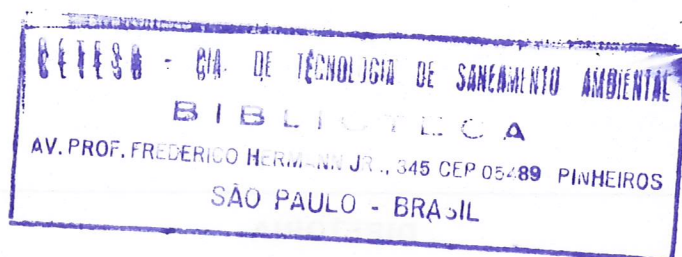




CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL



**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE
POLUENTES EM SOLOS**

Relatório Parcial - 1986

DIRETORIA DE PESQUISA

Dr. Samuel Murgel Branco

SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA EM IMPACTOS AMBIENTAIS

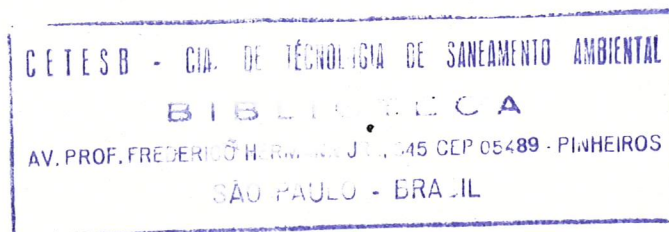
Dr. Aristides de Almeida Rocha

GÊRÊNCIA DE ESTUDOS E PESQUISAS AMBIENTAIS

Rodrigo César de Araújo Cunha

DIVISÃO DE PESQUISA DE SOLOS, ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E VEGETAÇÃO

João Ciarrocchi Lopez



Projeto: PESQUISA DE POLUIÇÃO DE SOLOS E ÁGUAS
SUBTERRÂNEAS (O.S. 020400).

Atividade: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO
DE POLUENTES EM SOLOS

Elaborado pela:

DIVISÃO DE PESQUISA DE SOLOS, ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E VEGETAÇÃO

Coordenação do Projeto:

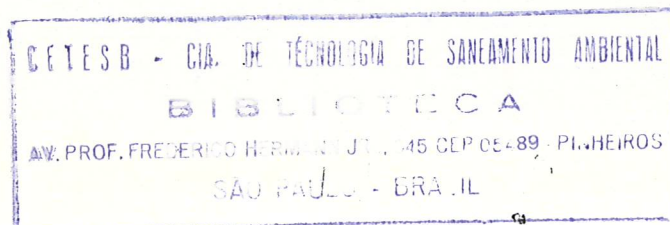
Engº Agrº Rodrigo César de Araújo Cunha
Biol. Dorothy Carmen Pinatti Casarini

Equipe Técnica

Farm.Bioq. Rosana Maria de Macedo
Biol. Suzi Cristina G.L. Martinez (DBC)

Apoio

Secretária Aldair Cintra Ugeda
Secretária Dirce Rosa do Amaral
Desenhista Marisa Cury (SPAR)



SUMÁRIO

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

1.	INTRODUÇÃO.....	01
2.	OBJETIVO.....	04
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	05
4.	RESULTADOS.....	07
4.1	- Caracterização Química do Solo nos Primeiros 40 cm de Profundidade.....	07
4.1.1	- Caracterização da amostra do solo utiliza do para os ensaios de respirometria	
4.2	- Caracterização Química da Borra Oleosa.....	07
4.3	- Resultados Obtidos nos Ensaio de Respirometria..	09
5.	DISCUSSÕES E CONCLUSÕES.....	13
5.1	- Otimização do Processo Devido à Correção do pH..	13
5.2	- Controle de pH e Óleos e Graxas no Final do Expe rimento.....	13
5.3	- Avaliação da Porcentagem de Biodegradação nos Di ferentes Tratamentos.....	14
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

1. INTRODUÇÃO

Landfarming é a denominação adotada pela EPA (Environmental Protection Agency - EUA) para um sistema de tratamento onde o resíduo orgânico é misturado à camada superior arável do solo (15 a 20 cm) para ser biodegradado enquanto que os íons metálicos presente no resíduo são incorporados no solo, não comprometendo as águas subterrâneas.

