



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Carine Souza da Silva

Valoração da eficiência de tratamento de água produzida através do cultivo de microalgas para produção de lipídeos e pigmentos.

Salvador

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Carine Souza da Silva

Valoração da eficiência de tratamento de água produzida através do cultivo de microalgas para produção de lipídeos e pigmentos.

Linha de Pesquisa:

Desenvolvimento de processos biológicos para a produção de bioprodutos de aplicação industrial

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Salvador

2021

RESUMO

A indústria petrolífera pode gerar um alto volume de águas residuais associadas às atividades de extração. Esse efluente é conhecido como a água produzida e é caracterizado por uma composição complexa de derivados de petróleo e sais. Esse efluente precisa ser tratado antes de ser descartado ou empregado em outros processos industriais. O objetivo desse estudo foi avaliar o tratamento da água produzida da indústria do petróleo através do seu aproveitamento para o cultivo de microalga. A água produzida possui nutrientes essenciais para o cultivo de microalgas e seu reaproveitamento valoriza economicamente esse efluente (upcycling). A *Dunaliella salina* foi cultivada em diferentes concentrações de água produzida suplementada com os constituintes do meio Conway, posteriormente passou por um período de adaptação na água produzida suplementada nas concentrações de sal de 45 e 50 gSTD/L. Os resultados mostraram que o meio de cultivo preparado com AP pode gerar biomassa e lipídeo algal com uma redução de apenas 2,3 vezes em relação ao controle. No entanto, o processo de adaptação ou aclimação da microalga a AP apresentou um ganho positivo para o cultivo de *Dunaliella salina*, chegando a um aumento da taxa de crescimento específico de 0,28 e 0,29 d⁻¹, produtividade de biomassa 45 e 48 mg L d⁻¹ e acúmulo de pigmentos nas concentrações salinas de 45 e 50 gSTD/L, respectivamente. O processo de adaptação também reduziu o período de cultivo. Destaca-se ainda que houve significativa remoção de nutrientes inorgânicos (N e P), assim como, de carga orgânica (DQO) durante o processo de cultivo (≥ 85%, respectivamente). Portanto, contribuindo significativamente para o tratamento da AP. Essa pesquisa também identifica que a melhor concentração salina para o cultivo de *Dunaliella salina* em AP é de 50 gSTD/L. Esse fato facilita o processo de cultivo em lagoas abertas e em larga escala, pois, a força seletiva da alta concentração de sais previne contaminação e crescimento por microalgas invasoras.

Palavras-Chave: *Dunaliella salina*, água produzida, hipersalino, microalga, petróleo e gás.

ABSTRACT

The oil industry can generate a high volume of wastewater associated with oil extraction activities. This effluent is known as produced water and is characterized by a complex composition of petroleum products and salts. This effluent must be treated before being discarded or used in other industrial processes. The objective of this study was to evaluate the treatment of produced water from the oil industry through its use for the cultivation of microalgae. The produced water has essential nutrients for the cultivation of microalgae and its reuse economically increases its value (upcycling). *Dunaliella salina* was grown in different concentrations of produced water supplemented with the Conway medium, and later went through an adaptation period to produced water with high salts content. The results showed that the culture medium prepared with AP can generate biomass and algal lipid with a reduction of only 2.3 times in relation to the control. However, the process of adapting or acclimating the microalgae to salted AP showed a positive gain for the cultivation of *Dunaliella salina*, reaching an increase in the specific growth rate of 0.28 and 0.29 d⁻¹, biomass productivity 45 and 48 mg L d⁻¹ and pigment accumulation at salts concentrations of 45 and 50 gSDT / L, respectively. The adaptation process also reduced the cultivation period. It is also noteworthy that during culturing showed a significant removal of inorganic nutrients (N and P), as well as organic load (COD) during the cultivation process ($\geq 85\%$, respectively). Therefore, contributing significantly to the treatment of PA. This research also identifies that the best saline concentration for the cultivation of *Dunaliella salina* in AP is 50 gSDT / L. This fact facilitates the cultivation process in open and large-scale lagoons, since the selective strength of the high concentration of salts prevents contamination and growth by invasive microalgae.

Keywords: *Dunaliella salina*, produced water, hypersaline, microalgae, oil and gas.

Lista de Figuras

- Figura 1. Metodologia.** Fluxograma mostrando os testes de cultivos de *Dunaliella salina* em diferentes proporções salinas (gSTD/L). Como a concentração média de sais nas APs foram de 41 e 80 gSTD/L, as amostras foram diluídas com água destilada ou suplementada com sais marinhos para gerar os testes com diferentes concentrações salinas. Em todos os tratamentos foi adicionado nutrientes inorgânicos de acordo com a composição do meio sintético Conway. Esse meio sintético foi paralelamente utilizado como controle. O fluxograma também mostra que a PW-7 foi pré-tratada através do fluxonamento de ar (método conhecido como “sparging”) por 48 h. O objetivo foi tentar extrair por arraste gasoso os compostos voláteis de potencial tóxico antes do processo de cultivo..... 14
- Figura 2. Curva de crescimento microalgal.** Cinética de crescimento da *Dunaliella salina* em diferentes concentrações da água produzida (PW-6)..... 19
- Figura 3. Cinética de Crescimento.** Curva de crescimento da *Dunaliella salina* no tratamento da água produzida (PW-6) suplementada. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.21
- Figura 4. Cinética de crescimento em água produzida.** Comparação da curva de crescimento da produção de biomassa durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada na água produzida suplementada, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada na água produzida (PW-6) nas concentrações de 45g e 50g de STD/L de salinidade; (B) *Dunaliella salina* adaptada, tratada na água produzida (PW-7) nas concentrações de 45g, 50g e 80g de STD/L de salinidade. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.....24
- Figura 5. Cinética de crescimento.** Comparação da curva de crescimento para produção de biomassa durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada no meio sintético Conway, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada no meio sintético Conway; (B) *Dunaliella salina* adaptada, cultivada no meio sintético Conway. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.26
- Figura 6. Acúmulo de Clorofila- α .** Comparação da curva de crescimento do acúmulo de clorofila durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada na água produzida suplementada, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada na água produzida (PW-6); (B) *Dunaliella salina* adaptada, cultivada na água produzida (PW-7). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.29
- Figura 7. Acúmulo de carotenoides.** Comparação da curva de crescimento do acúmulo de carotenóides durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada na água produzida suplementada, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada na água produzida (PW-6); (B) *Dunaliella salina* adaptada, cultivada na água produzida (PW-7). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.30

Lista de Tabelas

Tabela 1. Meio Conway. Composição da Solução Principal (P). É adicionado 1ml/L dessa solução em água marinha natural ou sintética.	12
Tabela 2. Meio Conway. Composição da Solução de Vitaminas. A cada um litro é adicionado 0,1 ml dessa solução de vitaminas em água marinha natural ou sintética.	12
Tabela 3. Composição da água produzida PW-6 e PW-7. Caracterização química da água produzida.	13
Tabela 4. Cinética de crescimento. Parâmetros do crescimento da <i>Dunaliella salina</i> na água produzida diluída(PW-6).....	19
Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento. Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> não adaptada na água produzida (PW-6) suplementada e no respectivo controle (Conway). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.	22
Tabela 6. Parâmetros cinéticos de crescimento. Comparação dos indicadores de crescimento de <i>Dunaliella salina</i> cultivada no meio Conway e na água produzida suplementada, não adaptada (PW-6) e adaptada (PW-7). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.	27
Tabela 7. Concentração de nutrientes. Dosagem da concentração de nutrientes dissolvidos em PW-6 e PW-7.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

Água produzida (AP)
Bactérias redutoras de sulfatos (BRS)
Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN)
Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX)
Carbono (C)
Cloreto (Cl⁻)
Cloreto de Sódio (NaCl)
Complexo de captação de luz (LHCII)
Demanda Química de Oxigênio (DQO)
Densidade Óptica (D.O.)
Dióxido de Carbono (CO₂)
Fósforo (P)
Gramas de sais totais dissolvidos (gSTD)
Hidrocarbonetos poliaromáticos (HAPs)
Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec)
Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM)
Magnésio (Mg²⁺)
Nitrogênio (N)
Oxigênio (O₂)
Potássio (K⁺)
Sódio (Na⁺)
Sulfeto de hidrogênio (H₂S)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica.....	4
2.1	Água Produzida	4
2.1.1	Composição da água produzida	4
2.1.2	Tratamentos da água produzida	6
2.2	Microalgas	7
3	Objetivo Geral	11
4	Metodologia	12
4.1.	Microalga e meio de cultura sintético (Conway)	12
4.2	Coleta da água produzida	13
4.3	Montagem dos fotobiorreatores para os testes cinéticos com <i>Dunaliella salina</i>	14
4.3.1	Testes com diferentes concentrações da água produzida	14
4.3.2	Teste de suplementação da água produzida	15
4.3.3	Protocolo de adaptação da <i>Dunaliella salina</i> na água produzida	16
4.3.4	Pré-tratamento por fluxonamento de ar ou “ <i>Air sparging</i> ” da água produzida.....	16
4.5.	Determinação de lipídeos, nutrientes e DQO	17
4.6.	Cálculo dos parâmetros cinéticos, produtividade e análise estatística.....	17
5	Resultados e Discussão	18
6	Conclusões	34
	Referências.....	35

1 Introdução

A indústria petrolífera é caracterizada pelo alto volume de consumo de água e geração de águas residuais associadas às atividades de extração, a chamada água produzida (AP). Conforme o relatório anual de Sustentabilidade da Petrobrás de 2018 a empresa relata ter consumido 182,3 milhões de m³ de água doce para suas atividades (PETROBRÁS, 2019). É possível que grande parte dessa água tenha sido injetada em processos de recuperação de petróleo gerando significativa quantidade de AP. No entanto, é difícil precisar o volume de AP gerada no processo de recuperação. Além dos fluidos injetados que não são exatamente reportados pelas empresas, existe uma quantidade de água presente no reservatório que é também extraída junto com o petróleo. De qualquer maneira, a água residual tem um alto potencial poluidor por conter derivados de petróleo e outros de composição química complexa utilizados em tecnologias de recuperação. Por esse motivo, é necessário um processo de tratamento eficiente antes de seu despejo ou reutilização. Esse é hoje um desafio biotecnológico para garantir o melhor gerenciamento desse efluente (JIMÉNEZ et al., 2018).

A maioria das empresas petrolíferas em todo o mundo tem adotado a política de 'descarga zero' (OSPAR Commission, 2015). Dessa forma estão sendo implantados métodos mais eficientes e econômicos de tratamento da AP que reduza a concentração de compostos tóxicos, para, assim, serem descartadas ou reutilizada com o mínimo de contaminantes para o meio ambiente (VEIL, et al., 2004). No entanto, para que a reutilização da AP ocorra necessita-se que esse rejeito atenda aos critérios apropriados de qualidade para o fim desejado. Um exemplo é a sua reutilização no processo de recuperação de petróleo e gás, ou mesmo para fins como irrigação, armazenamento de aquíferos, usos industriais municipais, ou meio de cultivo de microalgas (GUERRA, et al., 2011).

As opções de tratamentos da AP desenvolvidos até o momento são métodos físicos, químicos, sistema de membranas, sistema eletroquímico e, em alguns casos, o biológico (IGUNNU, et al., 2014; BACCELLA, et al., 2000). O tratamento biológico comumente aplicado consiste na utilização de microrganismos que metabolizam os

compostos orgânicos presentes na AP, mas, geralmente, em processos sem a produção de compostos de interesse comercial. Cita-se, por exemplo, processos de lagoas de estabilização ou de Lodos Ativados (PENDASHTEH, et al., 2010; SHPINER, et al., 2009). O cultivo de microrganismos para a produção de substâncias de valor comercial agregado tem sido estudado como uma alternativa para subsidiar o próprio tratamento. No entanto, uma das barreiras para a reutilização da AP como meio de cultura é a sua grande variação de composição orgânica e, muitas vezes, de salinidade. Isso ocorre devido a composição mineral da matriz rochosa, profundidade e, também, do histórico operacional reservatório (GRAHAM, et al., 2017).

Microrganismos fotossintetizantes como as microalgas apresentam espécies que toleram significativa concentração de sais ao mesmo tempo que produzem e acumulam substâncias de valor comercial. Cita-se como exemplo, lipídeos, carboidratos, proteínas e pigmentos. Existem alguns estudos propondo a utilização da AP para o cultivo de microalgas (ARRIADA, et al., 2014; AMMAR, et al., 2018). Os resultados sugerem que, além de ser possível cultivá-las em AP, esse processo funciona como um tratamento desse efluente. Nota-se que depois do cultivo ocorre significativa redução da demanda química de oxigênio (DQO), substâncias derivadas do petróleo e nutrientes inorgânicos de nitrogênio e fósforo.

