



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



ANDREZA HELOÍZA DA SILVA GONÇALVES

**TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO POR FUNGOS
FILAMENTOSOS E MICROALGA**

Maceió-AL

2023

ANDREZA HELOIZA DA SILVA GONÇALVES

**TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO POR FUNGOS
FILAMENTOSOS E MICROALGA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dr. Josealdo Tonholo
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardode
Farias Silva

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

G643t Gonçalves, Andreza Heloiza da Silva.

Tratamento de água produzida de petróleo por fungos filamentosos e microalga / Andreza Heloiza da Silva Gonçalves. – 2023.
69 f. : il color.

Orientador: Josealdo Tonholo.

Coorientador: Carlos Eduardo de Farias Silva.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 61-69.

1. Reator Coluna de Bolhas. 2. Biorremediação. 3. *Tetrademus obliquus*. 4. *Cunninghamella echinulata*. I. Título.

CDU: 665.6/.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **Andreza Heloiza da Silva Gonçalves** intitulada: **“TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO POR FUNGOS FILAMENTOSOS E MICROALGA”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 31 de março de 2023, às 9h, por meio de *videoconferência*.

Maceió, 31 de março de 2023.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente

 CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA
Data: 12/04/2023 22:47:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa

Documento assinado digitalmente

 RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA
Data: 13/04/2023 11:06:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa

Documento assinado digitalmente

 DIMAS JOSE DA PAZ LIMA
Data: 14/04/2023 14:45:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. DIMAS JOSE DA PAZ LIMA, UFAL
Examinador(a) Interno(a)



Dr. JOSEALDO TONHOLO, UFAL
Presidente

Dedico este trabalho a minha Família, em especial aos meus pais Maria Elizabete da Silva e André Luiz Gonçalves dos Santos e aos meus irmãos Allysson, Júnior e Maria Luiza.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ser minha base em todas as circunstâncias da minha vida. Aos meus pais e avô (Luiz Cícero) que sempre me incentivaram a estudar e apoiaram minhas decisões. Também aos meus irmãos pelos momentos de descontração, apoio e amizade.

Por todos os amigos que me ajudaram neste desafio, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Josealdo Tonholo por tanta paciência, orientação. Também ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva por toda dedicação, orientação e pelo tempo despendido durante todo curso. Também aos servidores e pesquisadores do Laboratório Tecnológico de Bebidas e Alimentos - LTBA do Centro de Tecnologia-CTEC (Francine Pimentel, Micaela Almeida, Josimayra, Margarete Cabral, José Anderson, Jaqueline, Brígida, Rosana).

Gostaria de agradecer aos professores, funcionários e pesquisadores do Instituto de Química e Biotecnologia-IQB-UFAL. Em especial aos professores: Cenira Monteiro de Carvalho, Vanderson Barbosa Bernardo, Dimas José da Paz, Amanda Lys dos Santos Silva e a Carmem Lúcia de Paiva e Silva Zanta. E aos pesquisadores Aryana Nogueira, Andrea Claudía de Oliveira, Domingos Lusitânio Pier Macuvele, e ao Técnico Aldy dos Santos.

Agradeço também aos demais amigos que conheci durante a graduação e o mestrado: Marta, Adrielle Firmino, Ísis Peralta, Rafael Silva, Luciana Campos, Krystal Marrie, Nathaly Almeida, Camila Chicuta.

Finalmente aos parentes e amigos que são e foram importantes na conclusão deste trabalho: Girlene Nascimento, Osmar Lyra, Dirlene Nascimento, Freed, Audinete Vânia, Fábio Santos, Felipe Santos, José Luiz (Zezinho), Gorete, Júlia, Silvania Gonçalves, Jéssica Gonçalves, Tuane Cipriano, Natana Cardoso, Cristiane e Pedro. E a todos que ajudaram de forma direta ou indiretamente.

“Nada te perturbe, nada te amedronte.
Tudo passa! Só Deus não muda. A
paciência tudo alcança. Quem a Deus tem
nada falta. Só Deus basta.”

(Santa Tereza D'Ávila)

RESUMO

O principal efluente da indústria petrolífera é a água produzida de petróleo, que possui em sua composição altas concentrações de óleo e graxas (TOG), demanda química de oxigênio (DQO) e outros compostos como surfactantes, nitrogenados, fosfatos, etc. Com isso, objetivo da dissertação é verificar a potencialidade de tratamento da água produzida de petróleo, utilizando o tratamento biológico com fungos filamentosos isoladamente e em consórcio com microalgas na remoção de TOG, nitrogênio e fósforo. Diante disto, o trabalho estudou o efeito no tratamento do efluente da concentração de TOG inicial, variando entre 312-2500 mg L⁻¹, da salinidade variando-se entre 5-50 g L⁻¹ e em diferentes concentrações de nitrogênio (25, 50 e 100 mg L⁻¹) e de fósforo (em torno de 30 mg L⁻¹). Foi utilizado um efluente sintético (BG-11 modificado) que garantia todos os nutrientes necessários ao cultivo fúngico e microalgal, sendo a fonte de carbono o petróleo bruto (caracterizado como leve - °API – rico em alcanos). Os microrganismos utilizados foram a microalga *Tetradismus obliquus* LCE-01 e os fungos filamentosos *Aspergillus niger* URM 7282, *Penicillium oxalicum* URM 7170 e *Cunninghamella echinulata*, URM 7150. Os experimentos iniciais foram realizados em reator coluna de bolhas aerado a uma taxa de 0,5 vvm e com 500 ppm de petróleo bruto (efluente sintético) utilizando uma iluminação de 100 μmol m⁻² s⁻¹ (nos experimentos com a microalga) e temperatura ambiente entre 30-35°C, cultivando todos os fungos e microalga isoladamente como em co-cultivo e verificou-se que a contribuição maior na remoção de TOG foi realizado pelos fungos filamentosos e pela espécie *Cunninghamella echinulata*, alcançando taxas entre 90-95%, com produção de biomassa microbiana entre 250-550 mg L⁻¹. Nesse sentido, continuou-se o estudo somente como a espécie fúngica *C. echinulata* e a microalga *T. obliquus*, esta última com o intuito de verificar uma contribuição adicional na remoção de outros contaminantes como nitrogênio e fósforo. Uma vez que a salinidade é um parâmetro importante nesse tipo de efluente, verificou-se sua influência no cultivo desses dois microrganismos, no mesmo sistema, mas utilizando um TOG inicial de 2500 mg L⁻¹. Percebeu-se que a *T. obliquus* conseguiu se manter viva até concentrações de 25 g L⁻¹, e o *C. echinulata* além de crescer em todas as concentrações salinas testadas, removeu significativamente o TOG com taxas de remoção entre 80-95%, produzindo em torno de 1 g L⁻¹ de biomassa microbiana, decrescendo à medida que a salinidade aumentava. Além disso, percebeu-se nos dois ensaios testados, que o fungo

filamentoso crescia com uma estabilidade do pH entre 6,5-7,5, enquanto que a microalga elevou significativamente o pH para valores até valores de 10, o que seria inviável para um co-cultivo com o fungo filamentosos, logo necessitando de ajustes diários. Em seguida, nos experimentos variando-se a concentração de nitrogênio e verificando a eficiência de remoção tanto de nitrogênio quanto de fósforo, utilizou-se um TOG inicial de 2500 mg L⁻¹. Confirmou-se altas taxas de remoção de TOG como nos ensaios precedentes (>95%), e percebeu-se que o co-cultivo do fungo com a microalga removeu maiores percentuais de nitrogênio e fósforo, de 63,4, 44,4 e 31,7% do nitrogênio presente para as concentrações iniciais de 25, 50 e 100 mg L⁻¹, respectivamente; e uma média similar de 36,58 ± 4,82 % de fósforo para todos os experimentos; enquanto que o fungo isoladamente removeu em torno de 10-15% para nitrogênio e de fósforo 22,28 ± 4,13%, mostrando que de fato a microalga contribui para a remoção de contaminantes adicionais que possam estar presente no efluente. Nisso, conclui-se que o trabalho delimitou parâmetros nutricionais e ambientais importantes que podem servir de base para o planejamento experimental de um tratamento biológico mediado por *C. echinulata* isoladamente ou em seu co-cultivo com *T. obliquus* em efluente real.

Palavras-chave: Reator Coluna de Bolhas; Biotecnologia Ambiental, Biorremediação, *Tetrademus obliquus*, *Cunninghamella echinulata*

ABSTRACT

The main oil industry effluent is called produced water and has in its composition high concentrations of oil and grease (TOG), chemical oxygen demand (COD) and other compounds such as surfactants, nitrogenous compounds, phosphates, etc. With this in mind, the aim of this work was to verify the biological treatment of produced water, using filamentous fungi, individually, and in consortium with microalga in the removal of TOG, nitrogen and phosphorus. The effect of the initial TOG concentration of the effluent, varying between 312-2500 mg L⁻¹, of the salinity varying between 5-50 g L⁻¹ and in different concentrations of nitrogen (25, 50 and 100 mg L⁻¹) and phosphorus (around 30 mg L⁻¹) were evaluated in the treatment. A synthetic effluent (modified BG-11) was used, which provided all the necessary nutrients for fungal and microalgal cultivation, with crude oil as the carbon source (characterized as light - °API - rich in alkanes). The microorganisms used were the microalga *Tetradesmus obliquus* LCE-01 and the filamentous fungi *Aspergillus niger* URM 7282, *Penicillium oxalicum* URM 7170 and *Cunninghamella echinulata*, URM 7150. The initial experiments were carried out in an aerated bubble column reactor at a rate of 0.5 vvm and with 500 ppm of crude oil (synthetic effluent) using 100 μmol m⁻² s⁻¹ of light intensity (in experiments with microalgae) and room temperature between 30-35°C, cultivating all fungi and microalgae separately and in co-cultivation and it was verified that the greatest contribution in the removal of TOG was performed by filamentous fungi and the best strain was the species *Cunninghamella echinulata*, reaching removal rates between 90-95%, with microbial biomass production between 250-550 mg L⁻¹. In this sense, the study continued only with the fungal species of *C. echinulata* and the microalga *T. obliquus*, the latter with the aim of verifying an additional contribution in the removal of other contaminants such as nitrogen and phosphorus. Since salinity is an important parameter in this type of effluent, its influence on the cultivation of these two microorganisms and was verified in the same system but using an initial TOG of 2500 mg L⁻¹. It was noticed that *T. obliquus* managed to stay alive up to concentrations of 25 g L⁻¹, and *C. echinulata*, in addition to growing in all saline concentrations tested, reaching removal rates of TOG between 80-95%, producing around 1 g L⁻¹ of microbial biomass, these rates decreased when salinity increased. In addition, it was noticed in the two assays tested that the filamentous fungus grew with a pH stability between 6.5-7.5, while the microalga significantly raised the pH

up to values of 10, which would be unfeasible for a co-culture with the filamentous fungus, thus requiring daily adjustments. Then, in the experiments varying the nitrogen concentration and verifying the removal efficiency of both nitrogen and phosphorus, an initial TOG of 2500 mg L⁻¹ was used. High TOG removal rates were confirmed as in the previous tests (>95%), and it was noticed that the co-cultivation of the fungus with the microalgae removed higher percentages of nitrogen and phosphorus, of 63.4, 44.4 and 31.7% of the nitrogen present for the initial concentrations of 25, 50 and 100 mg L⁻¹, respectively; and a similar average of 36.58 ± 4.82% phosphorus for all experiments; while the fungus individually, removed around 10-15% for nitrogen and 22.28 ± 4.13% for phosphorus in all experiments, showing that the microalga contributes to the removal of additional contaminants that may be present in the effluent. In this regard, it is concluded that the work delimited important nutritional and environmental parameters that can serve as a basis for the experimental planning of a biological treatment mediated by *C. echinulata* alone or in its co-culture with *T. obliquus* in real effluent.

Keywords: Bubble Column Reactor; Environmental Biotechnology, Bioremediation, *Tetrademus obliquus*, *Cunninghamella echinulata*

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Química dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs)	20
Figura 2. Gráfico da produção de petróleo, segundo regiões geográficas (milhões barris/dia) - 2020.	23
Figura 3. Principais compostos da água produzida.	25
Figura 4. Microrganismos utilizados nos experimentos (fungos filamentosos (suspensão de esporos) e microalga (células). Imagem de microscópio óptico com aumento de 400x.	34
Figura 5. Sistema de tratamento.	36
Figura 6. Curva padrão de TOG medido por gravimetria.	39
Figura 7. Curva padrão de correção do TOG em função da salinidade.	39
Figura 8. Curva padrão de fosfato total.	41
Figura 9. Curva padrão de nitrato total.	42
Figura 10. Curva padrão de nitrito total.	43
Figura 11. Espectro de Infravermelho do petróleo bruto.	46
Figura 12. Triagem dos fungos filamentosos em água produzida sintética. A) Remoção de TOG (%) e B) Peso seco.	48
Figura 13. Fungo filamentoso (<i>Cunninghamella echinulata</i>) aglomerado à superfície do petróleo.	50
Figura 14. Co-cultivo do fungo filamentoso (<i>Cunninghamella echinulata</i>) e microalga (<i>Tetradismus obliquus</i>), ambos se aglomerando à superfície do petróleo.	50
Figura 15. Tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de petróleo A) e B) Remoção de TOG, C) e D) Peso seco e D) e E) pH durante o cultivo por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A, C e E) e <i>Tetradismus obliquus</i> (B, D e F), respectivamente.	52
Figura 16. Tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de NaCl. A) e B) Peso seco, C) e D) Remoção de TOG e E) e F) pH durante o cultivo por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A, C e E) e <i>Tetradismus obliquus</i> (B, D e F), respectivamente.	55
Figura 17. Tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de nitrogênio por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A) e seu co-cultivo com <i>Tetradismus obliquus</i> (B).	58
Figura 18. Peso seco celular e remoção de TOG durante o tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de nitrogênio por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A e C) e seu co-cultivo com <i>Tetradismus obliquus</i> (B e D), respectivamente.	59
Figura 19. Variação de pH durante o tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de nitrogênio por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A) e seu co-cultivo com <i>Tetradismus obliquus</i> (B), respectivamente.	59

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Maiores reservas provadas de petróleo em 2020.	21
Tabela 2. A utilização de microalgas e fungos na remediação de efluentes.	32
Tabela 3. Biorremediação dos contaminantes nitrogênio e fósforo em diferentes efluentes através da monocultura e dos consórcios dos microrganismos.	33
Tabela 4. Composição do meio de cultura utilizado nos experimentos (BG-11).	35
Tabela 5. Resumo dos ensaios experimentais realizados.	37
Tabela 6. Tipos de petróleo.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs.	Absorbância
NA	<i>Aspergillus niger</i>
AN+ TO	<i>Aspergillus niger</i> + <i>Tetrademus obliquus</i>
AP	Água Produzida
API	<i>American Petroleum Institute</i>
ATR	Refletância Total Atenuada
BDA	Batata Dextrose Ágar
BG-11	Blue-Green Medium
BTEX	Benzeno, tolueno, Etil-benzeno e Xileno
CE	<i>Cunninghamella echinulata</i>
CE + TO	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Tetrademus obliquus</i>
COT	Carbono Orgânico Total
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FT	Fósforo Total
FTIR	Espectrometria no Infravermelho por Transformação de Fourier
IBP	Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás
MAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Monocíclicos
NORM	Materiais Radioativos de Ocorrência Natural
NOS	Nitrogênio, Enxofre e Oxigênio
NPD	Naftaleno, Fenantreno, Dibenzotiofeno
NT	Nitrogênio Total
OPEP	Organização dos Países Exportadores de Petróleo
1P	Reservas Provadas

2P	Reservas Provadas e Prováveis
PAHs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
PO	<i>Penicillium oxalicum</i>
PO + TO	<i>Penicillium oxalicum</i> + <i>Tetradesmus obliquus</i>
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
TDS	Sólidos Totais Dissolvidos
TO	<i>Tetradesmus obliquus</i>
TOG	Teor Óleos e Graxas
TPHs	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específico	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Indústria do petróleo	19
3.1.1. Descoberta do petróleo	20
3.1.2. Reservas, produção e consumo de petróleo	21
3.2. Água produzida- produção e características	24
3.3. Tratamento da água produzida	27
3.3.1. Microalgas	28
3.3.2. Fungo filamentosos	29
3.3.3 Biorremediação de AP a partir de microalgas e fungos filamentosos	30
3.3.4 Co-cultivo de microalgas e fungos para tratamento de efluentes	31
3.3.5 Remoção de nitrogênio e fósforo através do sistema de monocultura e consórcio fungo-microalga	32
4. METODOLOGIA	34
4.1. Espécies de fungos filamentosos e microalgas	34
4.2. Efluente sintético utilizado nos experimentos	35
4.3. Sistemas de tratamento	36
4.4. Experimentos preliminares	37
4.5. Otimização das condições ambientais e nutricionais	37
4.5.1. Avaliação da influência da concentração de TOG sobre o tratamento	37
4.5.2. Avaliação da influência salinidade sobre o tratamento	37
4.5.3. Avaliação do consumo de nitrato e fósforo sobre o processo de tratamento	38
4.5.4. Verificação do pH durante os cultivos com o fungo e/ou microalga	38
4.6. Análises realizadas	38
4.6.1. Análise do teor de óleos e graxas (TOG)	38
4.6.2. Determinação de peso seco celular	40
4.6.3. Determinação de fósforo total	40
4.6.4. Determinação de pH	41
4.6.5. Determinação de nitrato	41
4.6.6. Determinação de nitrito	42
4.6.7. Determinação de nitrogênio amoniacal	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1. Características do petróleo utilizado	45
5.2. Triagem dos fungos filamentosos	47
5.3. Avaliação da capacidade de remoção de TOG pelo <i>Cunninghamella echinulata</i>	51
5.4. Estudo da adaptabilidade do fungo e da microalga à salinidade	53
5.5. Avaliação da remoção de nitrogênio e fósforo pelo fungo e o consórcio fungo-microalga	57
6 CONCLUSÃO	61
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

No último século, o aumento da população gerou um consumo maior de produtos derivados do petróleo sejam como combustível ou produtos químicos, acarretando numa maior geração de efluentes. Nesse sentido, o processo de exploração de petróleo tanto em reservas subterrâneas seja *onshore* quanto *offshore*, geram um efluente denominado de água produzida (AP) que é o maior resíduo da exploração petrolífera. Projeções indicam, que na atualidade para cada barril de petróleo são gerados 4 barris de água produzida (DUDEK et al., 2020). Seus principais componentes são: compostos de óleo dissolvidos e dispersos, minerais de formação dissolvidos, compostos químicos de produção, sólidos de produção (incluindo sólidos de formação, produtos de corrosão e incrustações, bactérias, ceras e asfaltenos) e gases dissolvidos (COSTA et al., 2022). Com isso, há uma grande preocupação e ações voltadas tanto, para meio ambiente buscando minimizar o efeito poluidor desse tipo de efluente, como para que se tenha, ao longo dos anos matéria-prima renovável, para que se possa continuar os avanços tecnológicos em equilíbrio com a natureza.

