

8º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

BIORREMEDIAÇÃO POR ATENUAÇÃO NATURAL EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SOLO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO POR BIODIESEL E BLENDA DIESEL/BIODIESEL

AUTORES:

G.I. Matos^{1,2,3}, C.S. Junior⁴, T.C. Oliva⁴, D.F. Subtil¹, A.L. Chaves², S.N. Agathos⁵, B. Stenuit⁵, D.A. Coutinho², C.G. Ferreira², V. Oliveira², M.T. Lutterbach², E.F. Sérvulo¹

INSTITUIÇÃO:

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, ²Instituto Nacional de Tecnologia, ³Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, ⁴Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, ⁵Earth & Life Institute, UCL, Belgium.

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás - 8º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás - ABPG, no período de 20 a 22 de outubro de 2015, em Curitiba/PR. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 8º PDPETRO.

BIORREMEDIAÇÃO POR ATENUAÇÃO NATURAL EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SOLO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO POR BIODIESEL E BLENDS DIESEL/BIODIESEL

Abstract

The gradual introduction of biodiesel in the Brazilian energy landscape has primarily occurred through its blending with diesel. These formulations are called diesel B and express the percentage of biodiesel in the mixture (e.g., B20 (20% biodiesel) and B5 (5% biodiesel)). Because B20 and lower-level blends generally do not require engine modifications, their use as transportation fuel is increasing in the Brazilian fuels market used in the distribution networks. However, the environmental fate and ecotoxicological impacts of low-level biodiesel blends and pure biodiesel (B100) are poorly studied. Particularly, we need to define the ecotoxicological-safety endpoints as well as to characterize the biodiesel blends (bio)degradation profile in contaminated soils. For this aim, intrinsic biodegradation was evaluated in different depths in laboratory microcosms using closed reactor columns containing clay loam soil (20% humidity) contaminated (10% w/v) with pure biodiesel (EXPB100) and a low-level blend B5 (EXPB5), during 60 days. Gas Chromatography with Flame ionization detector (GC/FID) was used to define hydrocarbons and biodiesel (bio)degradation profiles. Also, the cultivable microbiota (bacteria and fungi) was monitored. At the end, soil samples were tested by dehydrogenase assays using triphenyltetrazolium chloride (TTC) method, and ecotoxicological tests using red worms (*Eisenia fetida*) to evaluate their toxicity. It was observed an important contaminant concentration decrease (approximately 80%) in all EXPB100 depths and EXPB5 upper fractions probably due to percolation and degradation (abiotic and biotic). However, it was detected significant biodegradation only of biodiesel and its fraction in the blend, supported by the microbial activity, as suggested by the increases in dehydrogenase activity and microbial biomass, over the incubation period. Additionally, it was observed higher toxicity reduction in the soil contaminated with pure biodiesel than when it was exposed to B5, before and after intrinsic biodegradation assays. These first findings suggest that bioremediation by natural attenuation of diesel B could be mediated by soil native fungi and bacteria at different depths, and the biodegradability of biodiesel is higher according to the increase of its concentration in the blend. A better characterization of microbial species involved in the process will help the development of more efficient remediation strategies for these contaminants in environments.

Introdução

Políticas nacionais e internacionais relacionadas ao controle da poluição ambiental têm motivado o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente favoráveis, principalmente relacionadas ao uso de energias oriundas de fontes renováveis, igualmente eficientes e com impacto ambiental reduzido. Neste cenário, o Brasil vem adotando medidas buscando a consolidação da utilização de biocombustíveis (BRASIL, 2005; RATHMAN et al., 2005). O biodiesel se insere como matriz energética promissora, posto que além de permitir a economia de divisas com a importação de petróleo e óleo diesel, pode ser obtido a partir de biomassa renovável, apresenta queima mais limpa, maior biodegradabilidade e menor toxicidade ambiental (SUAREZ et al., 2007). Desde novembro de 2014, conforme disposto pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), órgão regulador do suprimento de derivados de petróleo, gás natural e seus derivados, e de biocombustíveis, em todo o território nacional, o diesel circulante deve ser acrescido de 7% (v/v) de biodiesel (www.anp.gov.br). Contudo, a expectativa do setor é que o percentual do biodiesel ao diesel fóssil seja de 20% no transporte coletivo urbano em grandes cidades e regiões metropolitanas, o chamado B20 Metropolitano, o que além de atender a balança comercial brasileira, contribuiria para reduzir os efeitos da poluição atmosférica nos grandes centros.