O gênero *Dunaliella* spp. é composto por microalgas halotolerantes podendo suportar de 2,92 até 321,44 g/L de sais (STD/L) (FANG, et al., 2017; HOSSEINI TAFRESHI, et al., 2009). Esse gênero é comumente encontrado em águas marinhas com significativa variação salina (KHATOON, et al., 2017; BOROWITZKA, et al., 1988). Esta característica ecofisiológica sugere que esse gênero apresenta grande potencial para serem testados com AP de alto teor salino. Essas microalgas podem também utilizar alguns hidrocarbonetos como fonte de carbono em um modo fisiológico que combina fotossíntese com heterotrofia e, por isso, conhecido como crescimento mixotrófico. Estudos já confirmaram que *Dunaliella* salina consegue crescer em AP e remover nutrientes (RANJBAR, et al., 2015; TALEBI, et al., 2016). Uma técnica para potencializar o crescimento e tratamento do meio é o processo de adaptação, a cepa passa por múltiplas transferências em série para novos meios, até atingir um ajuste fisiológico para aquela condição (WOOD, et al., 2005).

Destaca-se ainda que durante o cultivo da microalga é necessário um processo de aeração. Esse fato não apenas favorece a alga, mas, também, o crescimento de bactérias degradadoras de derivados de petróleo. Portanto, criando um consórcio adaptado ao processo de biorremediação da AP. As espécies do gênero *Dunaliella spp.* também têm a capacidade de produzir e armazenar lipídeos, carotenóides, luteína, hidrocarbonetos, e outros compostos que são de interesse para indústria (TINOCO, et al., 2015).

Nesse trabalho foi escolhida a *Dunaliella salina* para testes de crescimento, produção e tratamento de AP de alto teor salino. O objetivo deste estudo, portanto, é otimizar cultivo de *Dunaliella salina* na AP. A produção de biomassa algal para fins comerciais como produção de biodiesel, pigmentos e insumos biológicos, apresenta um custo-benefício que valoriza o processo de tratamento. A valoração de efluentes como a AP como meio de cultivo de biomassa de microalga é um processo que se encaixa no conceito de “upcycling”. Isto é, criar algo novo e melhor a partir de itens antigos como ou de baixo valor; como por exemplo, a AP. Em contraste com a reutilização ou a reciclagem, o “upcycling” usa materiais existentes para melhorar os originais (SUNG, et al., 2015).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Água Produzida

Água produzida compreende o efluente gerado no processo de extração do petróleo e gás ou pode estar relacionada também aos resíduos gerados do processo de obtenção de gás de xisto e metano de camada de carvão. É caracterizada assim após ser extraída juntamente com o combustível fóssil no decorrer da atividade de extração, constitui-se de um resíduo complexo contendo água de formação, água de injeção e aditivos resultantes do processo de produção (ARTHUR, et al., 2011; FAKHRU'L-RAZI, et al., 2009; NEFF, 2002.).

Presume-se que a rocha na maioria das bacias sedimentares contendo petróleo tenha sido, a priori, completamente saturada com água do mar antes da invasão e aprisionamento de petróleo. Os hidrocarbonetos menos densos migraram para as trapas (locais de captura ou armadilhas), deslocando parte da água de formação para se tornar reservatórios de hidrocarbonetos. Assim, as rochas impermeáveis do reservatório normalmente contêm hidrocarbonetos de petróleo (líquido e gás) e água. As fontes desta AP podem incluir fluxo acima ou abaixo da zona de hidrocarboneto, fluxo de dentro da zona de hidrocarboneto ou fluxo de fluidos e aditivos injetados resultantes de atividades de produção (VEIL, et al., 2004). A água de formação consiste em um líquido natural que fica armazenado nos reservatórios rochosos (TELES, et al., 2010). A sua localização, o tipo de rochas e a bacia sedimentar onde a água de formação escoar determinam a concentração de compostos que vão conferir uma característica específica a este efluente.

2.1.1 Composição da água produzida

A composição da AP é complexa, pois a depender de sua formação geológica, suas propriedades físico-químicas variam significativamente. Além dos aditivos químicos que são acrescentados à água de injeção, algumas técnicas de extração de petróleo podem alterar a composição da AP por dissolver ativamente sais rochosos distintos. Os constituintes principais presentes na AP são: sais e sólidos suspensos, óleo e graxa, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), hidrocarbonetos poliaromáticos (HAPs), ácidos orgânicos, compostos orgânicos e

inorgânicos, metais pesados, radionuclídeos, gases, microrganismos, compostos químicos envolvidos na produção, e outros (MOTTA, et al., 2013).

Dentre os sais presentes na AP o que se encontra em maior concentração é o NaCl. Além deste, existe também uma grande contribuição por sais de Mg^{2+} e K^+ (AL-GHOUTI, et. al., 2019). De modo geral, os sais e metais presentes na AP são semelhantes ao da água do mar, diferenciando apenas nas concentrações desses. É possível que o efluente da extração de petróleo e gás (AP) apresente uma quantidade mais elevada por causa do processo de dissolução de rochas. É provável encontrar concentrações salinas de até 1000 vezes ao ambiente marinho (STEWART, et. al., 2011). Os metais frequentemente detectados na AP são bário, cobre, níquel, chumbo, cádmio, ferro e zinco.

O petróleo é composto de hidrocarbonetos como os BTEX, naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno (NPD), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e fenóis, sendo que estes podem ser divididos em dissolvido e disperso. Hidrocarbonetos alifáticos, ácido carboxílico e compostos aromáticos de baixo peso molecular são mais solúveis em água produzida, e os óleos dissolvidos também possuem a característica de serem polares com baixo número de carbono (EKINS, et. al., 2007). Já os óleos dispersos em sua maioria são apolares, formam gotículas de óleo que ficam suspensas na água ou podem sedimentar. O óleo mais denso é caracterizado por possuir hidrocarbonetos saturados de alto peso molecular e, por isso, menor capacidade de se dissolver em meio aquoso. Esse óleo requer maior atenção pois tem maior potencial de causar impacto ambiental. Este pode ficar depositado no fundo do oceano ou na superfície causando o aumento na demanda biológica de oxigênio na zona de mistura.

Devido ao processo de lixiviação de formações rochosas, na atividade de extração de petróleo a água produzida traz consigo sólidos dissolvidos, dentre estes, íons radioativos, o rádio-226 e rádio-228, que são derivados do urânio, bório e provenientes de certas rochas. Os elementos químicos que estão contidos em muitas águas produzidas podem interferir com os métodos analíticos de determinação de nutrientes e carga orgânica e os componentes do rádio podem ser mascarados. Esse fato gera dificuldades de monitoramento ou falso negativo para

amostras que podem conter quantidades significativas de íons radioativos (UTVIK, 2003).

A salinidade e a temperatura interferem na solubilidade dos gases na água produzida do processo de extração de petróleo e gás, porém o aumento de pressão favorece a dissolução. Os gases presentes na AP são CO₂, H₂S, metano, butano, etano e propano. Esses podem estar presentes naturalmente ou serem produzidos por bactérias redutoras de sulfatos (BRS). Devido à alta quantidade de compostos tóxicos neste resíduo, poucos microrganismos conseguem crescer, exceto BRS e outros anaeróbios, que sobrevivem no efluente. O oxigênio não está presente de forma natural na AP, mas no momento em que essa chega à superfície o gás interage com o fluido e pode causar problemas, como corrosão (MOTTA, et al., 2013).

Alguns produtos químicos são adicionados ao fluido de injeção visando facilitar os procedimentos de extração de petróleo e gás. Esses produtos tem o objetivo de prevenir incrustação, corrosão, desemulsificantes, dispersantes e biocidas para controle biológico (ARTHUR, et al., 2011; MOTTA, et al., 2013).

2.1.2 Tratamentos da água produzida

As opções de tratamento da água produzida desenvolvidas hoje podem ser métodos físicos, químicos, com membranas e biológicos. No tratamento físico as cargas orgânicas e inorgânicas são retiradas através de forças físicas como as forças de van der Waals. Os processos químicos ocorrem com a ação dos agentes químicos empregados para remover e oxidar substâncias orgânicas e outros componentes. Sistemas eletroquímicos, nos quais a passagem de corrente elétrica ou produção de energia elétrica alteram componentes químicos e tratamento biológico. Metodologia em sistema de membranas, baseia-se na utilização de membranas de vários diâmetros de poro que realiza a remoção de compostos por um processo de ultrafiltração e/ou diálise. (JAIN, et. al.,2017).

O tratamento biológico refere-se à utilização de microrganismos que aproveitam os poluentes disponíveis no efluente como fonte de crescimento, transformando compostos tóxicos complexos em elementos não tóxicos mais

simples. A biooxidação é uma técnica desenvolvida para o tratamento biológico que consiste na oxidação de componentes orgânicos por bactérias, fungos, algas e protozoários. Compostos orgânicos biodegradáveis, como os hidrocarbonetos presentes na AP são decompostos em moléculas mais simples por bactérias que utilizam a energia química liberada para o seu metabolismo. Na biofloculação, consórcios de microrganismos tem a capacidade de utilizar os compostos químicos presentes na AP como fonte de nutrientes e carbono. No sistema de lodo ativado, os microrganismos tratam o efluente pelos mecanismos de oxidação e floculação. Apesar de ser simples, barata e limpa esse método produz um grande montante de resíduos. Uma alternativa para esse problema é complementar o tratamento com sistema de membranas (biorreatores de membrana), que realizam a filtração do efluente, resíduo gerado no tratamento (SHANNON, et al., 2010).

O processo de tratamento da água produzida baseado em microalgas é uma técnica que pode alcançar alta taxas de remoção dos hidrocarbonetos. As microalgas podem utilizar o BTEX em baixas concentrações, como fonte de carbono e assim diminuir a toxicidade do resíduo poluente (DAS, et al., 2019; AL-GHOUTI, et al., 2019; MENDES, et al., 2011). É importante ressaltar que bactérias podem crescer em simbiose durante o cultivo de microalgas e auxiliar no processo de tratamento (YAO, et. al., 2019). Além de conseguir degradar componentes tóxicos do efluente, a microalga produz bioprodutos de interesse para indústria, constituindo um processo biosustentável.

2.2 Microalgas

Microalgas são microrganismos unicelulares, usualmente encontradas em água salgada e doce. Podem ser procarióticas (cianobactérias) ou eucarióticas (Clorófitas, Rodófitas, entre outras). São consideradas produtores primários e são capazes de fixar aproximadamente 50% do carbono global com a produção de oxigênio (O₂) (METZ, et al., 2007). Estão presentes em todos os ecossistemas terrestres existentes, não apenas aquático, representando uma grande variedade de espécies, vivendo em uma ampla gama de condições ambientais. É estimado que existam mais de 50 mil espécies, mas apenas cerca de 60% já foram estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004).

O cultivo de microalgas pode ser considerado um sistema biológico muito eficiente no armazenamento de energia solar, através da fotossíntese, sendo que a maioria das espécies de microalgas cresce mais rápido do que as plantas oleaginosas, possibilitando um maior rendimento de biomassa algal (GUTERMAN, et al., 1990). O meio de cultura para as microalgas deve prover os elementos inorgânicos que compõem a célula algal, e elementos essenciais que incluem, principalmente, carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), além de vitaminas e sais minerais que são vitais para o crescimento de algas. Mas também deve-se ter um equilíbrio entre parâmetros operacionais (oxigênio, dióxido de carbono, pH, temperatura, intensidade da luz e remoção de produtos e subprodutos) para o cultivo algal (WILLIAMS, 2002).

Algumas microalgas podem expressar vários tipos de metabolismos (autotrófico, heterotrófico, mixotrófico) e são capazes de uma mudança metabólica como resposta às mudanças das condições ambientais. Por exemplo, as microalgas do gênero *Dunaliella* em condições de mudança de salinidade, realizam uma osmorregulação, produzindo ou expelindo glicerol, para manter o equilíbrio osmótico (CHEN, et al., 2009). Algumas microalgas são capazes de crescer mixotroficamente, combinando assim a heterotrofia com a autotrofia (LEE, 2008).

A composição celular é formada majoritariamente por proteínas, carboidratos e lipídeos, e a quantidade dessas macromoléculas será determinada pelas condições que o organismo será exposto. Parâmetros como temperatura, pH, salinidade, e luminância são capazes de mudar a rota metabólica das microalgas e assim favorecer o acúmulo ou a diminuição de determinados bioprodutos (RAO, et al., 2007; SANTOS, et al., 2013). Compostos produzidos por estes organismos, tais como pigmentos, enzimas, açúcares, lipídeos, esteróis e vitaminas podem ser comercializados em diversas áreas tais como agricultura, aquicultura, geração de energia “limpa”, cosmética, farmacêutica, nutricional, dentre outras (KOLLER, et al., 2014).

Um bioproduto das microalgas de interesse industrial são os lipídeos. O conteúdo lipídico é definido como a concentração de lipídeos que está dentro das células microalgais sem considerar a produção de biomassa, enquanto a

produtividade lipídica depende da produção de biomassa e refere-se ao acúmulo de lipídeos dentro das células da biomassa total produzida (BRENNAN & OWENDE, et al., 2010; CHISTI, 2007). No trabalho de Kiran et al. (2014), o maior conteúdo lipídico foi encontrado no cultivo de *Dunaliella tertiolecta* ATCC 30929 (60,6-67,8% de seu peso seco), enquanto que a maior produtividade lipídica foi encontrada no cultivo da *Chlorella sp.* (121-178 kg m³ d⁻¹), com um conteúdo lipídico de 32-34%. Portanto, a produtividade lipídica é o indicador mais utilizado para afirmar o potencial da microalga para o biocombustível líquido. A relação entre a produtividade de biomassa e o conteúdo lipídico é inversamente relacionada às condições de estresse, como a privação de nutrientes como fonte de nitrogênio e fósforo, que limitam o crescimento celular, porém aumentam o conteúdo lipídico intracelular (RUBIO, et al., 2003; KHOZIN-GOLDBERG & COHEN, 2006). Deste modo, a produtividade lipídica pode ser aumentada ou diminuída quando esses parâmetros são variados, e assim pode ser otimizada durante um cultivo microalgal para a produção de biodiesel.