Os tratamentos químicos e físicos que são empregados na atualidade, possuem algumas desvantagens, como custo elevado e geração de resíduos tóxicos. Há necessidade de buscar alternativas mais econômicas e ecologicamente mais sustentáveis, a citar, o tratamento biológico, também chamado de biorremediação, que utiliza microrganismos para degradar/desintoxicar contaminantes presentes nos efluentes (VARJANI, 2016).

Os fungos filamentosos são eficientes na degradação de hidrocarbonetos e derivados do petróleo, devido a sua plasticidade enzimática e pode remediar sejam efluentes líquidos ou solos contaminados (SINGH e WARD, 2004; BARBIERI e GALLI, 2012). Por outro lado, as microalgas possuem a capacidade de consumir fósforo, nitrogênio, carbonos orgânicos, constituintes de muitos efluentes (KUMAR et al., 2022). Muitos pesquisadores relatam que existe uma boa relação entre esses microrganismos na natureza, que é nomeada como líquens ou associações simbióticas (DAS et al., 2022). Com isso, objetivo do trabalho é avaliar o tratamento de água produzida por fungos filamentosos na remoção de TOG, nitrato e fósforo; e verificar se a relação simbiótica fungo-microalga pode exercer vantagens adicionais durante o tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o processo de remoção de TOG, nitrato e fosfato em água produzida de petróleo utilizando fungo filamentosos, microalga e/ou sua simbiose.

2.2 Específicos

- Realizar experimentos preliminares, com o intuito de se fazer um *screening* dos fungos filamentosos de forma a escolher a espécie mais promissora na remoção de TOG do efluente;
- Verificar a real contribuição da microalga na remoção de TOG;
- Avaliar a influência da concentração de petróleo no tratamento da água produzida por fungos filamentosos e microalgas;
- Verificar a influência da salinidade no processo de tratamento da água produzida por fungos filamentosos e microalgas;
- Estudar a eficiência de remoção de nitrato presente em diferentes concentrações durante o tratamento da água produzida por fungos filamentosos e em seu co-cultivo com microalgas;
- Verificar a remoção de fósforo durante o tratamento da água produzida por fungos filamentosos e em seu co-cultivo com microalgas;
- Avaliar o comportamento do pH durante os cultivos realizados com fungo filamentosos, microalga e/ou sua simbiose.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

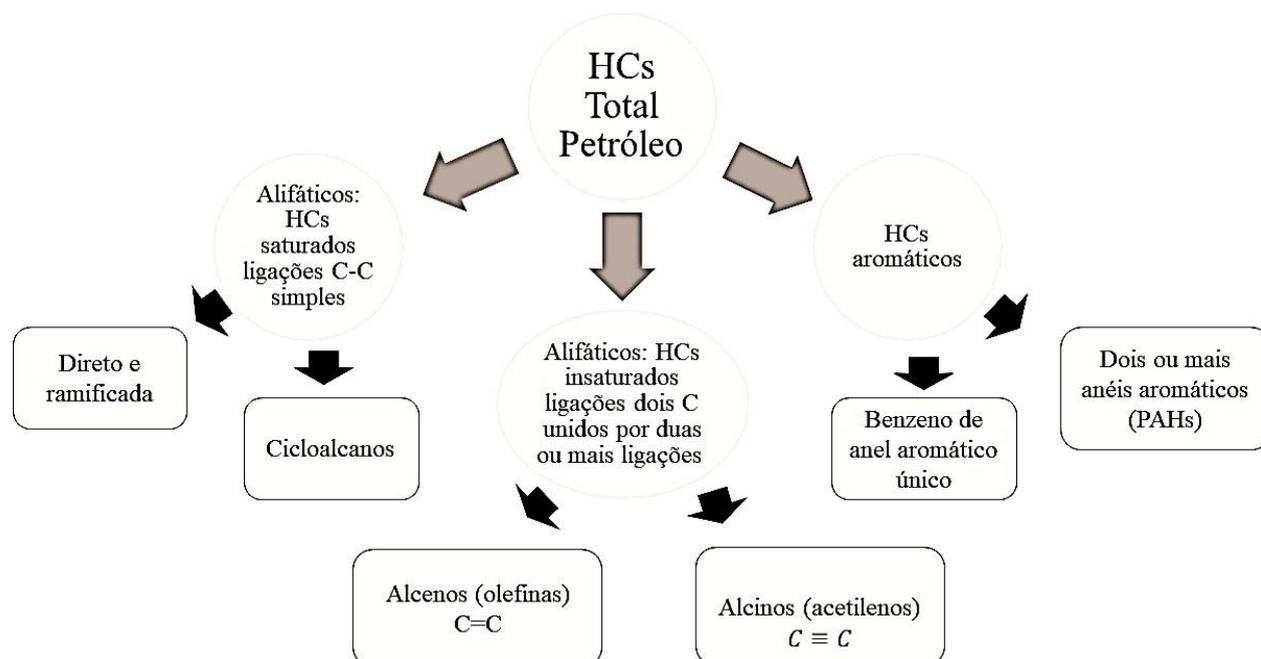
3.1 Indústria do petróleo

O petróleo bruto é obtido através da matéria orgânica acumulada, deteriorada e compactada em grandes aglomerados de rocha em um processo que ocorre em um tempo estimado, de centenas de milhões de anos (VARJANI, 2016., SPEIGHT, 2006). Tais condições, alta pressão e temperatura, são determinantes para transformar a deterioração incompleta do plâncton, vegetais e resíduos de origem animais, em petróleo (DUDEK et al., 2020).

As características geológicas do petróleo podem ser mencionadas como uma combinação natural gerada preferencialmente por hidrocarbonetos que são encontrados no estado sólido, líquido ou gasoso em condições específicas de temperatura e pressão para que ocorra a formação do petróleo (TECHNOLOGY, 2012). Os hidrocarbonetos podem ser descobertos em reservas subterrâneas nas opções de *onshore* quanto *offshore*. A composição e as propriedades do petróleo dependem muito da origem biológica do petróleo bruto da formação geológica (condições térmicas, tipo de rocha reservatória), sua idade e exposição a microrganismos (DUDEK et al., 2020).

Comumente se espera, que o petróleo bruto tenha, em uma maior concentração, hidrocarboneto. Usualmente os hidrocarbonetos são mensurados como Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs), conforme a **Figura 1**, (YANG, 2011). Além de ter moléculas mais complexas, não são formadas apenas por carbono e hidrogênio, pois existe em sua estrutura heteroátomos, como por exemplo, nitrogênio, oxigênio e enxofre (VARJANI, 2016) e em uma menor concentração metais, como níquel, vanádio ou cobre (DUDEK et al., 2020). Com isso, os compostos de petróleo podem ser classificados em dois grupos majoritários: hidrocarbonetos e compostos com heteroátomos (YANG, 2011).

Figura 1. Química dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs).



Fonte: adaptado de YANG, 2011.

Contudo os compostos que fazem parte dos hidrocarbonetos totais de petróleo - TPHs, que são os mais estáveis e conseguem permanecer no ecossistema por muito tempo, são aromáticos. Já os hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos (MAH), benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX), são normalmente vistos em uma quantidade superior aos aromáticos policíclicos e são mais voláteis. E os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), possuem um percentual de 20% dos hidrocarbonetos que compõem o petróleo bruto e alguns destes compostos podem ocasionar problemas ao meio ambiente em proporções elevadas (EL SIKAILY et al., 2003; HAAPKYLAE et al., 2007; TURNERÿ, 2017).

3.1.1 Descoberta do petróleo

A notoriedade do petróleo e do gás natural para população atual é bem conhecida. Porém a utilização do petróleo na sociedade começou na antiguidade, como fonte de energética, no século XIX (THOMAS, 2004; LUCCHESI, 1998). No final da década de 1850, Edwin Drake perfurou o primeiro poço de petróleo (IGUNNU e CHEN, 2012;

LUCCHESI, 1998), no estado da Pensilvânia, nos Estados Unidos assim alcançando inicialmente a profundidade de 21 metros. Esse foi marco para exploração de petróleo (THOMAS, 2004; LUCCHESI, 1998).

3.1.2 Reservas, produção e consumo de petróleo

As reservas de petróleo são volumes conhecidos de hidrocarbonetos em campos identificados que estão em condições técnicas, economicamente possíveis para realizar a retirada do petróleo dentro dos parâmetros definidos (ANP, 2021; SORREL et al., 2012). Na mensuração das reservas há algumas incertezas, com isso elas são classificadas em dois grupos: reservas provadas (1P) e reservas provadas e prováveis (2P) (SORREL et al., 2012). De acordo com Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás-IBP, as Reservas Provadas em 2020, alcançaram a marca de 1,7 trilhão de barris no mundo, assim alcançou a mesma posição que em 2019, com um pequeno retrocesso de 0,1%, conforme a Tabela 1 (ANP, 2021).

Tabela 1: Maiores reservas provadas de petróleo em 2020.

MAIORES RESERVAS PROVADAS DE PETRÓLEO 2020 (BILHÕES DE BARRIS)		
1° Venezuela	303,8	18%
2° Arábia Saudita	297,5	17%
3° Canadá	168,1	10%
4° Irã	157,8	9%
5° Iraque	145,0	8%
6° Rússia	107,8	6%
7° Kuwait	101,5	6%
8° Emirados Árabes Unidos	97,8	6%
9° EUA	68,8	4%
10° Líbia	48,4	Outros 17%
11° Nigéria	36,9	
12° Cazaquistão	30,0	
13° China	26,0	
14° Catar	25,2	
15° Argélia	12,2	
16° Brasil	11,9	
Reservas mundiais totais	1.732	

Fonte: adaptado de IBP, 2023.

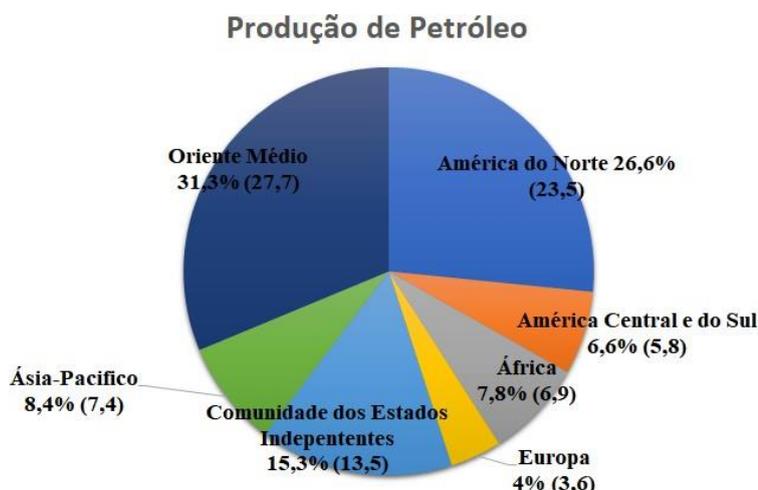
Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível, a produção de petróleo mundialmente em 2020 caiu 6,9% quando comparado ao ano anterior (2019). Com isso, passando de 95 milhões de barris/dia para 88,4 milhões de barris/dia. Os países produtores da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP), obtiveram um declínio de 12,4% com uma recessão de 4,3 milhões de barris/dia. Também houve um retrocesso na produção dos países que não fazem parte da OPEP, a queda foi de 3,7 % corresponde a um declínio de 2,2 milhões de barris/dia.

Apesar do retrocesso registrado em 2020, os Estados Unidos mantiveram sua colocação como maior produtor mundial de petróleo, registrando média de 16,5 milhões de barris/dia (18,6% do total mundial). A Árabia Saudita permaneceu no segundo lugar do ranking, com uma produção equivalente a 11 milhões de barris/dia (12,5% do total mundial), uma queda de 6,7% quando comparado a 2019. Em terceiro lugar ficou a Rússia (12,1% do total mundial), em quarto o Canadá (5,8% do total mundial) e em quinto, Iraque (4,7% do total mundial) (ANP, 2022).

Quando avaliadas as maiores regiões produtoras de petróleo, o Oriente Médio manteve sua colocação de maior produtor, apesar da queda de 4,5% em comparação com 2019. A América do Norte ficou em segundo lugar (decréscimo de 3,5%). Já Comunidade dos Estados Independentes ficou em terceiro (acrécimo de 8,4%). Na sequência região Ásia-Pacífico (queda de 2,7%). Na quinta colocação a região da África (decreceu em 18,8%). Em seguida veio região das Américas Central e do Sul (retrocesso de 5,9%). Por último a Europa que obteve a quarta colocação após registrar crescimento de 4,5% em relação ao ano anterior. No gráfico 1 pode ser observado produção de petróleo através das regiões produtoras em milhões de barris dia e suas respectivas porcentagens (ANP, 2022).

A Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) começou suas atividades em 1960, com intuito de sistematizar políticas entre seus integrantes, com objetivo de manter a estabilidade do mercado de petróleo diante do tamanho da sua produção coletiva. Nos anos 70 a OPEP, alcançou 50% da produção mundial, e a organização vem oscilando sua produção em média 40% nas últimas décadas.

Figura 2: Gráfico da Produção de petróleo, segundo regiões geográficas (milhões barris/dia) – 2020.



Fonte: adaptado de ANP, 2023.

Em 2020, a OPEP ganhou mais prestígio e incentivo, devido ao retrocesso na produção de petróleo ocasionada pela pandemia da Covid-19. Com isso, houve um acordo histórico entre a organização e aliados, com a intenção de alavancar a economia. Porém, nos últimos meses diante da guerra entre Rússia e Ucrânia, houve um aumento significativo no preço do petróleo, desestabilizando o mercado financeiro e promovendo ainda mais, incentivos para que OPEP leve sua produção a uma estabilização no preço do petróleo (IBP, 2022).

O consumo global de petróleo no ano de 2020 foi de 88,5 milhões de barris/dia, diante do declínio de 9,3% (9,1 milhões de barris/dia) quando confrontado com ano de 2019. Quando avaliado os países que mais consumiram petróleo em 2020, os que obtiveram as primeiras colocações foram os mesmo de 2019. Com isso, os Estados Unidos foi o primeiro colocado com um consumo 17,2 milhões de barris/ dia (19,4% do total mundial). A China conquistou a segunda posição, com consumo médio de 14,2 milhões de barris/dia de petróleo (16,1% do total mundial). Na terceira colocação se manteve a Índia com 7,7 milhões de barris/dia (5,3% do total mundial) (ANP, 2022).

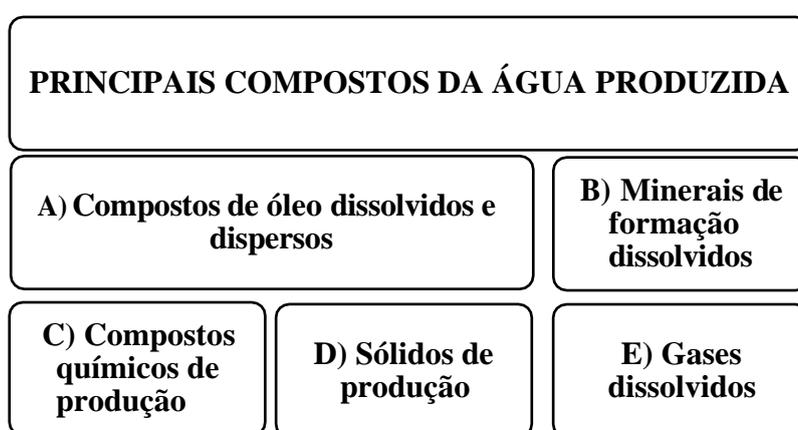
3.2 Água produzida - produção e características

A extração de petróleo e gás gera um resíduo natural definido como água produzida (AP) (ABUJAYYAB, 2021; SOUZA et al., 2020; AL-KAABI et al., 2019; AL-KAABI et al., 2021; AL-GHOUTIY, 2019). A AP é também denominada como água de formação, água conata ou água residuais (AL-KAABI et al., 2019; AL-KAABI et al., 2021; AL-GHOUTIY et al., 2019). Possui uma acidez baixa ou pode ser alcalina, é encontrada no subsolo abaixo do petróleo em reservatórios porosos. A AP é composta pela água de formação (confinada por camada de rocha e solo) e a água de injeção que são retiradas em conjunto com o petróleo bruto no decorrer da produção de petróleo e gás (JIMÉNEZ et al., 2018; MUNIRASU, 2016; FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). Quando os hidrocarbonetos e o gás são retirados a pressão nos reservatórios é restringida, com isso é necessário injetar água sobre a camada de água do reservatório com intuito de conservar a pressão hidráulica e impulsionar a extração do petróleo (JIMÉNEZ et al., 2018; MUNIRASU, 2016; IGUNNU e CHEN, 2012). Existe também a adição de hidrocarbonetos (SEDLACKO, 2020) e produtos químicos nos procedimentos de produção e tratamento (DUDEK et al., 2020; JIMÉNEZ et al., 2018). Assim a água produzida é o maior fluxo gerado de resíduo da extração de petróleo e gás (AL-KAABI et al., 2021).

A produção de petróleo bruto e conseqüentemente a geração de água produzida na década de 90, era em torno de 65 a 190 milhões de barris por dia, respectivamente. Após três décadas, a produção global por dia de petróleo cresceu para aproximadamente 80 milhões de barris, entretanto a produção de água produzida ampliou para aproximadamente 320 milhões de barris por dia (DUDEK et al., 2020). Os dados usualmente mencionados de 3 barris de AP para um barril de petróleo são atualmente substituídos por um valor mais próximo de 4 barris de água produzida para um 1 de hidrocarbonetos (ABUJAYYAB, 2021, DUDEK et al., 2020, AL-KAABI et al., 2021). As proporções de AP/hidrocarbonetos estão evoluindo globalmente, devido ao envelhecimento dos reservatórios convencionais de óleo e gás, conseqüentemente produzido mais resíduo (AP) para uma proporção baixa de petróleo (ABUJAYYAB, 2021, AL-GHOUTIY et al., 2019). Com isso, já existe uma estimativa que até 2025, a relação AP/ hidrocarbonetos alcance uma taxa 12:1 (v/v) (AL-KAABI et al., 2021, JIMÉNEZ et al., 2018). Logo, existe suposição que haja uma expansão do mercado de gestão e reuso da água produzida (SALEM E THIEMANN, 2022).

A água residual ou água produzida é uma combinação de compostos orgânicos e inorgânicos (MUNIRASU, 2016; HAKIM, 2016). Determinadas condições como localização geológica do campo, sua formação geológica, vida útil de seus reservatórios e tipo de produto de hidrocarboneto que está sendo produzido são determinantes para as condições físicas e químicas da AP (AL-KAABI et al., 2021; AL-GHOUTIY et al., 2019; JIMÉNEZ et al., 2018; FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). Os principais compostos da água produzida podem ser observados na **Figura 3** (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009):

Figura 3: Principais compostos da água produzida.



Fonte: adaptado de COSTA et al., 2022.