No Brasil, o principal modal de transporte de cargas e passageiros é o transporte rodoviário, compreendendo frota de veículos automotores de grande porte do ciclo diesel (CNT, 2013). Por esta razão, desde 2000, o óleo diesel tem sido o derivado de petróleo mais consumido no país (BONFÁ, 2011). A elevada e crescente demanda por óleo diesel, e, atualmente, por biodiesel, para atender a legislação em vigor, obrigam o seu transporte e armazenamento de grandes volumes em todo território nacional. Neste cenário, existe a possibilidade de derrames acidentais pela mistura diesel/biodiesel, como comumente associado à indústria do petróleo, o que pode comprometer o ambiente, com poluição de solos e/ou águas (superficiais e subterrâneas).

Os solos em geral, podem apresentar microbiota capaz de promover a degradação de poluentes, gerando subprodutos de menor, maior ou igual grau de toxicidade. Mesmo naqueles sem histórico de contaminação, espécies microbianas com capacidade de metabolizar compostos poluentes podem estar presentes (SINGH et al., 2009). Entretanto, dependendo do nível de recalcitrância da substância química de origem antrópica, a atividade promovida pela comunidade autóctone, pode não ser suficiente para mitigar o poluente ou, pelo menos, reduzir o seu nível para valores seguros e aceitáveis ambientalmente. Neste caso, podem ser adotadas estratégias de remediação, cuja aplicação dependerá de vários fatores a serem bem definidos, como características do poluente e do sítio contaminado.

Ainda são escassas na literatura as informações sobre os fatores que influenciam a biorremediação do diesel B em solo. Acredita-se que o biodiesel, por ser constituído por compostos de menor complexidade estrutural em comparação ao diesel, está mais susceptível à degradação por ação microbiana (FERNÁNDEZ-ALVAREZ et al., 2007). No entanto, existe uma carência de estudos abordando a contaminação de solos por vazamentos ou derramamentos de blends diesel/biodiesel no que tange às populações microbianas envolvidas, tempo de biodegradação e influencia das condições ambientais de modo a melhor entender os impactos ambientais causados. Neste contexto, o presente trabalho busca apresentar o perfil de (bio)degradação, assim como a participação da microbiota cultivável envolvida (fungos e bactérias), a atividade metabólica desidrogenásica e os níveis de ecotoxicidade de amostras coletadas de reatores em coluna preenchidos com solo franco-argiloso artificialmente contaminado por biodiesel (B100) e blenda diesel/biodiesel (B5).

Metodologia

Estudos laboratoriais em microcosmos e desenho experimental

A amostra de solo (100 kg) utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). O solo de textura franco-argilosa foi coletada na cidade de São Paulo-SP, Brasil, em local sem histórico de contaminação prévia. No laboratório, o solo foi devidamente homogeneizado, peneirado em malha de 2 mm de abertura e quarteado, sendo estocado em tambor à temperatura ambiente, até o momento de uso. As amostras de biodiesel e diesel foram obtidas a partir de um centro de distribuição para postos de gasolina na região metropolitana do Rio de Janeiro, localizado no município de Duque de Caxias-RJ, Brasil. Foram realizados quatro ensaios de biorremediação por atenuação natural monitorada (ANM), em condições distintas, conforme detalhado na figura 1. Os experimentos foram conduzidos concomitantemente em reatores de policloreto de polivinila (PVC), constituídos de três compartimentos, cada um apresentando 10 cm de raio e 20 cm de altura. Cada compartimento foi preenchido com 7 kg de solo, e contaminado com 10% (v/m) da mistura B5 e biodiesel para fins comparativos. Foram também realizados ensaios controle, nas mesmas condições, utilizando solo e combustíveis esterilizados por tindalização (1 atm/20 min.) e por filtração (membrana de 0,45µm), respectivamente.

Todos reatores foram mantidos por 60 dias, em local arejado (temperatura variou de 25 a 28°C), com controle semanal da umidade (20%). Para todas as condições ensaiadas foram feitas determinações de teor residual de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), e do número de bactérias heterotróficas e fungos cultiváveis. Findo o tempo de processo, os solos de cada reator foram avaliados quanto a toxicidade por bioensaios com anelídeos e de atividade desidrogenásica.