Apesar de viável tecnicamente, os gastos com os sistemas de cultivo de microalgas ainda podem chegar a mais de 50% dos custos totais (BENEMANN, 2009; CHISTI, 2008). Por esse motivo, o que limita a produção de óleo de microalga em larga escala são os custos de produção (PIENKOS & DARZINS, 2009). A recuperação de energia acumulada nos resíduos gerados pela agroindústria e efluentes domésticos é considerada como alternativa para baratear os custos e viabilizar tal biotecnologia (RAWAT, et al., 2011; PARK, et al., 2011).

Muitas espécies de microalgas são capazes de crescer eficientemente em efluentes agroindustriais ou domésticos, devido à habilidade das algas em utilizarem nutrientes como o N, P, e carbono orgânico que existem nestes resíduos. E dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se o esgoto doméstico (CONCEIÇÃO et al. 2019, CABANELAS et al., 2013), efluente de biodigestores (RODULFO et al., 1980, MARQUES et al., 2013), vinhaça de cana-de-açúcar (MARQUES et al., 2013, SANTANA et al, 2016), águas residuais da produção de soja (ZHANG et al., 2012) e resíduos da suinocultura (TRAVIESO et al., 2006).

A AP possui alguns nutrientes essenciais para o crescimento de microalgas. Variavelmente, no entanto, variavelmente esses nutrientes encontram-se em concentrações inferiores às necessárias. Dependendo do estágio do cultivo isso pode ocasionar um estresse fisiológico na alga, o que pode direcionar a uma rota metabólica que aumenta a produção de lipídeos ou bioativos como os carotenóides. A alta salinidade também pode ser causador desse estresse (HOSSEINI TAFRESHI, et al., 2009). Portanto, estas são variáveis possíveis de serem utilizadas para melhorar a produção de bioativos.

Alguns compostos tóxicos presentes na AP podem ser nocivos para as microalgas (GRAHAM, et al., 2017). Alguns estudos com microalgas cultivadas em água produzida oriunda do processo de extração de petróleo e gás foram publicados. Nestes foram analisados taxa de produtividade de biomassa e de lipídeos juntamente com a eficiência do tratamento desse processo de cultivo (ARRIADA, et al., 2014; RANJBAR, et al., 2015; TALEBI, et al., 2016; AMMAR, et al., 2018; HOPKINS, et al., 2019). Outros estudos com microalgas crescidas em água produzida de fonte não convencional (gás de xisto e metano de camada de carvão) foram conduzidos no intuito de avaliar a produção de biomassa e de bioprodutos, bem como o acúmulo de lipídeos (GODFREY, 2012; BUCHANAN, 2013; ARAVINTHAN, et al., 2014; WOOD, et al., 2015; HODGSKISS, et al., 2016). Os estudos citados comprovam que o crescimento microalgal é possível nesse efluente.

3 Objetivo Geral

Avaliar o aproveitamento da água produzida da indústria do petróleo para o cultivo de *Dunaliella salina* e otimização da produção de produtos de valor agregado como lipídeos, pigmentos e biomassa através do processo de adaptação.

Objetivo específico:

- Testar o cultivo de microalga em diferentes concentrações de água produzida bruta e suplementada.

- Testar o efeito de um processo de adaptação em água produzida para melhorar a cinética de produção algal.

- Analisar a microalga no quesito cinética de crescimento e produtividade lipídica e de bioprodutos.

- Analisar a eficiência do tratamento da água produzida através da remoção de nitrato, fosfato e carga orgânica.

4 Metodologia

4.1. Microalga e meio de cultura sintético (Conway)

Dunaliella salina da classe *Chlorophyta* foi escolhida por ser uma alga halotolerante com alto conteúdo lipídico (15-68%) (HUESEMANN e BENEMANN, 2009). Conhecida por sua capacidade de crescer em diferentes ambientes e produzir biomassa em condições adversas, possui apenas uma membrana plasmática simples que lhe confere a habilidade de responder rapidamente às mudanças de salinidade do meio (CHEN, et. al., 2009). Os exemplares foram doados pelo Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) da UFBA. A alga foi mantida no meio Conway com salinidade de 36 g de STD/L. O meio é preparado misturando a composição principal (Tabela 1) com a solução de vitaminas (Tabela 2) em água marinha natural ou sintética. A água marinha sintética foi obtida dissolvendo sais marinhos da Red Sea Salt, um produto da marca Red Sea Ltda utilizado para reconstituição de água marinha para aquários ornamentais.

Tabela 1. Meio Conway. Composição da Solução Principal (P). É adicionado 1ml/L dessa solução em água marinha natural ou sintética.

Componentes	Valores (g/L)
C ₁₀ H ₁₄ O ₈ Na ₂ . 2H ₂ O (Na EDTA sal sódico)	45
H ₃ BO ₃ (Ácido Bórico)	33.6
NaNO ₃ (Nitrato de Sódio)	100
MnCl ₂ . 4H ₂ O (Cloreto de Manganês)	0.36
FeCl ₃ . 6H ₂ O (Cloreto de Ferro)	1.30
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O (Fosfato dissódico di-hidrogenado)	20.0

Tabela 2. Meio Conway. Composição da Solução de Vitaminas. A cada um litro é adicionado 0,1 ml dessa solução de vitaminas em água marinha natural ou sintética.

Concentração	Valores (mg/L)
Vitamina B12 - Cianocobalamina	5
Vitamina B1 - Biotina	100

4.2 Coleta da água produzida

A água produzida utilizada como meio de cultivo foi cedida pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM). As amostras são oriundas de distintos campos de extração de óleo e gás, bem como estações de tratamento de água produzida. Foram realizadas duas coletas de água produzida, a primeira água (PW-6) acabou após os primeiros experimentos, sendo necessário uma nova coleta (PW-7) para continuar os testes. As características químicas dos efluentes coletados foram resumidas na Tabela 3. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro borossilicato de 5L e/ou em galões com capacidade de 10L.

Tabela 3. Composição da água produzida PW-6 e PW-7. Caracterização química da água produzida.

Componentes	Valores PW-6	Valores PW-7
pH	6,31	5,19
Salinidade	41,2 g/L	80,00 g/L
Alcalinidade Total	114 mgCaCO ₃ /L	111 mgCaCO ₃ /L
STD (Sais Totais Dissolvidos)	414,4 g/L	81,80 g/L
Cloreto	95,5 mg/L	94,9 mg/L
Sulfato	105 mg/L	94,55 mg/L
Fosfato Total	109 mg/L	111,35 mg/L
Ferro	83 mg/L	111 mg/L
Cobre	81 mg/L	103 mg/L
Óleos e graxas	95 mg/L	100 mg/L

4.3 Montagem dos fotobiorreatores para os testes cinéticos com *Dunaliella salina*

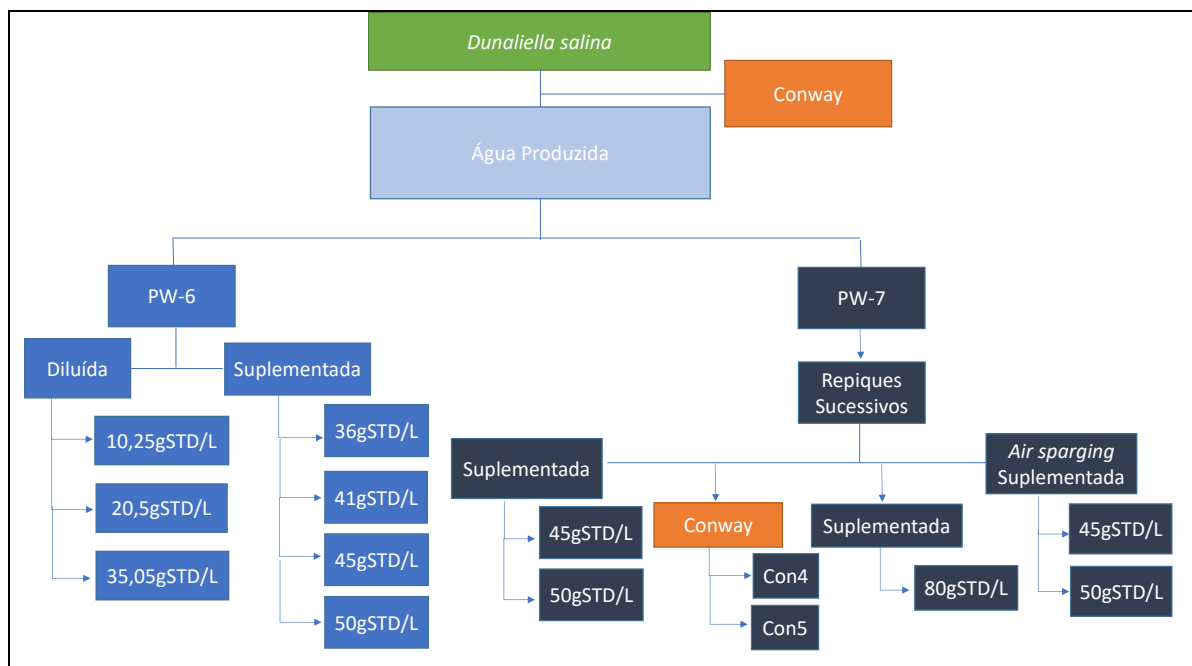


Figura 1. Metodologia. Fluxograma mostrando os testes de cultivos de *Dunaliella salina* em diferentes proporções salinas (gSTD/L). Como a concentração média de sais nas APs foram de 41 e 80 gSTD/L, as amostras foram diluídas com água destilada ou suplementada com sais marinhos para gerar os testes com diferentes concentrações salinas. Em todos os tratamentos foi adicionado nutrientes inorgânicos de acordo com a composição do meio sintético Conway. Esse meio sintético foi paralelamente utilizado como controle. O fluxograma também mostra que a PW-7 foi pré-tratada através do fluxonamento de ar (método conhecido como “sparging”) por 48 h. O objetivo foi tentar extrair por arraste gasoso os compostos voláteis de potencial tóxico antes do processo de cultivo.

A Figura 1 resume os testes realizados de cultivos da *D. salina* em diferentes concentrações de AP. A amostra PW-6 foi testada com diferentes concentrações da AP e também com a suplementação desta mesma AP. A PW-7 foi testada com suplementação e também foi submetida a um protocolo de pré-adaptação da microalga e um pré-tratamento por fluxonamento.

4.3.1 Testes com diferentes concentrações da água produzida

A água produzida (PW-6) coletada possui uma salinidade de 41 g de STD/L, e para verificar em qual concentração a *Dunaliella salina* conseguia crescer nesse resíduo foi feito um ensaio preliminar onde a água produzida coletada foi diluída

resultando em proporções salinas de 10,25 g, 20,5 g e 35,05 g de STD/L. Foram feitas análises de crescimento microalgal por densidade óptica (D.O) no comprimento de onda (λ) de 680 nm em espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D) e por acúmulo de pigmentos (Figura 1).

4.3.2 Teste de suplementação da água produzida

Após o teste preliminar utilizando água produzida *in natura*, os experimentos foram estruturados da seguinte forma: a PW-6 foi suplementada com solução principal 1,0 ml/L (Tabela 2), solução de vitaminas 0,1 ml/L (Tabela 3) do meio sintético Conway conforme protocolo adaptado (WALNE, 1966). Essa suplementação teve o objetivo de aumentar as concentrações de nutrientes essenciais para o crescimento microalgas, como nitrato e fosfato, pois na água produzida esses nutrientes são encontrados em baixas concentrações.

Para se obter as diferentes concentrações salinas do experimento foi utilizada uma mistura de sais marinhos (Red Sea Salt, um produto da marca Red Sea Ltda empregado para aquários ornamentais). As concentrações da suplementação salina foram 36, 41, 45 e 50 gSTD/L (sais totais dissolvidos). O tratamento controle foi cultivado no meio Conway com salinidade de 36 gSTD/L. Os ensaios de crescimento ocorreram em triplicata utilizando frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo um volume de 540 mL de meio e 10% do inóculo na fase de crescimento exponencial. A cultura foi mantida sob intensidade luminosa (3500 lux), agitação (100rpm), aeração com ar atmosférico e temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), que se manteve constante e fotoperíodo de 12h:12h (claro/escuro). Diariamente foram feitas leituras do crescimento microalgal por densidade óptica (D.O) no comprimento de onda (λ) de 680 nm em espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D), controle do pH e a cada 24h análise de pigmentos. Foram realizadas análises das variáveis abióticas: turbidez; concentração inicial e final de nutrientes. Avaliou-se a dinâmica de crescimento a partir do inóculo após a determinação gravimétrica, com base em curva de calibração relacionando os dois parâmetros, densidade ótica e biomassa. Os cálculos de produtividade de biomassa e coeficiente de crescimento específico ocorreram através de regressão linear na fase exponencial ($R^2 \geq 95\%$) de acordo com Chinalia et al., (2008).