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos, incluindo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno (NPD), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e fenóis. A água não pode dissolver todos os hidrocarbonetos, então a maior parte do óleo é dispersa na água (DUDEK et al., 2020). Os volumes de óleo dissolvidos e suspenso presentes na água produzida (antes do tratamento) estão atrelados às seguintes condições: composição do óleo, pH, salinidade, TDS (sólidos totais dissolvidos), temperatura, relação óleo/água, tipo e quantidade de produtos químicos do campo petrolífero, tipo e quantidade de vários compostos de estabilizante (ceras, asfaltenos, sólidos finos) (JIMÉNEZ et al., 2018; FAKHRU'L-RAZI et al., 2009).

As moléculas inorgânicas dissolvidas na AP contêm ânions, cátions, metais pesados, e materiais radioativos de ocorrência natural (NORM). A água produzida é

composta de uma diversidade de cátions e ânions que possuem concentração parecida para diferentes metais (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009).

Os cátions comuns na água produzida são: Na, Ca, K, Mg, Fe, Al, B, Ba, Cu, Li, Zn, Ti, Mn. Os principais ânions na AP são: cloreto, sulfato, sulfito, bicarbonato, nitrato, nitrito, etc (MUNIRASU, 2016). A existência de determinados cátions e ânions podem ocasionar a incrustação inorgânica de equipamentos de produção ou no poço (DUDEK et al., 2020).

Na AP são encontrados traços de diversos metais pesados, como cádmio, cromo, cobre, chumbo, mercúrio, níquel, prata e zinco. As concentrações destes metais estão relacionadas à idade das reservas e à geologia da formação (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). Seu acúmulo pode alcançar valores 102 a 105 vezes a encontrada na água do mar. (JIMÉNEZ et al., 2018). Já os materiais radioativos (NORM), mais abundantes na água produzida são ^{226}Ra e ^{228}Ra e dependendo da geologia, alguns poços podem ter também ^{238}U e ^{235}U (MUNIRASU, 2016).

Na exploração de petróleo e gás, os agentes químicos de produção são normalmente inseridos ao poço de hidrocarboneto ou gás para minimizar problemas operacionais, com isso melhorando o processo de extração de óleo, gás e água, consequentemente evitando a corrosão de dutos e formação de hidrato de metano no sistema de produção de gás. Os agentes químicos fundamentais para o processo de produção variam de acordo com vários sistemas de produção. Os produtos químicos de tratamento de produção, como incrustação, corrosão, inibidores de hidratação, biocidas, produtos químicos para tratamento de água como floculantes e antiespumantes, quebradores de emulsão, quebradores de emulsão reversa e coagulantes, que são usados, na recuperação e bombeamento de hidrocarbonetos (AL-GHOUTIY, et al., 2019). De acordo com a utilização, os produtos químicos de produção podem ser solúveis em óleo ou água e dependendo das circunstâncias em ambos (DUDEK et al., 2020).

Os sólidos de produção são oriundos de uma diversidade de materiais orgânicos e inorgânicos sólidos que estão juntos a água produzida. (JIMÉNEZ et al., 2018). Também pode ter materiais flutuantes ou à deriva encontrada na água, como lodo, sedimentos, areia, algas e plâncton (AL-GHOUTIY et al., 2019). Podem possuir também compostos cristalinos inorgânicos (SiO_2 , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , e BaSO_4) (JIMÉNEZ et al., 2018).

A água produzida é normalmente composta por gases dissolvidos, como hidrocarbonetos voláteis, dióxido de carbono, oxigênio e sulfeto de hidrogênio (CO₂, O₂ e H₂S) (DUDEK et al., 2020; MUNIRASU, 2016; FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). Esses gases são gerados espontaneamente por ação de bactérias (HAKIM, 2016) ou por reações químicas em água. (IGUNNU e CHEN, 2012).

3.3 Tratamento da água produzida

O tratamento deste efluente petrolífero pode ser realizado por meio de diversos processos: físicos, químicos e biológicos (OKEKE et al., 2022). Os métodos físicos possuem diferentes técnicas (filtração, eletrodialise e flutuação). Já os métodos químicos têm como técnicas, a precipitação, oxidação química, como também tecnologias eletroquímicas (AL-KAABI et al., 2021).

Os métodos de tratamentos físico e químicos já são consolidados na sociedade e possuem diversos inconvenientes, como custo proveniente da escavação e carregamento de enormes volumes de resíduos para tratamento *ex-situ* (VARJANI, 2016), formação de lodo, consumo de energia, demanda de operadores qualificados e geração de resíduos tóxicos (PESSÔA et al., 2022).

Com esses inconvenientes, existe uma demanda iminente em realizar tratamentos biológicos que não gere tantos resíduos tóxicos para meio ambiente (OKEKE et al., 2022; PESSÔA et al., 2022; AL-KAABI et al., 2021; VARJANI, 2016; JYOTI; SINHA; FAGGIO, 2022). Os processos tecnológicos que são ecologicamente corretos, utilizam métodos biológicos como a biorremediação (aplicação de organismos vivos para degradar/desintoxicar) para remoção de poluentes de origem petrolífera encontrados na natureza (VARJANI, 2016).

No entanto, é importante encontrar espécies que possam se adaptar às características da água produzida, principalmente pelo teor de hidrocarbonetos, alta salinidade e presença de nitrato/nitrito e fósforo.

3.3.1 Microalgas

Microalgas ou fitoplâncton ('phyto'=planta; 'planktos' = feito para vagar) (SUPARMANIAM et al., 2019) são organismos microscópicos, fotossintetizantes e eucarióticos (DUARTE et al., 2021), responsáveis pela maior parte da fotossíntese no planeta (SEVERO; NASCIMENTO; FAGUNTES, 2021). Esses microrganismos usam energia solar, nutrientes, CO₂ para produzir biomassa rica em lipídios, proteínas, carboidratos e outros compostos orgânicos valiosos (PESSÔA et al., 2022; MATOS, 2021), e são agrupados em quatro grupos principais: (1) diatomáceas, 2) algas verdes, (3) algas douradas e (4) cianobactérias (algas verdes azuis) (ZAINITH et al., 2021).

Esses microrganismos possuem um sistema simples, de crescimento celular para perpetuar a espécie, com isso permitindo rápida proliferação e sobrevivência por um longo período em várias condições ambientais adversas (SUPARMANIAM et al., 2019). Também vivem em ambientes marinhos ou de água doce (KUMAR, et al., 2022). Além de resistirem a vários contaminantes e podem ser cultivadas em terras impróprias para outras finalidades (DEBOWSKI et al., 2020).

Para seu desenvolvimento e produção as microalgas necessitam de macronutrientes (maior concentração) e micronutrientes (menor concentração). Os macronutrientes básico independente da espécie são: nitrogênio, fósforo e carbono são os nutrientes inorgânicos primários. Já os micronutrientes essenciais são: Mo, K, Co, Fe, Mg, Mn, B e Zn (ZAINITH et al., 2021). A concentração dos macros e micronutrientes vão variar de acordo com o processo metabólico de cada espécie de microalga (DUARTE et al., 2021).

De acordo com as características metabólicas (energia e fonte de carbono utilizada) (KUMAR et al., 2022) e a oferta nutriente que o meio de cultura disponha, as microalgas podem ser agrupadas em três ordens: cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (ZHOU et al., 2020; ANDRADE e FILHO, 2014).

As microalgas autotróficas necessitam da fotossíntese e usam o carbono inorgânico, como fonte primária de carbono, além de usarem a luz natural ou artificial como fonte de energia (DUARTE et al., 2021). Por outro lado, no sistema heterotrófico (do grego *heteros*, outros e *trophos*, que come) as microalgas utilizam compostos orgânico produzidos por fontes externas para atender as demandas energéticas (ANDRADE e FILHO, 2014) e podem ser mantidas sem iluminação. No cultivo

mixotrófico, o carbono como fonte para o crescimento de microalgas inclui tanto inorgânicos (CO₂), como o carbono orgânico (por exemplo, a glicose), com isso o mixotrófico é a combinação do cultivo autotrófico e heterotrófico (PETER et al., 2022; ZHOU et al., 2020; ANYANWU et al., 2018)

O sistema de cultivo das microalgas pode ser feito de duas maneiras principais: aberto (tanques ou lagoas) ou fechado (fotobiorreator). O cultivo aberto é mais simples a construção e manutenção quando comparado o sistema fechado. Porém existe algumas limitações do sistema aberto, como o mau uso da luz pela célula, perdas por evaporação, grande exigência de terra e risco de contaminação. Por outro lado, o cultivo fechado é mais eficiente no controle do sistema, com isso há uma produtividade maior, contaminação reduzida, captura superior de CO₂ e desenvolvimento controlado (ZAINITH et al., 2021; SEVERO; NASCIMENTO; FAGUNTES, 2021; ANYANWU et al., 2018).

A biorremediação através das microalgas pode ser afetada por algumas variantes no processo de cultivo deste microrganismo. Os fatores que interferem na remediação eficiente vão desde a escolha da espécie, até variantes nutricionais, como nitrogênio, fósforo, potássio como outros macro e micronutrientes. Também condições ambientais, como temperatura, pH, salinidade, carbono inorgânico, oxigênio, intensidade de luz e CO₂. Outras condições que devem ser levadas em consideração, são as seguintes: agitação, mistura, largura, profundidade do biorreator entre outros (ZAINITH et al., 2021; ANYANWU et al., 2018)

3.3.2 Fungo filamentoso

O reino *Fungi* é composto pelos bolores, cogumelos, líquens, leveduras entre outros. Esses microrganismos vivem como saprófitos, parasitas ou mutualistas, por exemplo, plantas (micorrizas) ou algas (líquens). Os fungos filamentosos são classificados como organismos eucarióticos, heterotróficos, absorptivos que tipicamente desenvolvem um corpo tubular ramificado chamado micélio e se reproduzem por meio de esporulação (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011). Alguns destes organismos (fungos extremófilos) possuem tolerância a condições ambientais extremas (temperaturas de -5 a +60°C; pH de 1 a 9). (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011).

Esses organismos utilizam suas hifas fúngicas para aprisionar e adsorver sólidos suspensos, com objetivo de supri sua demanda por energia e nutrientes. Eles excretam algumas enzimas que contribuem para a degradação de substrato no decorrer da purificação de efluentes residuais (RANI et al., 2019).

Os fungos têm a capacidade de realizar a biorremediação de inúmeros efluentes, como poluentes orgânicos persistentes (POPs), corantes têxteis, hidrocarbonetos de petróleo, efluentes da indústria de papel e celulose, efluentes de curtimento de couro, HPAs, pesticidas (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016). Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Varicospora* são os fungos mais estudados devido à sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos. O fungo filamentoso *Cladosporium sphaerospermum* é capaz de degradar PAHs de cinco e seis anéis usando enzimas extracelulares de degradação de lignina e purifica solos poluídos por HPAs (MACAYA et al., 2019).

3.3.3 Biorremediação de AP a partir de microalgas e fungos filamentosos

O tratamento de efluentes utilizando microalgas tem se mostrado uma alternativa sustentável devido a capacidade em utilizar determinados contaminantes como fonte de nutrientes. Por exemplo, o BTEX presente em AP pode ser usado como fonte de carbono para algumas espécies de microalgas, no entanto pode ocorrer inibição em seu crescimento devido ao aumento da concentração de BTEX e tempo de contato (AL-GHOUTI et al., 2019). Normalmente, APs apresentam compostos tóxicos que podem inibir o crescimento das microalgas, no entanto, possuem concentrações de nitrogênio e fósforo em sua composição, os quais são nutrientes necessários para o metabolismo microalgal. A alta salinidade em AP é um desafio para o cultivo de microalgas, porém, o tratamento pode ser satisfatório utilizando espécies resistentes a hipersalinidade. Esse tipo de cultivo/tratamento produz biomassa, a qual pode ser usada como matéria prima para produção de produtos de valor agregado (HAKIM et al., 2018). Por exemplo, Probir Das et al. (2019), utilizaram a *Chlorella* sp. para tratar água produzida suplementada com Nitrogênio e Fósforo, após 15 dias o rendimento de biomassa microalgal foi de 1,72 g/L, atingindo uma remoção de 73% de carbono orgânico total (COT) e 92% de nitrogênio total (NT). E Arriada e Abreu (2014), avaliaram apenas a viabilidade de crescimento da microalga marinha *Nannochloopsis oculata* em diferentes concentrações de água

produzida. *N. oculata* apresentou crescimento significativo em meio diluído (50%) e puro, embora obtendo menores rendimentos de biomassa para o meio com 100% de efluente.

Uma variedade de fungos filamentosos isolados de áreas contaminadas por hidrocarbonetos é capaz de mineralizar compostos de petróleo (GARGOURI et al., 2015). A maior parte dos fungos filamentosos não são capazes de degradar totalmente os hidrocarbonetos aromáticos, tornando-os apenas em produtos com menor toxicidade e mais suscetíveis à decomposição por bactérias (STELIGA, 2012). A capacidade de remoção significativa de hidrocarbonetos por fungos foi demonstrada por Okoro (2008), estudou o uso de culturas puras dos fungos filamentosos *Penicillium* sp. e *Aspergillus niger* na biodegradação de hidrocarbonetos em AP com um teor de óleo e graxa de 1407 mg L⁻¹ contendo várias frações de hidrocarbonetos de petróleo, incluindo n-alcanos (608 mg L⁻¹), aromáticos (13,88 mg L⁻¹), compostos de nitrogênio, enxofre e oxigênio (NSO) (12,68 mg L⁻¹) e PAHs (0,833 mg L⁻¹). Após 120 dias tratamento os resultados mostraram que as taxas de biodegradação foram levemente maiores usando a *A. niger* do que *Penicillium* sp., no qual a cultura de *Penicillium* sp. alcançou uma remoção do teor de óleos e graxas (TOG) de 94,86%, reduzindo para 65,5 mg L⁻¹ de n-alcanos, 0,98 mg L⁻¹ de aromáticos, 1,64 mg L⁻¹ de compostos NSO e 0,0021 mg L⁻¹ PAHs, e a cultura de *A. niger* removeu o teor de óleo e graxa em 95,8%, reduzindo para 56,5 mg L⁻¹ de n-alcanos, 0,65 mg L⁻¹ de aromáticos, 0,96 mg L⁻¹ de compostos NSO e 0,008 mg L⁻¹ PAHs. De forma semelhante, Okoro e Amund (2010), uma cultura de *Aspergillus fumigatus* foi capaz de reduzir os hidrocarbonetos para 78,5 mg L⁻¹ de n-Alcanos, 1,58 mg L⁻¹ de aromáticos, 1,22 mg L⁻¹ de compostos NSO (1,22 mg L⁻¹) e 0,0168 mg L⁻¹ de PAHs.

3.3.4 Co-cultivo de microalgas e fungos para tratamento de efluentes

Se relata uma correlação positiva quando fungos filamentosos são utilizados juntamente com o cultivo de algas. A relação simbiótica natural entre microalgas e fungos ou cianobactérias e fungos também denominada como líquens existe há mais de 600 milhões de anos (DAS et al., 2022).

As relações podem ser de mutualismo (as duas espécies se beneficiam concomitantemente) ou comensalismo (apenas uma espécie se beneficia). Um exemplo de comensalismo/mutualismo entre bactérias e microalgas, é que algumas espécies microalgas necessitam de vitamina B₁₂, que pode ser produzido pelas bactérias (LUTZU

e DUNFORD, 2018). Na **Tabela 2** pode ser verificado alguns trabalhos desenvolvidos no sistema de co-cultivo entre microalgas e fungos na remediação de efluentes.

Tabela 2: A utilização de microalgas e fungos filamentosos na remediação de efluentes.

Águas Residuais	Fungos	Microalgas	Remoção de nutrientes			Rendimento de biomassa	Referência
			DQO	Nitrogênio Total	Fósforo Total		
Águas residuais de melão	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i>	70,68%	67,09%	88,39%	4,215 g L ⁻¹	(YANG; LI; WANG, 2019)
Pasta de biogás	<i>Pleurotus geesteranus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	41,29–65,37%	42,53–73,53%	40,28–76,66%	0,071–0,162 g L ⁻¹ dia ⁻¹	(CAO et al., 2017)
Pasta de biogás	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	45,65–70,24%	46,25–75,57%	48,76–78,26%	0,086–0,183 g L ⁻¹ dia ⁻¹	(CAO et al., 2017)
Pasta de biogás	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	37,92–62,38%	40,39–67,72%	39,11–71,36%	0,064–0,153 g L ⁻¹ dia ⁻¹	(CAO et al., 2017)
Águas residuais de suínos	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	79,74%	74,28%	85,37%	4,77 g L ⁻¹ (0,45 g L ⁻¹ dia ⁻¹)	(GUO et al., 2017)
Estrume suíno diluído	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	70,34%	44,68% (TN); 23,23% (amônio)	84,70%	/	(ZHOU et al., 2012)
Efluente secundário de plantas de processamento de frutos do mar	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	> 74%	> 44%	> 93%	/	(SRINUANPAN et al., 2018)
Pasta de biogás (55% de CO ₂ inicial concentração)	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	68,29%	61,75%	64,21%	0,174 g L ⁻¹ dia ⁻¹	(ZHOU; ZHANG; JIA, 2018)

*DQO – Demanda química de oxigênio.

Fonte: Adaptado de LIN et al., 2023.

3.3.5 Remoção de nitrogênio e fósforo através do sistema de monocultura e consórcio fungo-microalga

A eutrofização dos ambientes aquáticos oriundas de altas concentrações de fósforo (P) e nitrogênio (N), instiga preocupação ambiental devido à formação de rejeitos sólidos e emissões de gases nocivos para a atmosfera (CHAI et al., 2021). Os microrganismos, como os fungos filamentosos possuem a capacidade de consumir nitrogênio orgânico e inorgânico, porém as microalgas exercem uma eficiência maior, para degradar esses contaminantes. O sistema em simbiose da microalga com fungo, poder ser mais efetivo

do que sistema de monocultura (LENG et al., 2021). Na **tabela 3**, é demonstra alguns trabalhos sobre a biorremediação dos contaminantes nitrogênio e fósforo em diferentes efluentes, através da monocultura e do consórcio dos microrganismos (fungo e microalga).

Tabela 3: Biorremediação dos contaminantes nitrogênio e fósforo em diferentes efluentes através da monocultura e dos consórcios dos microrganismos.

