

Copyright 2004, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP

Este Trabalho Técnico Científico foi preparado para apresentação no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, a ser realizado no período de 2 a 5 de outubro de 2005, em Salvador. Este Trabalho Técnico Científico foi selecionado e/ou revisado pela Comissão Científica, para apresentação no Evento. O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pelo IBP. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões do Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, Sócios e Representantes. É de conhecimento e aprovação do(s) autor(es) que este Trabalho será publicado nos Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás

Utilização de Nitrato de Potássio e Peróxido de Hidrogênio para Biorremediação “In Situ” de Solos Contaminados por Petróleo

Castro, R.A.; Carvalho, F.J.P.C.; Krenzcynski, M.C.; Gonçalves, C.M.;
Oliveira, S.C.T.; Carvalho, F.J.T.C.; Creplive, M.; Joanello Jr., L.A., Coneglian, D.¹

¹Antroposphaera – Instituto para o Desenvolvimento do Meio Ambiente, Rua Jacarezinho
215, rodrigoazc@terra.com.br, francisco.carvalho@ufpr.br, mikre@ig.com.br,
claudiamgoncalves@yahoo.com.br, samucaap@pop.com.br, eu_chico@yahoo.com.br,
maricelma@gmail.com.br, joanello@pop.com.br, diogoconeglian@yahoo.com.br

Resumo - Devido a solubilidade limitada do oxigênio na água e em profundidades maiores do solo, fica difícil a distribuição de grandes quantidades do elemento em meios subsuperficiais contaminados. Aceptores alternativos de elétrons podem ser usados para a biorremediação em subsolo, como o nitrato, por vários tipos de bactérias anaeróbicas. O oxigênio também pode ser quimicamente suprido através de peróxido de hidrogênio que além de aumentar os teores de oxigênio, para oxidações biológicas, gera radicais hidroxilas que são importantes também nas reações abióticas de degradação de hidrocarbonetos. Este trabalho tem como objetivo o tratamento de solos de subsuperfície, contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, através da aplicação de nitrato de potássio e peróxido de hidrogênio. A área escolhida para tratamento está inserida na extensão territorial atingida pelo vazamento de petróleo ocorrido em 16/07/2000 na PETROBRAS/REPAR, Araucária, Paraná, Brasil. Foram analisados o número de bactérias e fungos heterotróficos e hidrocarbonoclasticos, denitrificantes, pH, matéria orgânica, fertilidade, respiração e TPH do solo da profundidade de 10 a 50 cm. Foi observada a possibilidade de remediação de subsolos contaminados com os bioestimulantes escolhidos, desde que sejam observadas e corrigidas as características limitantes que dificultam a ação dos microrganismos nos processos de biodegradação de hidrocarbonetos.

Palavras-Chave: Biorremediação; petróleo; subsolo; nitrato de potássio; peróxido de hidrogênio

Abstract - There are three key issues that should be addressed to achieve a successful bioremediation. It must be determined whether the contaminant is biodegradable, whether the environment is habitable (presence of toxic chemicals or sufficient life-sustaining growth factors), and what the rate limiting factor is and whether it can be modified. Most bioremediation technologies have focused on the addition of oxygen to facilitate the biodegradation. Because more energy is derived from aerobic respiration than other microbial processes, oxygen is the preferred electron acceptor, if present. But, because of the limited solubility of oxygen in water, it is difficult to deliver large quantities of dissolved oxygen to contaminated subsurface environments. Alternate electron acceptors can be used for bioremediation in subsoil. A variety of oxy-anions can substitute for oxygen and allow microbial degradation of organic contaminants. Practical alternate acceptors include nitrate, sulfate, and salts of iron III. Various types of anaerobic bacteria exist in nature that can use these anaerobic electron acceptors. Oxygen as well can be chemically supplied by hydrogen peroxide. This work includes the utilization of nitrate and hydrogen peroxide in contaminated subsurface soils with petroleum hydrocarbon.