Os mecanismos primários relacionados com "landfarming" são: biodegradação, evaporação, fotooxidação e imobilização de constituíntes perigosos que possam existir no resíduo. Este método está sendo usado no Brasil como uma forma de tratamento e de disposição de alguns resíduos considerados perigosos provenientes das seguintes indústrias: refinarias de petróleo e indústrias petroquímicas, indústrias de madeira, indústria de papel e papelão, indústrias químicas e indústrias de sabões e detergentes.

Por se tratar de um processo dinâmico onde as interações solo-resíduo necessitam de avaliações caso a caso, assim como os fatores climáticos e biológicos, se constitui em um sistema de tratamento complexo podendo em casos de projeto e gerenciamento indevido ocasionar problemas imediatos de contaminação de águas superficiais, subterrâneas, do ar e de destruição do potencial de biodegradação do solo.

Sabe-se que o sistema "landfarming" que ainda não possui uma denominação nacional, foi desenvolvido há mais de vinte anos pela indústria petrolífera para tratamento de seus resíduos que incluem o petróleo bruto e seus derivados. Neste projeto se propõe à desenvolver uma metodologia de laboratório para a avaliação da biodegradação de poluentes em solos, classificando-os como possíveis candidatos para serem dispostos em sistema "landfarming", usando-se as borras oleosas de refinaria de petróleo como resíduo-referência na padronização da metodologia.

O processamento de petróleo nas refinarias gera, indubita-

velmente, um volume considerável de borras oleosas. As fontes mais comuns destas borras são as geradas no sistema API de separação de óleo-água, no sistema de flotação que constitui as borras oleosas com elevado teor de óleos e graxas e as geradas no processo de lodo ativado das unidades de tratamento biológico do resíduo industrial e esgoto doméstico que constitui as borras biológicas com baixo teor de óleos e graxas.

Os hidrocarbonetos presentes em resíduos de refinaria são de difícil decomposição nos sistemas clássicos de tratamento, como o lodo ativado, sendo atualmente operado em condições de baixa eficiência, o que requer um sistema complementar para a decomposição do lodo gerado.

O sistema de disposição de resíduos ou efluentes, conhecido como "landfarming" tem sido utilizado como um método alternativo para o tratamento de resíduos de refinarias de petróleo visto que o solo apresenta um largo "spectrum" de bactérias e uma extensa área superficial, onde as reações bacterianas podem ocorrer. Entretanto, os mecanismos de decomposição de borras oleosas no solo não são claramente conhecidos e inúmeros processos podem ocorrer simultaneamente.

Algumas substâncias presentes nos resíduos de refinarias de petróleo são instáveis sob condições normais e portanto quando lançadas no solo em um sistema "landfarming" pode sofrer processos de evaporação, fotodecomposição, adsorção, percolação e de gradação microbiana. Admite-se, entretanto, ser a biodegradação a causa primária da redução de borras oleosas em águas (Hutton et al. 1949).

Sabe-se que microorganismos como *Pseudomonas* e *Candida*, são capazes de decompor hidrocarbonetos (McKenna e Kallio, 1964; Vanlooche et al. 1975), porém informações referentes aos fatores ambientais que controlam a biodegradação em solos são inconclusivas e controversas. Loynachan (1978) observou que as práticas de cultivo, aumentam a transferência de oxigênio para o solo e aumentam as taxas de redução da borra pelos microorganismos. Odu (1978), por outro lado, observou que não existe um

efeito aparente na biodegradação em solos, efetuando-se ou não a movimentação do solo.