Águas Residuais	Microalgas		Remoção de nutrientes		Referência
			Nitrogênio	Fósforo	
Efluente de digestor anaeróbico	<i>Scenedesmus sp</i>		I: 273 mg L ⁻¹ >99,19%	I: 58,75 mg L ⁻¹ 98,01%	(KIM et al., 2015)
Efluentes de curtume	<i>Scenedesmus sp</i>		I: 343 mg L ⁻¹ 85,63%	I: 6,6 mg L ⁻¹ 96,78%	(FONTOUR A et al., 2017)
Poluentes por FBRs	<i>Monoraphidium sp.</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Nannochloris sp.</i>		I: 274 mg L ⁻¹ 89,9 %	I: 19,1 mg L ⁻¹ 99,7%	GIL-IZQUIERDO et al., 2021)
Águas residuais de uma estufa hidropônica comercial	<i>Tetrademus obliquus</i>		I (ensaio 1): 284,8 ± 0,18 mg L ⁻¹ I (ensaio 2): 235 ± 0,29 mg L ⁻¹ (ensaio 1): 97,5 e 100% (dias 13 e 15, respectivamente) (ensaio 2): 100% (dia 8)	I (ensaio 1): 15,3 ± 0,01 mg L ⁻¹ I (ensaio 2): 8,8 ± 0,04 mg L ⁻¹ (ensaio 1): 100% (3 dias) (ensaio 2): 100% (3 dias)	(SALAZAR et al., 2023)
Águas residuais de suínos diluídas com água do mar estéril	<i>Fungos</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af)	<i>Microalgas</i> <i>Thraustochytrid</i> (Af/Thr) e <i>Tetraselmis chuii</i> (Af/Tc)	I: NH ₄ ⁺ -N = 680,7 ± 23,1 mg L ⁻¹ Fung.: 43% M: (Thr): 30% (Tc):32% C: (Af/Thr): 86% (Af/Tc):77%	I: 145,4 ± 13,7 mg L ⁻¹ Fung.: 31% M: (Thr): 18% (Tc):40% C: (Af/Thr): 69% (Af/Tc):51%	(WREDE et al., 2014)
Efluente de melão	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	I: NT = 407,5 mg L ⁻¹ , NH ₃ -N = 170 mg L ⁻¹ Fung.: 18,20% M: 44,39% C: 67,09% e NH ₃ -N = 94,72%	I: 30,4 mg L ⁻¹ Fung.: 40% M: 30% C: 88,39%	(YANG et al., 2019)
Águas residuais de molho de soja	<i>Penicillium sp</i>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	I: NH ₄ ⁺ -N = 154,5 ± 2,6 mg L ⁻¹ , NT = 172,4 ± 10,9 mg L ⁻¹ Fung.: 18,20% M: 44,39% C: 67,09% e NH ₃ -N = 94,72%	I: 24,9 ± 2,2 mg L ⁻¹ Fung.: 0,9 ± 0,02 mg L ⁻¹ d ⁻¹ M: 3,3 ± 0,01 mg L ⁻¹ d ⁻¹ C: 4,1 ± 0,18 mg L ⁻¹ d ⁻¹	(SONG et al., 2022)
Águas residuais de amido de batata	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	I: NT = 611,30 ± 1,78 mg L ⁻¹ Fung.: 73,96 % M: 52,81 % C: 83,56 %	I: 49,59 ± 1,45 mg L ⁻¹ Fung.: 82,57% M: 42,18% C: 96,58%	(WANG et al., 2022)

*I – Concentração inicial do contaminante, Fung. - Fungo, M - Microalga, C- Co-cultivo.

Fonte: Autora, 2023.

Como pode ser visualizado na **Tabela 2 e 3**, a utilização do co-cultivo entre microalgas e fungos em tratamento de efluente residuais é atual. No entanto, trabalhos usando este sistema de cultivo para biorremediação de água produzida, que é foco do trabalho, ainda não está difundido como uma das possibilidades de tratamento biológico.

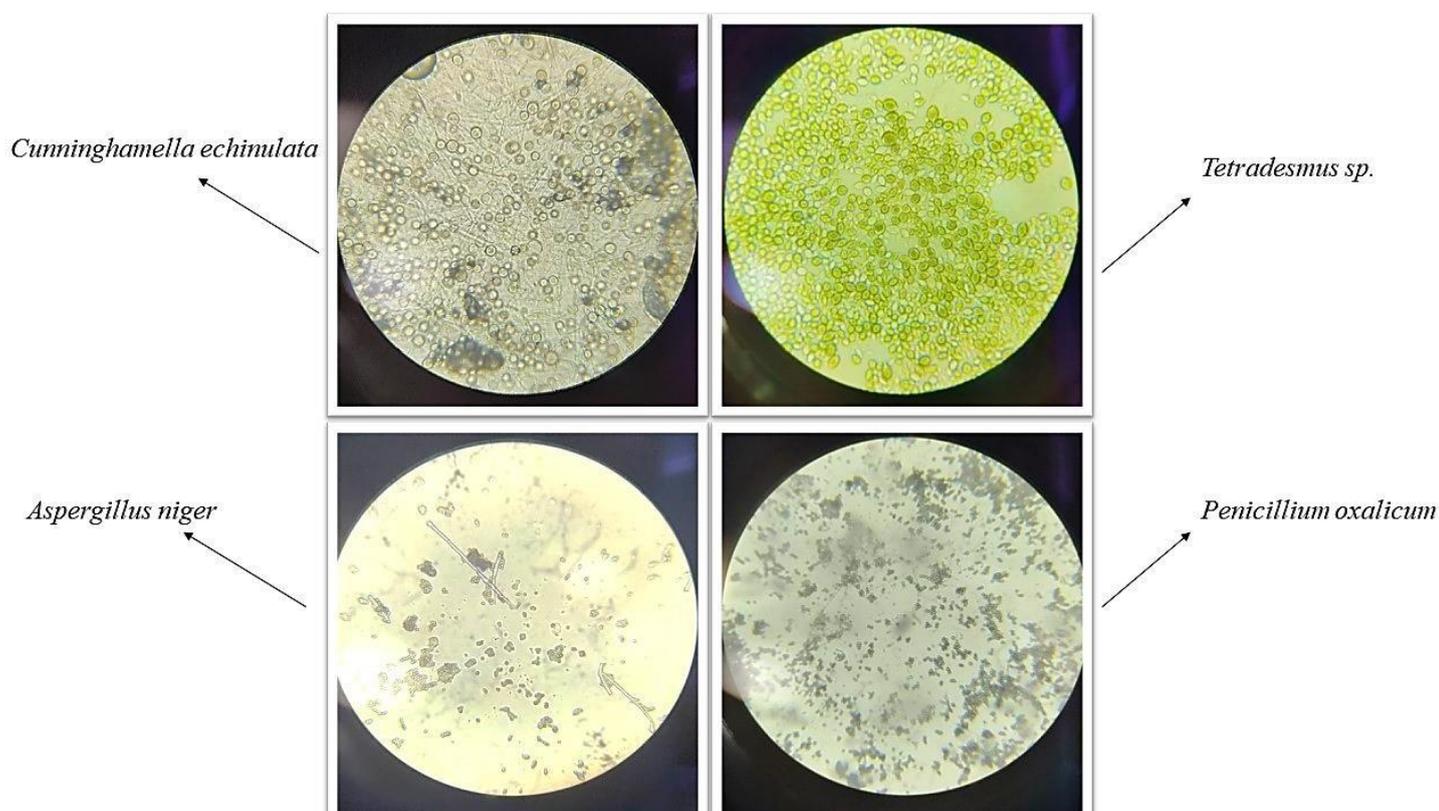
4 METODOLOGIA

4.1 Espécies de fungos filamentosos e microalga

A microalga utilizada foi a espécie *Tetrademus sp.* LCE-01 (**Figura. 4**). Mantida em meio solidificado de ágar nutriente (Kasvi®), e em meio líquido para uso como inóculo de BG-11 (blue-green medium) (RIPPKA et al., 1979).

As espécies de fungos filamentosos usados foram *Penicillium oxalicum* Currie & Thom URM 7170, *Aspergillus niger* Thiegh URM 7282 e *Cunninghamella echinulata* Thaxt URM 7150 (**Figura. 4**), adquiridas frente à Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. As espécies fúngicas foram mantidas em meio BDA (Batata Dextrose Agar). Para a suspensão de esporos foi utilizada uma solução estéril de Triton 0,1% (v/v), após um período médio de crescimento de 10 dias, e a concentração de esporos foi determinada a partir do procedimento de contagem em câmara de Neubauer.

Figura 4: Microrganismos utilizados nos experimentos (fungos filamentosos (suspensão de esporos) e microalga (células)). Imagem de microscópio óptico com aumento de 400x.



Fonte: Autora, 2023.

4.2 Efluente sintético utilizado nos experimentos

O efluente sintético foi baseado no meio de cultura BG-11 (RIPPKA et al., 1979), especificamente usado para o cultivo de microalgas observando também o meio Bushnell-Haas utilizado em testes de degradação por espécies fúngicas (ATAKPA et al., 2022; BEMGUENAB e CHIBANI, 2021) de forma a atender ambas as necessidades nutricionais desses grupos microbianos (**Tabela 4**) e petróleo bruto fornecido pela Petrobras campo Pilar.

Tabela 4: Composição do meio de cultura utilizado nos experimentos (BG-11).

Composto	BG-11 (g/ L)	BG-11 modificado (g/ L)
Na ₂ MG EDTA	0,001	0,002
Citrato férrico de amônio	0,012	0,024
Ácido cítrico . 1H ₂ O	0,012	0,024
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,036	0,072
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,075	0,150
K ₂ HPO ₄	0,04	0,170
H ₃ BO ₃	0,003	0,003
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,002	0,002
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0002	0,0002
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,00008	0,00008
COCl ₂ . 6H ₂ O	0,0005	0,0005
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,0004	0,0004
Na ₂ CO ₃	0,02	0,02
NaNO ₃	1,5	1,5

Fonte: Autora, 2023.

Em relação ao petróleo, a empresa forneceu um laudo no qual especificou que o mesmo possui densidade 0,7781 g cm⁻³ e grau API 49,4 (Petrobras, 2022). Com o intuito

de confirmar a presença de alcanos no petróleo, realizou-se uma análise de espectrometria no infravermelho por transformação de Fourier (FTIR).

O petróleo bruto foi solubilizado em hexano e analisado em espectrofotômetro Shimadzu (modelo IR-Affinity-1), havendo a correção do espectro pela análise somente do hexano (branco). O espectro foi verificado na faixa de comprimento de onda entre 500 a 4000 cm^{-1} , e número de *scan* de 64, com acessório de refletância total atenuada (ATR).

4.3 Sistema de tratamento

Frascos vítreos cilíndricos Drechsel® de 500 mL (60 mm de diâmetro externo) foram utilizados para simular o comportamento de um reator coluna de bolhas, e receberam 400 mL de volume útil. Sob incidência luminosa artificial constante de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (radiômetro Delta Ohm 2302.0) para os experimentos contendo microalga. O sistema foi aerado com o uso de um compressor (JEBO 660; 2 L min^{-1}) a uma taxa de 0,5 vvm (**Figura 5**).

A concentração de esporos utilizada foi de 10^4 esporos mL^{-1} para os experimentos contendo fungo, e em torno de 50 mg L^{-1} para a concentração de microalgas. O pH desses meios foram ajustados conforme a necessidade do microrganismo utilizado, desta forma para meios com apenas microalga o pH foi mantido entre 8 e 8,5, enquanto para o fungo filamentoso e o consócio microalga-fungo o pH foi mantido entre 7 e 7,5. Todos os experimentos tiveram uma duração de 7 dias e foram realizados em duplicata.

Figura 5: Sistema de tratamento.



Fonte: Autora, 2023.

4.4 Experimentos preliminares

Inicialmente, em todos os experimentos foram utilizados água produzida sintética (meio de cultura BG11 modificado com petróleo bruto) com concentração de 500 mg L⁻¹ de petróleo. Nesses experimentos, se utilizou as três espécies fúngicas de forma a verificar qual seria mais adaptada ao sistema para ser utilizado nas etapas de otimização das condições ambientais e nutricionais. Os experimentos realizados estão resumidos na **Tabela 5**.

Tabela 5: Resumo dos ensaios experimentais realizados.

Microrganismo	Condições do processo
Sem microrganismo – Controle	Iluminação e aeração constantes, por 7 dias, pH 7-7,5
<i>Tetrademus</i>	Iluminação e aeração constantes, por 7 dias, pH 8-8,5
<i>Tetrademus</i> + <i>Cunninghamella echinulata</i>	Iluminação e aeração constantes, por 7 dias, pH 7-7,5
<i>Tetrademus</i> + <i>Penicillium oxalicum</i>	Iluminação e aeração constantes, por 7 dias, pH 7-7,5
<i>Tetrademus</i> + <i>Aspergillus niger</i>	Iluminação e aeração constantes, por 7 dias, pH 7-7,5
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Aeração constante, por 7 dias, pH 7-7,5
<i>Penicillium oxalicum</i>	Aeração constante, por 7 dias, pH 7-7,5
<i>Aspergillus niger</i>	Aeração constante, por 7 dias, pH 7-7,5

Fonte: Autora, 2023.

4.5 Otimização das condições ambientais e nutricionais

Todos os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições experimentais descritas na **seção 4.4**, com as devidas modificações sendo mencionadas abaixo.

4.5.1 Avaliação da influência da concentração de TOG sobre o tratamento

Após se verificar qual fungo será o de maior eficiência na remoção de óleos e graxas, se avaliou o efeito da concentração de óleo no tratamento aplicando ao sistema concentrações iniciais de TOG entre 312-2500 mg L⁻¹.

4.5.2 Avaliação da influência da salinidade sobre o tratamento

Em seguida, se avaliou o efeito da salinidade no crescimento e na capacidade de remover TOG pelo fungo e microalga de modo a verificar se há alguma limitação expressiva que possa comprometer o processo de tratamento, uma vez que a água

produzida real costuma conter um significativo teor salino, porém há as exceções, dependendo das condições físicas e químicas do poço. A salinidade aplicada variou entre 5-50 g L⁻¹. A concentração inicial de TOG foi de 2500 mg L⁻¹ em todos os experimentos.

4.5.3 Avaliação do consumo de nitrato e fósforo sobre o processo de tratamento

Por fim, se verificará a remoção de nitrogênio e fósforo no efluente de forma a adequar o efluente sintético às necessidades nutricionais dos microrganismos. Se utilizou os seguintes valores: 25, 50 e 100 mg L⁻¹ de nitrogênio de nitrato e concentração de fósforo em torno 30 mg L⁻¹. TOG inicial utilizado foi de 2500 mg L⁻¹.

4.5.4 Verificação do pH durante os cultivos com o fungo e/ou microalga

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes para garantir o bom funcionamento do cultivo microbiano (ZAINITH et al., 2021). Por isso, ele sempre foi monitorado em todos os experimentos e verificando-se o comportamento de crescimento para o fungo e microalga em separado e em seu co-cultivo de forma a avaliar a melhor forma de controlá-lo de modo a não interferir no metabolismo de ambos os grupos microbianos.

4.6 Análises realizadas

4.6.1 Análise do teor de óleos e graxas (TOG)

Para determinação de óleos e graxas, foi utilizado o método gravimétrico por extração com hexano na proporção 5:1 de meio:hexano. O hexano foi adicionado à amostra e agitado por 2 minutos, em seguida transferido para um balão de separação, após 10 minutos a parte contendo o solvente foi levado à estufa a 55°C em cadinho previamente tarado por no máximo 48 horas, verificando-se a completa evaporação do solvente.

Cálculo:

$$\text{TOG } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{N}{V} \cdot f c \quad (1)$$

Onde:

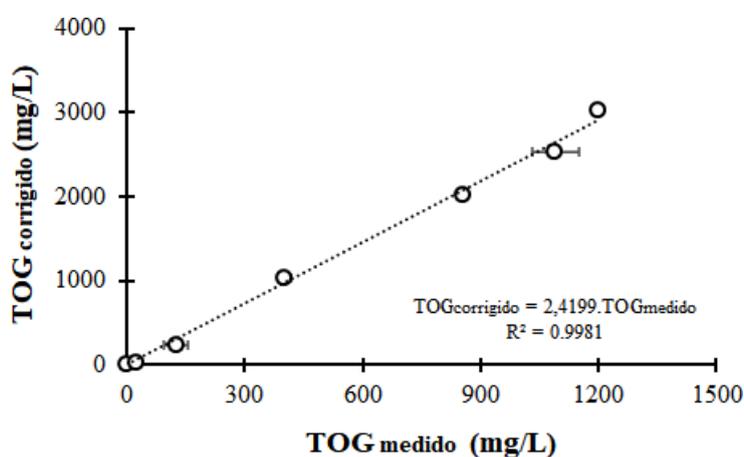
N = massa do resíduo seco (massa da cápsula com o extrato seco menos a tara da cápsula) em g;

V = volume tomado da amostra, em mL;

fc = fator da curva de correção (igual a 2,4999), visualizado na curva padrão disponibilizada na **Figura 6**.

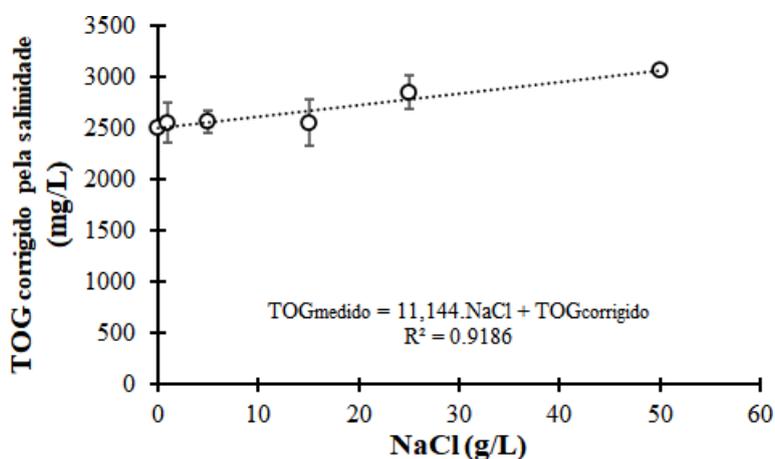
Durante os experimentos, verificou-se que quando uma alta salinidade estava presente no meio, a mesma exercia influência na gravimetria do TOG após extração com hexano e por isso foi necessário a elaboração de uma curva padrão de correção da salinidade. Na **Figura 7**, é possível visualizar o fator de correção para a salinidade. Logo na Equação 1, além de fc, tem-se também o fc^{sal} , que deve ser multiplicado pela concentração de sal para ser subtraído no $TOG_{corrigido}$ (o qual utilizou o fc).

Figura 6: Curva padrão de correção do TOG medido por gravimetria.



Fonte: Autora, 2023.

Figura 7: Curva padrão de correção do TOG em função da salinidade.



Fonte: Autora, 2023.

4.6.2 Determinação de peso seco celular

Para determinação do peso seco, utilizou-se os sólidos que foram separados na etapa de centrifugação após a etapa de extração com hexano para TOG. Eles foram transferidos para cápsulas previamente taradas em estufa a 105°C por 2h, ou até peso constante, em seguida resfriadas em dessecador por 15 minutos e pesadas.

Cálculo:

$$\text{Peso seco celular (PS)} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{N}{V} \cdot 10^6 \quad (2)$$

Onde:

N = massa do resíduo seco (massa da cápsula com o extrato seco menos a tara da cápsula) em g;

V = volume tomado da amostra, em mL.

4.6.3 Determinação de fósforo total

Se utilizará o método do ácido ascórbico (APHA, 2018b). Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de água destilada, 1 mL da amostra previamente filtrada e 0,4 mL da solução desenvolvedora de cor, os tubos foram, então, tampados e foi esperado um período de 30 min, em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 706 nm (Shimadzu, UV-mini 1240).