Keywords: Bioremediation; petroleum; subsoil; potassium nitrate; hydrogen peroxide

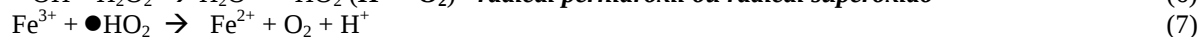
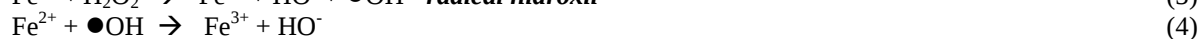
1. Introdução

O acidente ocorrido em 16 de julho de 2000 na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), localizada em Araucária/Paraná, promoveu o vazamento de 4.000 m³ de petróleo tipo Colombiano que percorreram em torno de 2 km de áreas internas da REPAR, que compreendem o arroio Saldanha. Para as áreas atingidas pelo óleo que ficou retido no solo/subsolo, foram determinados estudos de remediação com processos de bioestimulação que compreendem a utilização de nitrato de potássio e peróxido de hidrogênio.

A biorremediação *in-situ* é um dos meios mais efetivos de biorremediação por não requerer escavações e causar mínima ruptura de atividade de superfície. Uma desvantagem da biorremediação *in situ* é o intervalo longo de remediação devido a fatores como a heterogeneidade do contaminante, pobre transferência de massa, condições climáticas, concentração de nutrientes e muitas vezes disponibilidade limitada de aceptores de elétrons. A presença de oxigênio é de suma importância para o processo de biodegradação (JOBSON et al., 1972). Um grande número de compostos orgânicos pode ser rapidamente degradado sob condições aeróbicas onde o oxigênio serve como aceptor de elétron durante a biodegradação (SCHOCHER, 1991; MESTER, 1995). No entanto, em muitos sítios contaminados a difusão de oxigênio dentro dos solos é insuficiente para manter os níveis necessários da atividade aeróbica para a efetiva remediação. Na ausência de oxigênio, a biodegradação pode ocorrer numa variedade de meios anaeróbicos que incluem a denitrificação (NO₃ e NO₂), redutores de sulfato (SO₄), metanogênicos (CO₂ → CH₄), redutores do ferro III e manganês IV. Nitrato pode ser usado como oxidante para a mineralização de hidrocarbonetos (HESS et al., 1996). Injeções de doadores e aceptores de elétrons têm sido sugeridas como um método para distribuir a biomassa com mais efetividade para a biorremediação *in situ*. Bactérias denitrificantes são presentes nos solos e geralmente exibem extensa capacidade metabólica. Nitrato (NO₃⁻) é um ânion altamente solúvel em água, que dispersa rapidamente em solos úmidos, e serve como aceptor de elétron para biodegradação. Durante a biodegradação do contaminante, o nitrato é reduzido através de uma série de passos para nitrito, óxido nítrico e então gás dinitrogênio, com a oxidação concomitante do substrato carbonado (CAUWENBERGHE e ROOTE, 1998; ALEXANDER, 1999). Um grande número de bactérias pode reduzir NO₃⁻ a NO₂⁻ na ausência de oxigênio. A maioria dos denitrificantes é heterotrófica e comumente ocorrem nos solos, tais como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes* (GAMBLE et al., 1977). Importantes determinantes da taxa de denitrificação no solo são: disponibilidade de nitrato, suprimento de carbono metabolizável, umidade do solo, aeração do solo, pH e temperatura do solo (ALEXANDER, 1977 e PAUL e CLARK, 1989). A capacidade de se realizar uma verdadeira denitrificação está limitada a algumas bactérias aeróbicas e alguns quimioautotróficos. A maioria dos denitrificantes cresce melhor com pH próximo da neutralidade (entre 6,0 e 8,0), os processos são muito lentos com pH 5,0 e inexistentes abaixo de pH 4,0, embora em alguns solos ocorra a denitrificação a valores de pH em torno de 4,7 (ALEXANDER, 1977). MIHELIC e LUTHY (1988) investigaram a biodegradação de naftaleno e acenaphteno em condições de denitrificação. Eles encontraram que o material orgânico do solo pode competir por nitrato e que a biodegradação dos compostos estudados depende da disponibilidade de nitrato. Em muitos casos o peróxido de hidrogênio é utilizado para processos de biorremediação *in situ* sendo injetado no solo ou água do subsolo com a função de elevar os níveis de oxigênio (para aumentar a atividade microbiana) e ou promover a degradação de hidrocarbonetos através da reação que ocorre com Fe⁺², gerando hidroxilradicais e outras espécies, tais como, superóxidos e hidroperoxilradicais via hidroxilação (Equação 1) ou abstração do átomo de hidrogênio (Equação 2) conforme citado em BÜYÜKSÖNMEZ et al., (1998):



