-cementation*. School of Civil and Environmental Engineering, 2012.

CRUZ, R. C. *Influência de parâmetros fundamentais na rigidez, resistência e dilatação de uma areia artificialmente cimentada*. Tese (Doutorado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, UFRGS, Porto Alegre. 218p. 2008.

De JONG J.T, FRITZGES M.B, NUSSTEIN K. *Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear*. J Geotech Geoenviron Eng 32:1381–1392. 2006.

De JONG, J. D., SOGA, K. S., KAVAZANJIAN, E. *Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities, and challenges*. Geotechnique 63, No. 4, 287–301. 2013.

De JONG, J.T., MARTINEZ, B.C., MORTENSEN, B.M., NELSON, D.C., WALLER, J.T., WEIL, M.H., GINN, T.R., WEATHERS, T., BARKOUKI, T., FUJITA, Y., REDDEN, G., HUNT, C., MAJOR, D., TANYU, B. “*Upscaling of bio-mediated soil improvement*.” Proceedings of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering, Alexandria, Egypt, 2009.

De JONG, J.T., MORTENSEN, B.M., MARTINEZ, B.C., NELSON, D.C. *Bio-mediated soil improvement*. Ecological Engineering, Vol 36, 197-210, 2010.

De MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. *Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review*. Ecological Engineering. V 36, (2): 118-136. 2012.

DEDAVID, Berenice Anina. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

FERRIS, F.G., STEHMEIER, L.G., KANTZAS, A., MOURITS, F.M. *Bacteriogenic mineral plugging*. Can J Petrol Technol 35:56–61, 1996.

FETTER, C. W. *Contaminant Hydrogeology*. Macmillan publishing Company, United States. 458 p. 1993.

FONINI, Anderson. *Uso da técnica de eletrocinética para estabilização de um solo arenoso*. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Pós-Graduação em Engenharia Civil. Porto Alegre, 2008.

FREEZE, R. A. and CHERRY, J. A. *Groundwater*. Prentice Hall, Inc. U.S. 604 p. 1979.

FRTR. *Federal remediation technologies roundtable solidification/stabilization: ex situ physical/chemical treatment*. Disponível em: <www.frtr.gov>. Acesso em: 05 de dezembro de 2016.

GARBIN, R. G. *Avaliação de biocimentação em solo arenoso*. UPF. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Engenharia e Arquitetura – Curso de Engenharia Civil, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

GIL, Antônio C. *Como elaborar projetos de pesquisa*. 4. Ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GIRINSKY, O. *Pre-industrialisation d'un procede de Consolidation De sol par biocalcification in situ*. Universite d'angers Ufr sciences, 2009.

GÓMEZ, E. *Evaluación de las propiedades geotécnicas de suelos arenosos tratados con bacterias calcificantes*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 147 p. 2006.

GOMEZ, M.G.; DE JONG. J. T.; HUNT. C.; MAJOR. D.; DWORATZEK. S. *Bio-mediated Soil Improvement Field Study to Stabilize Mine Sands*. Geo Montreal. 2013.

GUILHERME, L. R. G.; MARCHI, G. *Metais em fertilizantes inorgânicos: avaliação de risco à saúde após a aplicação*. São Paulo: Anda, 154 p. 2007.

HAMMES, F. E VERSTRAETE, W. *Key roles and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation*. Environmental Science & Bio/Technology 1: 3-7. 2002.

HEINECK, K. S., CONSOLI, N., CRUZ, R. C, KNOP, A. Encapsulamento de um solo contaminado por óleo diesel. Revista da Sociedade Portugues de Geotecnia. 2007.

HELENE, Livia Portes Innocenti. Diagnóstico ambiental de solo contaminado por cromo de curtume em Motuca (SP) por métodos geofísicos. Rio Claro. 74 p. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. 2016.

HINZ, C. Description of sorption data with isotherm equations. Geoderma, v.99, p 225-243. 2001.

IVANOV, V., CHU, J. *Applications of microorganisms to geotechnical engineering*. Environmental Science Biotechnology. 2008.