Cálculo:

$$\text{Fósforo Total (FT)} \left(\text{PO}_4^{3-} \right) \left(\frac{mg}{L} \right) = fc * Abs * Diluição \quad (3)$$

Onde:

fc = fator da curva, visualizada na **Figura 8**;

Abs = Valor da Absorbância obtida em espectrofotômetro;

Diluição = Diluição da amostra.

Para a conversão em fósforo basta multiplicar pela relação entre as massas moleculares de fósforo e fosfato, de 31 e 95 g/mol, consistindo em um fator 31/95.

A solução desenvolvedora de cor foi formada pela fração das soluções dada a seguir e possui estabilidade de 4 horas.

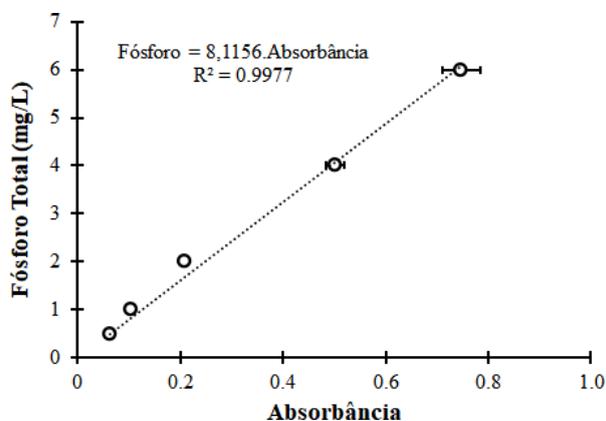
A = 0,5; B=0,05; C=0,15; D=0,3.

Solução A: ácido sulfúrico 5 N; Solução B: tartarato misto de antimônio e potássio

hemihidratado: 1,3715g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ para 500 mL de água; Solução C:

molibdato de amônio: 20 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 500mL de água e Solução D: ácido ascórbico 0,01M, 0,44 g para 100 mL de água.

Figura 8: Curva padrão de fosfato total.



Fonte: Autora, 2023.

4.6.4 Determinação do pH

Para a determinação de pH foi transferido uma alíquota da amostra para um Becker, e levado ao pHmetro previamente aferido (tampões pH 4,0 e pH 7,0), operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante (TECNAL).

4.6.5 Determinação de nitrato

Se utilizará o método de redução por cádmio (APHA, 2018c). Para determinação da concentração de nitrato as amostras foram filtradas em filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ e diluídas 100x com água destilada. Transferiu-se 10 mL da amostra para tubo tipo Falcon e foi adicionado 1,5 mL da suspensão de hidróxido de alumínio, agitou-se vigorosamente e em seguida centrifugado a 3500 rpm por 10 min. Na sequência o sobrenadante foi filtrado em filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ e adicionado 0,1 mL de HCl e homogeneizado. A leitura em espectro foi realizada em cubeta de quartzo e a leitura foi efetuada em dois comprimentos de onda: 220 nm (nitrato + matéria orgânica) e 275 nm (apenas matéria orgânica). Para construção da curva padrão se utilizou nitrato de sódio e suas diluições (**Figura 9**).

$$\text{Cálculo da absorbância: Absorbância} = \text{Abs. } 220\ \text{nm} - 2 \times \text{Abs } 275\ \text{nm} \quad (4)$$

Para o preparo da suspensão de hidróxido de alumínio (adaptado de CAWSE, 1967) transferiu-se 125 g de sulfato de alumínio e potássio $[\text{AlK}(\text{SO}_4)\cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ para

béquer de vidro de 2.000 mL e adicionar 1.000 mL de água destilada. Agitou-se para dissolver o reagente e aqueceu-se a mistura até 60°C. Em seguida, foi adicionado lentamente, em agitação, 250 mL da solução de NaOH 2 M. Esperou-se a suspensão formada sedimentar em repouso de um dia para o outro, à temperatura ambiente, descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com água destilada para remoção dos íons em solução por mais 2 vezes, no mínimo, adicionando cerca de 500 mL de água destilada por vez, misturando, deixando decantar (por cerca de 2 h) e descartando o sobrenadante (removendo o máximo de sobrenadante possível).

Cálculo:

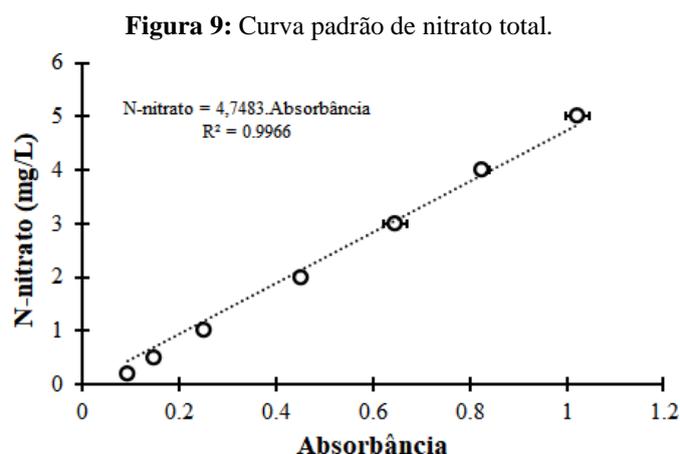
$$\text{Nitrato Total (N-NO}_3^-) \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = fc * Abs * Diluição \quad (5)$$

Onde:

fc = fator da curva, visualizada na **Figura 9**;

Abs = Valor da Absorbância obtida em espectrofotômetro;

Diluição = Diluição da amostra.



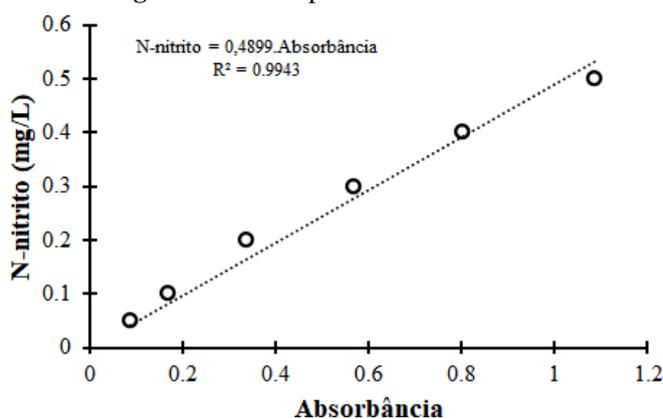
Fonte: Autora, 2023.

4.6.6 Determinação de nitrito

Se utilizará o método da solução de sulfato ferroso (APHA, 2018d). Para determinação da concentração de nitrito, as amostras foram previamente filtradas em filtros de 0,45 µm de diâmetro de poro e diluídas. Em seguida, transferiu-se 5 mL da amostra para tubos de ensaio e adicionou-se 200 µL do reagente colorante, e misturou-se bem por inversão. A leitura em espectrofotômetro foi realizada na absorbância de 543 nm, entre 10 min e 2 h após a adição do reagente colorante. Para a confecção da curva padrão se utilizou nitrito de sódio como padrão e suas diluições (**Figura 10**).

Para o preparo da solução colorante foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% e 10 g de sulfanilamida em béquer de vidro de 1.000 mL contendo 800 mL de água destilada sob agitação magnética até a dissolução completa da sulfanilamida. Em seguida adicionou-se 1 g do dicloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina agitando para dissolver, completando o volume em balão de 1000 mL. Essa solução é estável por cerca de 1 mês quando conservada na geladeira, em frasco âmbar, ao abrigo da luz.

Figura 10: Curva padrão de nitrito total.



Cálculo:

Fonte: Autora, 2023.

$$\text{Nitrito Total (N-NO}_2^-) \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = fc * Abs * Diluição \quad (5)$$

Onde:

fc = fator da curva, visualizada na **Figura 10**;

Abs = Valor da Absorbância obtida em espectrofotômetro;

Diluição = Diluição da amostra.

4.6.7 Determinação de nitrogênio amoniacal

O procedimento utilizado foi uma adaptação do Método de Kjeldahl utilizado para efluente agroindustriais, consistindo como na metodologia de 2 etapas: destilação e titulação (IAL, 2005).

Na destilação do nitrogênio, nos tubos próprios do sistema, se adiciona 50 mL da amostra e são adicionadas 2 gotas de fenolftaleína 1% sendo em seguida acoplados no destilador de nitrogênio (TECNAL, TE-0363), inseriu-se NaOH 40% até pH alcalino (mudança da coloração para rosa). Iniciou-se processo de aquecimento da amostra (início do processo de destilação) sendo o destilado coletado em um erlenmeyer de 250 mL contendo ácido bórico. O erlenmeyer continha 25 mL de ácido bórico 4%, 2 gotas do indicador vermelho de metila 0,25% e 2 gotas do indicador verde de bromocresol 0,2%. A destilação ocorreu até que se recolheu um volume de destilado de aproximadamente

100 mL. Por fim, a solução do erlenmeyer foi titulada com ácido clorídrico 0,001 N padronizado até o aparecimento da coloração rosada.

Cálculo:

$$\text{Nitrogênio Amoniacal (} \frac{mg}{L} \text{)} = \frac{V_{HCl} \cdot f_{HCl} \cdot N_{HCl} \cdot 14000}{V} \quad (6)$$

Onde:

V_{HCl} = Volume gasto na titulação com ácido clorídrico;

f_{HCl} = Fator de correção da solução de ácido clorídrico;

N = Normalidade ácido clorídrico;

V = Volume da amostra.

Padronização da solução de ácido clorídrico: Colocou-se certa quantidade de carbonato de sódio (Na_2CO_3 PM=106) em estufa a 100°C por 1 hora, deixou esfriar em dessecador por 15 minutos. Pesou cerca de 0,25g de bicarbonato isento de umidade, dissolveu em água isenta de CO_2 (previamente fervida), adicionou-se 2 gotas de alaranjado de metila. Titulou-se com a solução de HCl até a primeira coloração.

Cálculo:

$$f_{HCl} = \frac{2 \cdot m}{0,106 \cdot V_{HCl} \cdot N_{HCl}} \quad (7)$$

Onde:

f_{HCl} = Fator de correção da solução de ácido clorídrico;

m = massa do bicarbonato;

V_{HCl} = Volume gasto na titulação com ácido clorídrico;

N = Normalidade ácido clorídrico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características do petróleo utilizado

Como mencionado anteriormente, a empresa forneceu a densidade e o grau API do petróleo. O grau API foi estabelecido pela *American Petroleum Institute* (API) para melhor identificação comercial dos diferentes tipos de petróleo. Com isso, existe quatro classificações (**Tabela 6**). Logo o petróleo bruto coletado é caracterizado como leve (Petrobras, 2017). Nesse sentido, é possível verificar que o petróleo foi composto predominantemente por alcanos.

Tabela 6: Tipos de petróleo.

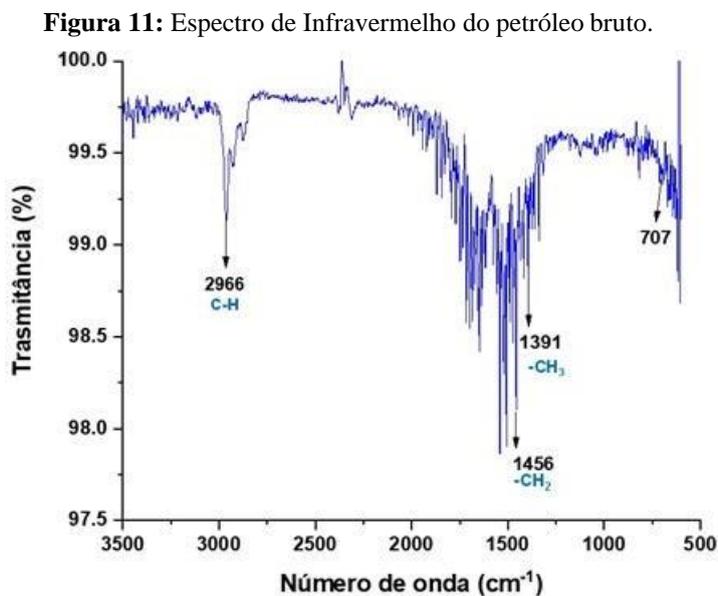
Tipos de petróleo	Grau API	Composição
Leve	≥ 30	Composto predominantemente por alcanos, com possível porcentagem de 15 a 25% de cicloalcanos.
Mediano	$22 \leq \text{API} < 30$	É formado por alcanos, além de uma porcentagem de 25 a 30 de hidrocarbonetos aromáticos.
Pesado	$10 \leq \text{API} < 22$	É constituído apenas por hidrocarbonetos aromáticos.
Extrapesado	< 10	Possui hidrocarbonetos de cadeia longa (superior ao pentano).

Fonte: Adaptado da Petrobras, 2017.

Para se ter uma ideia da composição do petróleo, realizou-se uma análise de espectrometria de infravermelho (FTIR). Como é possível visualizar na **Figura 11**, são verificadas algumas bandas características de alcanos. Por exemplo, uma banda de absorção em 2966 cm^{-1} que é característico de estiramento de C-H cm^{-1} , uma banda em 1456 cm^{-1} indicativo de dobramento de CH_2 e uma banda em 1391 cm^{-1} , o qual é atribuído dobramento CH_3 . Finalmente, em 707 cm^{-1} é possível observar o movimento de *rocking* que é associado a quatro ou mais grupos CH_2 em uma cadeia aberta (PAIVA et al., 2010).

Mouillet, Farcas e Besson (2008), também trabalharam com o petróleo leve, em suas análises de FTIR encontraram as bandas alifáticas de estiramento ($\text{CH}_3 + \text{CH}_2$) em 2923 e 2852 cm^{-1} e as bandas de deformação de metil (1365 cm^{-1}) e grupos metil e metileno ($\delta\text{-(CH}_3 + \text{CH}_2)$, 1465 cm^{-1}). Além disso, a banda atribuída à vibração

esquelética de mais de quatro grupos metileno (CH_2), em 720 cm^{-1} , similarmente a este trabalho.



Fonte: Autora, 2023.

Os fungos filamentosos são muito utilizados como biorremediadores de petróleo e seus derivados, e nesse sentido, também aplicados para tratamento de água produzida (AI-JAWHARI et al., 2015). Adicionalmente, as microalgas estão presentes em alguns estudos para o tratamento de água produzida de petróleo (GILLARD et al., 2021). No entanto, em comparação aos métodos físicos e químicos, são poucos os trabalhos que utilizam tratamento biológico, embora seja um método com menor custo e que garante melhor sustentabilidade ambiental (DELL'ANNO, 2021), ainda apresentam limitações devido principalmente a característica recalcitrante do petróleo e presença de outros contaminantes na água produzida além de elevada salinidade do efluente (DAS et al., 2019).

Nesse sentido, é necessário que haja mais estudos buscando microrganismos com maior capacidade degradativa assim como sistemas de tratamento de efluentes que garantam uma melhor adaptabilidade a eles para remoção dos contaminantes presentes na água produzida.

Inicialmente, buscou-se selecionar um fungo filamentoso de interesse, dentre os disponíveis (*Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum* e *Cunninghamella echinulata*) e verificar sua adaptabilidade à microalga *Tetradesmus obliquus* visando o co-cultivo para tratamento de água produzida. Após isso, verificou-se a capacidade fúngica em remover

TOG em diferentes concentrações iniciais de petróleo. Em seguida, estudou-se a capacidade de sobrevivência da microalga e do fungo filamentosos (*Cunninghamella echinulata*) em diferentes salinidades, uma vez que é uma característica avaliada na água produzida e importante para o cultivo microbiano. No caso do co-cultivo com a microalga, intensificou-se os estudos para verificar a capacidade das microalgas em remover contaminantes adicionais na água produzida, principalmente em forma de nitrogênio e fósforo, uma vez que elas possuem uma capacidade alta de remoção deles em efluentes.

5.2 Triagem dos fungos filamentosos

Em reator coluna de bolhas, com um TOG inicial de 500 mg L⁻¹ utilizando BG-11 modificado avaliou-se a capacidade dos fungos filamentosos acima citados em remover TOG sozinhos e em co-cultivo com a microalga. Para fins comparativos realizou-se um experimento controle e um com apenas a microalga uma vez que a aeração forçada (0,5 vvm) não era estéril. Nos experimentos com a microalga utilizou-se uma intensidade luminosa lateral nos reatores de 100 μmol m⁻² s⁻¹.

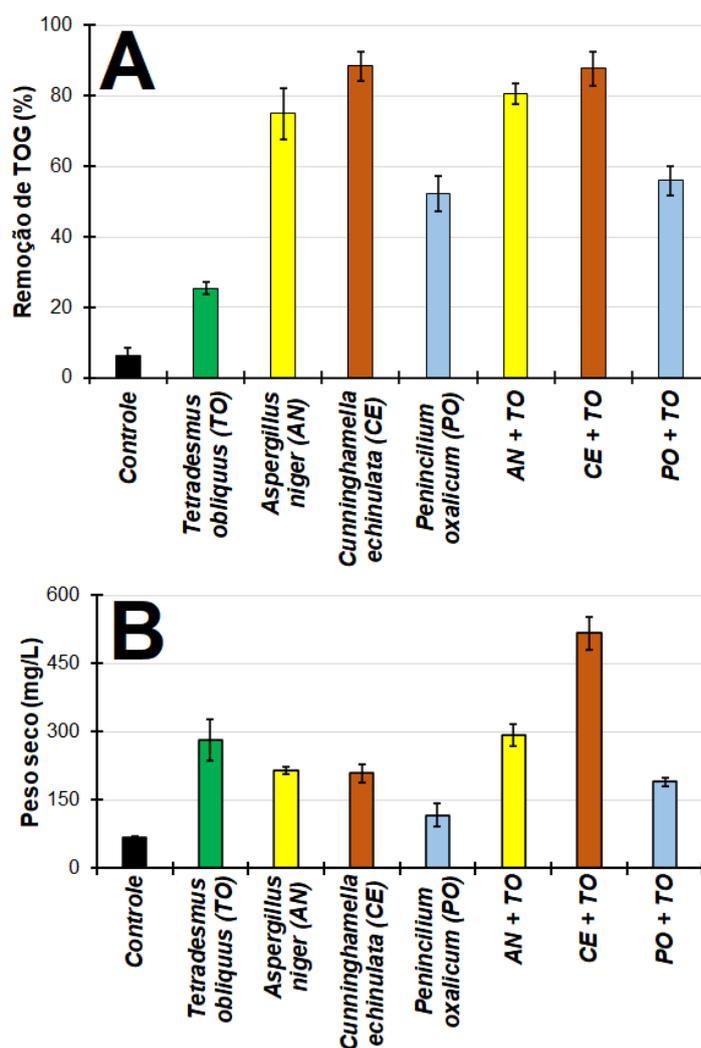
Como é possível observar na **Figura 12**, os fungos filamentosos foram eficientes na remoção de TOG do efluente entre 80-90%, sendo as espécies mais promissoras o *Aspergillus niger* e o *Cunninghamella echinulata*.