Está documentado que tanto em solos autoclavados e não autoclavados, o ferro aparece como o melhor processo para a decomposição do peróxido (Equações 3 a 7). Esta reação é conhecida como reação de *Fenton* (*Fenton's reaction*) sendo mostradas por WATTS et al. (1990) e SEDIK et al. (1991) e PIGNATELLO (1992) ambos citados por ZAPPI et al. (2000):



MILLER et al. (1996) trabalharam com reagente de *Fenton* e demonstraram que as eficiências superiores foram associadas com solos contendo baixa quantidade de matéria orgânica e baixa capacidade de neutralização de ácidos. A reação de *Fenton* é maximizada em pH's ácidos, devido o aumento da solubilidade de espécies reduzidas de ferro II que inicia a produção do radical. LEETHEM (2002) cita que o pH ótimo está em torno de 3,0 a 4,5, baseando-se na química do ferro. O peróxido de hidrogênio se decompõe devido às reações de catálise do solo. Os solos contêm uma concentração natural de compostos orgânicos, ferro (como a goetita), níquel e cobre que catalisam esta reação (MURPHY et al., 1989; LAWES citado por COOKSON, 1995) conhecida como reação de *Fenton* modificada. O peróxido de hidrogênio pode ser usado em concentrações que variam de 100 a 500 mg/l de acordo com o tipo de solo, utilizando-se de doses maiores para solos argilosos. Concentrações acima de 1200 a 2000 mg/l são consideradas

tóxicas (COOKSON, 1995). A toxicidade pode ser minimizada aplicando-se doses reduzidas de peróxido, possivelmente 50 mg/l, e então aplicar de modo gradativo até atingir doses mais elevadas em torno de 1000 mg/l (ALEXANDER, 1999). API (1995) cita quantidades eficientes para o uso de peróxido em torno de 100 mg/l (H_2O_2 - 30%). O objetivo do trabalho desenvolvido na área atingida é avaliar o resultado da aplicação de bioestimulantes para a biodegradação do contaminante através de análises de caracterização e monitoramento. Para isto foram desenvolvidos experimentos que visam estudar a ação da aplicação de nitrato de potássio e peróxido de hidrogênio. São discutidos o valor TPH, a biodegradação, o número de microrganismos heterotróficos, hidrocarbonoclasticos e denitrificantes e características químicas, como o pH e teor de matéria orgânica.

2. Material e Métodos

2.1. Tubos Instalados

Para a aplicação das soluções de nitrato de potássio, peróxido de hidrogênio e controle (com água), foram instalados três tubos na área contaminada (Figura 1). A instalação dos tubos consistiu da realização do furo com trado de diâmetro de 25 cm, aplicação de bentonita como selagem de fundo, colocação do tubo, aplicação de areia lateral, selagem com bentonita e finalização superficial com areia. Foram construídas 08 fileiras longitudinais de furos (parte interna ao solo) distanciadas entre si em 7,8 cm (para transferência da solução), com furos de 0,7 cm de diâmetro e distantes entre si em 3 cm, em tubos de PVC DN 50 com 20 cm de diâmetro. Para facilitar a distribuição das soluções ao perfil de solo foram instaladas 3 canaletas por tubo na posição perpendicular as tangentes do tubo com ângulos eqüidistantes entre si com as seguintes dimensões: 8 x 60 x 60 cm. As canaletas foram construídas após a primeira etapa de aplicação das soluções.