4.3.3 Protocolo de adaptação da *Dunaliella salina* na água produzida

Posteriormente ao cultivo nas proporções de AP de 45 e 50 gSTD/L, que apresentaram os melhores resultados, passaram por 15 repiques sucessivos com período de 20 dias, na água PW-7 suplementada com 1,0 mg/L de solução principal e 0,1 mg/L de solução de vitaminas, pois, nesse momento a PW-6 havia terminado. Logo em seguida aos repiques sucessivos, as microalgas já adaptadas a AP passaram por uma batelada de testes de crescimento na PW-7, onde foram cultivadas na AP nas proporções de 45 e 50 gSTD/L, em AP com maior salinidade de 80gSTD/L e no meio Conway na salinidade de 36 gSTD/L (Figura 1). O cultivo foi mantido sob intensidade luminosa (3500 lux), agitação (100rpm), aeração com ar atmosférico e temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), que se manteve constante e fotoperíodo de 12h:12h (claro/escuro). Diariamente foram feitas leituras do crescimento microalgal por densidade óptica (D.O) no comprimento de onda (λ) de 680 nm em espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D), controle do pH e a cada 24h análise de pigmentos.

4.3.4 Pré-tratamento por fluxonamento de ar ou “*Air sparging*” da água produzida

Afim de testar o desempenho da *Dunaliella salina* em amostras de AP com menor quantidade de voláteis derivados do petróleo, a PW-7 passou pelo processo de *air sparging*. Essa técnica consiste na injeção ou percolação de ar pelo efluente com o intuito de remover os compostos orgânicos voláteis por arraste gasoso (JOHNSON, et. al., 1993). Esse processo foi realizado por aproximadamente 5 (cinco) horas. A PW-7 após o *air sparging* foi suplementada com solução principal e solução de vitaminas de acordo com o descrito para o meio sintético Conway e as microalgas passaram por mais uma batelada de cultivo sob intensidade luminosa (3500lux), agitação (100rpm), aeração com ar atmosférico e temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12h:12h (claro/escuro). Diariamente foram feitas leituras do crescimento microalgal por densidade óptica (D.O) no comprimento de onda (λ) de 680 nm em espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D), controle do pH e análise de pigmentos.

Após os dias de cultivo, a biomassa foi coletada por centrifugação (Centrífuga Mod. 280R FANEM®), e posteriormente congelada a -70°C para análises químicas posteriores.

4.5. Determinação de lipídeos, nutrientes e DQO

A extração lipídica seguiu o protocolo de Freeman (1957), e utilizou a solução clorofórmio/metanol 2:1 de acordo com o descrito por Marques et al. (2013). Foram analisadas as concentrações inicial e final de nutrientes (fosfato, nitrato) e variações na DQO (carga orgânica) inicial e final, com o objetivo de quantificar a remoção desses nutrientes do meio (MARQUES, et al., 2013; APHA, et al., 1999).

4.6. Cálculo dos parâmetros cinéticos, produtividade e análise estatística

Os parâmetros cinéticos de crescimento e produtividade foram realizados através da aplicação de uma regressão linear na fase exponencial da curva de crescimento de biomassa ($R^2 > 90$) e o coeficiente de crescimento (μ) utilizando a mesma metodologia com os dados de LN da biomassa, como descrito por Chinalia et. al., (2008). Os parâmetros cinéticos e de produtividade foram estatisticamente comparados utilizando os valores obtidos com o ajuste de curvas nas réplicas individuais que, depois, foram comparados utilizando ANOVA (Excel v 2010).

5 Resultados e Discussão

5.1 Teste preliminares

As amostras de AP coletadas, PW-6 e PW-7, apresentaram uma concentração de sais mais alta (41 e 80 gSTD/L, respectivamente) do que a água do mar (Tabela 3). Para testar os efeitos da salinidade em concentrações menores do que a do mar e se a microalga consegue crescer na AP, a microalga foi inoculada em amostras do efluente diluídas para as proporções de AP de 10,25; 20,5 e 35,05 gSTD/L (Figura 2). Os resultados da Figura 2 mostram que a produção de biomassa da *Dunaliella salina* está positivamente correlacionada ao aumento da concentração salina até o valor de 35,05 gSTD/L. A Figura 2 mostra que a *Dunaliella salina* apresentou uma taxa de produtividade de 0,051 g L d⁻¹ com crescimento específico de 0,38 d⁻¹ (Tabela 4) na concentração de 35,05 gSTD/L. Esse último desempenho foi 1,46 vezes maior que a policultura reportada por Buchanan et al, (2013). Esses autores cultivaram um consórcio de microalgas na água produzida de gás de camada de carvão com salinidade de 1,7 gSTD/L alcançando um crescimento específico de 0,26 d⁻¹.

É muito importante destacar que descobrir o limite de salinidade onde a produção da *Dunaliella salina* é a melhor, serve para formular uma proposta de padronização do processo de cultivo como estratégia aos problemas causados pela alta variação de salinidade da AP. Para que um processo de cultivo de microalgas seja bem-sucedido é preciso diminuir ao máximo todas as variações. Definindo-se um valor máximo ideal para a salinidade, espera-se que caso a amostra de AP de um determinado mês seja maior, basta diluí-la para fazer o meio. No caso de ser menor, basta adicionar sais para chegar à concentração ideal previamente identificada e padronizada. Portanto, dessa forma, a água produzida deve ser sempre padronizada para a quantidade adequada de sal antes do cultivo. Diminuindo assim as variações naturais que ocorrem com esse efluente.

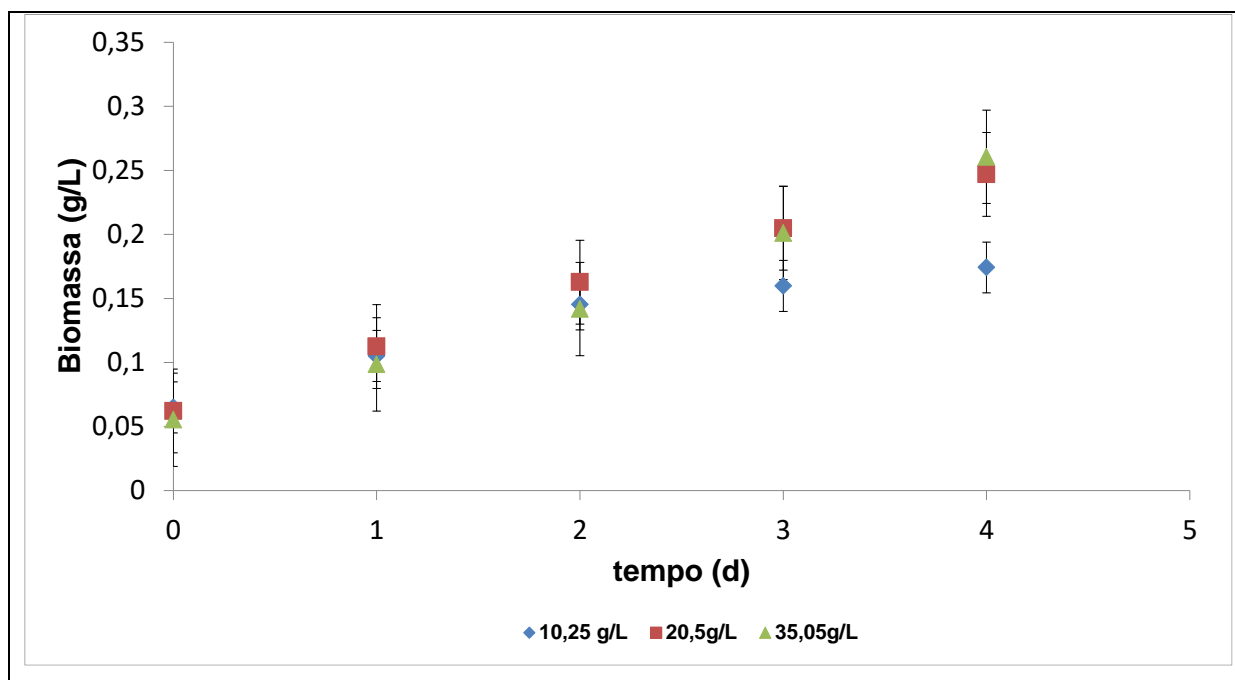


Figura 2. Curva de crescimento microalgal. Cinética de crescimento da *Dunaliella salina* em diferentes concentrações da água produzida (PW-6).

Tabela 4. Cinética de crescimento. Parâmetros do crescimento da *Dunaliella salina* na água produzida diluída (PW-6).

	10,25g/L	20,5g/L	35,05g/L
Produtividade de Biomassa (g L d ⁻¹)	0,029	0,050	0,051
μ específico (d ⁻¹)	0,24	0,34	0,38

Após constatar que é possível crescer *Dunaliella salina* na água produzida com salinidades próximas ao mar, foi elaborado um segundo experimento. Nesse, a água produzida, PW-6, foi suplementada com 1,0 mg/L de solução principal e 0,1 mg/L de solução de vitaminas do meio Conway, agora nas razões de AP de 36, 41, 45 e 50 gSTD/L. O objetivo foi de testar qual seria o limite máximo de salinidade para o crescimento de *Dunaliella salina* em AP.

As proporções de AP 45 e 50 gSTD/L alcançaram os melhores valores dos parâmetros cinéticos analisados para os experimentos com a AP (Figura 3 e Tabela 5). As taxas de produtividade obtidas nesta pesquisa foram de 30 e 44 mg L d⁻¹ nas proporções de AP de 45 e 50 gSTD/L, respectivamente. Esse resultado foi 1,47 vezes maior que o reportado por Ammar, et. al., (2018) que cultivaram *Nannochloropsis oculata* a 25% de água produzida suplementada com meio sintético BG-11. Esses autores reportam um crescimento específico de 0,17 d⁻¹.

É importante destacar, no entanto, que foi observada uma queda de 2,3 vezes na produção de biomassa algal, conforme mostra a Tabela 5, nas condições experimentais de 45 e 50 gSTD/L em relação ao controle (Conway com 36 gSTD/L). Essa queda pode estar relacionada ao impacto de substâncias tóxicas presentes na AP (SIRON, et al., 1991; LÓPEZ, et al., 2015). Curiosamente, no entanto, o aumento da salinidade nos experimentos reportados na Tabela 5, mostram que houve um similar aumento de produção. A produção de biomassa no meio Conway comparado com a AP na mesma concentração de 36 gSTD/L foi quase 5 vezes maior. Essa diferença diminuiu com o aumento de salinidade (Tabela 5). Dessa maneira, o aumento da salinidade diminuiu o efeito tóxico presente na AP. Esse resultado pode estar relacionado ao mecanismo de resposta da *Dunaliella sp.* em meios com alta salinidade. Essa alga sintetiza uma grande quantidade de glicerol para se osmorregular, podendo atingir concentrações de glicerol de 55% do seu peso total. A alta concentração de glicerol pode, portanto, atuar também em um mecanismo de proteção para outros agentes tóxicos. Lembrando ainda que esse processo de osmorregulação é desencadeado por mudanças em várias vias metabólicas (BEN-AMOTZ e AVRON, 1973). Portanto, pode também servir de estímulo para ligar um mecanismo secundário de proteção, como proposto por Salinas-Whittaker, et al., (2020), que a produção de β-caroteno e fenóis protegem a célula do estresse oxidativo logo no primeiro contato com os hidrocarbonetos.

Quando se analisa a produtividade lipídica (Tabela 5) percebe-se que no experimento com a maior proporção de AP, 50 gSTD/L, foi onde se observou a maior produtividade lipídica. Takagi, et al., (2006) relatou que o aumento da salinidade aumenta a quantidade de lipídeos na *Dunaliella sp.*, possivelmente devido ao seu mecanismo de resposta quando sob estresse salino. Os indicadores cinéticos

de produtividade de biomassa e produtividade lipídica, que se mostraram melhores nos tratamentos de 45 e 50 gSTD/L, são características de grande interesse na escolha da microalga para produção de bioprodutos de valor agregado (GRIFFITHS, et al., 2009). O achado desse estudo é significativo para um sistema de cultivo algal em AP, pois mostra que a *Dunaliella salina* se adapta a alta concentração de sais presente nesse tipo de efluente. Sendo que uma padronização da concentração salina nos altos níveis testados um fator positivo para o futuro do processo.