Ensaio	Descrição
EXP B5	Solo in natura contaminado por diesel B5
EXP B100	Solo in natura contaminado por biodiesel puro (B100)
CE B5	Solo estéril contaminado por diesel B5 estéril
CE B100	Solo estéril contaminado por biodiesel puro (B100) estéril

Figura 1. Ensaios de microcosmos em reatores em coluna de PVC. Condições de incubação: 21 kg de solo franco-argiloso, 20% de umidade, 10% (v/m) de contaminação, temperatura externa: 25-28°C, tempo de incubação: 60 dias.

Metodologia Microbiológica e Analítica

A quantificação da biomassa microbiana heterotrófica cultivável, tanto das populações fúngicas quanto bacterianas, foi realizada a partir de amostras de 5 gramas de solo colhidas em duplicata (virgem e após 30 e 60 dias de incubação) nas diferentes alturas, resuspendidos em 50 mL de solução fisiológica (0,9% m/v NaCl) acrescida de 1% de Tween 80. Para bactérias, foi utilizada técnica de tubos múltiplos em triplicata cultivadas a partir de diluições decimais seriadas para determinação do Número Mais Provável por grama de solo (NMP/g). Para quantificação de bactérias aeróbias, as diluições foram feitas em solução fisiológica, e empregado o meio Caldo Nutriente (Sigma-Aldrich), ambos distribuídos em tubos de ensaio com rolhas de algodão. Para atender a condição de anaerobiose, as diluições foram feitas em solução redutora e os cultivos em Meio Fluido ao Tioglicolato (Himedia®), purgados com N₂, empregando frascos de penicilina lacrados com selos de alumínio. Os fungos filamentosos foram quantificados pela técnica de semeadura em placa de Petri,

sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC)/g de solo. As determinações de NMP/g e UFC/g foram feitas após incubação a 30°C por 2 dias para bactérias e 7 dias para fungos, respectivamente.

A atividade metabólica do solo inicial e em intervalos periódicos de 30 dias foi mensurada pela atividade de enzimas desidrogenásica, utilizando adaptação dos métodos colorimétricos de Casida et al. (1964) e Alef & Nanniepiere (1995). Esta metodologia se baseia na quantificação da taxa de redução do reagente cloreto 2,3,4 trifeniltetrazólio (TTC), incolor e solúvel em água, a trifenilformazan (TPF), que apresenta coloração avermelhada. O TTC atua comoceptor artificial de elétrons, sendo reduzido a TPF que pode ser quantificado calorimetricamente. Amostras de 5 g de solo colhidas ao longo do curso de reator foram incubadas em triplicata a 30°C por 2 horas, com homogeneização a cada 20 minutos. Ao final atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm e os dados de concentração calculados com o auxílio da curva analítica obtida utilizando-se concentrações conhecidas de solução de TPF.

Para avaliação da toxicidade do solo após a biorremediação foram conduzidos testes de ecotoxicidade com minhocas, sendo utilizado o anelídeo da espécie *Eisenia fetida*, baseado na norma ABNT NBR 15.537/2007 (ABNT, 2007) e adaptações. A taxa de mortalidade foi determinada relacionando a mortalidade no solo ao final do processo com a obtida no solo virgem. Os testes foram conduzidos em triplicata em recipientes contendo 200 g de solo e 10 minhocas selecionadas por 14 dias à temperatura ambiente.

Com o intuito de determinar a biodegradabilidade dos contaminantes ao longo do processo simulado de biorremediação por atenuação natural, foram realizadas análises para quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e de ésteres de ácidos graxos (constituíntes do biodiesel) no início e ao final do período de incubação (60 dias). Para tanto, amostras de solo (1 g) foram submetidas a extração com 25mL de solução de solvente hexano:acetona (50:50 v/v), em banho-maria com ultrassom, durante 1 hora e à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada em seringa com membrana de Nylon, e em seguida analisada por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG/DIC). Foram analisados hidrocarbonetos na faixa entre C₁₀ e C₂₄, utilizando-se os hidrocarbonetos alcanos como padrões internos. De forma semelhante, os ésteres de ácidos graxos também foram analisados por CG/FID, na plataforma do Laboratório de Bioquímica Nutricional e Toxicologia Ambiental da Universidade Católica de Louvain, Bélgica. As concentrações finais de contaminantes em cada um dos reatores (em todas as suas alturas) foram comparadas com a detectada no tempo inicial de experimento, para a determinação dos percentuais de biodegradação.

