

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
PÓS GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

CULTIVO DA MICROALGA MARINHA
Nannochloropsis oculata
(EUSTIGMATOPHYCEAE) EM ÁGUA DE
PRODUÇÃO DE PETRÓLEO:

VIABILIDADE DE CRESCIMENTO,
PRODUÇÃO DE LIPÍDEO E AÇÚCARES

ALESSANDRA DE ABREU ARRIADA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Oceanografia Biológica da Universidade
Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Dr. Paulo César Abreu

RIO GRANDE
Agosto 2014

DEDICATÓRIA

*Eu dedico esta tese ao meu pai.
Por toda a saudade, por todo o amor,
por todos os momentos e as conquistas
as quais eu gostaria imensamente de ter dividido
pessoalmente contigo.
Gracias, Pai. Espero que te orgulhes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por sempre me apoiar em todos os sonhos e investidas e sempre compreender minhas ausências: minha mãe, Angélica, minha irmã Márcia e meu irmão/cunhado Augusto, sempre presentes, minha irmã Patrícia e família, e, principalmente aos meus sobrinhos João Augusto e Antônio; com os quais resgato a ternura em meio ao endurecer dos dias;

A minha Vó Inah, presente, pessoalmente, até o meio desse caminho, mas em pensamento, ajuda e exemplo, presença constante, iluminada e alegre para sempre;

Obrigada ao Programa de Recursos Humanos da ANP, prh27, Maria Isabel Machado, Gilberto Griep e todos os amigos e colegas, não somente pela bolsa e confiança concedida, mas também pelo apoio incondicional, amizade, carinho e suporte. Os aprendizados, as viagens, os ensinamentos, a rigidez com ternura e leveza, o coleguismo com paciência, amor e amizade, levarei por toda a vida;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia de Microorganismos Marinhos e Fitoplâncton, ao meu Orientador Paulo Cesar Abreu e demais professores e funcionários, meu muito obrigada, por tudo;

Agradeço a Professora Clarisse Odebrecht, juntamente ao Professor Paulo Abreu, por terem me aceitado inicialmente como bolsista, e posteriormente como doutoranda, dando início ao que seria um desafio apaixonante em minha vida: trabalhar com microalgas;

Agradeço a Lisa Meinerz, em sua generosidade, amizade, amor ao trabalho, doçura, paciência e disciplina. Ela me conduziu de maneira inesquecível por um caminho ainda não conhecido, me ensinando a amar o cultivo, o Lourenço (2006), a *Nannochloropsis oculata*, a taxonomia, e a amar, para sempre, sua amizade.

Ao curso de Pós Graduação em Oceanografia Biológica, ao Instituto de Oceanografia e a FURG, agradeço a oportunidade, a estrutura e o suporte;

À Estação Marinha de Aquicultura, ao Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, ao colega Lucas Maria, Laércio, Sergiane e a todos que ajudaram nas análises, nos experimentos e em outras fases da caminhada, grata pelo suporte, ajuda e ensinamentos;

Agradeço a banca de acompanhamento por toda a ajuda, correções, reuniões e aprendizados;

Meu muito obrigada com toda a minha gratidão e amor a todos os meus amigos e conhecidos ao longo da jornada. Digo amigos e conhecidos, sem nomeá-los, pois cada um passa em nossa vida, deixando um pouco de si e levando um pouco de nós. Cada

amizade conquistada ou cada personagem de um momento ou história sabe exatamente porque a viveu. Cada conversa compartilhada, a salinha, o mate, as angústias, cada caderno recolhido, lágrima assistida, abraço. Cada palavra, sofrimento, trabalho, prova, cada confissão, cada análise, gráfico, ajuda. Os almoços, as angústias, as alegrias, as jantas com vinho, a lareira, o inverno rigoroso, o calor das discussões. A qualificação, o recomeçar, o aprender de maneira incessante como crescer, evoluir, melhorar, mesmo, e principalmente, nos momentos impossíveis. As separações, as inconstâncias da vida, as mortes, as perdas, os aprendizados, os que ficam e os que se vão. Os que te ensinam de maneira mais doce, os que te ensinam na dor. As amigadas pra toda vida e a certeza de ter aprendido muito. Muito obrigada.

ÍNDICE

Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução geral.....	10
Objetivos.....	19
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos e hipóteses.....	19
Material e métodos (linhas gerais).....	20
Síntese dos Resultados	22
Capítulo 1	23
Síntese dos resultados.....	23
Capítulo 2	25
Síntese dos resultados.....	25
Discussão geral.....	28
Conclusões.....	31
Referências Bibliográficas.....	32
Apêndice 1.....	38
Apêndice 2.....	51

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2.

Tabela 1. Perfil ácidos graxos *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo (*Experimento 1*).....30

Tabela 2. Perfil ácidos graxos *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo (*Experimento 2*).....30

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Abundância celular da *Nannochloropsis oculata* em água de produção (Experimento 1).....24

Figura 2. Abundância celular da *Nannochloropsis oculata* em água de produção (Experimento 2).....24

Capítulo 2

Figura 1. Rendimento lipídico *Nannochloropsis oculata* em água de produção (Experimento 1).....26

Figura 2. Rendimento lipídico *Nannochloropsis oculata* em água de produção (Experimento 2).....26

Figura 3. Carboidratos particulado (intracelular) e dissolvido (extracelular) da microalga *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo (Experimento 2).....27

RESUMO

A água de produção constitui um efluente da indústria do petróleo. Trata-se de uma água geológica com altos teores de elementos orgânicos e inorgânicos, que é extraída juntamente com o óleo sendo um dos principais rejeitos associados à indústria de petróleo, tanto terrestres quanto em mar aberto. As microalgas marinhas são microorganismos autotróficos que, dentre muitos elementos, produzem grandes quantidades de lipídios e ácidos graxos, pigmentos, açúcares, de grande interesse devido ao seu potencial biotecnológico. O objetivo desta tese foi testar a viabilidade de crescimento e aclimação de uma espécie de microalga utilizada na aquicultura, *Nannochloropsis oculata*, em meio de cultivo com água de produção de petróleo, e analisar a composição química de lipídios e açúcares comparativamente à microalga cultivada em meio de cultivo laboratorial. *N. oculata* demonstrou elevado crescimento em água de produção de petróleo nas concentrações testadas (0, 50 e 100%), sendo as taxas de crescimento na microalga aclimatada maiores que a microalga não aclimatada atingindo $0,22\text{ d}^{-1}$ e $0,09\text{ d}^{-1}$ dos tratamentos de 50 e 100% respectivamente em comparação a $0,12\text{ d}^{-1}$ e $0,06\text{ d}^{-1}$ de células não adaptadas nesses tratamentos. O cultivo de *N. oculata* aclimatada em água de produção, no entanto, não conferiu à microalga um aumento de biomassa, já que o incremento de células ou rendimento foram maiores no primeiro tratamento (microalga não aclimatada) e no tratamento em 0% de água de produção. Os resultados dos experimentos mostraram que a espécie *Nannochloropsis oculata*, além de ter um crescimento significativo nesse efluente, também apresentou um bom rendimento de lipídio, perfil de ácidos

graxos e produção de açúcares também significativos, comparativamente às células cultivadas em meio de cultivo tradicional.

Palavras-chave: água de produção; microalgas; *Nannochloropsis oculata*; lipídios; açúcares.

ABSTRACT

The produced water is an effluent of oil industry. It is a geological water with high levels of organic and inorganic elements which is extracted together with the oil being a major effluent associated with the oil industry in land and offshore. Marine microalgae are autotrophic microorganisms, among many elements, produce large amounts of lipids and fatty acids, pigments, sugars, of great interest due to their biotechnological potential. The aim of this thesis was to test the feasibility of growth and adaptation of a species of microalgae used in aquaculture, *Nannochloropsis oculata* in culture medium with oil production water, and analyze the chemical composition of lipids and sugars compared to microalgae growing in medium laboratory cultivation. *N. oculata* showed high growth in in the tested concentrations of produced water (0, 50 and 100%), and growth rates were larger for acclimated microalgae than not acclimated microalgae (0.22 d^{-1} and 0.09 d^{-1} of 50 treatments and 100%, respectively in comparison to 0.12 and 0.06 d^{-1} for not adapted cell in these same treatments. The cultivation of microalgae in produced water, however, did not confer an increase of the microalgae biomass, since the cells grew better when not acclimated and at 0% water production. The results of the experiments showed that the species

Nannochloropsis oculata besides to grow in this effluent also showed a good yield of lipid, fatty acid profile and production of sugars in comparison to the cells cultured in traditional culture medium.