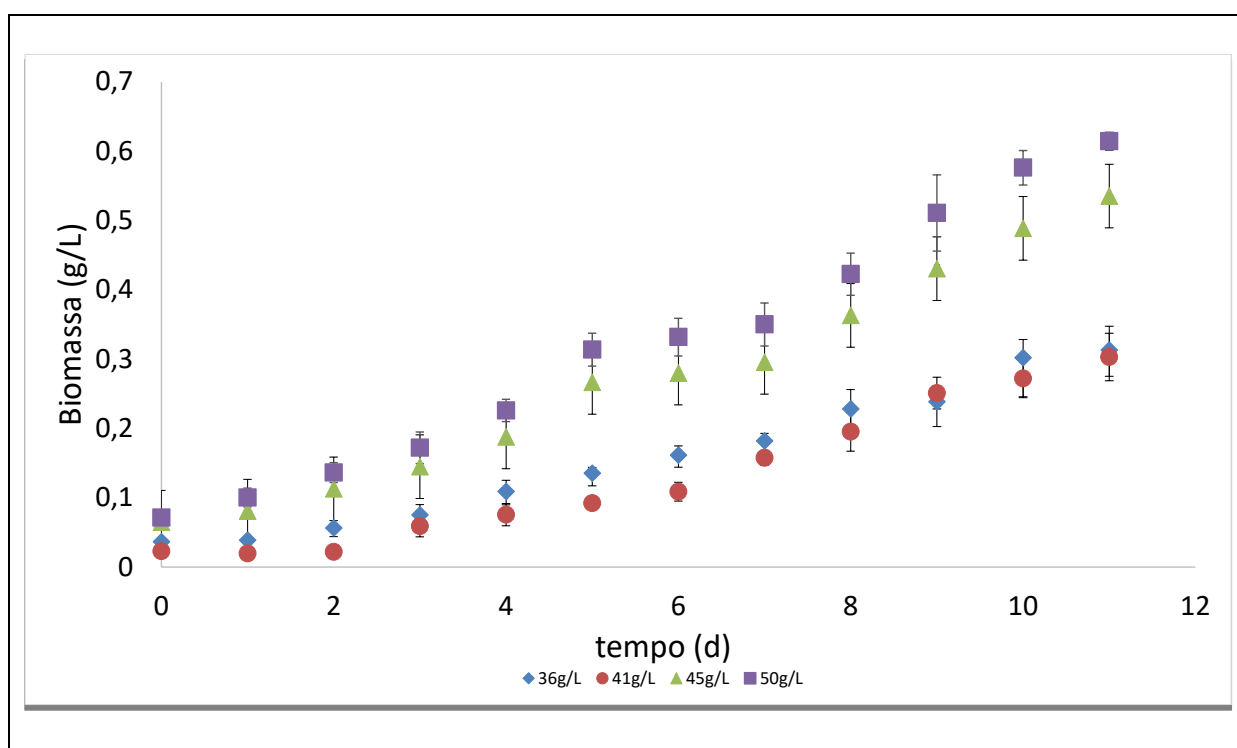


Figura 3. Cinética de Crescimento. Curva de crescimento da *Dunaliella salina* no tratamento da água produzida (PW-6) suplementada. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

A utilização de teores mais elevados de sais faz com que o meio se torne mais seletivo, o que representa uma vantagem. Portanto, essas condições evitam possíveis contaminações por outros microrganismos durante o cultivo. Por isso, essa microalga é uma excelente candidata para cultivo em lagoas abertas sem o comprometimento de contaminação (WOOD, et al., 2015; BUCHANAN, 2013;

SCHLIPALIUS, 1991). Um caso semelhante acontece com o cultivo comercial de *Spirulina sp.* onde o pH ótimo para o seu cultivo é limitante para a grande maioria dos microrganismos fotossintetizantes.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento. Cultivo de *Dunaliella salina* não adaptada na água produzida (PW-6) suplementada e no respectivo controle (Conway). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

	Conway (36 g/L)	AP 36g/L	AP 41g/L	AP 45g/L	AP 50g/L
Produtividade Total (g/L)	0,886 (±0,02)	0,199 (±0,03)	0,172 (±0,03)	0,323 (±0,09)	0,382 (±0,01)
Produtividade da Biomassa (mg/L/d)	109 (±0,02)	22 (±0,02)	18 (±0,01)	30 (±0,01)	44 (±0,02)
μ específico (d⁻¹)	0,31	0,19	0,30	0,25	0,25
Conteúdo Lipídico (%)	15,55 (±6,00)	19,07 (±3,73)	21,70 (±0,20)	20,66 (±1,28)	19,17 (±4,16)
Produtividade Lipídica (mg/L/d)	1695,72	495,90	585,99	909,34	997,01

5.2 Teste de Adaptação

Logo após os testes de crescimento de *Dunaliella salina* na água produzida com suplementação, os melhores resultados foram escolhidos para a fase de adaptação dessas microalgas. As proporções de AP de 45 e 50 gSTD/L do efluente foram utilizadas como meio de cultivo para as algas cultivada através de 15 repiques sucessivos. Porém, nessa etapa de aclimação houve a necessidade de fazer uma

nova coleta de AP. Na coleta PW-7 observou-se que a carga salina estava 1,9 vezes mais alta que a PW-6, além de baixo pH e altas concentrações de metais.

Após o período de cultivo sucessivos, foram analisados novamente os parâmetros cinéticos de crescimento da *Dunaliella salina* na AP (Figura 4), o tempo de cultivo foram de 19 dias, porém percebeu-se que cinética de crescimento exponencial com $R^2 \geq 90\%$ ocorreu no período dos 7 primeiros dias com redução da velocidade de crescimento após esse dia. O crescimento foi 1,2 vezes maior nos tratamentos de 45 e 50 gSTD/L, respectivamente, quando comparado com a *Dunaliella salina* não adaptada (Figura 4). Para confirmar esse resultado foram feitos testes estatísticos, One-way ANOVA comparando as médias dos tratamentos e os valores de $P > 0,05$, comprovou-se que os tratamentos tiveram diferenças estatísticas, ou seja, o crescimento específico da *Dunaliella salina* na AP nas concentrações 45 e 50 gSTD/L aumentou com o processo de aclimação.

Ranjbar, et al., (2015) cultivaram a *Dunaliella salina* na AP de fraturamento hidráulico esterilizada e suplementada com nitrato e fosfato, no período de 30 dias obteve 1,0 g/L de biomassa. Em nosso estudo o valor de produção de biomassa até o 7º dia de cultivo foi de 0,36 g/L e 0,38 g/L nas proporções de AP de 45 e 50 gSTD/L, respectivamente, atingindo 1,0 g/L de biomassa no 19º. Esse resultado mostra que o processo de adaptação resultou em um acúmulo de biomassa em menor tempo, conforme o trabalho de CHEN, et al., (2011). Esses autores cultivaram *Dunaliella tertiolecta* em meios com deficiência de nutrientes essenciais e relataram que do 3 ao 7º dia foi o período de maior acúmulo de lipídeos. A redução de tempo de cultivo é um aspecto favorável ou economicamente positivo para implementação em um processo de larga escala industrial.

Wood, et al., (2005) relatam que comparar os parâmetros cinéticos obtidos depois da adaptação com a condição original é um bom método para se avaliar o processo de adaptação. Caso a aclimação realmente tenha ocorrido a taxa de crescimento específico da cultura adaptada será menor quando retornada ao cultivo no meio sintético. Os nossos resultados comprovam isso, a *Dunaliella salina* já adaptada nas proporções de AP de 45 (Con4) e 50 gSTD/L (Con5) foram inoculadas no meio sintético Conway. As culturas adaptadas quando retornadas a esse meio

não demonstraram um crescimento melhor comparando com a cepa não adaptada (Figura 5).

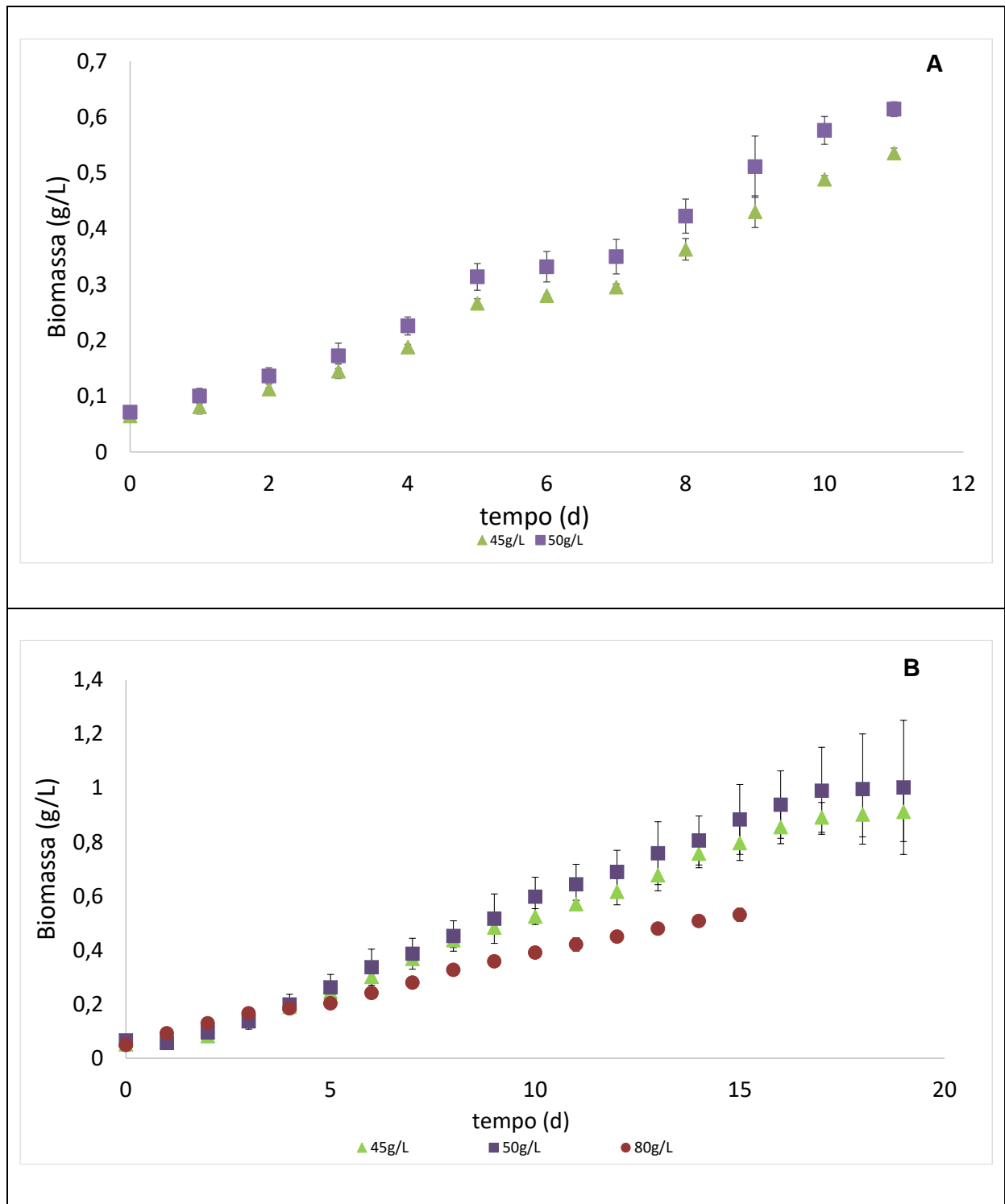


Figura 4. Cinética de crescimento em água produzida. Comparação da curva de crescimento da produção de biomassa durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada na água produzida suplementada, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada na água produzida (PW-6) nas concentrações de 45g e 50g de STD/L de salinidade; (B) *Dunaliella salina* adaptada, tratada na água produzida (PW-7) nas concentrações de 45g, 50g e 80g de STD/L de salinidade. Os parâmetros

cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

A taxa de crescimento específico da cepa adaptada foi de $0,20 \text{ d}^{-1}$ e $0,18 \text{ d}^{-1}$ para Con4 e Con5, respectivamente (R^2 acima de 95%). Essas taxas foram 1,5 e 1,6 vezes menor que a taxa de crescimento específico da *Dunaliella salina* adaptada quando retornada ao cultivo em meio sintético Conway (Tabela 6). Essa redução na taxa de crescimento pode ter ocorrido devido a um novo período de adaptação em um meio sintético com menor concentração de sais e ausência de outras substâncias que estavam presentes na água produzida.

Dunaliella sp. consegue responder de forma rápida as mudanças osmóticas através da eliminação de glicerol da célula até atingir o equilíbrio osmótico intracelular com o meio externo (CHEN, et. al., 2009). No entanto, devido a alteração metabólica desencadeada pela mudança abrupta de salinidade, a sua taxa de crescimento pode reduzir consideravelmente (JAHNKE, et al.,2003).