Resultados e Discussão

Perfil geral de (bio)degradação dos contaminantes nas diferentes profundidades dos microcosmos

Muitos estudos têm sido conduzidos a fim de identificar microrganismos e suas vias catabólicas envolvidas na metabolização de alcanos e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) presentes em locais contaminados. As vias de degradação destes contaminantes dependem, em sua maioria, da utilização de oxigênio molecular. No entanto, o metabolismo anaeróbio apresenta também um papel importante no processo de biodegradação, neste caso, outros aceptores de elétrons são utilizados. Embora as vias aeróbias sejam predominantes em meios com a presença de oxigênio atmosférico devido principalmente a eficiência energética, a ação concomitante da degradação em anaerobiose já foi relatada (KRUMHOLZ; CALDWELL; SUFLITA, 2005; PENG et al., 2008).

Analisando a figura 2, nota-se que os maiores decréscimos das concentrações de contaminantes foram observados nas porções superiores dos reatores, como esperado, devido à degradação espontânea e percolação dos contaminantes e, provavelmente, pela ação de microrganismos aeróbios. Entretanto, comportamentos diferenciados se evidenciam para degradação de B5 e de B100.

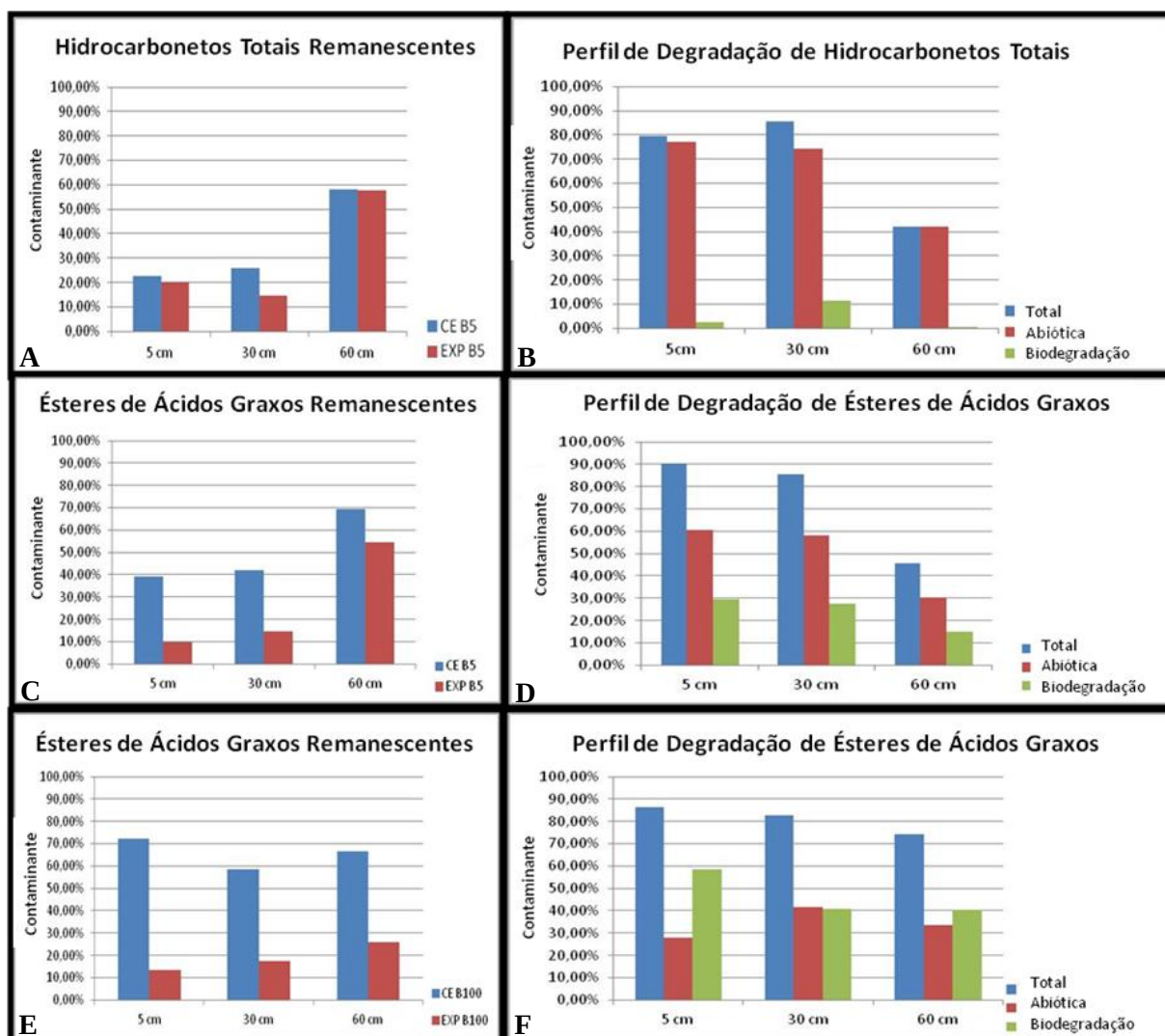


Figura 2: Análises percentuais de contaminantes HTP e Ésteres de Ácidos Graxos residuais (esquerda) e sua (bio)degradação (direita), determinada pela comparação entre os dados obtidos nas condições experimentais e respectivos controles. Os gráficos A, B, C e D referem-se aos reatores contaminados com B5 e E e F àqueles contaminados com B100.

O biodiesel é um combustível não derivado de petróleo, sendo uma mistura de ésteres monoalquílicos principalmente saturados, mono e dienólicos C16, C18 e/ou C22 alquil (geralmente metil) ésteres, obtidos por transesterificação de óleos vegetais. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes no biodiesel são degradados aproximadamente na mesma velocidade que os n-alcenos (tipicamente nC12 para nC24), principais componentes do diesel de petróleo (PRINCE, 2010). A direta correlação entre a diminuição da ecotoxicidade com a (bio) degradação do diesel/biodiesel ainda não é completamente elucidada neste estudo, mas alguns autores já observaram bioestimulação da biodegradação do diesel na presença de biodiesel, inclusive por sua capacidade de atuar como agente solubilizante do petróleo bruto (CYPLIK et al., 2011; PASQUALINO et al., 2006; PEREIRA & MUDGE, 2004; TAYLOR & JONES, 2001).

Neste contexto, é importante ressaltar que as vias de degradação microbiana desses combustíveis iniciam-se de maneira correlata o que poderia de fato co-estimular a biodegradação