Keywords: water production; microalgae; *Nannochloropsis oculata*; lipids; sugars.

INTRODUÇÃO GERAL

A exploração de petróleo é uma das atividades industriais mais importantes da sociedade moderna, sendo o petróleo com diversas aplicações na indústria química, além da produção de combustíveis. No entanto, essa atividade gera um efluente chamado água produzida (AP) ou água de formação, extraída juntamente com o petróleo. Esta água geológica tem grandes concentrações de impurezas tais como sais inorgânicos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, fenóis, metais e também elementos utilizados na separação de água e óleo na linha de produção. Além disso, as grandes quantidades de NaCl em água produzida geram uma grande preocupação em relação ao seu tratamento e descarte (Campos *et al.*, 2002). O tratamento desta água antes de seu descarte é, portanto, necessário com o objetivo de evitar impactos ambientais e atender a legislação específica (Resolução 357/Art 34 CONAMA). Porém, este tratamento gera mais custos para toda a cadeia de produção.

As características e quantidade da AP dependem da formação geológica dos reservatórios, da idade do poço de petróleo além do procedimento utilizado para a extração do óleo, podendo atingir até 90% do volume total extraído,

excedendo em muito o volume de óleo produzido (Hansen e Davies, 1994). Ela é constituída pela água de formação (naturalmente presente na formação geológica do reservatório do petróleo) e pela água de injeção (água utilizada para o aumento da produção), sendo formada quando as águas de injeção são introduzidas nos campos de petróleo para aumentar a pressão dos poços e auxiliar a subida do óleo à superfície. As operações de injeção são feitas nas camadas inferiores dos reservatórios e realizadas para manter as condições de pressão necessárias para a migração do petróleo (Lima *et al.*, 2008). Durante este processo, as frações de água e óleo presentes nos reservatórios se misturam continuamente e muitos dos compostos presentes no óleo acabam se dispersando e dissolvem-se na água (Stronguen *et al.*, 1995). A água produzida gerada nos campos de petróleo é caracterizada por apresentar pequenos volumes durante as fases iniciais de produção e tendem a aumentar com decorrer do tempo. Em um campo novo de petróleo, a participação da água no óleo pode variar de 5 a 15% do volume de água produzida e atingir uma faixa de 75 a 90% do volume, à medida que chega ao estágio final de produção (Ray e Engelhardt, 1992). Durante os processos de extração de petróleo, ao chegar à superfície, o petróleo passa por processos de separação que têm por finalidade separar o óleo, o gás e a água. Antes de ser descartada no ambiente marinho, a água produzida proveniente da separação do petróleo, é transferida para sistemas de tratamento que funcionam baseados na diferença da gravidade específica entre água e óleo. Apesar de atualmente existirem tecnologias avançadas, a maioria dos tratamentos disponíveis remove somente o óleo disperso e não necessariamente consegue remover o óleo e/ou os compostos solúveis (Gabardo, 2007).

Em áreas *offshore*, a água produzida é reinjetada no poço, mas em sua maioria é descartada diretamente no oceano, que tem grande capacidade de diluição. No entanto, em campos terrestres, o que representa aproximadamente 23% da produção brasileira de petróleo, este efluente deve ser tratado antes de ser descartado e, nesse caso, deverá atender as exigências legais que regulam as características de cada efluente (CONAMA, 2007). Mesmo para a reinjeção nos poços, a AP deve ser tratada de modo a remover compostos, tais como os sólidos em suspensão, os gases e as bactérias que induzem a corrosão (Stephenson, 1992).

Os programas de monitoramento realizados durante longos períodos de tempo em áreas submetidas a uma elevada densidade de instalações e de elevados volumes de descarga de água produzida (Mar do Norte e Golfo do México) indicam que os efeitos decorrentes da água produzida são de baixa toxicidade intrínseca e pontuais as áreas de deságue (Durell *et al.*, 2006). No entanto, devido a crescente exploração do petróleo, a água de produção tem sido um dos principais efluentes avaliados em razão da complexidade e do potencial tóxico que seus constituintes podem ocasionar às diferentes espécies de organismos marinhos.

Com o aumento da produção e o envelhecimento dos campos de petróleo atuais, a tendência é que o volume dessa água descartada no ambiente marinho se torne cada vez maior (NRC, 2003). No entanto, com o avanço das tecnologias de exploração de petróleo e gás e as preocupações cada vez maiores com o meio ambiente, outras técnicas, como a biorremediação têm sido usadas como alternativas para melhorar a gestão e tratamento deste e de outros efluentes. Biorremediação é a utilização de microrganismos para remover ou converter os

contaminantes em componentes menos tóxicos. Organismos como bactérias, fungos e microalgas têm sido utilizados em vários procedimentos de biorremediação (Kao e Wang, 2000).

Microalgas são organismos unicelulares que fazem fotossíntese e constituem a base da cadeia alimentar da maioria dos ambientes aquáticos. Esses microorganismos têm importantes aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica e, mais recentemente, têm sido apontados como uma alternativa para a produção de biocombustíveis, especialmente o biodiesel (Chisti, 2007). A biomassa de microalgas e os seus extratos têm substâncias como os ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e pigmentos com propriedades antioxidantes e imunológicas, além de enzimas, antibióticos e vitaminas. Além dos lipídios, os açúcares produzidos pelas microalgas também podem ser utilizados na produção de biocombustíveis (Slade e Bauen, 2013).

O êxito biotecnológico das microalgas depende da escolha de espécies com propriedades relevantes e da facilidade de seu cultivo. A possibilidade de produzir concentrados de biomassa de algas a baixo custo, sem a alteração de suas características, permite uma maior exploração biotecnológica das microalgas. Para que as microalgas tenham custo competitivo como uma fonte de material para a produção de biocombustíveis, a espécie utilizada precisa apresentar alta eficiência fotossintética e grande rendimento na produção de lipídios, por exemplo (McGinnis *et al.*, 1997). Para isso, o conhecimento sobre a caracterização da composição química das espécies e identificação de cepas com alto rendimento é necessária, além da determinação das condições ideais de cultivo que permitam a

maior produção de compostos de interesse biotecnológico, como ácidos graxos e açúcares.

Os lipídios são quimicamente um grupo diverso de elementos compostos por carbono, hidrogênio e oxigênio, cuja única característica física em comum é a insolubilidade em água (Lehninger *et al.* 2005). Os lipídios desempenham diferentes funções podendo ser classificados em lipídios de reserva (apolares) e lipídios de membrana (polares) (Gushina e Harwood 2009). Outros lipídios, embora em pequenas quantidades, possuem papel ativo no metabolismo e tem funções como co-fatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos, âncoras hidrofóbicas para proteínas, hormônios e mensageiros intracelulares (Lehninger *et al.* 2005). A grande maioria dos lipídios possui, pelo menos, uma cadeia de ácido graxo na sua molécula. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos que variam de 4 a 36 carbonos, podem ser saturados (sem dupla ligação) ou insaturados.

Os lipídios nas microalgas, além de serem componentes estruturais, exercem funções como produtos de reserva (Lourenço 2006). Estes lipídios são incorporados aos animais marinhos através da dieta e aos humanos através do consumo de frutos do mar (Mansour *et al.*, 2005). O teor de lipídios das microalgas pode ser alterado, dependendo do estado fisiológico das algas, de sua fase de crescimento e das condições do meio, como temperatura, salinidade e nutrientes. Segundo Thompson Jr. (1996) uma deficiência de nutrientes causa um contínuo decréscimo nas taxas de crescimento. Porém, sob estas circunstâncias, muitas espécies de microalgas continuam sintetizando ácidos graxos ativamente. Na falta da usual utilização dessas substâncias, isto é, construção de novas

membranas, as células convertem os ácidos graxos em triglicerídeos. O conteúdo dos ácidos graxos das microalgas e a transformação deste em triglicerídeos dependem não somente das espécies, mas também das condições do meio, incluindo a sua composição, aeração, intensidade luminosa, temperatura e idade da cultura (Dunstan *et al.*, 1993).