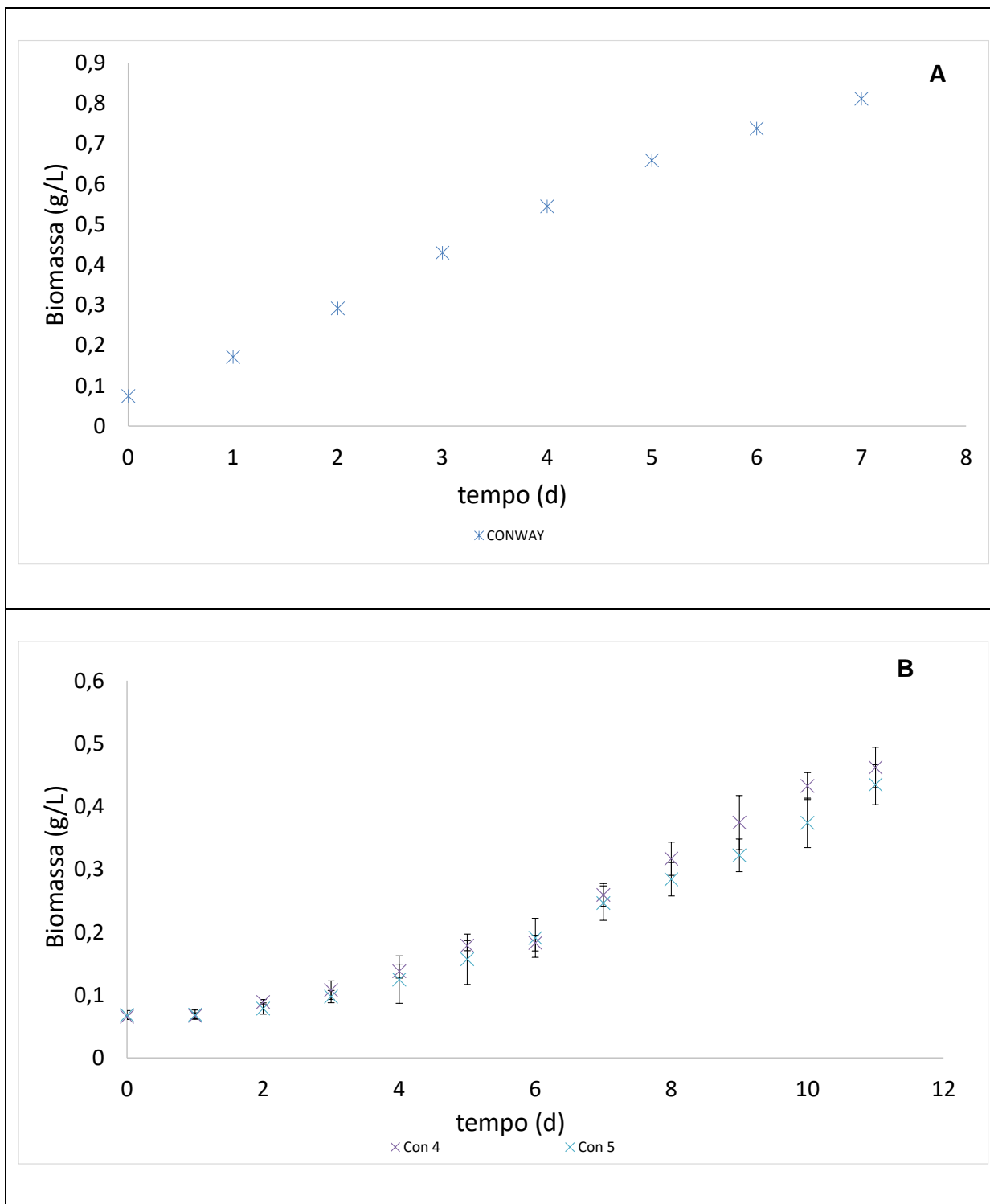


Figura 5. Cinética de crescimento. Comparação da curva de crescimento para produção de biomassa durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada no meio sintético Conway, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada no meio sintético Conway; (B) *Dunaliella salina* adaptada, cultivada no meio sintético Conway. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

A taxa de produtividade de biomassa da microalga adaptada resultou em 45 e 49 mg L d⁻¹ (Tabela 6), nas proporções de AP de 45 e 50 de gSTD/L,

respectivamente, demonstrando um aumento de 1,5 e 1,1 vezes mais que a cultura não adaptada, referente aos dias 0 a 7. A salinidade na proporção de água produzida de 50 gSTD/L apresentou a taxa de produtividade de 1,06 vezes maior que a policultura cultivada por Hopkins et. al., (2019) na concentração de sais de 60 gSTD/L na AP e alcançou uma taxa de crescimento de 46 mg L d⁻¹ no final de 25 dias de cultivo.

A Figura 4B resume os dados de um cultivo da cepa adaptada em uma concentração salina de 80 gSTD/L. Observa-se um decaimento considerável na taxa de produção de biomassa. Esses resultados sugerem que há uma concentração salina ideal para a produtividade da *Dunaliella salina*, a concentração de sais de 50 gSTD/L mostrou ser uma condição ótima para o crescimento dessa microalga e o processo de adaptação com a suplementação do meio com nutrientes, como o nitrato, estimula o seu crescimento na AP em um período menor de tempo, esse achado é importante para a redução de custo para um possível processo industrial.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos de crescimento. Comparação dos indicadores de crescimento de *Dunaliella salina* cultivada no meio Conway e na água produzida suplementada, não adaptada (PW-6) e adaptada (PW-7). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

	Conway 36 g/L	Adaptada Con4	Adaptada Con5	AP 45g/L	AP 50g/L	Adaptada 45g/L	Adaptada 50g/L	Adaptada 80g/L
Produtividade Total (g/L)	0,886 (±0,02)	0,283 (±0,02)	0,269 (±0,01)	0,323 (±0,00)	0,382 (±0,02)	0,402 (±0,01)	0,423 (±0,03)	0,305 (±0,01)
Produtividade da Biomassa (mg/L/d)	100 (±0,02)	26 (±0,00)	24 (±0,01)	30 (±0,02)	44 (±0,01)	45 (±0,00)	49 (±0,03)	30 (±0,00)
μ específico (d⁻¹)	0,31	0,20	0,18	0,25	0,25	0,28	0,29	0,21

5.2.1 Acúmulo de pigmentos

A variação da concentração de clorofila α (Figura 6) indica que o ensaio experimental da AP adaptada 45 e 50 gSTD/L resultou em um maior acúmulo de clorofila α em ambos tratamentos ($6 \mu\text{g mL}^{-1}$). A quantidade de clorofila α dentro da célula pode variar um pouco, mas, está ligada ao crescimento microalgal fotossintético (APHA, 2005). O estresse causado pela alta concentração de sal de NaCl pode ter induzido a fosforilação do complexo de captação de luz (LHCII) nas membranas de tilacóides de *D. salina*, favorecendo, assim, um maior acúmulo de clorofila α (LIU, et. Al., 2005).

Os carotenóides são pigmentos sintetizados quando a microalga está sob estresse de pH, compostos tóxicos ou escassez de nutrientes. A alga aumenta a concentração dos carotenóides para proteger a célula. A Figura 7 sugere que os experimentos com a AP PW-7, geraram um estresse na célula da microalga adaptada, dobrando o aumento no acúmulo de carotenóides (aproximadamente $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Farhat et. al., (2011), reportaram que *Dunaliella salina* acumulou $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de carotenóides quando cultivada em água do mar sob estresse salino por 25 dias. Essa pesquisa mostra um leve aumento, devido ao menor período de cultivo, onde, em apenas 7 dias a *Dunaliella salina* acumulou 25% do valor obtido por Farhat, porém no 16º dia esse valor seria atingido. O processo de adaptação foi positivo no mecanismo de defesa das microalgas ao estresse gerado pelos compostos tóxicos e salinidade da AP, que é comprovado pelo aumento de acúmulo de pigmento fotoprotetor (GALLEGO-CARTAGENA, et al., 2019).

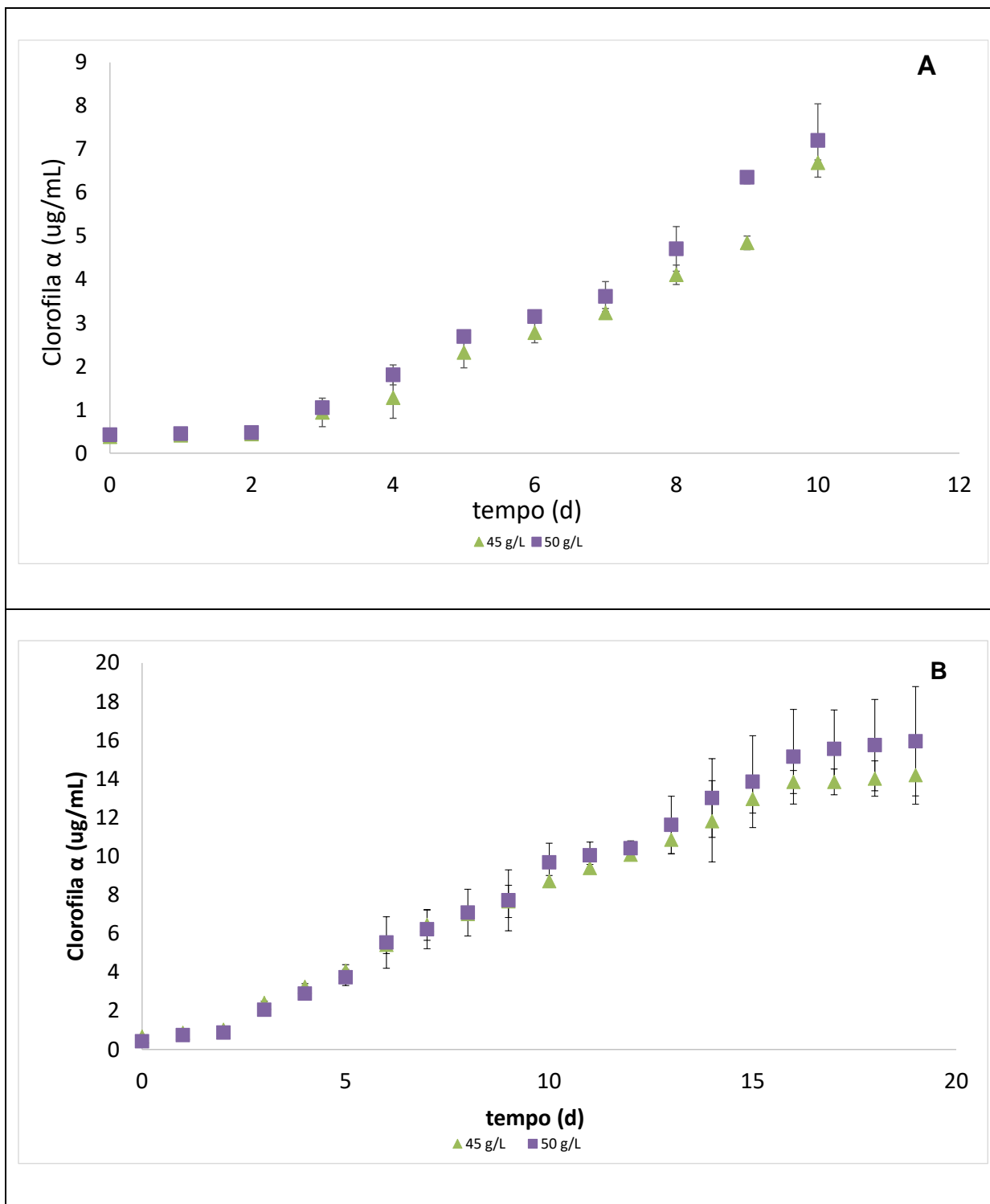


Figura 6. Acúmulo de Clorofila- α . Comparação da curva de crescimento do acúmulo de clorofila durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada na água produzida suplementada, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada na água produzida (PW-6); (B) *Dunaliella salina* adaptada, cultivada na água produzida (PW-7). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