JROUNDI, F.; GÓMEZ-SUAGA, P.; JIMENEZ-LOPEZ, C.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. T.; FERNANDEZ-VIVAS, M. A. *Stone-isolated carbonatogenic bacteria as inoculants in bioconsolidation treatments for historical limestone*. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. 2012.

KANDELER, E.; GERBER, H. *Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium*. Bundesanstalt für Bodenkultur, Denigasse 31-33, A-1200 Vienna, Austria. 1988.

KAROL, R.H. *Chemical grouting and soil stabilization*, 3rd edn. M. Dekker, New York. 2003.

KLOSE, Susanne; TABATABAI, M.A. *Urease activity of microbial biomass in soils*. Department of Agronomy, Iowa State University, Ames, IA 50011-1010, U.S.A. 1998.

KUCHARSKI, E. S., WINCHESTER, W., LEEMING, W. A., CORD-RUWISCH, R., MUIR, C., BANJUP, W. A., WHIFFIN, V. S., AL- THAWADI, S, AND MUTLAQ, J. *Microbial biocimentation*. Patent application. International application. Patent. 2005.

LEE, M. L., SOON, S., TANAKA, Y. *Stress-deformation and compressibility responses of bio-mediated residual soils*. Ecological Engineering 60. 142– 149. 2013.

LÓPEZ, I. *Tratamiento de un suelo con Bacillus pasteurii. Efecto de la humedad y la porosidad*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 160 p. 2008.

MACHADO S.L.; BOTELHO, M.A.B.; CAVALCANTE, R.F.; AMPARO, N.S. *Contaminação por metais pesados em Santo Amaro da Purificação – BA – Ensaio de coluna e parâmetros hidráulicos de um solo residual expansivo*. In: Congresso Brasileiro de Geotecnia Ambiental. 5º, 2003: REGEO. ABMS: Porto Alegre, 2003.

MAHAN, B. M. *Química: um curso universitário*. 4a ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

MANN S. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press, Oxford. 216 p. 2001.

MARTINS. L. R.; TABAJARA. L. L.; FERREIRA E. R. *Linha de costa: problemas e estudos*. Porto Alegre. 2004.

MATOSO, E.; KUBOTA, L.T.; CADORE, S. *Pré-concentração e determinação de cobre em águas, usando sílica modificada com fosfato de zircônio*. Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2001.

MAY, P. B; DOUGLAS, L. A. *Assay for soil urease activity*. Soil Science Section, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Melbourne, Parkville, Victoria, 3052, Australia. 1975.

MEURER, E. J. *Fundamentos de química do solo*. Porto Alegre: Gênese, 2000.

MONTOYA, B. M. *Bio-mediated soil improvement and the effect of cementation on the behavior, improvement, and performance of sand*. California, Tese. 252 p. Programa de pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental. University of California. 2012.

MOREIRA, C. S. *Adsorção competitiva de cádmio, cobre, níquel e zinco em solos*. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MUÑETÓN, C.M.G. *Avaliação geotécnica de um perfil de solo tratado biotecnologicamente para fins de pavimentação*. Brasília, Tese. 187 p. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília. 2013.

NG, W.S.; LEE, M.N. and HII, S.L. *An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2012.

PEDREIRA, Rita Romeu. *Bio-Cimentação de solos arenosos para melhoramento das suas características hidro-mecânicas*. Dissertação de Mestrado. Técnico Lisboa. 124 p. 2014.