As microalgas marinhas apresentam os seus lipídios encapsulados pela parede celular (Patil *et al.*, 2007), entre eles de especial interesse estão os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), incluindo os ômega-3, eicosapentaenóico (EPA - C20:5) e docosahexaenóico (DHA - C22:6), e os ômega-6 linoléico (C18:2) e aracdônico (AA - C20:4) (Vargas *et al.*, 1998). Estes ácidos graxos são derivados dos ácidos graxos essenciais os quais são sintetizados pelos vegetais, mas não pelos animais (Sayanova e Napier 2004). Diferentemente das microalgas, plantas superiores não sintetizam PUFAs de cadeia muito longas como AA, EPA, e DHA (Harwood e Guschina 2009). As microalgas contem as enzimas desaturases encontradas nas plantas superiores além de diversas desaturases adicionais que podem produzir PUFAs de cadeia longa (Alonso e Maroto 2000), sendo as maiores produtoras de EPA e DHA (Patil *et al.*, 2007). Esses PUFAs são largamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e alimentar, para a produção de suplementos alimentares, alimentos para animais, aditivos e fármacos (Dyer *et al.*, 2008) o que torna sua produção em microalgas interessante do ponto de vista biotecnológico e econômico.

Dentre os metabólitos produzidos pelas microalgas, destacam-se também os polissacarídeos, tanto os intra como extracelulares. São divididos em três grandes grupos: reserva, estruturais e extracelulares, sendo este último os menos

conhecidos tanto em termos de composição e estrutura, quanto em função biológica para as microalgas (Girolardo *et al.*, 2003). O acúmulo de carboidrato nas microalgas usualmente ocorre sob condições de estresse ambiental ou deficit de nutrientes, o que é geralmente associado com baixa produtividade em biomassa (Dragone *et al.*, 2011). A excreção desses componentes geralmente aumenta da fase estacionária até a fase de senescência (Reviers, 2006). Algumas microalgas como a *Conticribra weissflogii* crescendo em condições não favoráveis como alta temperatura ou sob limitação de nutrientes, acumulam carboidratos ao invés de lipídios (Shifrin and Chisholm, 1981; Harrison *et al.*, 1990). Por outro lado, o excesso de nitrogênio pode estimular a produção de proteína nas células em algumas espécies, e reduzir consequentemente a síntese de carboidratos e lipídios (Lourenço *et al.*, 2004).

Os carboidratos de microalgas podem ser utilizados na indústria principalmente para a produção de combustíveis (etanol) (Chen *et al.*, 2011)(Slade and Bauen, 2013), além da indústria farmacêutica e alimentícia (Spolaore, 2006). Muitas propriedades biológicas de microalgas como imunoestimulante, antiviral e anti-hiperlipidêmica, podem ser derivadas dos polissacarídeos presentes em sua biomassa (Dvir *et al.*, 2009; Talyshinkshy *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2001; Dvir *et al.*, 2000; Bonh e BeMiller, 1995). Sabe-se que essas propriedades biológicas estão diretamente relacionadas à estrutura química destas moléculas em relação a sua composição monossacarídica, padrões de ligações glicosídicas, presença de grupos substituintes, tamanho molecular e a conformação. Todos estes são fatores que variam com família, gênero e até mesmo espécie a qual pertence a microalga, por este motivo elas podem ser ricas fontes de moléculas com propriedades

biológicas diferenciadas e o potencial de apresentarem propriedades biológicas é tão grande quanto sua variabilidade de estruturas (Talyshinkshy *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2001).

As microalgas foram recentemente consideradas como uma matéria-prima em potencial para a produção de biocombustíveis, devido à sua elevada eficiência fotossintética, rápido crescimento e elevada produção de biomassa (Miao and Wu, 2006). No entanto, a produção em larga escala deste organismo ainda tem algumas limitações tecnológicas, tais como altos custos para produzir e recuperar a biomassa produzida (McGiniis, 2007). O alto custo de nutrientes, como nitrogênio e fósforo utilizados em meios de cultura é, certamente, um fator limitante para a produção em massa de microalgas, e representa um obstáculo para a expansão dessa atividade econômica. Além disso, o consumo de nutrientes para a produção de microalgas poderia competir diretamente com a agricultura em caso de produção aumentar consideravelmente para atender a demanda de biodiesel da maioria dos países.

É sabido que a água de produção tem altas concentrações de nitrogênio e fósforo (Ahmadun *et al.*, 2009). Portanto, este efluente poderia ser usado para o crescimento de microalgas, e representaria uma importante alternativa para meios de cultura normalmente utilizados contribuindo para reduzir os custos e os impactos ambientais causados por este efluente da indústria do petróleo. Além disso, o crescimento de microalgas em AP poderia contribuir para purificar este efluente além de produzir bioelementos de elevado valor comercial.

Pesquisadores do Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), sul do Brasil,

isolaram treze espécies de microalgas capazes de crescer em água produzida e remover alguns poluentes deste efluente (Mendes *et al.*, 2010) . Contudo, essas espécies não apresentam altas taxas de produção. Sendo assim, seria interessante avaliar outras espécies de microalgas já empregadas na aquicultura que são resistentes, que apresentam altos índices de produção e também produzem elementos de valor comercial.

A microalga marinha *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) apresenta altas taxas de crescimento, resistente em condições ambientais adversas e produz, entre outros elementos, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados como o perfil com altas quantidades de Eicosapentaenóico (EPA, C20:5), encontrado por Borges *et al.*, 2011, para *Nannochloropsis oculata* cultivada em meio f/2, sendo esse ácido graxo de grande interesse para as indústrias farmacêutica e de alimentos.

Sua composição lipídica foi estudada em cultivos (Zhukova e Aizdaicher 1995), em diferentes taxas de iluminação (irradiâncias) e em culturas semi-contínuas (Fábregas *et al.*, 2004), em diferentes concentrações (Suen *et al.*, 1987) e fontes de nitrogênio (Lourenço *et al.* 2002). É uma espécie marinha, parte do picoplâncton, esféricas e levemente ovóides, com 2 a 4 µm de diâmetro, com um cloroplasto por celular, sendo seu pigmento acessório a violaxantina (Van Den Hoek *et al.*, 1995).

Também essa espécie tem grande capacidade de produzir polissacarídeos extra e intracelulares, conforme comprovado por Campos *et al.*, 2010.

No entanto, não há estudos analisando o crescimento e composição química dessa espécie em água de produção de petróleo.

Objetivos

Geral

Avaliar o desenvolvimento e aplicações biotecnológicas da microalga *Nannochloropsis oculata* em diferentes concentrações de água de produção de petróleo

Específicos

1. Avaliar o crescimento e uma possível aclimação da microalga no efluente

Hipótese: A microalga apresentará bom crescimento e aclimação à pequenas quantidades de água de produção no meio de cultivo

2. Determinar se o cultivo em água de produção tem efeito na produção de lipídios e composição de ácidos graxos

Hipótese: A microalga apresentará uma variação na produção de lipídios e composição de ácidos graxos comparativamente ao cultivo em meio tradicionalmente utilizado, com aumento de ácidos graxos poli-insaturados

3. Determinar se o cultivo em água de produção interfere na produção de açúcares

Hipótese: A microalga apresentará uma variação na produção de açúcares comparativamente ao cultivo em meio tradicionalmente utilizado

MATERIAL E MÉTODOS (linhas gerais)

Experimentos foram realizados com a microalga marinha *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) da coleção do Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) (código da cepa NANNOCUL-1). Esta microalga é uma espécie não naturalmente de nossa costa brasileira e proveniente primeiramente do cepário da Coleção da Universidade Federal de Santa Catarina.

Dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o crescimento e a adaptação da microalga em água de produção de petróleo. No primeiro experimento, *N. oculata* foi inicialmente cultivada em meio f/2 (Guillard, 1975) e periodicamente re-inoculada (3:1) em sua fase exponencial ou logarítmica (LOG). Esse processo se repetiu até o cultivo atingir o volume total de 9 L, então se dividiu em três tratamentos em distintas concentrações de água de produção de petróleo, 0, 50 e 100%, sendo 0% somente meio f/2, 50%, f/2 e 50% de água de produção e 100%, somente água de produção.