Figura 1. Tubos para aplicação das soluções com detalhe das canaletas

2.2. Soluções Aplicadas

A concentração da solução de nitrato foi de 315,6 mg/l de nitrato de potássio (KNO_3) conforme API (1995). A concentração da solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi de 500 mg/l (primeira e segunda etapas de aplicação) e 1000 mg/l (terceira etapa de aplicação), conforme ALEXANDER (1999). Foram realizadas três etapas de aplicação das soluções. A primeira etapa de aplicação foi realizada após a primeira amostragem, a segunda etapa de aplicação foi realizada após a segunda amostragem foi interrompida por uma semana para a realização da terceira amostragem e se estendeu até a quarta amostragem. A terceira etapa de aplicação foi iniciada após a quarta etapa de amostragem.

2.3. Amostragem de Solo

As amostragens de solo foram realizadas com trado holandês (primeira e segunda amostragens) e trado calador (terceira, quarta e quinta amostragens) na profundidade de 10 a 50 cm e considerando todo o perfil de solo (Figura 2). Foram realizadas 05 campanhas de amostragem.

2.4. Análises Realizadas

As análises foram: respiração do solo (PETROBRAS – ME-6360 – 027), bactérias e fungos, heterotróficos e hidrocarbonoclasticos, utilizando o meio de Martin (MENZIES, 1965), denitrificantes (TIEDJE, 1994), pH em água e cloreto de cálcio (EMBRAPA, 1997), fertilidade (PAVAN et al., 1992) e as análises de TPH através da extração com sulfato de sódio anidro ativado (como agente higroscópico) e diclorometano (como extrator dos hidrocarbonetos de petróleo do solo) e a leitura realizada por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890 Series GC System. A quantificação dos TPH's foi realizada através de integração do cromatograma pelo programa *HP-Chemstation*. A análise de textura do solo foi realizada por metodologia da EMBRAPA (1997) e a classificação textural dos solos dos tubos foi realizada conforme OLEJNIK et al. (1989). A condutividade hidráulica foi obtida através do relatório (FAURGS, 2000). As análises químicas e físicas foram realizadas somente na primeira amostragem, a quantificação de microrganismos na primeira e quinta amostragem e TPH e respirometria em todas as amostragens.

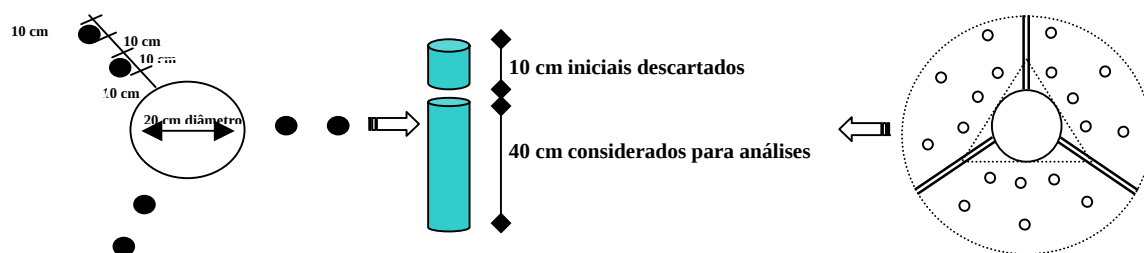


Figura 2. Amostragem com trado holandês, solo utilizado para análise e amostragem com trado calador

3. Resultados

3.1. Quantidade de Bioestimulantes e Soluções Aplicadas

Foram aplicadas as quantidades demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidades de Água e Solução

Tratamentos	Bioestimulante (ml)	Solução (litros)	Bioestimulante (ml)	Solução (litros)	Bioestimulante (ml)	Solução (litros)
Controle	0,0	569,9	0,0	1903,5	0,0	1957,5
Peróxido de hidrogênio	3286,2	633,7	3856,4	2578,5	7362,2	1917,0
Nitrato de potássio	2757,8	486,4	3924,4	1849,5	3746,0	2025,0

3.2. Fertilidade do Solo

Os resultados de fertilidade estão demonstrados na Tabela 2. Foi realizada somente na primeira etapa de amostragem como caracterização.