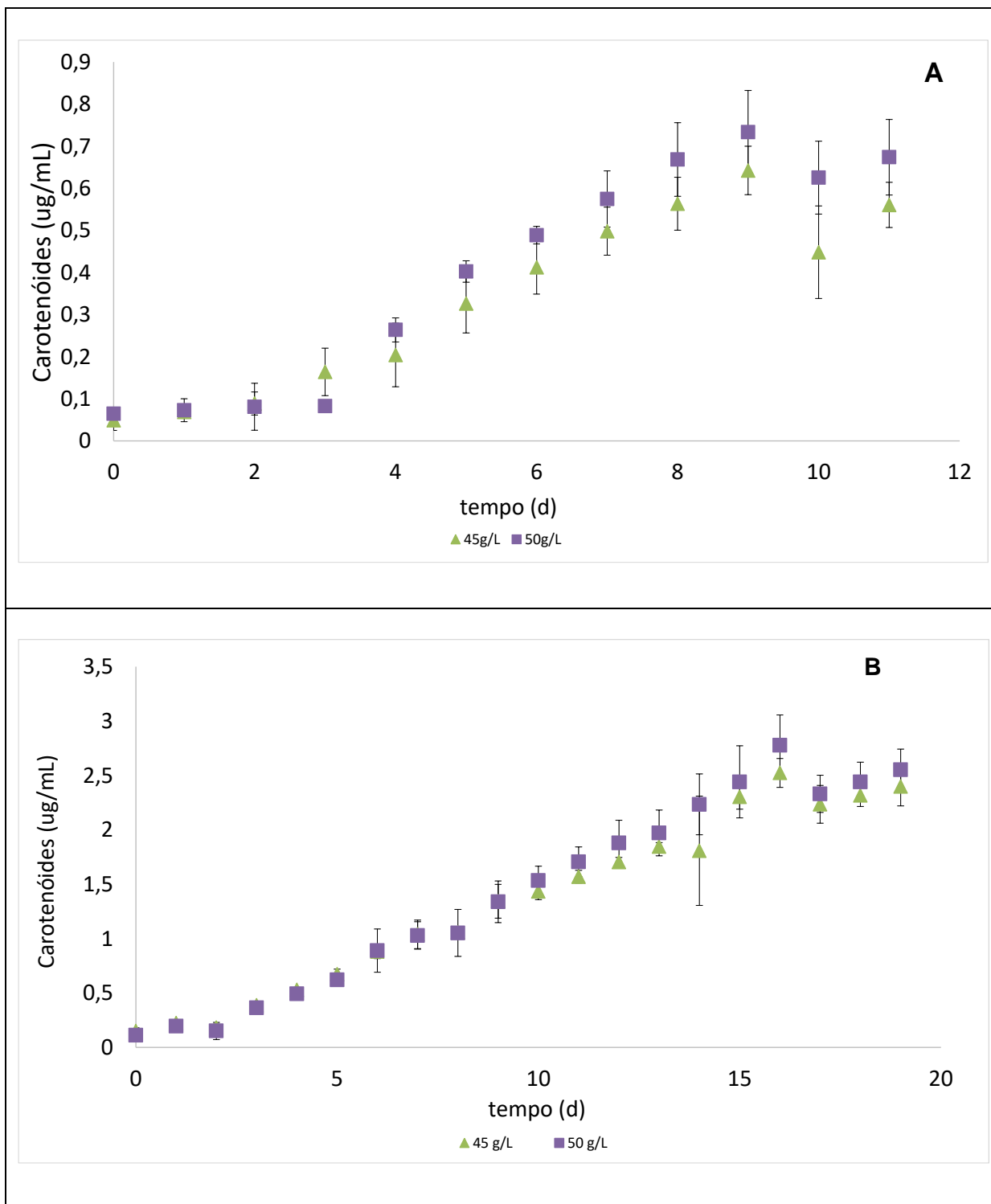


Figura 7. Acúmulo de carotenoides. Comparação da curva de crescimento do acúmulo de carotenoides durante o cultivo da *Dunaliella salina* tratada na água produzida suplementada, (A) *Dunaliella salina* não adaptada, cultivada na água produzida (PW-6); (B) *Dunaliella salina* adaptada, cultivada na água produzida (PW-7). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

5.2.2 Análises química de nutrientes

O descarte sem o devido tratamento da água produzida pode causar impactos ambientais no meio. Por exemplo, a existência de nitrogênio e seus derivados, assim como o fosfato, no meio promove regiões hipóxias gerando danos ao ecossistema onde é descarregado (GEDDES, 1984; VEIL, et al., 2005). Por isso faz necessário o tratamento da AP mesmo que esses nutrientes estejam em baixas concentrações.

Hopkins, et al., (2019), relataram que a remoção de nutrientes do meio está relacionada com o aumento da salinidade, a microalga consome mais nutrientes, como nitrato e fosfato, em meios hiperosmótico, possivelmente para suprir as demandas energéticas metabólicas de crescimento. Os resultados do estudo (Tabela 7), demonstram que as condições salinas cultivadas geraram um grande estresse, resultando em uma remoção de nitrato e fosfato maior que 95%.

Tabela 7. Concentração de nutrientes. Dosagem da concentração de nutrientes dissolvidos em PW-6 e PW-7.

	AP 45g/L	AP 50g/L	AP 45 g/L Adaptada	AP 50 g/L Adaptada
Fosfato (ug/L PO4-P/L)	1642,77 (± 0,01)	1642,77 (± 0,01)	483,33 (± 0,003)	500,00 (± 0,002)
Taxa de Remoção de Fosfato (%)	>95	>95	>95	>95
Nitrato (mgNO3-N/L)	857,14 (± 0,01)	857,14 (± 0,01)	857,14 (± 0,001)	857,14 (± 0,001)
Taxa de Remoção de Nitrato (%)	>95	>95	>95	>95
DQO (g/L)	3,56 (± 0,02)	3,56 (± 0,02)	6,52 (± 0,01)	9,61 (± 0,001)
Taxa de Remoção de DQO (%)	95,3	93,2	96,5	94,3

A água produzida é um efluente frequentemente caracterizado por possuir uma alta concentração de NaCl e uma carga orgânica baixa. A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é uma análise que estima o teor de carga orgânica na amostra.

Os impactos causados pelo excesso de carga orgânica no ambiente são acidificação, salinização, eutrofização, dentre outros (BRASIL, 2006). Para um bom tratamento do efluente faz-se necessário o controle dessa variável. De acordo com Ammar, et al., (2018), a alta concentração de compostos da AP e a salinidade no meio reduz a taxa de remoção de DQO nas microalgas, porém as algas adaptadas a altas salinidades conseguem resistir ao meio hiperosmótico e realizar e/ou estimular a biodegradação de compostos orgânicos. Essa pesquisa mostra uma redução significativa da DQO durante o cultivo (Tabela 7). Principalmente para a AP, PW-7, que mostrou ter uma carga orgânica maior que a PW-6.

5.1.1 *Air sparging*

Na composição da AP observa-se a presença significativa de compostos orgânicos voláteis. Esses compostos podem ser tóxicos para as microalgas quando em altas concentrações (GRAHAM, et al., 2017). Por esse motivo, testou-se a técnica de pré-tratamento conhecida como *air sparging* (JOHNSON, et. al., 1993). No entanto, a Figura 8 mostra que a cepa adaptada de *Dunaliella salina* apresentou uma leve redução na taxa de crescimento específico em meio de cultura preparado com AP pré-tratada por “sparging”. Os coeficientes de crescimento foram de 0,26 e 0,28 d⁻¹, nas proporções de AP de 45g e 50 g de STD/L, respectivamente. Dunstan, et al., (1975), cultivaram *Dunaliella sp.* em meio sintético com determinadas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos, relatou que até a concentração máxima testada de 105 ug/L a *Dunaliella tertiolecta* apresentou melhor crescimento, quando comparado com o controle (sem os compostos orgânicos voláteis).

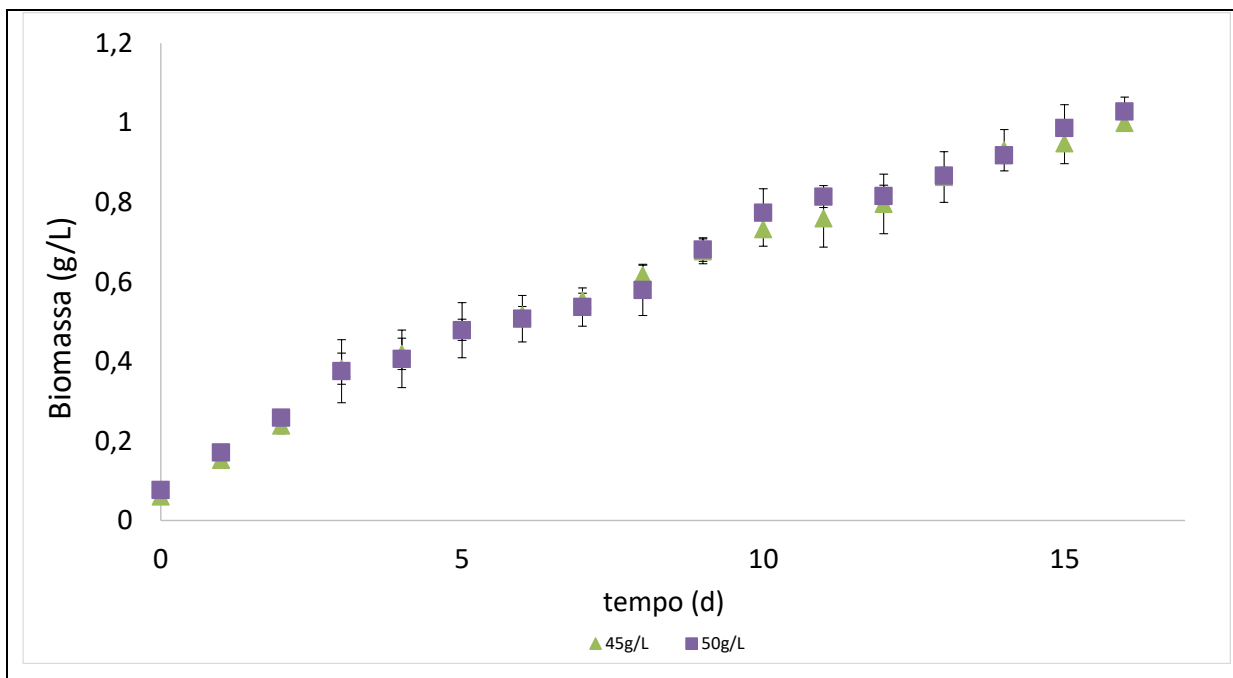


Figura 8. Cinéticos de crescimento. Curva de crescimento da *Dunaliella salina* adaptada na água produzida suplementada para produção de biomassa com o processo *air sparging*. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando a fase exponencial de crescimento que ocorreram nos primeiros sete dias de incubação.

Portanto, a presença de hidrocarbonetos voláteis pode ter um efeito positivo para o cultivo de *Dunaliella sp.*. Os compostos orgânicos voláteis por possuir um baixo peso molecular são de fácil assimilação para o metabolismo microalgal e podem ser utilizados como fonte adicional de carbono.

6 Conclusões

Os resultados mostram que é possível cultivar *Dunaliella salina* em água produzida da indústria de petróleo. Testes com diferentes proporções salinas sugerem que o intervalo de salinidade com melhores respostas de produção é de 50 gSTD/L; que é 1,4 vezes maior que a concentração da água do mar. No entanto, a produção de biomassa algal com AP pode ser 2,3 vezes menor do que é obtido com meio sintético controle (Conway). Por outro lado, testes de adaptação ou aclimação da cultura a AP melhoraram esses resultados em mais de 10%. Dados esses que sugerem possíveis reajustes para o processo de cultivo de *Dunaliella salina* em AP.

Existe uma vantagem significativa com o resultado de melhor produção na AP com a proporção de AP de 50 gSTD/L de acordo com os parâmetros empregados na pesquisa. Esse dado pode viabilizar uma estratégia de padronização da AP que é rotineiramente coletada para o cultivo de microalga. Além de facilitar a padronização da AP através da diluição ou adição de sais antes do cultivo da microalga, esse processo também garante uma maior pressão de seleção ao meio evitando, assim, contaminação por outras espécies algais durante o cultivo. Esse fato é importante considerando que o cultivo pode se dar em lagoas abertas.

Os resultados também demonstraram que o cultivo de *Dunaliella salina* foi uma metodologia eficiente para a remoção de nutrientes (N e P) e até de carga orgânica (DQO). Portanto, demonstrou ser um processo positivo para o tratamento de AP antes de seu descarte ou reutilização.

Referências

- AL-GHOUTI, M. A., Al-Kaabi, M. A., Ashfaq, M. Y., & Da'na, D. A. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 222-239, 2019.
- AMMAR, S. H.; KHADIM, H. J.; MOHAMED, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 132-142, 2018.
- APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC, 1999.
- APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition. 10200I – Determination of biomass (standing crop). 2005.
- ARAVINTHAN, V.; HARRINGTON, D. Coal seam gas water as a medium to grow *Dunaliella tertiolecta* microalgae for lipid extraction. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 4-6, p. 947-958, 2014.
- ARRIADA, A. A.; ABREU, P. C. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 8, n. 3, 2014.
- ARTHUR, J. D., Hochheiser, W. H., Bottrell, M. D., Brown, A., Candler, J., Cole, L., ... & Morris, D. W. Management of produced water from oil and gas wells. **Working Document of the NPC North American Resource Development Study Paper**, p. 2-17, 2011.
- BACCELLA, S., Cerichelli, G., Chiarini, MARCO, Ercole, C., Fantauzzi, E., Lepidi, A., & Veglio. Biological treatment of alkaline industrial waste waters. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 595-602, 2000.
- BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. **Plant physiology**, v. 51, n. 5, p. 875-878, 1973.
- BENEMANN, J. R. Microalgae biofuels: a brief introduction. Benemann Associates and MicroBio Engineering, Walnut Creek, CA, 2009..
- BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. **Algal biotechnology**. Elsevier Applied Science, Essex, UK, pp. 371-381, 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae — a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.557–577, 2010.