No segundo experimento, a microalga que havia crescido em água de produção pura (tratamento 100%), foi re-inoculada em água de produção da mesma forma descrita anteriormente até atingir o volume total de 9L e novamente dividida nos tratamentos (0, 50 e 100%). Este processo de cultivo de *N. oculata* em água de produção durou aproximadamente 21 dias até a realização do segundo experimento.

Ambos experimentos duraram 19 dias e as amostras permaneceram em câmara de germinação (Fanem model 347-CDG), com irradiância ou taxa de

iluminação de $100 \mu \text{ mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, onde os vasilhames sofriam rotatividade dentro da incubadora a fim de haver uma homogeneização da irradiância. O fotoper\u00edodo foi de 12L:12D, temperatura de 25°C , e a salinidade final de todos os cultivos era de 25. A aera\u00e7\u00e3o das culturas era feita permanentemente objetivando o fornecimento de CO_2 .

A \u00e1gua de produ\u00e7\u00e3o de petr\u00f3leo utilizada nos experimentos foi fornecida pela Unidade de Processamento e Tratamento de Fluidos da Petrobr\u00e1s, de Guamar\u00e9, Rio Grande do Norte, Brasil. As caracter\u00edsticas qu\u00edmicas desta \u00e1gua foram fornecidas pela pr\u00f3pria empresa e demonstraram uma \u00e1gua de salinidade baixa, poucos metais e valor de am\u00f4nia reduzido, conforme tabela descrita no ap\u00eandice 1.

Para avaliar o crescimento da microalga, era feita a contagem celular, em ambos os experimentos, de dois em dois dias, em triplicata para cada amostra. As c\u00e9lulas eram contadas em c\u00e2mara de Neubauer, usando microsc\u00f3pio Nikon, com 100x de aumento e contagem de at\u00e9 1600 c\u00e9lulas com erro de $\pm 5\%$ (Lund *et al.*, 1958). A taxa de crescimento era determinada utilizando a equa\u00e7\u00e3o

$$\mu = \frac{\log X_t - \log X_0}{\log e (T - T_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{(T - T_0)}$$

onde X_0 e X_t s\u00e3o abund\u00e2ncia celular inicial e final, respectivamente, onde se considerou todo o experimento.

O rendimento foi determinado utilizando a equa\u00e7\u00e3o: subtraindo a densidade celular m\u00e1xima pela densidade celular m\u00ednima ($X = X_{max} - X_0$) (Stein, 1984) (Schelegel, 1986).

A análise estatística utilizada para verificar a diferença entre os tratamentos foi análise de variância (ANOVA) seguida por Tukey's ($p \leq 0.05$). (Zar, 1996).

A coleta de biomassa para análise de lipídios e açúcares foi feita ao fim do primeiro e segundo experimento, no início da fase estacionária dos cultivos, com metodologia detalhada no apêndice 2.

SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os resultados desta Tese estão apresentados em dois capítulos. No primeiro capítulo (Capítulo 1), o trabalho intitulado “Cultivo de *Nannochloropsis oculata* em água de produção: uma alternativa para a produção de microalgas?” trata do Objetivo Específico número 1. Este estudo foi aceito pela Revista ABPG (Brazilian Journal of Petroleum and Gas).

O segundo capítulo (Capítulo 2) “Produção de carboidratos, lipídios e ácidos graxos da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo” refere-se ao objetivo específico número 2 e 3. Este trabalho foi submetido para a Revista FUEL e encontra-se em fase de revisão.

CAPÍTULO 1

Cultivo de Nannochloropsis oculata em água de produção: uma alternativa para a produção de microalgas?

Síntese dos resultados

O objetivo desse estudo foi avaliar o crescimento, e uma possível aclimação da microalga em água de produção de petróleo.

No primeiro experimento, *Nannochloropsis oculata* foi inoculada em um meio de cultura contendo diferentes concentrações (0, 50 e 100%) de água de produção apresentando crescimento tanto na microalga em água de produção pura quanto diluída. O maior incremento de células alcançado foi no tratamento em 0% de água de produção (2063) comparativamente aos tratamentos em 50 (439) e 100% (271), sendo também o que apresentou maior taxa de crescimento ($0,13 \text{ d}^{-1}$) em relação a 50 ($0,12 \text{ d}^{-1}$) e 100% ($0,06 \text{ d}^{-1}$) (Fig. 1). Já no segundo experimento, onde as microalgas cultivadas em 100% de água de produção pura foram reinoculadas e divididas novamente nos tratamentos 0, 50 e 100% de água de produção, a taxa de crescimento nos tratamentos em 50 ($0,22 \text{ d}^{-1}$) e 100% ($0,09 \text{ d}^{-1}$) foram maiores em relação ao tratamento em 0% ($0,08 \text{ d}^{-1}$), indicando uma possível aclimação da microalga. O incremento de células do tratamento em 0% no entanto, foi maior que nos outros tratamentos (1102 em 0% e 466 e 353 em 50 e 100% respectivamente), o que representa uma vantagem adaptativa no segundo experimento, porém sem aumento de biomassa (Fig. 2).

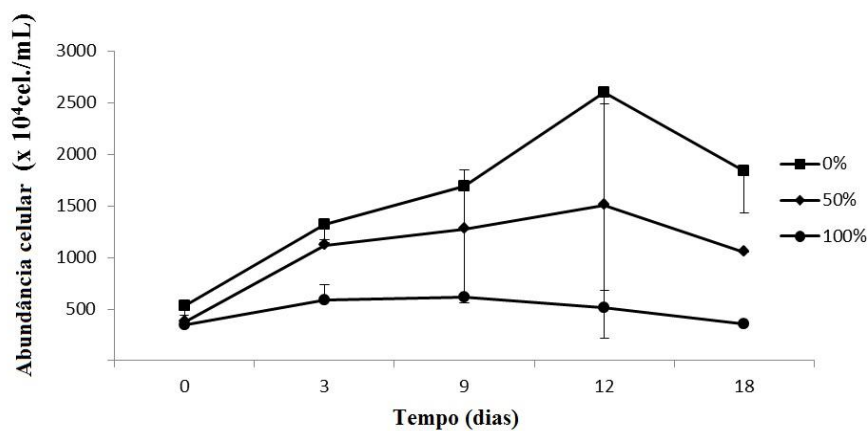


Figura 1. Abundância celular da *Nannochloropsis oculata* nos tratamentos com 0%, 50% e 100% de água de produção (Experimento 1)

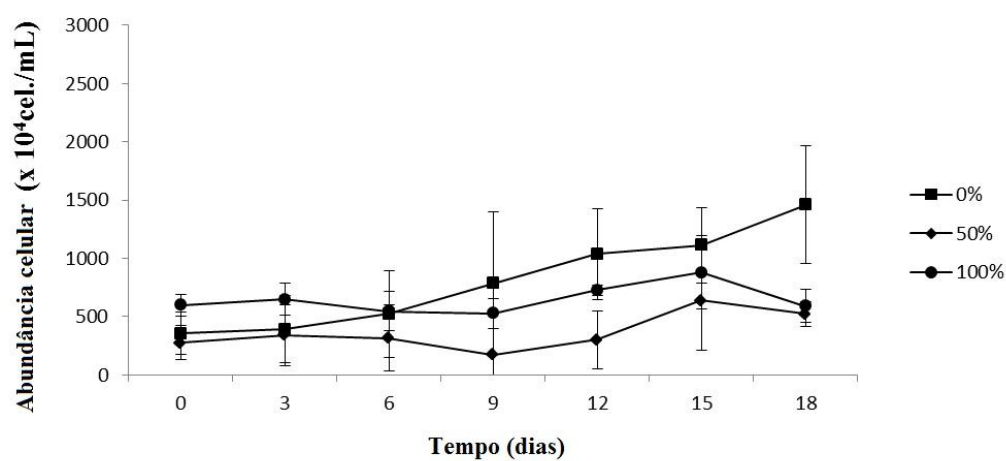


Figura 2. Abundância celular da *Nannochloropsis oculata* previamente cultivada em água de produção (100%) e repicada em tratamentos com 0%, 50% e 100% de água de produção (Experimento 2)

CAPÍTULO 2

Produção de carboidratos, lipídios e perfil de ácidos graxos da microalga marinha Nannochloropsis oculata em água de produção de petróleo.