Tabela 2. Fertilidade do solo

Tratamento	pH		Al ³⁺	H+Al	Ca ²⁺ +Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	T	P	C	V
	CaCl ₂	SMP			cmol _c /dm ³				mg/dm ³	g/dm ³	%
Controle	5,83	6,87	0,00	2,57	19,40	15,70	0,25	22,22	1,37	14,00	88,38
Peróxido	5,93	6,80	0,00	2,77	19,67	15,23	0,26	22,70	1,20	19,63	87,84
Nitrato	6.13	6.90	0.00	2.60	22.27	18.60	0.30	25.17	1.50	19.43	89.70

3.3. Textura e Condutividade Hidráulica

Foi encontrado o valor de condutividade hidráulica de $2,619 \times 10^{-4}$ cm/s (FAURGS, 2000). O solo dos tubos é classificado como franco argiloso, com uma distribuição de 32% de areia, 36% de silte e 32% de argila.

3.4. Hidrocarbonetos Totais de Petróleo - TPH

Os resultados de TPH estão demonstrados na Tabela 3. A porcentagem de redução de TPH é calculada considerando a primeira e a quinta amostragens.

Tabela 3. Valores de TPH obtidos e porcentagem de redução

Tratamentos	TPH μg/g					% redução
	Amostragens					
	1	2	3	4	5	
Controle	8311,1	10611,3	11868	13109,6	5146,7	38,07
Peróxido	12711,9	9198,6	7786	11070,9	1690,9	86,70
Nitrato	5962,3	5895,6	9497	4210,9	496,1	91,68

3.5. Respiração do Solo

Os resultados de respiração do solo estão demonstrados graficamente na Figura 3.

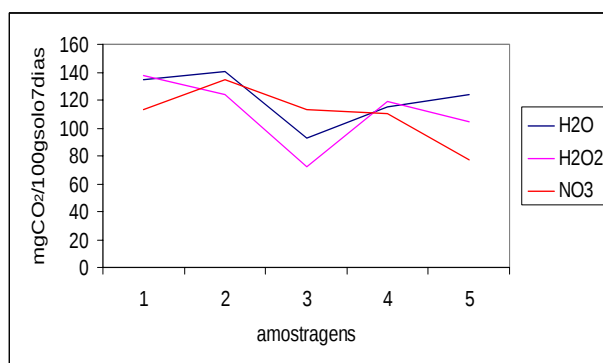


Figura 3. Respiração do solo

3.6. Bactérias e Fungos Heterotróficos e Hidrocarbonoclasticos e Denitrificantes

A quantificação microbiana pode ser verificada nas Tabelas 4 e 5 e são relativas a primeira e quinta etapas de amostragens.

Tabela 4. Microrganismos primeira etapa de amostragem

*	Bactérias Heterotróficas	Fungos Heterotróficos	Bactérias Hidrocarbonoclasticas NMP/g solo seco	Fungos Hidrocarbonoclasticos	Denitrificantes
1	2,02530E+06	1,68880E+04	3,02700E+04	1,95900E+03	2,02378E+05
2	2,31692E+06	8,87100E+03	4,96080E+04	4,07800E+03	9,50667E+05
3	1,41561E+06	5,19700E+03	6,79770E+04	3,44400E+03	1,71754E+05

* - 1, 2 e 3 representam respectivamente o tratamento controle, com peróxido de hidrogênio e nitrato de potássio