Um fato amplamente conhecido é a necessidade de um balanço de nutrientes como nitrogênio e fósforo, para que ocorra a biodegradação da matéria-orgânica. Sob este aspecto alguns pesquisadores demonstraram que a adição de fertilizantes aumenta a biodegradação de borras oleosas (Kicannor, 1972 e Westlake et al., 1978). Raymond et al. (1976) apresentou um estudo cuidadoso e extensivo sobre a biodegradação de borras oleosas em solo, conduzindo os ensaios no campo, sob condições metereológicas locais.

Dibble & Bartha (1979) conduziram um estudo em laboratório para avaliar e caracterizar os níveis de otimização dos parâmetros ambientais nos sistema "landfarming" para borras oleosas.

Inúmeras são as preocupações com a utilização deste sistema, sua melhor forma de operação e as consequências ambientais provenientes de um manejo não adequado, o que justifica o desenvolvimento desta pesquisa para esclarecimentos dos aspectos acima discutidos.

2. OBJETIVO

Padronização da metodologia de respirometria para identificação dos principais mecanismos relacionados com a biodegradação dos constituintes da borra oleosa no solo, e estabelecimento dos parâmetros ambientais para determinar as condições de operação deste sistema em campo.

Conhecendo-se estas condições, e com a adoção das práticas adequadas de manejo, os efeitos em campo serão acompanhados por metodologias de monitoramento previamente selecionadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a verificação da biodegradabilidade da borra oleosa em solo adotou-se o método de respirometria de Atlas & Bartha (1981).

A amostra do solo utilizado foi coletada em área de "landfarming" localizada na Refinaria Henrique Lage da Petrobrás (REVAP) em São José dos Campos-São Paulo. O solo foi seco ao ar e passado em tamis de malha de 2mm.

Foi realizada uma caracterização química do solo desta área com determinações de pH (H_2O e KCl), C, N, cátions trocáveis e óleos e graxas (Catani e Jacintho, 1974). Especificamente na amostra de solo utilizada para os ensaios de respirometria, determinou-se capacidade de campo pelo método de anel de Hildegard (Pramer e Schmidt, 1966), umidade (Standard Methods) e pH (Embrapa, 1979).

Tendo em vista que o processo de biodegradação é otimizado em pH neutro, a calagem da amostra do solo utilizada nos respirometros foi realizada pela adição de 15 mg de hidróxido de cálcio p.a. que elevou o pH do solo de 5,13 à 7,1 após dois dias de repouso.

A borra oleosa coletada caracteriza-se como lodo biológico proveniente de um processo de tratamento de lodo ativado determinando-se: umidade, óleos e graxas, resíduo total, voláteis e metais.

Para a montagem dos respirometros foram utilizados 10g da amostra do solo, sendo que a taxa de aplicação da borra oleosa de 1g corresponde aos 1% de óleos e graxas, embora o sugerido por Atlas & Bartha (1981) é de 5-10%. A duplicação desta taxa de aplicação busca dados quanto ao rendimento de método.

Os respirometros foram devidamente esterelizados, recebendo o solo misturado à borra oleosa. A umidade do solo adotada para o ensaio foi de 50% de sua capacidade de campo, sendo este com

plementado com N e P nas porcentagens de 1% (NH_4NO_3) e 0,1% (K_2HPO_4). A água necessária para fornecer os 50% da capacidade de campo ao solo foi adicionada aos respirômetros sob a forma de solução dos nutrientes.

No braço lateral de cada respirômetro foram adicionados 10 ml de solução de hidróxido de potássio 0,2N, incubando-se os mesmos a uma temperatura de 21°C durante um período aproximado de 3 meses, com acompanhamento da produção de CO_2 que após reagir com o hidróxido de potássio é dosado por titulometria (Atlas & Bartha, 1981).

A tabela 1 mostra os diferentes tratamentos realizados nos respirômetros.