De acordo com AL-HAWASH.; (2018); DELL'ANNO, (2021), os gêneros específicos de *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium* entre outros, tem sido relatado na biorremediação de hidrocarbonetos alifáticos e na quebra de hidrocarbonetos aromáticos. O *Penicillium oxalicum* apesar de pertencer a um gênero muito citado para biorremediação de petróleo (AI-JAWHARI et al., 2015; MAAMAR et al., 2020), conseguiu remover o TOG apenas em torno de 55-60%, e pode ser um resultado das condições ambientais e nutricionais, ou operacionais do reator utilizado.

Percebe-se que a microalga não exerceu papel significativo na remoção de TOG do efluente, provavelmente pelo petróleo possuir compostos que podem exibir toxicidade celular ou a microalga não possuir o aparato enzimático necessário para total metabolização (LV et al., 2023). No entanto, alguns trabalhos mostram a utilização de microalgas para remoção de TOG, por exemplo, Ammar et al. (2018), que estudaram a

viabilidade do cultivo das microalgas marinhas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* em água produzida (em diferentes cargas de efluente: 10 a 50%) com meio BG-11 modificado com água salgada (salinidade 35 g L⁻¹), (TOG inicial = 540 mg L⁻¹). *Nannochloropsis oculata* removeu 66,5% e 89% do óleo e a *Isochrysis galbana* removeu 68% a 82% do óleo quando cultivadas em carga de 50% e 10% de AP, respectivamente.

Figura 12: Triagem dos fungos filamentosos em água produzida sintética. A) Remoção de TOG (%) e B) Peso seco.



Fonte: Autora, 2023.

No entanto, é interessante também mencionar, que apesar de não metabolizar eficientemente o TOG, a microalga foi capaz de crescer produzindo biomassa em quantidade igual ou superior aos fungos filamentosos, realizando provavelmente fotossíntese captando gás carbônico do ar injetado no reator. E que conseguiu ser

cultivada em conjunto com os fungos filamentosos produzindo conseqüentemente mais biomassa que os fungos cultivados de forma isolada, atuando assim de forma sinérgica.

Existem trabalhos que mostram que o sinergismo entre fungos filamentosos e microalgas pode ser aplicado ao tratamento de efluentes. O estudo de Zorn et al. (2020), teve como objetivo avaliar a formação de biomassa consorciada entre o fungo filamentoso *Mucor circinelloides* e a microalga *Chlorella vulgaris*. Um meio sintético com glicose (2 g L^{-1}) e nutrientes minerais essenciais para esses microrganismos foi utilizado. Após 180h os cultivos de *C. vulgaris* e *M. circinelloides* alcançaram as concentrações de biomassa em torno de $0,75$ e 1 g L^{-1} , respectivamente. A biomassa consorciada, composta em sua grande maioria por micélios fúngicos (contribuição das células de microalgas na faixa de $11,9 \pm 1,1\%$), atingiu valores próximos a 2 g L^{-1} .

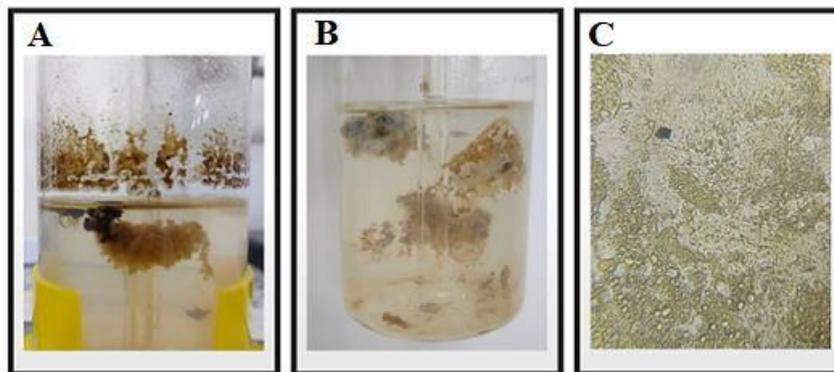
De acordo com o trabalho de Tang et al. (2019), o consórcio constituído pelo fungo (*Aspergillus* sp. XJ-2) e a microalga (*Chlorella sorokiniana* XJK), teve melhor desempenho do que o sistema único em termos de remoção de nutrientes e formação de biomassa no efluente simulado do Dispersed Red 3B (DQO = 545 mg L^{-1} , FT = 20 mg L^{-1} e $\text{NH}_4^+ \text{-N} = 100 \text{ mg L}^{-1}$). Os cultivos ocorreram em frascos contendo 100 mL de meio, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 160 rpm , $\text{pH} = 6$, por 4 dias, na proporção fungo:microalga de 1:2. Os monocultivos de *Chlorella sorokiniana* XJK e *Aspergillus* sp. XJ-2, removeram apenas $54,9$ e 50% , 50 , e $49,8\%$, 75 e 70% de DQO, FT e $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, respectivamente. Enquanto a taxa de remoção de DQO, FT e $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ atingiu $93,9\%$, $83,9\%$ e $87,6\%$, respectivamente, quando o consórcio foi usado. A biomassa do fungo foi de $0,75 \text{ g L}^{-1}$, e a biomassa da microalga de $0,35 \text{ g L}^{-1}$, quando cultivados isoladamente. No entanto, a biomassa total dos microrganismos co-cultivados foi de $1,42 \text{ g L}^{-1}$.

Outra característica interessante visualizada, é que o cultivo dos fungos filamentosos durante os 7 dias de cultivo, não obteve nos biorreatores uma variação significativa do pH estando inicialmente com $7,5$ - $8,0$, permaneceu nessa faixa não necessitando de ajuste. Para a microalga, no entanto, apesar de iniciar o cultivo com pH do meio no mesmo intervalo elevou-se continuamente para pH até de $10,5$, característico de microrganismos fotossintéticos (DE ANDRADE et al., 2022), apesar de também não ser necessário ajuste, pois essa espécie microalgal é cultivada tranquilamente nessa faixa.

O mecanismo de ataque e metabolização dos hidrocarbonetos pelo fungo filamentoso ocorre através da aglomeração à superfície do petróleo. Percebe-se que a

aglomeração não garante que dentro do tempo de tratamento não é totalmente solubilizada, mas que consegue ser facilmente removida do sistema, obtendo-se uma água tratada (**Figura 13 A-C**).

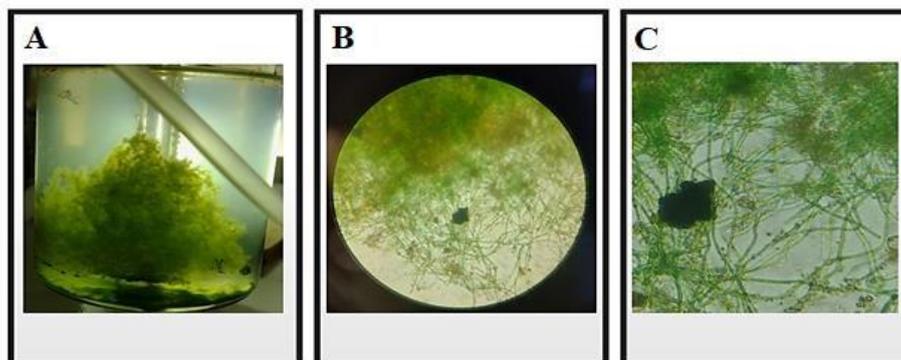
Figura 13: A) e B) Fungo filamentososo (*Cunninghamella echinulata*) aglomerado à superfície do petróleo. C) Imagem de microscópio óptico com aumento de 400x.



Fonte: Autora, 2023.

Por outro lado, quando os microrganismos foram cultivados em conjunto, houve necessidade de ajuste de pH diariamente, para valores de 7,3-7,5 de forma a atender ambas as espécies, pois o tamponamento biológico no efluente sintético não conseguiu ser eficiente. Em alguns trabalhos, dependendo das características do efluente, o tamponamento no co-cultivo fungo-microalga pode existir, não necessitando de controle biológico (LIN et al., 2022).

Figura 14: A) Co-cultivo do fungo filamentososo (*Cunninghamella echinulata*) e microalga (*Tetradasmus obliquus*), ambos se aglomerando à superfície do petróleo. B) e C) Imagens de microscópio óptico com aumento de 400x.



Fonte: Autora, 2023.

Com tudo o que foi mencionado, decidiu-se continuar os trabalhos com o fungo *Cunninghamella echinulata*, pelos seguintes motivos:

- Maior capacidade de remoção de TOG do efluente sintético;
- Maior produção de biomassa microbiana com conseqüente melhor adaptabilidade de consórcio fungo-microalga;
- Menor quantidade de estudos do fungo como biorremediador de petróleo e seus derivados.

5.3 Avaliação da capacidade de remoção de TOG pelo *Cunninghamella echinulata*

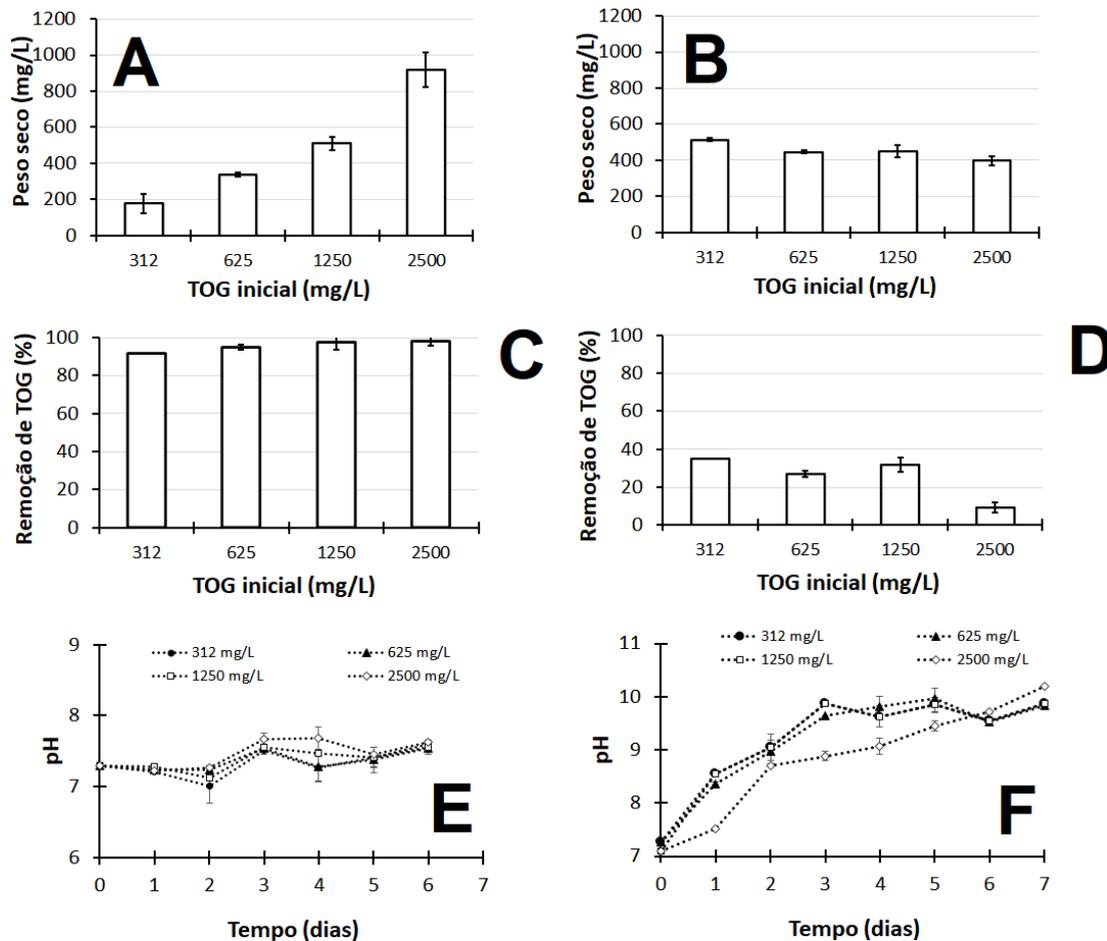
Verificando que o fungo filamentososo era o maior responsável pela remoção de TOG do efluente e com a finalidade de verificar sua eficiência mesmo em concentrações elevadas de petróleo, foram realizados experimentos com concentrações iniciais de petróleo entre 312-2500 mg L⁻¹, com o mesmo aparato da etapa anterior e nas mesmas condições.

Essas concentrações de TOG, estão comumente presentes em água produzida (AMMAR et al., 2018; OKORO e AMUND, 2010). Percebeu-se que o fungo foi capaz de crescer bem e tratar o TOG do efluente sintético em todas as concentrações testadas com % de remoção entre 95-98% (**Figura 15C**). Também foi possível visualizar uma produção de biomassa microbiana proporcional à concentração inicial de petróleo (**Figura 15A**), chegando a quase 1g L⁻¹ de peso seco quando 2500 mg L⁻¹ de petróleo foi usado.

Por outro lado, as microalgas produziram em torno de 400-500 mg L⁻¹ de biomassa, mas removeram muito pouco do TOG presente no efluente (em torno de 30%) diminuindo sua eficiência com o aumento da concentração de TOG (**Figura 15B e 15D**). Na literatura é possível encontrar que as microalgas removem o TOG do efluente, mas em baixas concentrações, como verificado por Ammar et al. (2018) que necessitaram diluir a água produzida com TOG inicial de 540 mg L⁻¹. Eles demonstraram que as concentrações finais de biomassa das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* diminuem com o aumento da porcentagem de AP (devido a toxicidade). A concentração de biomassa caiu de 1,01 para 0,31 g L⁻¹ para *Nannochloropsis oculata*, e de 0,899 a 0,314 g L⁻¹ para *Isochrysis galbana*, quando a carga de efluente aumentou de 10% para 50%. *Nannochloropsis oculata* removeu 66,5% e 89% do óleo e a *Isochrysis*

galbana removeu 68% a 82% do óleo quando cultivadas em carga de 50% e 10% de AP, respectivamente.

Figura 15: Tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de petróleo A) e B) Remoção de TOG, C) e D) Peso seco e D) e E) pH durante o cultivo por *Cunninghamella echinulata* (A, C e E) e *Tetradesmus obliquus* (B, D e F), respectivamente.



Fonte: Autora, 2023.

Por fim, como verificado anteriormente, não houve mudança significativa da faixa de pH durante o cultivo fúngico na água produzida sintética, não necessitando de controle de pH (**Figura 15E**), no entanto, em relação as microalgas, o pH continuamente aumentou até alcançar valores ao redor de 10 (**Figura 15F**). Os resultados alcançados estão em concordância com Xie et al. (2013), que realizou um estudo para otimizar o co-cultivo de microalgas (*Chlorella vulgaris*) com fungo filamentoso (*Cunninghamella echinulata*), para alcançar a remoção completa de células únicas de algas do meio líquido, por peletização. Um dos parâmetros avaliado foi o pH, em sistema de cultivo, em monocultura e co-cultivo. Através desta avaliação foi constatado que em sistema de

monocultura a *Chlorella vulgaris* se desenvolveu melhor em pH alcalino (próximo a 8), já o fungo *Cunninghamella echinulata* tem um crescimento superior em meio ácido (entre 5 e 6,3). Porém em co-cultivo o pH tendia a baixa para valores entre 3,5 e 5, esse fenômeno no sistema de co-cultivo, divergente do que ocorreu no nosso trabalho, mas mostrando que o desbalanço do pH pode ocorrer.

Por outro lado, no estudo desenvolvido por Qiao et al. (2022) reafirma-se que o *Cunninghamella* possui uma maior eficiência, em pH variando entre 6 e 7, pois através de sua pesquisa demonstrou, uma maior eficiência no co-cultivo entre o fungo *Cunninghamella echinulata* e a levedura *Trichosporon fermentans* entre 6 e 7 em efluente de óleo de soja, que estão coerentes com as condições que foram ajustadas no presente estudo.

5.4 Estudo da adaptabilidade do fungo e da microalga à salinidade

Nessa etapa, verificou-se a capacidade de sobrevivência do fungo *Cunninghamella* e da microalga *Tetradismus* em diferentes salinidades do efluente sintético, uma vez que, a salinidade é um parâmetro importante para avaliar a tratabilidade do efluente (SILVA, 2021).

A salinidade da água produzida proveniente de exploração em offshore, possui altas taxas de sais, em torno de 30 g L^{-1} (ZANDONADE e SANJOMBI, 2015). Também a AP oriunda da exploração *onshore* contém salinidade superior a água do mar (35 g L^{-1}) (OJAGH, FALLAH E NASERNEJAD, 2020), no entanto ressalta-se que esses valores podem ser bem maiores. Com isso, é uma grande desvantagem para o tratamento biológico visto que a maioria dos microrganismos terrestres crescem melhor em baixa salinidade. Em relação à adaptabilidade para salinidade, os microrganismos são classificados em não halófilos (concentrações de NaCl menor que $0,2 \text{ M}$, aproximadamente 12 g L^{-1}), porém se tolerarem concentrações de salinas superiores, são nomeados como halotolerantes. Os microrganismos que se desenvolvem em concentrações de sal, entre $12\text{-}30 \text{ g L}^{-1}$ são os levemente halófilos (considerados seres marinhos). Os halófilos moderados, se adaptam melhor, em condições salinas contendo $30\text{-}150 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl. Por fim, os halófilos extremos têm crescimento satisfatório em concentrações de sal maior que 150 g L^{-1} de NaCl (ŚLIŹEWSKA, 2022).

Nesse sentido, escolheu-se valores entre 0 (condição controle) e 50 g L⁻¹ de NaCl adicionados a água produzida sintética, verificando-se tanto a remoção de TOG, quanto produção de biomassa microbiana e pH durante a fermentação, com uma concentração inicial de TOG constante e igual a 2500 g L⁻¹ (maior concentração) (utilizou-se o mesmo aparato experimental das etapas precedentes).

O aumento da salinidade no efluente ocasionou uma redução na produção de aglomerado fúngico, variando de 1000 para 900 mg L⁻¹ e no tratamento da água produzida de 95% para em torno de 80%, para o efluente sem NaCl adicionado e adicionado 50 g L⁻¹, respectivamente (**Figura 16A e C**). O aumento da salinidade, prejudica a sobrevivência da maioria dos seres vivos devido o estresse osmótico e iônico (CORRAL, 2019). Porém alguns seres, como por exemplo os fungos, criam diferentes mecanismos de adaptação (ŚLIŹEWSKA, 2022).

Em relação às microalgas (principalmente as que habitam em água doce) o aumento da salinidade afeta o desenvolvimento e a fotossíntese, ocasionando danos irreparáveis ao sistema fotossintético. Também, o estresse salino, prejudica atividade de algumas enzimas específicas, com isso influenciando os processos metabólicos (QIU, 2022; Ji et al., 2018). Diante disso, é necessário realizar estudo preliminar variando a concentração de sal, visto que, normalmente, a água produzida apresenta alta concentração salina.