desses combustíveis quando presentes em mistura. Entretanto, o fenômeno de competição entre as vias também pode ser observado, diminuindo a eficiência das vias metabólicas (JAKERIA et al., 2014). A figura 2 corrobora com esta última hipótese, visto que as taxas de biodegradação dos ésteres de ácidos graxos observadas são bastante superiores no reator que possuía biodiesel puro (B100) em detrimento ao reator contaminado com B5. Ademais, a biodegradação de hidrocarbonetos observada não se apresentou significativa em 60 dias, não demonstrando uma co-estimulação, mas a seleção por vias metabólicas preferenciais que utilizam fontes de carbono mais metabolicamente assimiláveis (biodiesel).

Análises microbianas, metabólicas e ecotoxicológicas correlatas ao perfil de biodegradação observado

Paralelamente ao perfil de degradação, também foi monitorada a flutuação da biomassa microbiana, a partir da quantificação de fungos filamentosos e bactérias (aeróbias e anaeróbias) cultiváveis. Em comparação com o solo virgem, a biomassa bacteriana, de maneira geral, se encontrou aumentada em ambos os microcosmos, após 60 dias de incubação. Nas três profundidades monitoradas, tanto para EXPB100 quanto para EXPB5 houve intenso crescimento das populações bacterianas anaeróbicas (e facultativas) (dados não apresentados). Os números de fungos filamentosos na camada mais superficial de ambos os reatores decorridos 60 dias de ANM se mantiveram semelhantes ao número inicial no solo virgem, de $4,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹. No entanto, foi detectada uma redução significativa da concentração desta população nas regiões mais profundas, principalmente em EXPB100 ($3,33 \times 10^2$ UFC.g⁻¹).

Após 60 dias, foi observado aumento da atividade desidrogenásica (AD) em ambos os microcosmos (EXP5 e EXP100) em comparação ao solo virgem, sendo os maiores valores encontrados nos solos de maior profundidade (60 cm) (dados não apresentados). Segundo alguns autores, os microrganismos em condição de anaerobiose produzem elevados montantes de desidrogenases; a limitação de oxigênio no solo tem sido associado com um aumento da AD (WOLINSKA & STEPNIEWSKA, 2012; BRZEZINSKA, 2001).

A taxa de mortalidade de minhocas nas amostras de solo de EXPB100 reduziu de 63% para 0%. Já para o ensaio EXPB5, a taxa de mortalidade de 100% caiu para 53% e 90% na parte superior e mais inferior do reator, respectivamente. Logo, a biorremediação é mais efetiva para biodiesel puro do que em mistura com o combustível fóssil. Também pode-se inferir que o biodiesel, quer na forma pura quer em mistura, pode ser biodegradado por via aeróbia e anaeróbia.