TABELA 1: IDENTIFICAÇÃO DOS TRATAMENTOS UTILIZADOS

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
1	solo + pH normal + lg borra + 50% capacidade de campo
1	solo + pH normal + lg borra + 50% capacidade de campo
Controle	solo + pH normal + 50% capacidade de campo
2	solo + pH 7,0 + lg borra + 50% capacidade de campo
2	solo + pH 7,0 + lg borra + 50% capacidade de campo
Controle*	solo + pH 7,0 + 50% capacidade de campo
3	solo + pH 7,0 + 2g borra + 50% capacidade de campo

* Este controle foi utilizado para o tratamento 2 e 3.

Este ensaio teve a duração de 107 dias com titulação diária na primeira semana, a titulação foi utilizada semanalmente e quinzenalmente ao final do experimento, sempre com fornecimento de O_2 ao solo através da aeração do sistema.

4. RESULTADOS

4.1- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO NOS PRIMEIROS 40 CM DE PROFUNDIDADE

Profundidade do solo (cm)	pH		C	N	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H ⁺
	H ₂ O	Kcl								
0 - 20	4,50	4,10	1,39	0,07	1,00	2,00	0,20	0,10	2,80	9,60
20 - 40	4,60	4,10	0,92	0,04	1,00	1,70	0,20	0,25	2,40	5,60

Profundidade do solo (cm)	Fe	Cu	Zn	Mn	Óleos e graxas %
	µg/g				
0 - 20	1684	1,08	1,04	1,52	0,03
20 - 40	962	0,62	0,22	1,92	0,02

4.1.1-CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO SOLO UTILIZADO PARA OS ENSAIOS DE RESPIROMETRIA

O pH obtido foi de 5,13 que após a colagem com hidróxido de cálcio elevou-se a 7,1.

A capacidade de campo determinada foi de 42% sendo portanto adicionada água destilada para fornecer 50% desta capacidade, ou seja uma umidade de 21% na relação volume de águas, volume de solo.

A umidade residual do solo foi de 2%.

A densidade determinada pelo método direto (ou volumétrico) foi de 1,1.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA OLEOSA

Óleos e Graxas %	Resíduo Fixo %	Resíduo Volátil %	Resíduo Total %	Umidade %	Cd Pb Hg Zn Ni V					
					μg/g					
10,80	3,3	15,6	18,9	81,3	0,84	26,8	0,50	500	41,9	44,8

Basicamente a borra oleosa possui em sua composição: água, óleos e graxas (hidrocarboneto) e minerais. Existe também uma pequena porcentagem de outros compostos orgânicos como ácidos carboxílicos, aldeídos e acetonas, o que pode ser observado na diferença entre a porcentagem de resíduo volátil e óleos e graxas (hidrocarboneto).

4.3-RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE RESPIROMETRIA

A tabela 2 apresenta a quantidade acumulativa de gás carbônico produzida durante o processo de biodegradação da borra oleosa. Esta quantidade é acumulativa no decorrer de todo o período experimental. As quantidades de CO₂ são expressas em micromoles.

TABELA 2 - QUANTIDADE ACUMULATIVA DE CO₂ (μ moles)

Tempo após incubação (dias)	QUANTIDADE ACUMULATIVA DE CO ₂ (μ moles)				
	1		2		3
	Controle 1	Trat.*	Contr.2 e 3	Trat.*	Tratamento *
1	135	177	150	190	237
2	150	215	185	242	282
3	175	260	225	310	375
4	195	280	275	350	450
6	250	370	350	445	590
8	250	377	355	487	730
10	265	462	400	617	1065
12	265	452	405	710	1267
14	265	515	410	777	1477
19	265	627	410	942	1782
21	265	647	410	960	1822
25	285	745	425	1077	1967
34	320	965	485	1307	2110
41	325	1075	510	1390	2175
50	375	1210	555	1500	2257
56	415	1322	575	1605	2330
64	420	1372	580	1675	2365
78	440	1427	590	1710	2395
92	475	1472	600	1790	2425
107	540	1509	615	1872	2475