Síntese dos Resultados

O objetivo deste estudo foi avaliar se o cultivo em água de produção de petróleo interfere na produção de lipídios e açúcares.

A microalga mostrou um rendimento de lipídios (% peso seco) de 41,2%, 36,5% e 28,2%, respectivamente (Fig 1). O ácido graxo Cis C18:1 apresentou um aumento, diminuindo a concentração de C20: 5 paralelamente em relação a concentração de AP (Tab. 1). Para o segundo experimento, os rendimentos de lipídios foram 38,2, 31,7 e 26,6%, com alto teor de lipídios por célula (Fig. 2). Houve um predomínio de ácidos graxos de reserva como o C14:0 e C16:0 e a ocorrência do Trans C18:1, provavelmente devido a condições de cultivo adversas (Tab. 2). Açúcares particulados e extracelulares dissolvidos foram medidos neste experimento. Para os diferentes tratamentos (0,50% e 100) células apresentaram 140,67 mg / L, 176,36 mg L⁻¹ e 85,65 mg L⁻¹ de particulados e 5,68 mg L⁻¹, 0,76 mg L⁻¹ e 3,45 mg L⁻¹ de açúcares extracelulares, respectivamente.

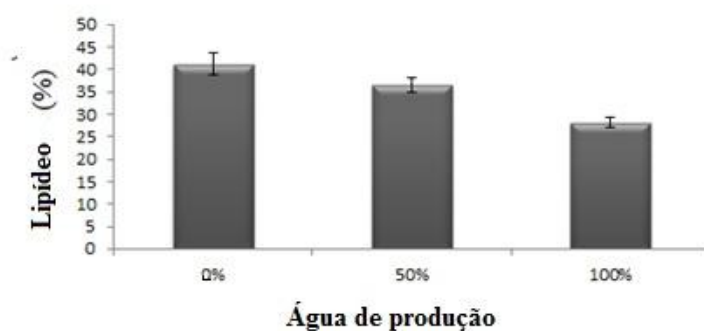


Figura 1. Rendimento lipídico *Nannochloropsis oculata* em diferentes níveis (0%, 50% e 100%) de água de produção (Experimento 1)

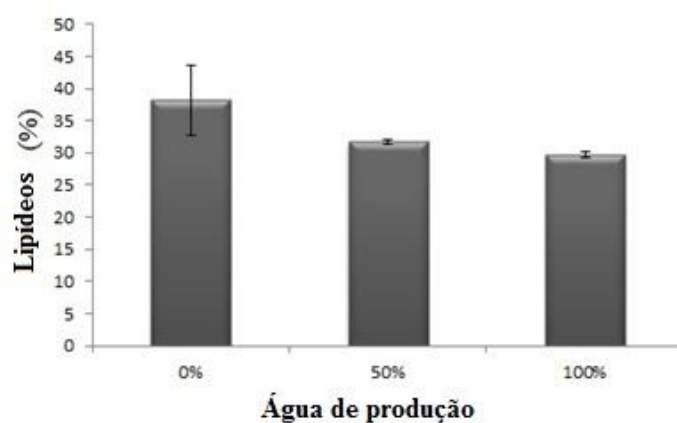


Figura 2. Rendimento lipídico *Nannochloropsis oculata* pré-cultivada em água de produção e re-inoculada em meios com diferentes concentrações (0%, 50% e 100%) de água de produção (Experimento 2)

Tabela 1. Perfil ácidos graxos *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo (Experimento 1)

	C14:0	C15:0	C16:1	C16:0	C18:2	C18:1c	C18:1t	C18:0	C20:4	C20:5	C17:0	C20:1	C20:0	C22:0	C22:6
0%	6,9	0,6	24,6	28,6	2,9	13,7	2,4	1,4	3,3	15,7	0	0	0	0	0
50%	7	0,6	23,5	27,2	3,4	14,3	1,4	1,4	3,5	17,8	0	0	0	0	0
100	5,1	0,6	24,6	28,7	2,9	22,5	1,4	2,5	2,2	9,6	0	0	0	0	0

Tabela 2. Perfil ácidos graxos *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo (Experimento 2)

	C14:0	C15:0	C16:1	C16:0	C18:2	C18:1c	C18:1t	C18:0	C20:4	C20:5	C17:0	C20:1	C20:0	C22:0	C22:6
0%	10,43	1,49	19,5	36,19	1,83	20,93	1,9	6,26	0	0	1,93	0	0	0	0
50%	2,77	0,5	12,35	22,16	14,42	8,24	22,64	9,66	0	1,39	1,56	1,44	1,64	1,24	0
100	7,52	2,3	13,36	27,33	4,51	6,3	18,18	8,67	0	0	3,07	0	3,26	5,5	0

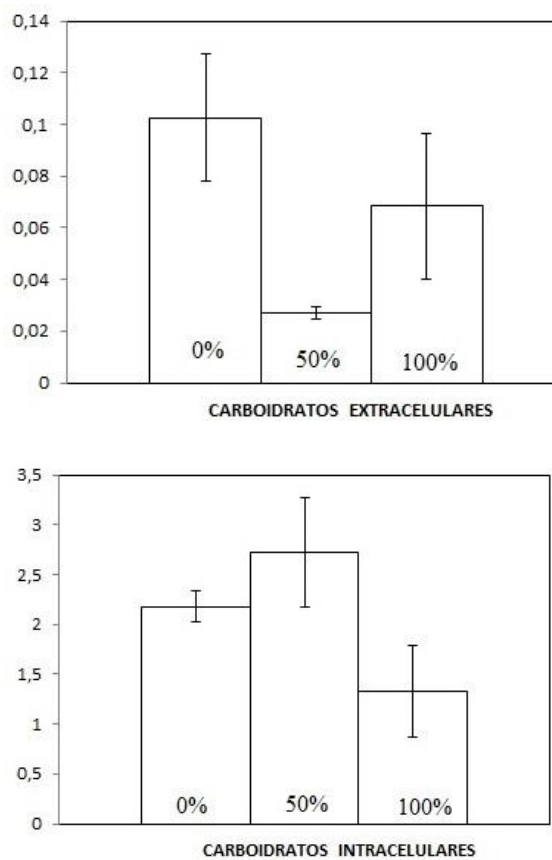


Figura 3. Carboidratos particulado (intracelular) e dissolvido (extracelular) da microalga *Nannochloropsis oculata* pré-adaptada em água de produção de petróleo e re-inoculada em meios com diferentes concentrações (0%, 50% e 100%) de água de produção (Experimento 2)

DISCUSSÃO GERAL

Um dos grandes gargalos da produção em grande escala de microalgas e suas aplicações em indústria, alimentação e outros fins como, o emergente e crescente consumo para energias ditas verdes ou renováveis, como o biodiesel, é, justamente, os custos com insumos e nutrientes (Chisti 2007). Analisar alternativas de cultivo, viabilizando suas aplicações é um dos objetivos de estudo desta tese. Outra problemática abordada é de caráter ambiental e econômico, e diz respeito a um importante efluente da indústria de petróleo, a água de produção ou de formação. Ambiental, por se tratar de um importante rejeito, inerente ao processo de produção de óleo (Neto, 2008). E econômico, por onerar severamente o mesmo processo produtivo, uma vez sendo necessário seu tratamento, tanto em plataformas terrestres como as marítimas (Ihara, 2008).

A microalga marinha *Nannochloropsis oculata* já havia sido utilizada por outros autores em estudo com outros efluentes objetivando biorremediação e tratamento com produção de biomassa. Lopes *et al.*, 2011, propôs a utilização desta microalga para o tratamento do efluente proveniente do sistema de produção superintensiva do camarão-branco *Litopenaeus vannamei* e para a produção de biomassa da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*. Os autores verificaram maior densidade celular (17.475×10^4 células mL⁻¹) e maior biomassa (1,06 g L⁻¹ em 11 dias de cultivo) em comparação com o tratamento onde foi empregado o meio f/2 (8.283×10^4 células mL⁻¹ e 0,51 g L⁻¹ em 10 dias de cultivo), resultando numa produtividade de 0,089 e 0,043 g L⁻¹ d⁻¹ respectivamente.