- REBECHI, M. R. L. *Bioremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel*. Passo Fundo, Dissertação. 112 p. Programa de Pós Graduação em Engenharia. Universidade de Passo Fundo. 2007.
- REIS, T. H. P.; GUIMARÃES, P. T. G.; FIGUEIREDO, F. C.; POZZA, A. A. A.; NOGUEIRA, F. D.; RODRIGUES, C. R. *O silício na nutrição e defesa de plantas* (Boletim técnico, 82). Belo Horizonte: EPAMIG, 12 p. 2007.
- RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S. B. D.; CORRÊA, G. F. *Pedologia: base para distinção de ambientes*. 5 ed. Lavras: UFLA, 322 p. 2007.
- RICHARD, F. C., BOURG, A. C., M., *Aqueous Geochemistry of Chromium: a Review*, Water. Research, 25, 7, 807-816, 1991.
- ROJAS, J. W. J. *Estudo de remediação de solo contaminado por borra oleosa acida utilizando a técnica de encapsulamento*. Porto Alegre, RS. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
- ROWE, R.K. *Geotechnical and geoenvironmental engineering handbook*. Canadá: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- SALEH, F. et al. *Kinetics of chromium transformations in the environment*. Science of the Total Environment, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 25-41, Oct. 1989.
- SHACKELFORD, C.D. *Geotechnical practice for waste disposal*. In: Daniel, D. E. 1ª ed., Londres: Chapman & Hall, 1993.
- SILVA, C.S.; PEDROZO, M.F.M. *Ecotoxicologia do cromo e seus compostos*. Série: Cadernos de referência ambiental. Salvador: Centro de Recursos Ambientais - CRA, 2001.
- SINSABAUGH, R. L., REYNOLDS, H., LONG, T. M. *Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples*. Biology Department, University of Toledo, Toledo, OH 43606, USA. 2000.
- SOARES, P.S.M.; YOKOYAMA, L.; FREIRE, D.D.C. *Transporte de metais pesados no solo no contexto da disposição de resíduos sólidos*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2005.
- SODRÉ, F. F.; LENZI, E.; COSTA, A. C. S. da. *Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos*. Química Nova, v. 24, n.3, p. 324-330, 2001.
- SONDI, I. AND E. MATIJEVIC. 2001. *Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction*. J. Colloid. Interface. Sci. 238.
- SPINELLI, L. F. *Comportamento de fundações superficiais em solos cimentados*. Porto Alegre. 133p. Dissertação (mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFRGS. 1999.
- STABNIKOV, V., NAEMI, M., IVANOV, V., & CHU, J. *Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement*. Cement and Concrete Research, 41, 1143–1149. 2011.

- STOCKS-FISHER, S. GALINAT, J. K, BANG, S. S. *Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>*. Soil Biology and biochemistry 31(11):1563-1571. 1999.
- SUSSULINI, A.; ARRUDA, M. A. Z. *Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem*. Eclética Química. vol.31, n.1, pp.73-80, 2006.
- TABATABAI, M. A; BREMNER, J. M. *Assay of urease activity in soils*. Department of Agronomy, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A. 1972.
- THAWADI, S.M. *High strength in-situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria*. Ph.D dissertation. Murdoch University, Western Australia. 2008.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). Method 3060A: *Alkaline digestion of hexavalent chromium*, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods - SW-846, U.S. Environment Protection Agency: Washington, DC, 1996.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). Method 7196A: *Chromium, Hexavalent (colorimetric)*. Environment Protection Agency: Washington, DC. 1992.
- Van BEELEN, P.; VERBRUGGEN, E. M. J.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. *The evaluation of the equilibrium partitioning method using sensitivity distributions of species in water and soil*. Chemosphere, v. 52, p. 1153-1162, 2003.
- Van PAASSEN, L.A., DAZA, C.M., STALL, M., SOROKIN, D.Y., Van LOOSDRECHT, M.C.M. *In situ soil reinforcement by microbial denitrification*. In: 1st International Conference on Bio-Geo-Civil Engineering, Netherlands, pp. 124–133. 2008.
- Van PAASSEN, L.A.; GHOSE, R.; Van der LINDEN, T.J.M; Van der STAR, W.R.L. and Van LOOSDRECHT, M.C.M. *Quantifying Biomediated Ground Improvement by Ureolysis: Large-scale Biogrout Experiment*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering. 2010.
- WHIFFIN, V. S. *Microbial CaCO<sub>3</sub> precipitation for the production of biocement*. Science and Engineering, School of Biological sciences and biotechnology Perth, Western Australia, Murdoch University. Ph D Thesis: 154. 2004.
- WHIFFIN, V.S., VAN PAASSEN, L.A., HARKES, M.P. *Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique*. Geomicrobiol. J. 25 (5), 417–423. 2007.
- WILES, C. C., *A review of solidification/stabilization technology*. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268 (U.S.A.). 1987.
- YANG I.C., LI Y., PARK J.K., YEN T.F. *Subsurface application of slime-forming bacteria in soil matrices*. In: Proceedings of the 2nd international symposium in situ and on site bioreclamation, April 1993, San Diego, CA, Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1993.