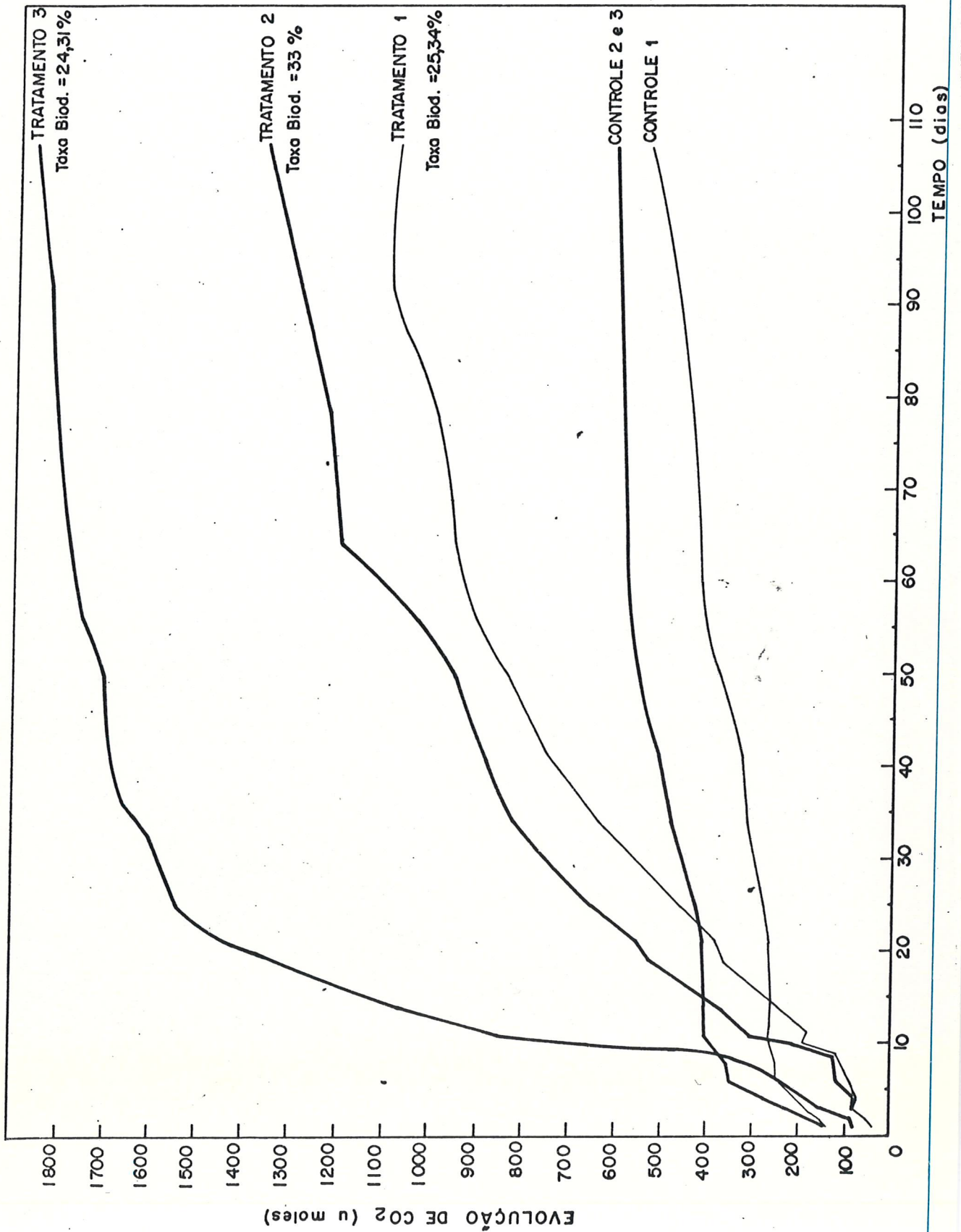
* Média de duas repetições

A tabela 3 apresenta a quantidade acumulativa de gás carbônico efetiva, ou seja subtraindo-se a quantidade produzida pelo controle da quantidade produzida no tratamento.