Magnotti (2013) utilizando o mesmo efluente para produção de biomassa algal alcançou um ganho de biomassa da *Nannochloropsis oculata* de 474 mg/L⁻¹

com a microalga assimilando 85% do nitrato e praticamente todo o ortofosfato ao final de dez e dois dias, respectivamente.

Jiang *et al.* (2011) com o objetivo de reduzir o custo de produção de biodiesel de microalgas, testaram o cultivo dessa microalga em efluente doméstico obtendo melhor crescimento da microalga em 50% do efluente, com meio f/2 e um incremento de biomassa e conteúdo lipídico por célula maior que no cultivo em meio tradicionalmente utilizado, após 12 dias de cultivo.

No entanto, não há estudos analisando água de produção de petróleo como possível meio de cultivo para a microalga. Tampouco há estudos da composição química dessa microalga no efluente testado.

As taxas de crescimento de *N. oculata* determinadas nos experimentos 1 e 2 foram menores que a mencionado por Spolaore *et al.*(2006) (0.86 d^{-1}), mas similar a obtida por Converti *et al.* (2009) , que alcançou $0.13 \mu \text{ d}^{-1}$ utilizando meio f/2. O rendimento, ou incremento de células obtido em ambos os experimentos de nosso trabalho foram semelhantes ao encontrado por Meinerz (2007) com a *Nannochloropsis oculata* cultivada em meio f/2.

Também em rendimento lipídico, a *Nannochloropsis oculata* atingiu valores superiores a Borges (2011) com 16, 2%, e Sheng Y *et al.* (2009) com 22,7%.

Analisar o conteúdo celular das microalgas e relacionar com as condições utilizadas se torna importante ao se utilizar um meio de cultivo alternativo, como a água de produção de petróleo, considerando ser o objetivo final o uso dessa biomassa produzida.

No caso da microalga *Nannochloropsis oculata*, esta apresentou em ambos os experimentos um rendimento lipídico, um perfil de ácidos graxos e uma produção de açúcares semelhante aos valores encontrados para o meio de cultivo geralmente empregado para a espécie estudada. Sabe-se que um cultivo em condições estressantes leva ao aumento na produção lipídica, porém um decréscimo no crescimento celular (Brennan e Owende 2010).

Quanto ao perfil de ácidos graxos encontrados, a microalga em água de produção mostrou a presença de ácidos de grande interesse biotecnológico, como o ácido oleico, palmítico e palmitolêico e os perfis encontrados foram os semelhantes encontrados geralmente para a espécie (Fábregas *et al.*, 2004). Em maiores concentrações de água de produção, houve o aumento de C:18c (oleico) e diminuição de C20:5 (EPA) e semelhantes valores em todos os tratamentos de palmítico e palmitolêico. O Eicosapentaenôico é um ácido graxo de grande utilização biotecnológica e geralmente ocorre sob condições favoráveis de cultivo já que nessas condições a célula sintetiza lipídios de membrana (polares), geralmente formados pelos ácidos poliinsaturados como os EPA (Hoshida *et al.*, 2005).

Quanto à produção de açúcares, os resultados para carboidratos intra e extracelulares com a microalga domesticada demonstraram valores semelhantes e maiores ao encontrados para a espécie em meio de cultivo geralmente utilizado, o que geralmente ocorre em cultivos já na fase de senescência ou ainda em situações de depleções de nutrientes ou condições estressantes (Reviers, 2006).

CONCLUSÕES

Concluiu-se com o presente trabalho ser possível a produção da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo. A microalga apresentou em ambos os experimentos um rendimento lipídico, um perfil de ácidos graxos e uma produção de açúcares semelhante aos valores encontrados para o meio de cultivo laboratorial (f/2). No entanto, considerando as condições estressantes do meio de cultivo utilizado e mais ainda, as alterações fisiológicas necessárias para a sobrevivência e crescimento em meio com água de produção, pode-se dizer que a microalga mostrou um bom desempenho e viabilidade satisfatórios permitindo uma futura utilização deste efluente com meio de cultivo massivo para a produção de microalgas. Recomenda-se, por último, o aprofundamento de estudos para se verificar se o crescimento de *N. oculata* em água de produção também permite a depuração deste efluente.

REFERÊNCIAS

- Ahmadun, FR; A Pendashteh; CC Abdullah; DR Biak; SS Madaeni, Z Zurina. 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v170, p.530–551.
- Alonso, DL, FG Maroto. 2000. Plants as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol Adv* 18: 481-97.
- Bao, XK, C Liu, J Fang , X Li. 2001. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) *Carbohydrate Research*. v. 332, p. 67-74.
- Bohn, JA; JN BeMiller. 1995. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*. v. 28, p. 3-14.
- Borges, LV; JA Morón-Villarreyes, MGM D'Oca; PC Abreu. 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and Bioenergy*; v35,p.4449 – 4454.
- Braskstad, OG. & Johansen, Ø.1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Marine Environmental Research*, 40(2):147-169.
- Brennan, L., P Owende. 2010. Biofuels from microalgae, A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev* 14: 557-77.
- Campos, JC; RMH Borges; AM Oliveira Filho, R Nóbrega; G Sant'Anna Jr. 2002. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. *Water Research*; v36,p. 95-104.

Campos, VB, E Barbarino, SO Lourenço. 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Cienc Rural*; 40:339-347.

Cheng, WC, HH Chen, HT Hsueh, H Chu. 2011. CO₂ fixation by Marine Microalgae and its Potential Bioenergy Composition at Conditions of Nitrogen Deficiency. National Cheng Kung University, Department of Environmental Engineering, Taiwan.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v25, p.294-306.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 393 de agosto de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

Dragone, G, BD Fernandes, AP Abreu, AA Vicente, JA Teixeira. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy* 88 (10), 3331–3335.

Dunstan, GA, JK Volkman, SM Barrott, JM Leroy, SV Jeffrey. 1993. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatoms (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 35 (1):155–61.

Durrel, G, T RØE Utvik, S Johnsen, T Frost, Neff, J. 2006. Oil well produced water discharge to the North Sea. Part I: Comparison of deployed mussels (*Mytilus edulis*), semi-permeable membrane devices, and the DREAM model predictions to estimate the dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 62:194-223.

Dvir, I, R Chayoth, U Sod-moriah, S Shany, A Nyska, HA Stark, Z Madar, Arad, S. 2000. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *British Journal of Nutrition*. v. 84, p. 469-476.

Dvir, I, HA.Stark, R Chayoth, Z Madar, Arad, S.2009. Hypocholesterolemic Effects of Nutraceuticals Produced from the Red Microalga *Porphyridium* sp in Rats. *Nutrients*. v. 1, p. 156-167.

Dyer, J, S Stymne, AG Green, AS Carlsson. 2008. High-value oils from plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 54 (4) 640-55.

Fábregas, J, A Maseda, A Dominguez, A Otero. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semi-continuous culture. *World J Microb Biot* 20(1): 31-35.

Gabardo, IT. 2007. Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). 235p.

Giroldo D, AAH Vieira, BS Paulsen. 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 39, 1109 – 1115.

Guschina, IA., JL Harwood. 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry in: Arts MT, Brett MT and Kainz MJ (eds) *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer New York, p.1-24.

Hansen, BR.; SRH Davies. 1994. Review of Potential Technologies for the Removal of Dissolved Components from Produced Water. *Chemical Engineering Research*; v72, p76-88.

Harrison, PJ, PA Thompson. 1990. Calderwood, G.S., Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J Appl Phycol*; 2:45-56.

Hoshida H, T Ohira, A Minematsu, R Akada, Y Nishizawa. 2005. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J Appl Phycol*;17: 29-34.

Ihara, PM. 2008. Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos teste na determinação da toxicidade da água produzida, Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, 90p.

Kao, CM; CC Wang. 2000. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. Water Research; v34, p.3413-23.