O presente estudo traz importantes dados sobre o potencial de biodegradabilidade anaeróbia do biodiesel puro e em blends, corroborada com uma redução significativa da ecotoxicidade, assim como elevadas taxas de atividade das enzimas desidrogenásicas em profundidades de até 60 cm.

Conclusões

Os resultados aqui apresentados sugerem que a biodegradação do biodiesel e suas misturas com o diesel, catalisada por microrganismos nativos do solo podem potencialmente ocorrer até 60 cm de profundidade. Neste contexto, a atenuação natural monitorada de solos contaminados com biodiesel pode ser considerada uma estratégia promissora para a biorremediação de solo contaminado com B100 ou B5.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do "Interuniversity Attraction Poles of the Belgian Science Policy Office".

Referências Bibliográficas

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Biodiesel - Introdução**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: julho de 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 15537: ecotoxicologia terrestre/ecotoxicidade aguda/método de ensaio com minhocas**. Rio de Janeiro, 2007.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic press, 1995.
- BONFÁ, M. **Diesel S10: Impacto sobre o rendimento do parque de refino brasileiro em 2020 e propostas mitigadoras**. Rio de Janeiro: COPPEAD, 2011.
- BRASIL. Lei Federal n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira**, 2005.
- BRZEZIŃSKA, M., STĘPNIEWSKI W., STĘPNIEWSKA Z., PRZYWARA G. Effect of Oxygen Deficiency On Soil Dehydrogenase Activity In a Pot Experiment With Triticale CV. Jago Vegetation. **International Agrophysics**, 15, pp. 145-149, 2001.
- CASIDA, J.R.; KLEIN, D.A. SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, 98(6), 1964.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DO TRANSPORTE (CNT). **Boletim Estatístico publicado em março de 2013**, 2013.
- CYPLIK, P., SCHMIDT M., SZULC A., MARECIK R., LISIECKI P., HEIPIEPER H.J., OWSIANIAK M., VAINSHTEIN M., CHRZANOWSKI L. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Bioresource Technology**, 102:4347–4352, 2011.
- FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ P., VILA J., GARRIDO J.M., GRIFOLL M., FEJOO G., LEMA, J.M. Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 147: 914–922, 2007.
- JAKERIA, M. R., FAZAL, M. A., HASEEB, A.S.M.A. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 30: 154-163, 2014.
- KRUMHOLZ L.R., CALDWELL M.E., SULFITA J.M. **Biodegradation of 'BTEx' hydrocarbons under anaerobic conditions**. In: Bioremediation: principles and applications / R.L. Crawford and D.L. Crawford. - (Plant and microbial biotechnology research series; 5), 2005.
- PASQUALINO J.C., MONTANÉ D., SALVADO J. Synergic Effects of Biodiesel in the Biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Energy**, v.30, pp. 874-879, 2006.
- PENG R.H., XIONG A.S., XUE Y., FU X.Y., GAO F., ZHAO W., TIAN Y.S., YAO Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiol Rev**. Nov;32(6):927-55, 2008.
- PEREIRA M.G., MUDGE S.M. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. **Chemosphere**. Jan;54(3):297-304, 2004.
- Prince R.C. **Biodiesel**. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Timmis, K.N., ed. (Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, Germany), pp. 2271-2275, 2010.
- Rathmann R., Santos O.I.B., Padula A.D., Plá J.V.J.A. Biodiesel: Uma Alternativa Estratégica Na Matriz Energética Brasileira? **Página Oficial do Biodiesel do Governo Federal do Brasil**. Brasília - DF, 2005.
- SINGH, A; KUHAD, R C; WARD, O P. **Soil Biology – Advances in Applied Bioremediation**. Ed. Springer. 365pp, 2009.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de Triglicerídeos em Combustíveis, Materiais Poliméricos e Insumos Químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, 30(3):667-676, 2007.
- TAYLOR L.T., JONES D.M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. **Chemosphere**, Volume 44(5): 1131-1136, 2001.
- WOLINSKA, A., STEPNIIEWSKA, Z., **Dehydrogenase Activity in the Soil Environment**. The John Paul II Catholic University of Lublin, Institute of Biotechnology, Department of Biochemistry and Environmental Chemistry, Lublin, Poland, 2012.