TABELA 3 - QUANTIDADE ACUMULATIVA DE CO₂ EFETIVA (μ moles)

Tempo após incubação (dias)	QUANTIDADE ACUMULATIVA DE CO ₂ EFETIVA (μ moles)		
	T R A T A M E N T O		
	1.	2	3
1	42	40	87
2	65	57	98
3	85	85	150
4	85	75	175
6	120	95	240
8	127	132	375
10	197	217	665
12	187	305	862
14	250	367	1067
19	362	532	1372
21	382	550	1412
25	460	652	1542
34	645	822	1615
41	750	880	1665
50	835	945	1702
56	907	1030	1755
64	952	1095	1785
78	987	1120	1805
92	997	1190	1825
107 C	969	1257	1860

Na sequência está representado a figura 1 que mostra as quantidades acumulativas de gás carbônico (μ moles) produzidas nos controles (1, 2 e 3) e as quantidades acumulativas de gás carbônico produzidas no processo de biodegradação da borra oleosa nos tratamentos 1, 2 e 3 já subtraídos dos valores das quantidades de gás carbônico produzidas nos respectivos controles.



5. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

5.1-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DEVIDO À CORREÇÃO DO pH

Tomando-se como ponto de referência o sexagésimo quarto dia, quando pode-se já notar a estabilização da produção de CO_2 , o tratamento 1 cujo solo não sofreu correção de pH apresenta uma produção acumulada de 952 μmoles de CO_2 (já descontado o controle) enquanto o tratamento 2 com pH no solo corrigido apresentou uma produção acumulada de aproximadamente 1095 μmoles de CO_2 (Tabela 3). Os 143 μmoles produzidos a mais pelo tratamento 2 refletem em termos de porcentagem em relação ao tratamento 1, o correspondente a 13%. Portanto poderia-se considerar que a biodegradação de borras oleosas no solo com pH corrigido é otimizada, com um maior rendimento.

5.2-CONTROLE DE pH E ÓLEOS E GRAXAS NO FINAL DO EXPERIMENTO

É muito discutível o fato de ter-se adicionado hidróxido de cálcio para calagem do solo e não o carbonato de cálcio, sugerido por Atlas & Bartha (1981) que funcionaria como um sistema tampão. Isto poderia otimizar ainda mais o tratamento 2 em relação ao tratamento 1 (Fig 1).

De acordo com a tabela 4 observa-se que o processo de biodegradação de borras oleosas provoca uma acidificação no solo, desde que o ensaio foi iniciado com pH 7,1 para os tratamentos 2 e 3 e no final do ensaio este pH abaixou para 5,9 e 5,4 respectivamente. A acidez da borra pode ser, em parte, a causadora deste fato, desde que o controle que não continha a borra o pH ficou em 6,83 no final do experimento.

TABELA 4 - pH E PORCENTAGEM DE ÓLEOS E GRAXAS NO SOLO NO FINAL DO EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO.

PARÂMETRO	CONTROLE		T R A T A M E N T O		
	1	2 e 3	1	2	3
pH	5,50	6,83	5,60	5,90	5,40
O.G. (%)	-	-	0,36	1,56	0,63

Em relação aos valores obtidos de óleos e graxas ao final do experimento, estes não mostram-se passíveis de interpretação visto que a quantidade de solo utilizada não permitiu que estes ensaios fossem realizados em duplicata. Deste fato pode-se destacar a necessidade de se considerar um ensaio paralelo para o controle deste parâmetro.

5.3. AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE BIODEGRADAÇÃO NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.