- BUCHANAN, J. J., Slater, F. R., Bai, X., & Pratt, S. Algal growth and community structure in a mixed-culture system using coal seam gas water as the water source. **Environmental technology**, v. 34, n. 6, p. 695-701, 2013.
- CABANELAS, I.T.D.; ARBIB, Z.; CHINALIA, F.A.; SOUZA, C.O.; PERALES, J.A.; ALMEIDA, P.F.; DRUZIAN, J.I.; NASCIMENTO, I.A. From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol. **Applied Energy**, v. 109, p. 283-290, 2013.
- CHEN, H., & Jiang, J. G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. **Journal of cellular physiology**, v. 219, n. 2, p. 251-258, 2009.
- CHEN, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. S., & Salley, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011.
- CHINALIA, F.A.; PATON, G.I.; KILLHAM, K.S. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 714-721, 2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25:294–306, 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 126- 131, 2008.
- CONCEIÇÃO, G. R. ; Xavier, L. M.; Matos, J. B.; de Almeida, P. F.; de Moura-Costa, L. F.; Chinalia, F. A. Glucose and Nitrogen Amendments Can Mitigate Wastewater-Borne Bacteria Competition Effect Against Algal Growth in Wastewater-Based Systems. **Journal of phycology**, v. 55, n. 5, p. 1050-1058, 2019.
- DAS, P.; AbdulQuadir, M.; Thaher, M.; Khan, S.; Chaudhary, A. K.; Alghasal, G.; Al-Jabri; H. M. S. Microalgal bioremediation of petroleum-derived low salinity and low pH produced water. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 435-444, 2019.
- DUNSTAN, W. M.; L. P. Atkinson; and J. Natoli. "Stimulation and inhibition of phytoplankton growth by low molecular weight hydrocarbons." **Marine Biology**, v. 31, n. 4, p. 305-310, 1975.
- EKINS, P.; VANNER, R.; FIREBRACE, J. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications. **Journal of Cleaner Production**, v. 15, n. 13-14, p. 1302-1315, 2007.
- FAKHRU'L-RAZI, A.; Pendashteh, A.; Abdullah, L. C.; Biak, D. R. A.; Madaeni, S. S.; Abidin, Z. Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of hazardous materials**, v. 170, n. 2-3, p. 530-551, 2009.
- FANG, L.; Qi, S.; Xu, Z.; Wang, W.; He, J.; Chen, X.; Liu, J. De novo transcriptomic profiling of *Dunaliella salina* reveals concordant flows of glycerol metabolic pathways upon reciprocal salinity changes. **Algal research**, v. 23, p. 135-149, 2017.
- FARHAT, N.; Rabhi, M.; Falleh, H.; Jouini, J.; Abdelly, C.; Smaoui, A. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (chlorophyceae) 1. **Journal of phycology**, v. 47, n. 5, p. 1072-1077, 2011.

- FREEMAN, N.; LINDGREN, Y.; NICHOLS, A. Serum lipid analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 449–464, 1957.
- GALLEGO-CARTAGENA, E.; CASTILLO-RAMÍREZ, M.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. Effect of stressful conditions on the carotenogenic activity of a Colombian strain of *Dunaliella salina*. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 7, p. 1325-1330, 2019.
- GEDDES, M. C. Limnology of Lake Alexandrina, River Murray, South Australia, and the effects of nutrients and light on the phytoplankton. **Marine and Freshwater Research**, v. 35, n. 4, p. 399-415, 1984.
- GODFREY, V. **Production of biodiesel from oleaginous organisms using underutilized wastewaters**. 2012. Theses (Master of Science). Department Chemistry and Biochemistry, Utah State University. 2012.
- GRAHAM, E. J. S.; Dean, C. A.; Yoshida, T. M.; Twary, S. N.; Teshima, M.; Alvarez, M. A.; ... & Wagner, G. L. Oil and gas produced water as a growth medium for microalgae cultivation: A review and feasibility analysis. **Algal research**, v. 24, p. 492-504, 2017.
- GRIFFITHS, M. J.; and Susan TL H. "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production." **Journal of applied phycology**, v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.
- GUERRA, K.; DAHM, K.; DUNDORF, S. **Oil and gas produced water management and beneficial use in the Western United States**. US Department of the Interior, Bureau of Reclamation, 2011.
- GUTERMAN, H.; VONSHAK, A.; BEN-YAAKOV, S. A macro model for outdoor algal mass production. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 35, p. 809-819, 1990.
- HODGSKISS, L. H.; Nagy, J.; Barnhart, E. P.; Cunningham, A. B.; Fields, M. W. Cultivation of a native alga for biomass and biofuel accumulation in coal bed methane production water. **Algal research**, v. 19, p. 63-68, 2016.
- HOPKINS, T. C.; Graham, E. J. S.; Schwilling, J.; Ingram, S.; Gómez, S. M.; Schuler, A. J. Effects of salinity and nitrogen source on growth and lipid production for a wild algal polyculture in produced water media. **Algal research**, v. 38, p. 101406, 2019.
- HOSSEINI TAFRESHI, A.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009.
- HUESEMANN, M. H.; BENEMANN, J. R. **Biofuels from microalgae: review of products, processes and potential, with special focus on *Dunaliella* sp.** The alga *Dunaliella*: Biodiversity, physiology, genomics, and biotechnology. Enfield: Science Publishers, 2009.
- IGUNNU, E. T.; CHEN, G. Z. Produced water treatment technologies. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 9, n. 3, p. 157-177, 2014.
- JAHNKE, L. S.; Andrea L. White. "Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*." **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.

JAIN, P.; Sharma, M.; Dureja, P.; Sarma, P. M.; Lal, B. Bioelectrochemical approaches for removal of sulfate, hydrocarbon and salinity from produced water. **Chemosphere**, v. 166, p. 96-108, 2017.

JIMÉNEZ, S.; Micó, M. M.; Arnaldos, M.; Medina, F.; Contreras, S. State of the art of produced water treatment. **Chemosphere**, v. 192, p. 186-208, 2018.

JOHNSON, R. L.; Johnson, P. C.; McWhorter, D. B.; Hincee, R. E.; Goodman, I. An overview of in situ air sparging. **Groundwater monitoring & remediation**, v. 13, n. 4, p. 127-135, 1993.

KHATOON, H. H.; Haris, N.; Banerjee, S.; Rahman, N. A.; Begum, H.; Mian, S., ... & Endut, A. Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella sp.* isolated from South China Sea at different growth phases. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 112, p. 280-287, 2017.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, v. 67(7), p. 696–701, 2006.

KIRAN, B.; KUMAR, R.; DESHMUKH, D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1228–1244, 2014.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52-63, 2014.

LEE, R.E. **Phycology**. 4th ed. Cambridge Cambridge University Press. 2008.

LIU, X. D.; SHEN, Y. G. Salt-induced redox-independent phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in *Dunaliella salina* thylakoid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1706, n. 3, p. 215-219, 2005.

LÓPEZ, A.; Rico, M.; Santana-Casiano, J. M.; González, A. G.; González-Dávila, M. Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 14820-14828, 2015.

MARQUES, S.S.I.; NASCIMENTO, I.A.; DE ALMEIDA, P.F.; CHINALIA, F.A. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 171(8), p. 1933-1943, 2013.

MENDES, L.B.B.; Cunha, P.C.R.; D'oca, M.G.M.; Abreu, P.C.; Primel, E.G. **Method for Removing Pollutants from Produced Water**. U.S. Patent US 7,955,505, 7 June 2011.

METZ, B.; DAVIDSON, O.R.; BOSCH, P.R.; DAVE, R.; MEYER, L.A. **Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, Cambridge: United Kingdom and New York, USA; 2007.

MOTTA, A. R. P. D.; Borges, C. P.; Kiperstok, A.; Esquerre, K. P.; Araujo, P. M.; Branco, L. D. P. N. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo

por processos de separação por membranas: revisão. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 15-26, 2013.

NEFF, J. M. **Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water**. Elsevier, 2002.

OSPAR Commission, 2015. **Report Assessment of the Discharges, Spills and Emissions to Air on the Norwegian Continental Shelf, 2009-2013**.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102 (1), p. 35–42, 2011.

PENDASHEH, A. R.; Fakhru'l-Razi, A.; Chuah, T. G.; Radiah, A. D.; Madaeni, S. S.; Zurina, Z. A. "Biological treatment of produced water in a sequencing batch reactor by a consortium of isolated halophilic microorganisms." **Environmental technology**, v. 31, n. 11, p. 1229-1239, 2010.

PETROBRÁS - Petróleo Brasileiro S/A. **Sustentabilidade 2018: Relatório Anual**. Rio de Janeiro; 2019.

PIENKOS, P.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuels**. **Bioproducts and Biorefining**, v. 3(4), p. 431–440, 2009.

RANJBAR, S.; Quaranta, J. D.; Tehrani, R.; Van Aken, B. "**Algae-Based Treatment of Hydraulic Fracturing Produced Water: Metal Removal and Biodiesel Production by the Halophilic Microalgae *Dunaliella salina***". In *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, Third International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies*. 2015.

RAO, A.R.; DAYANANDA, C.; SARADA, R.; SHAMALA, T.R.; RAVISHANKAR, G.A. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 560–564, 2007.

RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**. v. 88, p. 3411–3424, 2011.

RICHMOND, A. (ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, Oxford, UK, 566p, 2004.

RODULFO, B. R.; MARMOL, N. H. R.; EMRALINO, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. **Phillipp Journal Science**, v.109, p. 51-58, 1980.

RUBIO, F.C.; CAMACHO, F.G.; SEVILLA, J.M.; CHISTI, Y.; GRIMA, E.M. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81(4), p. 459–73, 2003.

SALINAS-WHITTAKER, S.; Gómez-Gutiérrez, C. M.; Cordero-Esquivel, B.; Luque, P. A.; Guerra-Rivas, G. Effects of the water-soluble fraction of the mixture fuel oil/diesel on the microalgae *Dunaliella tertiolecta* through growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 28, p. 35148-35160, 2020.

SANTANA, H.; CEREIJO, C.R.; TELES, V.C.; NASCIMENTO, R.C.; FERNANDES, M.S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R.C.; SOARES, I.P.; SILVA, F.C.P.; SEIXAS SABAINI, P.; SIQUEIRA, F.G.; BRASIL, B.S.A. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization, **Bioresource Technology**, v. 228, p. 2133-140, 2016.

SANTOS, A.M.; LAMERS, P.P.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R.H. Biomass and lipid productivity of *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions. **Algal Research**, v. 2 (3), p. 204–211, 2013.

SCHLIPALIUS, L. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. **Bioresource technology**, v. 38, n. 2-3, p. 241-243, 1991.

SHANNON, M. A.; Bohn, P. W.; Elimelech, M.; Georgiadis, J. G.; Marinas, B. J.; Mayes, A. M. Science and technology for water purification in the coming decades. In: **Nanoscience and technology: a collection of reviews from nature Journals**, p. 337-346, 2010.

SHPINER, R.; Vathi, S.; Stuckey, D. C. "Treatment of oil well "produced water" by waste stabilization ponds: removal of heavy metals." **Water research**, v. 43, n. 17, p. 4258-4268, 2009.

SIRON, R.; Giusti, G.; Berland, B.; Morales-Loo, R.; Pelletier, E. Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. **Science of the total environment**, v. 104, n. 3, p. 211-227, 1991.

STEWART, M.; ARNOLD, K. **Produced water treatment field manual**. Gulf Professional Publishing, 2011.

SUNG, K.; Kyungeun S. "A review on upcycling: Current body of literature, knowledge gaps and a way forward." World Academy of Science, **Engineering and Technology**, 2015.

TALEBI, A. F.; Dastgheib, S. M. M.; Tirandaz, H.; Ghafari, A.; Alaie, E.; Tabatabaei, M. "Enhanced algal-based treatment of petroleum produced water and biodiesel production." **RSC advances**, v. 6, n. 52, p. 47001-47009, 2016.

TAKAGI, M.; Yoshida, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

TELES, D. R. de S.; AZEVEDO, E. G. de A.; SANTOS, C. P. L. dos. Caracterização Isotópica de Águas de Formação Hipersalinas de um Campo de Petróleo da Bacia do Recôncavo, Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica**. São Paulo, v. 28, n. 2, abr. 2010.

TINOCO, N. A.; Teixeira, C. M. L.; de Rezende, C. M. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1421-1440, 2015.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, v. 28 (2), p. 158-165, 2006.

VEIL, J. A.; Puder, M. G.; Elcock, D.; Redweik Jr, R. J. **A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane**. Argonne National Lab, IL (US), 2004.

Veil, J. A.; Kimmell, T. A.; Rechner, A. C. **Characteristics of produced water discharged to the Gulf of Mexico hypoxic zone (No. ANL/EAD/05-3)**. Argonne National Lab., Argonne, IL (US), 2005.

UTVIK, T. I. **Composition and Characteristics of Produced Water in the North Sea**. Produced Water Workshop, 2003.

WALNE, P. R. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **J Fish Invest Min Agric Fish London**, Ser, v. 2, p. 25: 53, 1966.

WILLIAMS, J.A. **Keys to Bioreactor Selection**. CEP Magazine, 34–41, 2002.

WOOD, A. M.; Everroad, R. C.; Wingard, L. M. "Measuring growth rates in microalgal cultures." **Algal culturing techniques**, v. 18, p. 269-288, 2005.

WOOD, J. L.; Miller, C. D.; Sims, R. C.; Takemoto, J. Y. Biomass and phycocyanin production from cyanobacteria dominated biofilm reactors cultured using oilfield and natural gas extraction produced water. **Algal research**, v. 11, p. 165-168, 2015.

ZHANG, Y.; SU, H.; ZHONG, Y.; ZHANG, C.; SHEN, Z.; SANG, W.; YAN, G.; ZHOU, X. The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products. **Water research**. v. 46, p. 5509-5516, 2012.

YAO, S., Lu, J., Sárossy, Z., Baggesen, C., Brandt, A., & An, Y. Neutral lipid production in *Dunaliella salina* during osmotic stress and adaptation. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 4, p. 2167-2175, 2016.

YAO, S., Lyu, S., An, Y., Lu, J., Gjermansen, C., & Schramm, A. Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 2, p. 359-368, 2019.