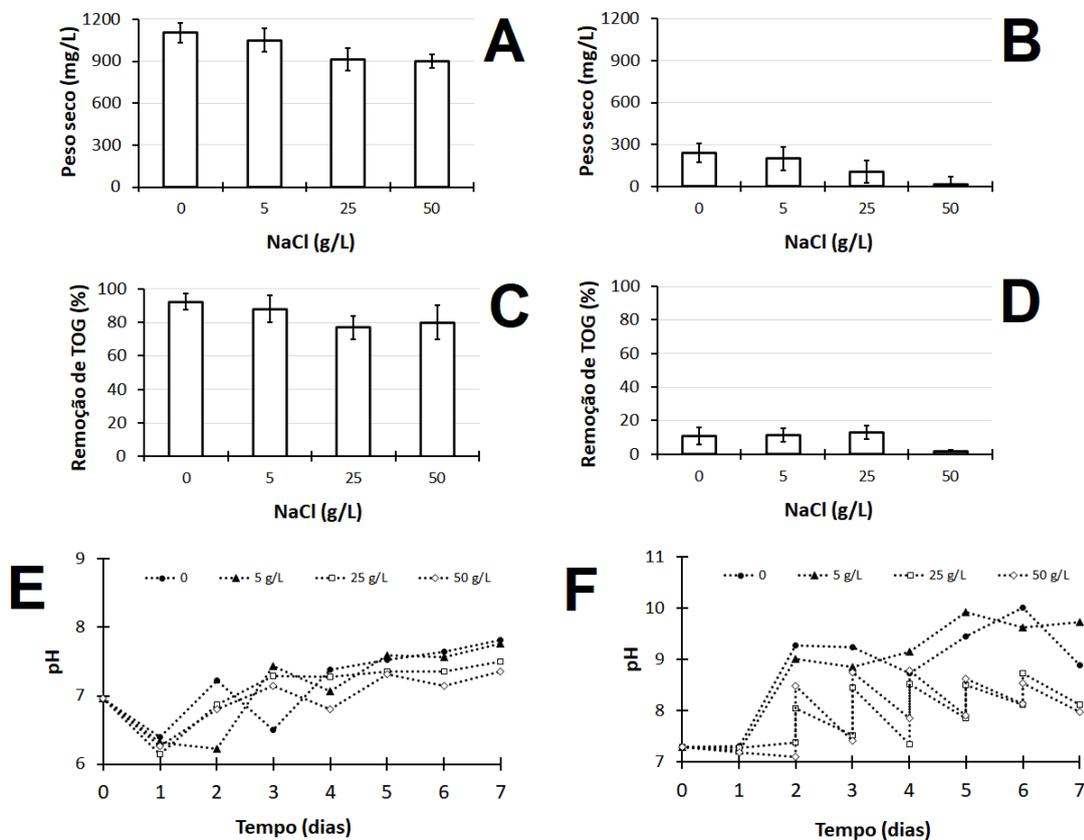
Em relação ao cultivo microalgal em diferentes concentrações de NaCl utilizando a mesma água produzida sintética, confirmou-se que a microalga estudada não remove significativamente o TOG do efluente, removendo entre 3-10% o TOG inicial. Por outro lado, percebeu-se que as microalgas permaneceram vivas em quantidade razoáveis em todos os experimentos entre 0-25 g L⁻¹ de NaCl, embora o crescimento celular ser negativamente influenciado pela concentração salina, principalmente a 50 g L⁻¹, alcançando peso seco máximo em torno de 300 mg L⁻¹ para a condição sem salinidade adicionada, e decrescendo até valores < 50 mg L⁻¹ de biomassa para 50 g L⁻¹ de NaCl (**Figura 16D e B**).

O comportamento obtido através do estudo corresponde com a literatura. Por exemplo, Ji et al. (2018) avaliou os efeitos fisiológicos e bioquímicos do estresse salino (0-12 g L⁻¹) na microalga de água doce *Scenedesmus obliquus* XJ002. Constatou que com o aumento da salinidade, houve um declínio da produção de biomassa, do conteúdo da

clorofila e carotenoides. Além de comprometer o complexo de desenvolvimento de oxigênio (OEC) e o centro de reação PSII (fotossistema II) e conseqüentemente diminuir o transporte de elétrons nos lados doador e receptor do centro de reação, influenciando a absorção, transferência e aplicação de energia luminosa.

Adicionalmente, Yang et al. (2022), verificaram uma produção inferior de biomassa com aumento da salinidade ($9\text{-}36\text{ g L}^{-1}$), em ambas as microalgas de água doce (*Chlorella sorokiniana* GEEL-01 e *Desmodesmus asymmetricus* GEEL-05) avaliadas durante os experimentos. Ressaltando que as microalgas foram completamente inibidas em 36 g L^{-1} de NaCl, mas removeram 60-80% de nitrogênio total (NT) até 27 g L^{-1} . As duas cepas degradaram totalmente o fósforo total (FT) após 8 dias de cultivo em águas residuais com até 18 g L^{-1} de NaCl, enquanto 40-80% de FT foi removido sob 27 g L^{-1} , corroborando com os resultados desse trabalho.

Figura 16: Tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de NaCl. A) e B) Peso seco, C) e D) Remoção de TOG e E) e F) pH durante o cultivo por *Cunninghamella echinulata* (A, C e E) e *Tetradismus obliquus* (B, D e F), respectivamente.



Fonte: Autora, 2023.

Apesar destas limitações devido à alta salinidade, há pesquisas atuais que comprovam a utilização de microalgas na biorremediação de água produzida. Por meio de diluição ou adaptação gradativa do microrganismo ao efluente. Hakim et al. (2018) realizou um isolamento de microalgas em regiões com alto teor de óleo e verificou sua adaptabilidade de cultivo em água produzida. Após estudos iniciais, as espécies promissoras foram *Menoraphidium*, *Chlorella*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Dictyosphaerium*. No entanto, alguns desses gêneros são encontrados com mais frequência em água doce. Hopkins et al. (2019) mostraram que um co-cultivo microalgal composto por *Cyanobacterium aponinum* (cyanobacterium), *Parachlorella kessleri* (microalga) e várias bactérias halotolerantes, principalmente; pode crescer em AP com alta faixa de salinidade (entre 15-60 g L⁻¹ de SDT – sólidos dissolvidos totais) obtendo uma produtividade de biomassa entre 46-51 mg L⁻¹ d⁻¹, diminuindo na maior salinidade.

Das et al. (2019) usaram *Chlorella* sp. para tratar a água produzida suplementada com nitrogênio e fósforo. Após 15 dias, o rendimento de biomassa microalgal foi de 1,72 g L⁻¹, atingindo remoções de 73% para COT e 92% para NT, apesar de ser uma espécie mais proeminente em água doce. Assim, com base nesses estudos, observa-se que o tratamento por diferentes espécies de microalgas tem se mostrado eficiente na remoção de contaminantes presentes em APs, como DQO, TOC e TOG, e boa adaptação ao meio com diferentes concentrações de salinidade, apesar de AP tendo alguns componentes que podem apresentar toxicidade para microalgas.

Em relação ao pH durante o cultivo para o crescimento fúngico, verifica-se que o comportamento foi semelhante nos quatro experimentos, ficando em uma faixa constante entre 6,0-7,5 (**Figura 16E**), similar aos experimentos das etapas precedentes.

Uma ocorrência divergente dos ensaios anteriores, em relação ao crescimento microalgal, foi que em elevadas concentrações salinas (25 e 50 g L⁻¹ de NaCl), o pH durante o cultivo tendia a baixar para valores próximos a 7,0 (**Figura 16F**), necessitando-se controlá-los diariamente, e isso pode ter sido um dos motivos de produção de biomassa microalgal significativamente inferior aos experimentos com 0 e 5 g L⁻¹ de NaCl, pois o pH afeta diretamente o cultivo microalgal. Uma possível causa para estar ocorrendo esse fenômeno, é o fato de que, resíduos provenientes de petróleo contêm hidrogênio livre, que ocasiona a acidificação do meio. Causando danos para equipamentos, transportes marítimos, além de tornando o meio aquático, inóspito para microrganismos (ALAZAIZA et al.; 2022).

Para microalgas o pH ideal é alcalino, inclusive para *Tetradasmus obliquus*, estando preferencialmente entre 8-9,5 (CASSINI et al.; 2017; ROSLI et al.; 2020), mas como isso é diretamente relacionado, salinidade e pH, necessita ser melhor estudado do ponto de vista celular e químico.

5.5 Avaliação da remoção de nitrogênio e fósforo pelo fungo e consórcio fungo-microalga

Uma vez que foi verificado que a microalga sozinha não removia eficiente o TOG do efluente, principalmente em concentrações elevadas; de forma a complementar o estudo, se realizou experimentos avaliando-se diversas concentrações de nitrato (em forma de nitrogênio de 25, 50 e 100 mg L⁻¹) e fosfato (em forma de fósforo em torno de 30 mg L⁻¹), com o fungo isoladamente e em co-cultivo com a microalga para verificar se há uma complementação na remoção desses contaminantes quando a microalga está presente.

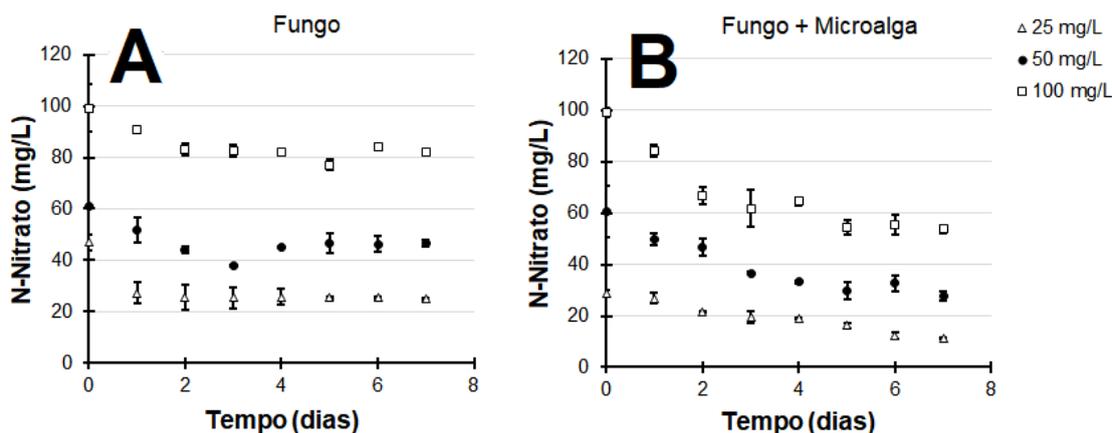
Pela **Figura 17** percebe-se que houve uma remoção significativamente maior quando o fungo foi cultivado em co-cultivo com a microalga. As microalgas são grandes removedores de nitrogênio e fósforo dos efluentes, contaminantes inclusive, responsáveis pelo fenômeno de eutrofização em corpos hídricos (DE ANDRADE et al., 2022). O fungo isoladamente conseguiu remover em torno de 10-15% do nitrogênio inicial (nitrato) (**Figura 17A**), enquanto quando cultivado em conjunto com a microalga removeram 63,4, 44,4 e 31,7% do nitrato presente no efluente para as concentrações iniciais de 25, 50 e 100 mg/L (**Figura 17B**).

Em relação a remoção de fósforo no efluente, os perfis para o fungo isoladamente foram similares nas três concentrações de nitrato iniciais utilizadas, tendo um % de remoção em torno de $22,28 \pm 4,13$ %. Semelhantemente, a taxa de remoção nos experimentos em co-cultivo foram valores próximos, resultando em $36,58 \pm 4,82$ %. É importante ressaltar que a remoção de fósforo foi superior (quase 15%) quando a microalga estava presente em co-cultivo com o fungo do que o fungo cultivado isoladamente.

Vários trabalhos são citados na literatura, tratando efluentes e mostrando a capacidade da *Tetradasmus* (filogeneticamente correlacionada com *Scenedesmus*, *Desmodesmus* e *Acutodesmus*), na grande assimilação de nitrogênio e fósforo. Como há

também, pesquisas que mostram a capacidade do co-cultivo de fungos filamentosos e microalgas para o tratamento de efluente, denominados de ‘liquens’ artificiais, discutindo sobre as vantagens mútuas que obtém e nas vantagens que podem ser aplicadas para o tratamento de efluente alcançando maiores valores que se cultivados isoladamente, como pode ser verificado na seção 3.3.5.

Figura 17: Tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de nitrogênio por *Cunninghamella echinulata* (A) e seu co-cultivo com *Tetradesmus obliquus* (B).

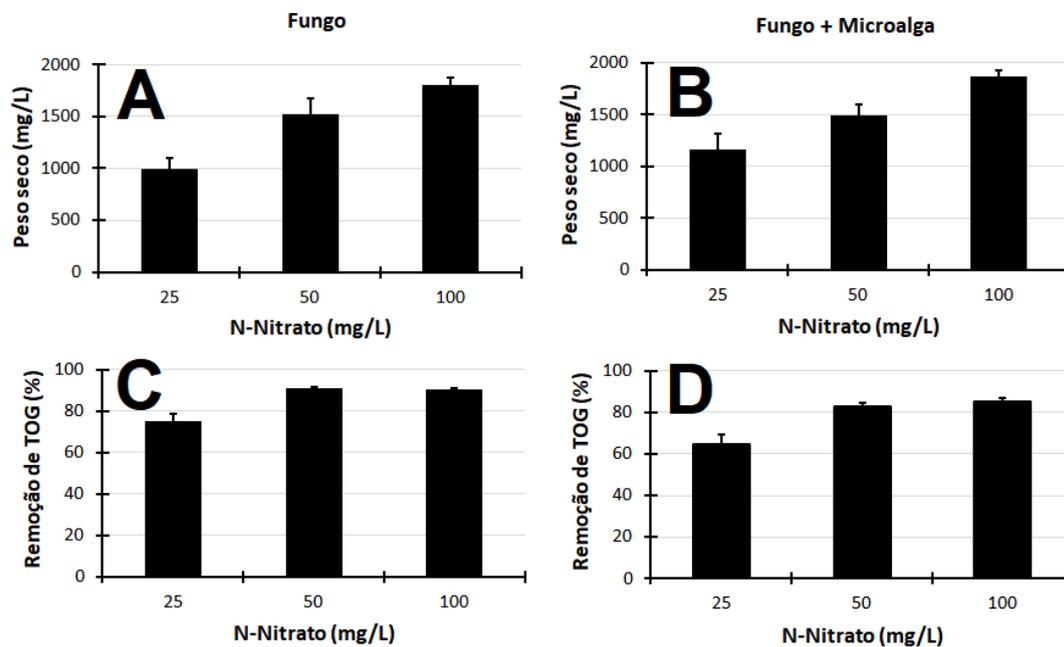


Fonte: Autora, 2023.

Em relação ao peso seco celular e a remoção de TOG nos experimentos em diferentes concentrações de nitrogênio (em forma de nitrato), percebeu-se que uma maior disponibilidade de nitrogênio favoreceu o crescimento celular, assim como a remoção de TOG, seja com o fungo isoladamente, ou com seu co-cultivo com a microalga (**Figura 18**).

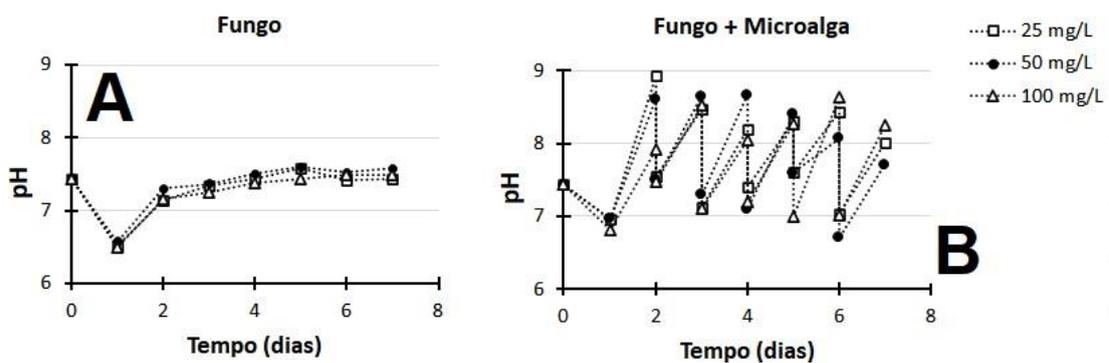
Como visto anteriormente, a variação do pH nos experimentos, mostrou uma estabilidade em relação ao cultivo fúngico, havendo uma inicial acidificação, mas com estabilidade por volta de 7,5 a partir do 2-3 dia de cultivo, não necessitando de ajuste de pH (**Figura 19A**). Por outro lado, no co-cultivo com a microalga, percebe-se a alcalinização do meio para valores altos, em torno de 9,0, necessitando-se de correção diária para valores próximos de 7,5 (**Figura 19B**). Esse fenômeno já foi visto anteriormente, mas é importante ressaltar que um maior estudo em relação a influência dessa variação de pH na sobrevivência de ambas as espécies microbianas, assim como sua interferência na remoção de contaminantes como TOG, nitrogênio e fósforo.

Figura 18: Peso seco celular e remoção de TOG durante o tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de nitrogênio por *Cunninghamella echinulata* (A e C) e seu co-cultivo com *Tetradismus obliquus* (B e D), respectivamente.



Fonte: Autora, 2023.

Figura 19: Variação de pH durante o tratamento de água produzida sintética em diferentes concentrações de nitrogênio por *Cunninghamella echinulata* (A) e seu co-cultivo com *Tetradismus obliquus* (B), respectivamente.



Fonte: Autora, 2023.

No estudo de Yang et al. (2019), após 5 dias de cultivo em águas residuais de melação (pH = 6,12). O pH do monossistema de fungos (*Aspergillus* sp.) diminuiu rapidamente, em torno de 5, enquanto para microalgas (*Chlorella vulgaris*) o valor do pH aumentou, valores próximo a 10. No entanto, o valor do pH no co-cultivo se manteve

estável entre 6 e 7,5. Song et al. (2022) cultivaram a microalga *Chlorella pyrenoidosa* e o fungo *Penicillium* sp. em águas residuais de molho de soja. Após 6 dias os valores de pH do cultivo de microalgas e do consórcio microalga-fungo aumentaram gradualmente até cerca de 9,5, enquanto para o cultivo do fungo o pH se manteve entre 7,5-8. Esses Resultados corroboram o comportamento encontrado nesse trabalho.