Lima, RMG, GRS Wildhagen, JWSD Cunha, JC. Afonso. 2008. Remoção de íons amônio de águas produzidas na exploração de petróleo em áreas offshore por adsorção e clinoptilolita. Química Nova In Press.

Lourenço, SO, E Barbarino, J Mancini-Filho, KP Schinke, E Aidar. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. Phycologia 41 (2) 158-68.

Lourenço, SO. 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. RiMa, São Carlos, 588p.

Lourenço, SO. 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. Europ Jour Phyc; 39:17-32.

Mansour, MP, DMF Frampton, PD Nichols, JK Volkman, SI Blackburn. 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C-24-C-28 polyunsaturated fatty acids. J Appl Phycol 17(4): 287-300.

Mendes, LB; PCR Cunha; M Montes D'Oca; PC Abreu; E Primel. 2010. Method for removing pollutants from produced water. US Patent 7955505 B2.

McGinnis, KM., TA Dempster, MR Sommerfeld. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. J Appl Phyco, 19: 19-24, 1997.

Metcalf, L, A Schmitz. 1961. The Rapid Preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. Anal Chem;33(3): 363.

Miao, XL, QY Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technol*; 97:841-46.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 2003. Oil in the sea III: Inputs, fates and effects. Washington, The National Academy Press. 280p.

Neto, AG. 2008. Avaliação da toxidez e potencial de fitorremediação da água de produção de petróleo salina pela halófita *Spartina alterniflora* Loisel (*Poacea*), Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal de Rio Grande, 89p.

Patil, V, T Källqvist, Olsen,. G Vogt, HR Gislerod. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult Int* 15: 1-9.

Ray, JP. & Engelhardt, FR. 1992. Produced Water: Technological/Environmental Issues and Solutions. Environmental Science Research New York, Plenum Press. 619p.

Reviers B. 2006. Biologia e filogenia das algas, Artmed; 280p.

Sayanova, OV, JA Napier. 2004. Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry* 65 147 – 58.

Shifrin, NS, SW Chisholm. 1981. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol*; 17: 374-384.

Slade, R; A Bauen. 2013. Micro-algae cultivation for biofuels: cost energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*; v53,p. 29-38.

Spolaore, P; C Joannis-Cassan; E Duran; A Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; v101, p. 87-96.

Stephenson, MT. 1992. Components of produced water: a compilation of industry studies. *Journal of Petroleum Technology*; v44, p548–603.

Stromgren, T., SE Sorstrom, Shou, I Kaarstad, T Aunaas, OG Braskstad, Johansen, Ø. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Marine Environmental Research* 40(2):147-169.

Suen, Y, JS Hubbard, G Holzer, TG Tornabene. 1987. Total Lipid Production of the Green-Alga *Nannochloropsis* sp. QII under Different Nitrogen Regimes. *J Phycol* 23(2), 289-296.

Talyshinsky, M, Y Souprun, M Huleihel. 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International*. v. 2.

Thompson Jr., GA. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta* 1302: 17-45.

Van Den Hoeck , C, OG Mann, HM Jahns.. 1995. *Algae: Un Introduction to Phycology*. New York. Cambridge University Press. 627 p.

Vargas, MA, H Rodriguez, J Moreno, H Olivares, JA Del Campo, J Rivas, MG Guerrero. 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J Phycol* 34(5), 812-17.

Zhukova, NV, NA Aizdaicher. 1995. Fatty-acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39(2), 351-56.

APÊNDICE 1

Nannochloropsis oculata growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production?

Alessandra Abreu Arriada^{a*}, Paulo Cesar Abreu^b,

^a Post Graduation Course on Biological Oceanography, Federal University of Rio Grande - FURG, RS, Brazil.

^b Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande - FURGRS, Brazil.
Tel.: +55 5332336509; Fax: +55 5332336601.

Av. Itália km, 8. Campus Carreiros. P.O. Box 474 –

Rio Grande/RS – Brazil. Zip Code: 96201-900.

e-mail: alessandraarriada@hotmail.com

ABSTRACT

Produced water (PW), a geologic water extracted with petroleum, presents high contents of impurities and, therefore, must be treated before being released into the environment. This clean-up process increases oil production costs. Microalgae are photosynthetic microorganisms that can produce biofuels and treat effluents. We tested the viability of a marine microalgae species to grow in culture medium with PW. In the first experiment, the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* was inoculated in culture media containing different concentrations (0, 50 and 100%) of PW. In the second experiment, *N. oculata* adapted to grow in PW, were re-inoculated into media with different proportions of this effluent (0, 50 and 100%) to evaluate a possible adaptation. *N. oculata* presented significant growth in diluted and pure PW. However, pre-adaptation did not result in higher biomass production. These results indicate that *N. oculata* can grow in this effluent and generate bioproducts.

Keywords: Produced water; Microalgae; *Nannochloropsis oculata*, Oil and gas, Biotechnology of microalgae

1. INTRODUCTION

The oil exploitation is one of the most important industrial activities of modern society and petroleum has many other applications in chemical industry, besides the fuels production. However, this activity generates an important effluent called produced water (PW) or formation water that is extracted with petroleum. This geologic water has varying concentrations of impurities such as inorganic salts, aliphatic and aromatic hydrocarbons, phenols, metals, radionuclides, and also added elements used in the separation of water and oil in the production line. Moreover, the high amounts of NaCl in produced water are also a matter of great concern (Campos *et al.* 2002). The treatment of this water is, thus, necessary in order to avoid environmental impacts, although it generates more costs to all production chain. The characteristics and amount of PW depend on the geological formation of the reservoirs, the age of the oil well, and the procedure used in the extraction of the oil. A new oil field produces, on average, 5 to 15% of PW, but as the oil wells get depleted the amount of PW increases to 90% of total volume extracted, greatly exceeding the volume of oil produced (Hansen and Davies, 1994).

In offshore areas, the produced water that is not re-injected in the well could be directly discharged into the ocean, which has great capacity of dilution. However, in onshore fields, which accounts for approximately 23% of the Brazilian oil production, PW must be treated before being discarded in the near coastal region. In this case, the discarded PW must attend the legal demands that regulate effluents characteristics (CONAMA, 2007). Even for the re-injection in the wells, PW must be treated in order to remove compounds such as suspended solids, gases and bacteria that induce corrosion (Stephenson, 1992).

With the advancement of oil and gas exploitation technologies and increasingly environmental concerns, bioremediation techniques have been used to improve the management and treatment of this and other effluents. Bioremediation is the use of microorganisms to remove or convert the contaminants into less toxic components. Organisms like bacteria, fungi and

microalgae have been used in many bioremediation procedures (Kao and Wang, 2000).

Microalgae are unicellular organisms that make photosynthesis due to the presence of chlorophyll *a* and constitute the basis of food webs of most aquatic environments. These microorganisms have important applications in the food and pharmaceutical industries and, more recently, have been pointed out as an alternative for the production of biofuels, especially the biodiesel (Chisti, 2007). The microalgae biomass and its extracts have substances like polyunsaturated fatty acids, proteins and pigments with antioxidant and immunological properties, besides enzymes, antibiotic elements and vitamins. Lipids and sugars produced by the microalgae can also be used in the biofuel production (Slade and Bauen, 2013)

The biodiesel production has received considerable attention in recent years because it is a biodegradable, renewable and nontoxic. This fuel is nowadays produced from animal fat, or oil seed of some superior plants. However, microalgae has recently been considered as a potential feedstock, due to their high photosynthetic efficiency, rapid growth and high biomass production. However, the large-scale production of this organism has still some technological limitations such as high costs of resources to produce and recover of the produced microalgae biomass. The high cost of nutrients such as nitrogen and phosphorus used in culture media is certainly a limiting factor for microalgae mass production, and represents an obstacle to the expansion of this economic activity. Moreover, nutrients consumption for microalgae production could directly compete with agriculture in case production increases considerably to attend the biodiesel demand of most countries.

It is well known that the produced water has high concentrations of nitrogen elements and phosphate (Ahmadun *et al.* 2009). Therefore, this effluent could be used for microalgae growth, representing an important alternative for culture media normally employed in the large scale microalgae production, contributing to reduce the costs and to reduce the environmental impacts caused by this oil industry effluent. Moreover, the growth of microalgae in PW could

contribute to clean up this effluent and also produce bioelements of high commercial value.