A porcentagem de biodegradação nos tratamentos foi calculada segundo Bartha (comunicação pessoal), que assume como 85% da quantidade de óleos e graxas na borra oleosa sendo carbono, e que 50% deste é transformado em biomassa e humus do solo. Considerando-se que a borra utilizada no experimento continha 10,8% de óleos e graxas, calcula-se que em 1g da borra havia 0,108g ou 108mg de óleos e graxas. Se 85% desta quantidade é carbono, estima-se que para cada grama de borra oleosa aplicada no solo, foram introduzidas 91,8mg de carbono. Dividindo-se este valor pelo mol de carbono (12) (para se transformar mg de carbono para μ moles de carbono), portanto, obtém-se que a taxa de aplicação de carbono no experimento de 7.650 μ moles/grama de borra aplicada.

A - TRATAMENTO 1

1g de borra oleosa e pH não corrigido

Neste tratamento, para esta taxa de aplicação, foi incorporado ao solo 7.650 μ moles de carbono.

A quantidade final de gás carbônico produzida neste tratamento foi de 969 μ moles (Tab 3), que multiplicado por 2, desde que 50% do carbono é incorporado à biomassa microbiana, determina uma produção de 1938 μ moles de CO_2 . Isto corresponde a uma taxa de biodegradação de 25,34% (Fig 1).

B - TRATAMENTO 2

1g de borra oleosa e pH corrigido para 7.

Neste tratamento aplicou-se 1g de borra oleosa o que corresponde também a 7.650 μ moles de carbono aplicado, sendo, entretanto, o pH do solo corrigido, elevando-se a 7,1.

A quantidade final de gás carbônico produzida para esta condição foi de 1257 μ moles x 2 (pois 50% incorpora-se à biomassa), correspondendo pois a 2514 μ moles de CO_2 . Isto determina uma taxa de biodegradação de 33% (Fig 1).

C - TRATAMENTO 3

2g de borra oleosa e pH corrigido para 7.

Neste tratamento duplicou-se a taxa de aplica-ção para 2g de borra oleosa, o que corresponde a 15.300 μ moles de carbono aplicado. A quantidade final de gás carbônico produ-zida neste tratamento foi de 1860 μ moles ou 3720 μ moles considerando-se a porcentagem de carbono assimilada pela biomassa. A taxa de biodegradação para este tratamento foi de 24,31% (Fig 1).

Observando-se a figura 1 nota-se que embora no tratamento 3 a produção de CO_2 seja maior que no tratamento 2, sua taxa de biodegradação foi menor. Isto pode ser explicado pois a taxa de biodegradação é calculada considerando-se a quan-tidade de hidrocarbonetos presentes na borra oleosa, sendo que outros compostos orgânicos, além destes, podem também estar presentes e serem igualmente oxidados a CO_2 . Conclue-se portanto, que para as condições do experimento a melhor taxa de aplicação da borra oleosa foi de 1% (peso/peso) da sua composição em hi

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL
 BIBLIOTECA

drocarboneto para 10g de solo. Para esta taxa obteve-se, como apresentado anteriormente, uma biodegradação de 33% do total de hidrocarbonetos aplicados.

Dibble e Bartha (1979) obtiveram em seus experimentos uma taxa de aplicação aconselhável de 1,0g de hidrocarboneto por 20g de solo arenoso. Estes autores também consideram que uma taxa de biodegradação acima de 30% (limite mínimo) é suficiente para considerar o resíduo, no caso a borra oleosa, como um bom candidato ao sistema de tratamento "landfarming". Considerando-se que a camada arável do solo é de 15 cm e admitindo-se sua densidade como sendo igual a $1,4 \text{ g/cm}^3$, para um hectare de terreno ter-se-á $2,10 \times 10^6 \text{ kg}$ de solo arável, levando-se em conta que para este experimento a melhor taxa de aplicação de borra oleosa em laboratório foi de 1,0g de borra para 10g de solo, pode-se extrapolar que a taxa de aplicação desta borra no campo, para condições de pH na faixa de 7-8 e corrigindo-se os teores de nutrientes dentro das relações C:N de 1% e C:P de 0,1%, será de 210 toneladas de borra oleosa por hectare de solo.