Tabela 5. Microrganismos quinta etapa de amostragem

*	Bactérias Heterotróficas	Fungos Heterotróficos	Bactérias Hidrocarbonoclasticas NMP/g solo seco	Fungos Hidrocarbonoclasticos	Denitrificantes
1	9,06891E+06	5,16050E+04	4,66922E+05	3,34390E+04	8,81720E+05
2	2,74758E+07	4,88160E+04	1,39190E+06	5,70240E+04	3,72340E+06
3	1,29721E+07	7,95010E+04	2,18676E+05	1,15401E+05	3,42391E+05

* - 1, 2 e 3 representam respectivamente o tratamento controle, com peróxido de hidrogênio e nitrato de potássio

4. Discussão

4.1. Tratamentos com Peróxido de Hidrogênio e Nitrato de Potássio

Os tratamentos que envolveram a aplicação de peróxido de hidrogênio e nitrato de potássio apresentaram as reduções de TPH respectivamente de 86,70% e 91,68%. O tratamento controle apresentou a redução de 38,07% indicando que a adição de bioestimulantes antecipa o processo de biodegradação e descontaminação de solos com hidrocarbonetos de petróleo. Não foram notadas diferenças entre as características químicas e físicas analisadas, de acordo com os resultados obtidos de análise química e física, favorecendo a interpretação dos valores de redução de TPH. Para o controle, a redução de 38,07% é justificada por processos mistos de decomposição aeróbica e anaeróbica naturais do próprio solo, em conjunto com a remoção física pela adição de água.

Para as doses administradas de 500 mg/l e 1.000 mg/l de H₂O₂ não foram observadas reduções nas populações analisadas, ou seja, toxicidade. Vários autores citam que estes níveis de peróxido de hidrogênio são seguros e podem ser utilizados para tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo sem prejudicar a população de microrganismos importante para os processos de biodegradação (TEXAS RESEARCH INSTITUTE, 1982; THOMAS e WARD, 1989; ALEXANDER, 1999). O tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou a maior redução do valor de TPH da quarta para a quinta amostragem, coincidindo com o aumento da concentração para 1.000 mg/l. Ainda assim não foram notados efeitos tóxicos à população de microrganismos. Com a adição de peróxido pode ocorrer o estímulo da população aeróbica com o aumento dos teores de oxigênio, podendo também ocorrer a oxidação química através da reação de *Fenton* modificada. CHEN et al. (1998) realizaram experimentos com e sem ajuste de pH e obtiveram resultados mais efetivos, ou seja maiores taxas de biodegradação, quando o pH era 7,0 do que em pH's

ácidos (pH = 2); resultado da melhor atividade biológica e redução da reação de *Fenton* com a precipitação dos metais. O pH do tratamento com peróxido foi de 5,93 em CaCl₂.

Da primeira para a quinta amostragem podem ser notados aumentos para todas as populações analisadas e para todos os tratamentos. Foram notados valores elevados para a população de denitrificantes em todos os tratamentos, cuja população foi favorecida muito provavelmente devido aos valores de pH encontrados. Condições de pH entre 6,0 e 7,0 favorecem o processo de denitrificação (ALEXANDER, 1977; DAVIDSON et al., 1985).

Os tratamentos que envolveram a adição de bioestimulantes foram favorecidos pelo valor de condutividade hidráulica de 10⁻⁴ cm/s. HEYSE et al. (1986) e HINCHEE e DOWNEY (1988), ambos citados em API (1995), relatam que o uso de H₂O₂ pode ser economicamente inviável, principalmente se o solo for impermeável.