## ANEXOS

ANEXO A – Protocolo Urease escrito por Alisson S. (2001):

### UREASE PROTOCOL

**Steve Allison**

**July 2001**

based on Sinsabaugh (1998, unpub) and Kandeler and Gerber 1988

**Purpose:** measure the activity of urease (amidohydrolase, EC 3.5.1.5) in environmental samples. Urease is the common name for enzymes that decompose urea into carbon dioxide and ammonium. The enzyme is considered important in soil nitrogen cycling, particularly in agricultural systems.

#### 1. Prepare reagents:

40 mM urea

0.240 g urea

100 ml sodium acetate buffer, pH 5

0.3 M NaOH

12 g NaOH

1000 ml DI water

Na salicylate solution

17 g sodium salicylate

120 mg sodium nitroprusside

100 ml DI water

Na salicylate/NaOH solution (make fresh daily)

1 part 0.3 M NaOH

1 part Na salicylate solution

1 part DI water

Na dichloroisocyanide solution (make fresh daily)

0.1 g sodium dichloroisocyanide

100 ml DI water

**2.** Sample preparation (refer to pNP protocol): Blend 2 g wet soil with 60 ml, 50 mM pH 5 acetate buffer on whip setting for 1 min and pour suspension into a screw-cap Nalgene bottle.

**3.** While stirring vigorously, pipet 750  $\mu$ l suspension into 2 ml centrifuge tubes. Use 3-4 replicates and 2 replicate suspension controls (controls get acetate buffer in place of substrate). Also use 4 substrate controls/11 samples: replace soil suspension with acetate buffer.

**4.** Add 750  $\mu$ L of urea solution to each of the tubes (except suspension controls, which get acetate buffer). The final substrate concentration is 20 mM urea.

**NOTE:** pH optima for ureases is reportedly in 7-8 range. Depending on experimental design, you may want to select another buffer. Apparent  $K_m$  is a function of particle dispersion and mixing. This substrate concentration (20 mM) may not be high enough to reach substrate saturation in all systems.

5. Standards: Alpkem standard (1000 ppm  $\text{NH}_4\text{-N}$ ) is 71.43 mM. Dilute this 100X in acetate buffer to get a standard of 714 nmol/ml. 2X serial dilutions of this solution yield standards of 357, 179, 89.3, 44.6, and 22.3 nmol/ml. Construct a standard curve using this concentration range.

6. Incubate the tubes at room temperature for 2-18 h while shaking.

7. Centrifuge tubes at 10,000 rpm for 1 min.

**NOTE:** The next part is from Kandeler and Gerber 1988 (in Alef and Nannipieri, Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, p. 318). It omits the addition of an acid KCl solution to terminate the reaction and dilute the sample.

8. Ammonium determination: Pipet 0.5 ml supernatant or standard into 10 ml culture tubes, add 2.5 ml NaOH/Na salicylate solution and 1 ml Na isocyanide solution. Also prepare a blank with acetate buffer instead of supernatant. Let stand at room temperature for 30 min.

9. Read optical density of each sample/standard on spectrophotometer at 690 nm, using the blank to zero the spectrophotometer.

10. Calculate activity as nmole of ammonium released per hour per gram of soil.

Final OD = (mean OD of assay wells) - (mean OD of sample control wells) - (mean OD of substrate control wells)

Activity ( $\mu\text{mole NH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) = final OD / [(EC/ $\mu\text{mole/ml}$ ) / (1.5 ml/assay) (incubation time, h) (g dry soil used to make sample suspension / 60 ml sample suspension) (0.75 ml sample suspension)]