Observando-se a figura 1, o tratamento 1 onde o pH não foi corrigido, obteve-se uma baixa taxa de biodegradação o que pode evidenciar o baixo potencial microbiológico deste solo. Este fato pode ser visualizado na Tabela 5 construída a partir de uma análise microbiológica de duas amostras coletadas no local, sendo uma da célula com borra oleosa e outra de uma célula virgem sem histórico prévio de recebimento de borra.

TABELA 5 - QUANTIDADE DE MICROORGANISMOS NO SOLO
 (Número de microorganismos por gama de peso seco do solo)

	pH	Umidade %	Bacteria	Fungos	Actinomiceto
Célula com Borra	2,6	10,1	$7,8 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$	222
Célula Virgem	5,1	3,5	$1,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$

Como pode-se observar o pH na célula onde a borra vem sendo aplicada está drasticamente ácido o que deverá estar inibindo significativamente o desenvolvimento dos microorganismos que efetuam a biodegradação. Mesmo na célula virgem a quantidade de bactérias, que são as mais importantes na biodegradação de hidrocarbonetos, está muito abaixo do nível normal que é em torno de 10^8 , em consequência do baixo pH.

O sistema de "landfarming" para borras oleosas tem sido adotado por várias refinarias e como pode-se observar pelas discussões dos dados obtidos na fase inicial deste experimento, não está existindo, neste local, um manejo e gerenciamento adequado dos parâmetros ambientais para a otimização do processo. Parece que entre os principais parâmetros a serem controlados o pH, o balanço de nutrientes e a taxa de aplicação do resíduo se destacam como os mais importantes.

Com relação a metodologia de laboratório utilizada, esta se mostrou perfeitamente exequível, com nível de resposta satisfatório para sua padronização para borras oleosas, com possibilidade de empregá-la para outros resíduos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R. & BARTHA, R. - Microbial Ecology Fundamentals and Applications 2a. ed., Addison-Wesley Publishing Company. 1981.
- CATANI, R.A. & JACINTHO, A.O. - Análise química para avaliar a fertilidade do solo. Boletim Técnico nº 27:7p, Piracicaba, ESALQ, USP. 1974.
- DIBBLE, J.T. & BARTHA, R. - Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge, Applied and Environmental Microb. 37(4):729-739. 1979.
- EMBRAPA - Manual de Métodos de Análise de Solo. Rio de Janeiro, 1979.
- HUTTON, W.E. & ZOBELL, C.E. - The Occurrence and Characteristics of Methane Oxidizing Bacteria in Marine Sediments. J. Bacteriology, 58:463-473 (1949)
- KICANNON, C.B. - Only Waste Disposal by Soil Cultivation Process, U.S., EPA - R₂-72-110 (1972).
- LOYNACHAN, T.E. - Low Temperature Mineralization of Crude Oil in Soil, J. Environ.Qual., 7:494-500 (1978).
- MCKENNA, E.J. & KALLIO, R.E. - Principles and Application of Aquatic Microbial, John Wiley and Sons, New York, N.Y. (1964).
- ODU, C.T.I. - The effect of Nutrient Application and Aeration on Oil Degradation in Soil. Environ. Pollut., 15:235-239 (1978).
- PRAMER, D. & SCHMIDT, E.L. - Experimental Soil Microbiology. Burgess Pub.Co. Minneapolis. 1966.
- RAYMOND, R.L.; HUDSON, J.O. & JAMISON, V.W., Oil degradation in Soil. Applied and Environmental Microbiology, 31:522-535 (1976).

VANLOOCKE, R.; DE BORGER, R.; VOETS, J.P. & VERSTRAETE, W. -
Soil and Groundwater Contamination by Oil Spills, Problems
and Remedies. Intern. J. Environmental Studies, 8:99 - 111
(1975),

WESTLAKE, D.W.S.; JOBSON, A.M. & COOL, F.D. - In Situ
Degradation of Oil in a Soil of the Boreal Region of the
Northwest Territories. Can. J. Microbiology, 24:254-260
(1978).