6 CONCLUSÃO

Através desse estudo foi possível verificar que o fungo *Cunninghamella echinulata* é eficiente para remover o teor de óleos e graxas (TOG) em efluente líquido, consegue sobreviver e manter essa eficiência mesmo em elevadas concentrações de sal, que é uma característica que pode estar presente no efluente real. Apesar da microalga (*Tetradismus obliquus*) não ser eficiente na remoção de TOG, conseguiu resistir a concentração de 25 g L⁻¹ de NaCl, desempenhou funções importantes quando em simbiose com o fungo, visto que melhora significativamente a remoção de nitrogênio e fósforo, contaminantes ambientalmente perigosos. Um parâmetro que sempre deve ser levado em consideração é o pH, pois o fungo filamentosos tendeu a mantê-lo em valores levemente ácido a neutro, enquanto a microalga tende a aumentá-lo para valores bem alcalinos, portanto para que seu co-cultivo seja realizado, é necessário que o pH seja controlado para valores entre 7-7,5. Com isso, o estudo demonstrou a aplicabilidade dos microrganismos em co-cultivo para o tratamento biológico de água produzida. Além disso, os microrganismos conseguem produzir uma quantidade relevante de biomassa que pode ser usada em outros processos biotecnológicos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar do trabalho ter sido realizado em efluente sintético, ele abriu um leque de possibilidade de estudos futuros e que serão aperfeiçoados dentro do grupo de pesquisa, mostrando sua importância para o desenvolvimento do processo. Por exemplo:

- Avaliar a influência do pH e seu controle no rendimento do processo e sobrevivência dos microrganismos;
- Testar as condições verificadas em água produzida de petróleo real;
- Testar diferentes intensidade luminosas no cultivo da microalga em conjunto com o fungo filamentosos;
- Verificar a remoção de outros contaminantes da água produzida real como metais pesados e demanda química de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- AMMAR, Saad H.; KHADIM, Hussein J.; MOHAMED, Ahmed Isam. 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. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.002>
- ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, 2021.
- ANDRADE, D.S; A.C FILHO, Microalgas de Águas Continentais. Potencialidades e desafios do cultivo. *Microalgas de águas continentais*, v. 8, 2014.
- AL-HAWASH, Adnan B. et al. Isolamento e caracterização de duas cepas de fungos degradadores de petróleo bruto do campo petrolífero de Rumaila, Iraque. *Relatórios de biotecnologia*, v. 17, p. 104-109, 2018.
- AI-JAWHARI, Ihsan Flayyih Hasan et al. Efficiency of some filamentous fungi to treatment of effluent petroleum wastewaters from refinery. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 4, n. 4, p. 625-641, 2015.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.02.001>
- ABUJAYYAB, M.A.; HAMOUDA, M.; HASSAN, A.A. Biological treatment of produced water: A comprehensive review and metadata analysis. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 209, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109914>.
- AL-KAABI, M.A.; ZOUARI, N.; DA'NA, D.A.; AL-GHOUTI, M.A. Adsorptive batch and biological treatments of produced water: Recent progresses, challenges, and potentials. *Journal of Environmental Management*, v. 290, p. 112527, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112527>
- AL-KAABI, M.A.; AL-GHOUTI, M.A.; ASHFAQ, M.Y.M.; AHMEDB, T.; ZOUARI, N. An integrated approach for produced water treatment using microemulsions modified activated carbon. *Journal of Water Process Engineering*, v. 31, p. 100830, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100830>
- ALAZAIZA, Motasem YD et al. Potential use of algae for the bioremediation of different types of wastewater and contaminants: Production of bioproducts and biofuel for green circular economy. *Journal of Environmental Management*, v. 324, p. 116415, 2022.
- ANYANWU et al. Microalgae Cultivation Technologies. Reference Module in Materials Science and Materials 61 Engineering, p. 1-23, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.09258-4>
- APHA. 5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD). Standard methods for the examination of water and wastewater. 23.ed. Washington, DC, 2018a. American Public Health Association. DOI: 10.2105/SMWW.2882.103

APHA. 4500-NO₃– NITROGEN (NITRATE). Standard methods for the examination of water and wastewater. 23.ed. Washington, DC, 2018c. American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.089>

APHA. 4500-P PHOSPHORUS. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23.ed. Washington, DC, 2018b. American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.093>

APHA. 4500-NO₂– NITROGEN (NITRITE). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18.ed. Washington, DC, 2018d. American Public Health Association.

ARRIADA A.A, ABREU P.C.O.V. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. Brazilian Journal of Petroleum and Gas 8, 3, 119-125, 2014.

ATAKPA, Edidiong Okokon et al. Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria. Chemosphere, v. 290, p. 133337, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133337>

BARBIERI, P.; GALLI, E.; Microbiologia Ambientale ed elementi di ecologia microbica. Casa Editrice Abrosiana, 5 ed., 2012.

BENGUENAB, Asma; CHIBANI, Abdelwaheb. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. Acta Ecologica Sinica, v. 41, n. 5, p. 416-423, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2020.10.008>

CAO, W. et al. Simultaneously upgrading biogas and purifying biogas slurry using cocultivation of *Chlorella vulgaris* and three different fungi under various mixed light wavelength and photoperiods. Bioresource Technology, v. 241, p. 701-709, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.194>

CASSINI, Servio Tulio et al. Harvesting microalgal biomass grown in anaerobic sewage treatment effluent by the coagulation-flocculation method: effect of ph. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 60, 2017.

CORRAL, Paulina; AMOOZEGAR, Mohammad A.; VENTOSA, Antonio. Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. Marine drugs, v. 18, n. 1, p. 33, 2019.

COSTA, T.C. et al. Evaluation of the technical and environmental feasibility of adsorption process to remove water soluble organics from produced water: A review. Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 208, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109360>

CHAI, Wai Siong et al. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: a review. Environmental Pollution, v. 269, p. 116-236, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236>

DAS et al. Microalgal co-cultivation for biofuel production and bioremediation: Current status and benefits. BioEnergy Research, v. 15, n. 1, p. 1-26, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10254-8>

DA FONTOURA, Juliana Tolfo et al. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 111, p. 355-362, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.07.024>

DAS, Probir et al. Microalgal bioremediation of petroleum-derived low salinity and low pH produced water. *Journal of Applied Phycology*, v. 31, p. 435-444, 2019.

DE ANDRADE, F. P. et al. Consortium between microalgae and other microbiological groups: A promising approach to emphasise the sustainability of open cultivation systems for wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, v. 50, p. 103211, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103211>

DEBOWSKI et al. Microalgae cultivation technologies as an opportunity for bioenergetic system development—advantages and limitations. *Sustainability*, v. 12, n. 23, p. 9980, 2020. <https://doi.org/10.3390/su12239980>

DELL'ANNO, Filippo et al. Bacteria, fungi and microalgae for the bioremediation of marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons in the omics era. *Microorganisms*, v. 9, n. 8, p. 1695, 2021.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A.A.; PUROHIT, H.J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>

DUARTE et al. Mecanismos de remediação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do petróleo utilizando microalgas e cianobactérias com vistas a bioeconomia circular. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 11, p. e512101119954-e512101119954, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19954>

DUDEK, M. ; VIK, E.A.; AANESEN, V.; OYE, G. Colloid chemistry and experimental techniques for understanding fundamental behaviour of produced water in oil and gas production. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 276, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102105>

EL-SIKAILY, A.; KHALED, A.; EL NEMR, A.; SAID, T.O.; ABD-ALLA, A.M.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatics in the coral reef skeleton of the Egyptian Red Sea coast. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 1252-1259, 2003.

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, ed. 2-3, p. 530-551, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.044>

FONTOURA, J.T et al. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 111, p. 355-362, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.07.024>

GARGOURI, B. et al. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater. *Toxicity of Environmental Contaminants*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/929424>.

GILLARD, Jeroen TF et al. Potential for biomass production and remediation by cultivation of the marine model diatom *Phaeodactylum tricornutum* in oil field produced wastewater media. *Water*, v. 13, n. 19, p. 2700, 2021.

GIL-IZQUIERDO, A. et al. A sustainable approach by using microalgae to minimize the eutrophication process of Mar Menor lagoon. *Science of the Total Environment*, v. 758, p. 143613, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143613>

GUO, G. et al. Nutrient removal and biogas upgrading by integrating fungal–microalgal cultivation with anaerobically digested swine wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 6, p. 2857-2866, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1207-2>

HAAPKYLA, J., RAMADE, F., SALVAT, B., 2007. Oil pollution on coral reefs: a review of the state of knowledge and management needs. *Vie et Milieu* 57, 95-111

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 177-192, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>

HAKIM, A.Q.M.A. Potential application of microalgae in produced water treatment. Thesis (Master of Science in Environmental Science) - Faculty of College of Art and Sciences, Qatar University. Qatar, 2016.

HAKIM, Mohammed A. Abdul et al. Potential application of microalgae in produced water treatment. *Desalination and Water Treatment*, v. 135, p. 47-58, 2018. <https://doi.org/10.5004/dwt.2018.23146>.

HOPKINS, Thomas C. et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101406>

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Edição, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2005.

IGUNNU, E. T.; CHEN, G. Z. Produced water treatment technologies. *International Journal of Low-Carbon Technologies*, v. 9, n. 3, p. 157-177 2012 <https://doi.org/10.1093/ijlct/cts049>

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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.139>

Jl, Xiang et al. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. *Science of the total environment*, v. 633, p. 593-599, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>

JYOTI, D.; SINHA, R.; FAGGIO, C. Advances in biological methods for the sequestration of heavy metals from water bodies: a review. *environmental toxicology and pharmacology*, p. 103927, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103927>

KIM, Ga-Yeong et al. *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 235-240, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.091>

- KUMAR et al. Cultivation of microalgae on food waste: Recent advances and way forward. *Bioresource Technology*, p. 127834, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127834>
- LENG, Lijian et al. Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, v. 330, p. 125008, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125008>
- LIN et al. Application of filamentous fungi in microalgae-based wastewater remediation for biomass harvesting and utilization: From mechanisms to practical application. *Algal Research*, v. 62, p. 102614, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102614>
- LUCCHESI, C. F. *Petróleo. Estudos Avançados*, v. 12, n. 33, p. 17–40, 1998.
- LUTZU, G.A.; DUNFORD, N.T. Interactions of microalgae and Other microorganisms for enhanced production of high-value compounds. *Frontiers in Bioscience*, vol. 23, p. 1487-1504, 2018. <https://doi.org/10.2741/4656>
- LV, Xin et al. The Red Tide Organism *Chaetoceros* sp. Responding to Exposure to Oil and Dispersant. *Sustainability*, v. 15, n. 2, p. 1103, 2023. <https://doi.org/10.3390/su15021103>
- MAAMAR, Ahlem et al. Highlighting the crude oil bioremediation potential of marine fungi isolated from the Port of Oran (Algeria). *Diversity*, v. 12, n. 5, p. 196, 2020.
- MACAYA et al. Bioremediation of Petroleum. *Life Sciences*, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20810-8>
- MATOS, Ângelo Paggi. Advances in microalgal research in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200531>
- MOUILLET, Virginie; FARCAS, Fabienne; BESSON, Stanislas. Ageing by UV radiation of an elastomer modified bitumen. *Fuel*, v. 87, n. 12, p. 2408-2419, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.02.008>
- MUNIRASU, S.; HAIJA, M.A.; BANAT, F.; Use of membrane technology for oil field and refinery produced water treatment—A review. *Process safety and environmental protection*, v. 100, p. 183-202, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.01.010>
- OJAGH SMA; FALLAH N.; NASERNEJAD B. Tratamento biológico de compostos orgânicos em água produzida com uso de bactérias halotolerantes. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 104412, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104412>.
- OKEKE et al. Emerging bio-dispersant and bioremediation technologies as environmentally friendly management responses toward marine oil spill: A comprehensive review. *Journal of Environmental Management*, v. 322, p. 116123, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116123>
- OKORO C.C. Biodegradation of hydrocarbons in untreated produce water using pure fungal cultures. *African Journal of Microbiology Research* 2, 217-223, 2008. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000130>.

OKORO C.C, AMUND O.O. Biodegradation of Produced Water Hydrocarbons by *Aspergillus fumigatus*. Journal of American Science 6 (3), 143-149, 2010. <http://165.22.87.194:8080/jspui/handle/20.500.12398/119>.

PAVIA, Donald L. et al. Introdução à espectroscopia 4. ed. Bellingham: Cengage Learning, 2010.

PESSÔA et al. A review of microalgae-based biorefineries approach for produced water treatment: Barriers, pretreatments, supplementation, and perspectives. Journal of Environmental Chemical Engineering, p. 108096, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108096>

PETER et al. Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 154, p. 111852, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111852>

PETROBRAS. Informe Bacia de Santos. Ed.6.Santos-São Paulo, 2017.

PETROBRAS. Laudo de certificado de qualidade. Pilar, 2022.

Produção global de petróleo e participação da OPEP. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás-IBP, 2021. Disponível em: <https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/producao-global-de-petroleo-e-participacao-da-opep/>. Acessado em: 10 agost. 2022.

QIAO, Nan et al. Cunninghamella echinulata produced from soybean wastewater cleanly harvests oleaginous yeasts in soybean oil refinery effluent by efficient adhesion and improves microbial lipid quality. Journal of Cleaner Production, v. 365, p. 132813, 2022.

QIU, Yu et al. The Detrimental Effect of High Salinity on the Growth and Microcystins Contamination of *Microcystis aeruginosa*. Water, v. 14, n. 18, p. 2871, 2022.

RANI et al. Microbes: a key player in industrial wastewater treatment. In: Microbial wastewater treatment. Elsevier, 2019. p. 83-102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816809-7.00005-1>

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.J.B.W.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Microbiology-*sgm*. [s.l.], v. 111, p. 1-61, 1979. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1.

ROSLI, Siti Suhailah et al. Insight review of attached microalgae growth focusing on support material packed in photobioreactor for sustainable biodiesel production and wastewater bioremediation. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 134, p. 110306, 2020.

SALEM, F.; THIEMANN, T. Produced Water from Oil and Gas Exploration—Problems, Solutions and Opportunities. Journal of Water Resource and Protection, v. 14, n. 2, p. 142-185, 2022. doi: 10.4236/jwarp.2022.142009.

SALAZAR, João et al. Complete N and P removal from hydroponic greenhouse wastewater by *Tetrademus obliquus*: A strategy for algal bioremediation and cultivation in Nordic countries. Algal Research, v. 70, p. 102988, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102988>

SEDLACKO, E. M.; CHAPARRO, J.M.; HEUBERGER, A.L.; CATH, T.; HIGGINS, C.P. Effect of produced water treatment technologies on irrigation-induced metal and salt accumulation in wheat (*Triticum aestivum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). *Science of the Total Environment*, v. 740, p. 140003, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140003>

SEVERO, I.A.; NASCIMENTO, T.C.; FAGUNTES, M.B. *Microalgas: potenciais aplicações e desafios*. Canoas, RS: Editora Mérida Publishers, 2021. <https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-8-1>

SILVA, Carine Souza da. *Valoração da eficiência de tratamento de água produzida através do cultivo de microalgas para produção de lipídios e pigmentos*. 2021.

SINGH, A. WARD, O.P. *Biodegradation and Bioremediation*. *Soil Biology*, vol. 2, Springer, 2004.

ŚLIŹEWSKA, Weronika; STRUSZCZYK-ŚWITA, Katarzyna; MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, Olga. Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi—Current Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 8, p. 4189, 2022.

SRINUANPAN, S. et al. A rapid method for harvesting and immobilization of oleaginous microalgae using pellet-forming filamentous fungi and the application in phytoremediation of secondary effluent. *International journal of phytoremediation*, v. 20, n. 10, p. 1017-1024, 2018. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1452187>

SOUZA, J. S. B.; JÚNIOR, J.M.F.; SIMONELLI, G.; SOUZA, J.R.; GOIS, L.M.N.; SANTOS A, L.C.L. Removal of oil contents and salinity from produced water using microemulsion. *Journal of Water Process Engineering*, v. 38, p. 101548, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101548>

SORRELL, S.; SPEIRS, J.; BENTLEY, R.; MILLER, R.; THOMPSON, E. Shaping the global oil peak: A review of the evidence on field sizes, reserve growth, decline rates and depletion rates. *Energy*, v. 37, n. 1, p. 709-724, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2011.10.010>

SONG, Hanwu et al. Enhancing biomass yield, nutrient removal, and decolorization from soy sauce wastewater using an algae-fungus consortium. *Algal Research*, v. 68, p. 102878, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102878>

SUPARMANIAM et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 115, p. 109361, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109361>

SPEIGHT, JG. *The chemistry and technology of petroleum*. 4th edition Boca Raton, USA: CRC Press; 2006.

STELIGA, T. Role of fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbons in drill waste. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 21, n. 2, 2012.

TANG, Weihua et al. Decolorization and degradation analysis of Disperse Red 3B by a consortium of the fungus *Aspergillus* sp. XJ-2 and the microalgae *Chlorella sorokiniana* XJK. *RSC advances*, v. 9, n. 25, p. 14558-14566, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9RA01169B>

TECHNOLOGY, P.-P. G. *Geologia do Petróleo*. p. 24, 2012.

THOMAS, E. J. *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*. 2a ed. [s.l.] Interciência, 2004.

TURNERÝ, N.R.; RENEGAR, D.A. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 119, p. 1-16, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.050>

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 277-286, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

WANG, Shi-Kai et al. One-step co-cultivation and flocculation of microalgae with filamentous fungi to valorize starch wastewater into high-value biomass. *Bioresource Technology*, v. 361, p. 127625, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127625>

WREDE, Digby et al. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PLoS one*, v. 9, n. 11, p. e113497, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113497>

XIE, Shangxian et al. Efficient coagulation of microalgae in cultures with filamentous fungi. *Algal Research*, v. 2, n. 1, p. 28-33, 2013.

YANG, L.; LI, H.; WANG, Q.. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. *Bioresource technology*, v. 275, p. 35-43, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.036>

YANG, M. *Measurement of oil in produced water*. Produced water. Springer, New York, NY, p. 57-88, 2011.

YANG, Qi et al. Cultivation of freshwater microalgae in effluent under high salinity for biomass, nutrient removal and fatty acid/biodiesel production. *Valorization of Residues and Biomass*, v. 13, n. 7, pg 3245-3254, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01712-1>

ZAINITH et al. Application of microalgae in industrial effluent treatment, contaminants removal, and biodiesel production: Opportunities, challenges, and future prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability*, p. 481-517, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00020-1>

ZANDONADE, Tatiani Andrião; SANJOMBI, Bernabé Alfredo. Gerenciamento de injeção de água: análise qualitativa a partir dos resultados da salinidade da água produzida e testes com traçadores. *Latin american journal of energy research*, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2015.

ZHOU, W. et al. Novel fungal pelletization-assisted technology for algae harvesting and wastewater treatment. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 167, n. 2, p. 214-228, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9667-y>

ZHOU, Kai; ZHANG, Yuejin; JIA, Xiaobo. Co-cultivation of fungal-microalgal strains in biogas slurry and biogas purification under different initial CO₂ concentrations. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26141-w>

ZHOU et al. Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design. *Microalgae Cultivation For Biofuels Production*, [s.l.], p. 31-50, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00003-5>.

ZORN, Savienne MFE et al. Consortium growth of filamentous fungi and microalgae: Evaluation of different cultivation strategies to optimize cell harvesting and lipid accumulation. *Energies*, v. 13, n. 14, p. 3648, 2020. <https://doi.org/10.3390/en13143648>