5. Referências

- ALEXANDER, M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 467 p.
- ALEXANDER, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, second edition. 453 p.
- API. 1995. Publication Nº 4627, Health and Env.Sciences Dept. 139p.
- BÜYÜKSÖNMEZ, F., HESS, T.F., CRAWFORD, R.L., WATTS, R.J. 1998. Toxic effects of modified fenton reagents on *Xanthobacter flavus* FB71. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64 (10). p 3759 – 3764.
- CAUWENBERG, L.V., ROOTE, D.S. 1998. In situ bioremediation. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. 20 p.
- CHEN, C.T., TAFURI, A.N., RAHMAN, M., FOERST, M.B. 1998. Chemical oxidation treatment of petroleum contaminated soil using fenton's reagent. Journal of Environmental Science Health. Vol. 33 (6). p. 987 – 1008.
- COOKSON, J.T. 1995. Bioremediation engineering: design and application. McGraw-Hill, Inc. 525 p.
- DAVIDSON, E.A., STRAND, M.K., GALLOWAY, L.F. 1985. Evaluation of the most probable number method for enumerating denitrifying bacteria. Soil Science Society American Journal. Vol. 49. p. 642 – 645.
- EMBRAPA. 1997. Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos – Embrapa. Rio de Janeiro, 2ª edição. 212 p.
- GAMBLE, T.N., BETLACH, M.R., TIEDJE, J.M. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 33 (4). p. 926 – 939.
- HESS, A., HÖHENER, P., HUNKELER, D., ZEYER, J. 1996. Bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer: simulation studies in laboratory aquifer columns. Journal of Contaminant Hydrology. Vol 23. p. 329 – 345.
- JOBSON, A., COOK, F.D., WESTLAKE, D.W.S. 1972. Microbial utilization of crude oil. Applied Microbiology. Vol. (23). p. 1082 – 1089.
- LEETHEM, J.T. 2002. In-situ chemical oxidation of MTBE: a case study of the successful remediation of a large gasoline release. Contaminated Soil Sediment and Water. Aehsmag.com – July/August. P. 70 – 75.
- MENZIES, J.D. 1965. Fungi. In: BLACK, C.A. (ed.). Methods of Soil Analysis. Madison, American Society of Agronomy. Vol. 2 cap. 107. p. 1502-1505.
- MESTER, K.G. 1995. Field evaluation of in situ denitrification for bioremediation of contaminated soils and groundwater. New Brunswick, New Jersey. 155p.
- MIHELICIC, J.R., e LUTHY, R.G. 1988. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrifying conditions in soil-water systems. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 54 (5). p. 1188-1196.
- MILLER, C.M., VALENTINE, R.L., ROEHL, M.E., ALVAREZ, P.J.J. 1996. Chemical and microbiological assessment of pendimethalin-contaminated soil after treatment with Fenton's reagent. Water Research. Vol. 30 (11). p. 2579 – 2586.
- MURPHY, A.P., BOGLI, W.J., PRICE, M.K., MOODY, C.D. 1989. A Fenton-like reaction to neutralize formaldehyde waste solutions. Environmental Science Technology. Vol. 23. p. 166 – 169.
- PAUL, E.A., CLARK, F.E. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, Inc. – San Diego – California. 275p.
- PAVAN, M.A., BLOCH, M.F., ZEMPULSKI, H.C., MIYAZAWA, M., ZOCOLER, D.C. 1992. Manual de análise química de solo e controle de qualidade. Londrina IAPAR – Circular nº 76. 40p.
- PETROBRAS. 1997. REPAR-NORMA ME-6360-027 - Método de ensaio-Determinação da atividade respiratória potencial. 22p.
- SCHOCHER, R.J., SEYFRIED, B., VASQUEZ, F., ZEYER, J. 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. Archives of Microbiology. Vol. 157. p. 7 – 12.
- TEXAS RESEARCH INSTITUTE. "Enhancing the microbial degradation of underground gasoline by increasing available oxygen". API Publication nº4428; American Petroleum Institute: Washington, DC, 1982.
- THOMAS, J.M., WARD, C.H. 1989. In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. Environmental Science Technology. Vol. 23 (7). p. 760 – 766.
- TIEDJE, J.M. 1994. Denitrifiers. p 245-267. In: Weaver, R.W. et al (ed.). Methods of Soil Analysis. Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America.
- ZAPPI, M., WHITE, K., HWANG, H.M., BAJPAI, R., QASIN, M. 2000. The fate of hydrogen peroxide as an oxygen source for bioremediation activities within saturated aquifer systems. Journal Air & Waste Management Association. Vol. 50. p 1818 – 1830.