Researcher of the Laboratory of Phytoplankton and Marine Microorganisms of the Federal University of Rio Grande (FURG), southern Brazil, have isolated thirteen strains of microalgae capable of growing in produced water and remove some pollutants of this effluent (Mendes *et al.* 2010). Nevertheless, these species do not present high production rates. Therefore, it would be interesting to evaluate other microalgae species already employed in aquaculture that are resistant, present high production rates and produce elements of commercial value.

The Eustigmatophyceae *Nannochloropsis oculata*, a marine microalgae, shows high production rates, being cultivable even under adverse environmental conditions. This microalgae produces, among other elements, large amounts of polyunsaturated fatty acids like EPA (C20:5), which is of great interest to the pharmaceutical and food industries (Borges *et al.* 2011). For these reasons this microalga was chosen to be tested in culture media with different amounts of produced water.

2. MATERIAL AND METHODS

The studies were conducted with the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) from the culture collection of the Laboratory of Phytoplankton and Marine Microorganisms of the Federal University of Rio Grande (FURG) (code NANNOCUL-1).

Two experiments were carried out to evaluate the growth conditions of un-adapted and pre-adapted *N. oculata* in medium with different concentrations of produced water. In the first experiment, *N. oculata* was initially cultured in f/2 medium (Guillard, 1975), periodically inoculated (3:10) in new culture medium after reaching the exponential (LOG) growth phase. This process was repeated until the culture media reached a volume of 9 L. Then, the 9 L culture were divided into three treatments, (1 L triplicates), with the following amounts of PW: 0, 50, and, 100%, as described in Table 1.

Table 1 *Nannochloropsis oculata* in three (3) treatments with different concentrations of produced water

Treatment	Microalgae Inoculum (L)	f/2 medium (L)	Produced water (L)	Total volume (L)
0%	0.3	0.7	-	1
50%	0.3	0.35	0.35	1
100%	0.3	-	0.7	1

In the second experiment, the microalgae that have grown in pure produced water of experiment 1 (treatment 100%), was re-inoculated (3:1) only in PW until a volume of 9L. When it reached the LOG phase, after 7 days, the culture was inoculated in culture media containing 0, 50 and 100% of PW, in the same way as described before.

Both experiments lasted for 19 days and the flasks with cultures were kept in a germination chamber (Fanem model 347-CDG), with irradiance of $100 \mu \text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12L:12D photoperiod, temperature 25°C . Final salinity of all culture media was 25.

The produced water used in the experiments was collected in the Processing Unit of Fluids Treatment of Petrobras in Guamaré, Northeast Brazil, and the compounds of this effluent are described in table 2.

Carbon dioxide was introduced into the samples through constant air flow.

To evaluate the *Nannochloropsis oculata* cell growth in both experiments, water samples were collected every two days from each treatment and cells were counted in Neubauer chamber, using transmitted light microscope (Nikon), with 100x final magnification.

The microalgae growth rate (μ) was determined during the LOG phase as follows: $[\mu = \ln X_t - \ln X_0 / (T - T_0)]$

(1)

where X_0 and X_t are the cell abundances at the initial final period of the LOG phase.

The cells yield was determined subtracting the highest cell abundance from the minimum value:

$$(X = X_{max} - X_0).$$

(2)

(Stein,1984) (Schelegel,1986).

Statistical differences among the treatments were evaluated through the analysis of variance (ANOVA- one way) followed by Tukey's *ad hoc* multiple comparisons test ($p \leq 0.05$). The homoscedasticity and normal distribution of the data were previously tested and appropriate data transformation (logarithmic) were conducted, when required (Zar, 1996).

Table 2. Compounds of produced water of the Processing Unit of Fluids Treatment of Petrobras in Guamaré, Northeast Brazil and the parameters accepted in the relevant legislation (Res.Conama 357/Art.34).

PARAMETERS	RESULTS (mg/L)	RES.357 (mg/L)
pH (adm)	7,35	5,0 - 9,0
salinity (NaCl)	2	7
oil and greases	23,4	20
arsenic	0,001	0,5
barium	0,3358	5
boron	1,2	5
cadmium	< 0,004	0,2
lead	< 0,01	0,5
cyanide	0,064	0,2
cuprum	< 0,01	1
trivalent chrome	< 0,01	0,5
hevalent chrome	< 0,01	0,5
tin	< 0,01	4
iron	< 0,01	15
fluoride	1,43	10
manganese	< 0,01	1
mercury	< 0,001	0,01
nickel	< 0,008	2
total ammonial nitrogen	1,11	20
silver	< 0,001	0,1
selenium	< 0,0030	0,3
sulfides	0,1	1
zinc	0,013	5

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the first experiment the treatment with 0% of produced water (Control - f/2 medium) presented initial abundance of 535×10^4 cel. mL⁻¹ and the highest abundance of 2599×10^4 cel. mL⁻¹, whereas in treatments with 50% produced water, the initial cell abundance was 371×10^4 cel. mL⁻¹ and maximum abundance

1510×10^4 cel. mL⁻¹. At pure produced water (100%), *N. oculata* reached the maximum abundance on the 9th day with 617×10^4 cel. mL⁻¹ whereas the initial abundance in this treatment was 346×10^4 cel. mL⁻¹. There were statistical differences among maximum abundances of all treatments (Fig. 1).

The highest microalgae yield was reached at the 0% treatment, but both growth rates (μ) and yield did not present statistical differences among treatments. The calculated growth rates (μ) varied from 0.06 d⁻¹ (100%) to 0.13 d⁻¹ (0%) (Table 3).

In the second experiment, the initial cell abundance in the 0% treatment was 357×10^4 cel. mL⁻¹. This treatment also presented highest abundance (1459×10^4 cel.mL⁻¹) while in the 50% their initial cell abundance was 174×10^4 cel.mL⁻¹ and on the treatment of 100% the initial cell abundance was 527×10^4 cel.mL⁻¹. The maximum cell number in both treatments was 640 and 880×10^4 cel.mL⁻¹, respectively (Fig. 2). In this experiment highest cell yield also occurred in 0% (1102×10^4 cel.mL⁻¹) and growth rate of this treatment was 0.08 d⁻¹. The growth rate of the 100% treatment (0.22 d⁻¹) was bigger than the control, but the cell yield in this treatment just reached 353×10^4 cel.mL⁻¹ (Tab. 3). The cell yield and growth rates did not present statistical differences.

N. oculata without previous adaptation (experiment 1) showed better performance with higher cell abundance and yield in the 50 to 100% treatments ($p < 0.05$) (Tab. 3) than in the same treatments in the second experiment. However, growth rates in treatments 50 and 100% of experiment 2 were higher than the Control (0%), indicating a possible adaptive advantage of pre-adapted cells regarding the growth speed, but not of biomass production.

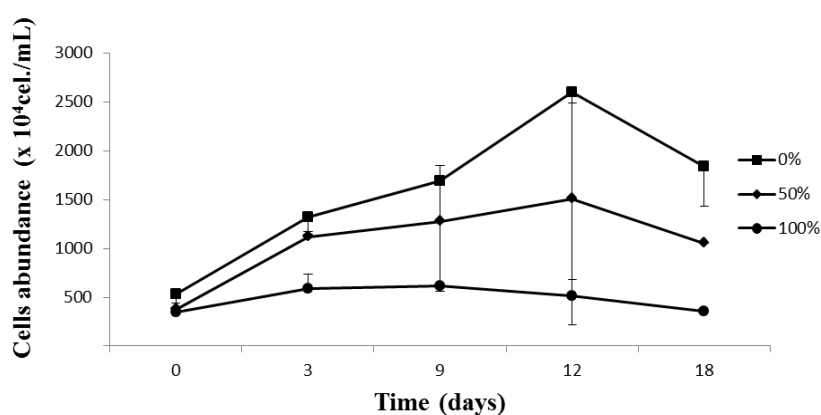


Figure 1 Experiment 1 - Cell abundance (10⁴ cel. mL⁻¹) of *Nannochloropsis oculata* inoculated in culture media with different concentrations of produced water (0, 50 and 100%)

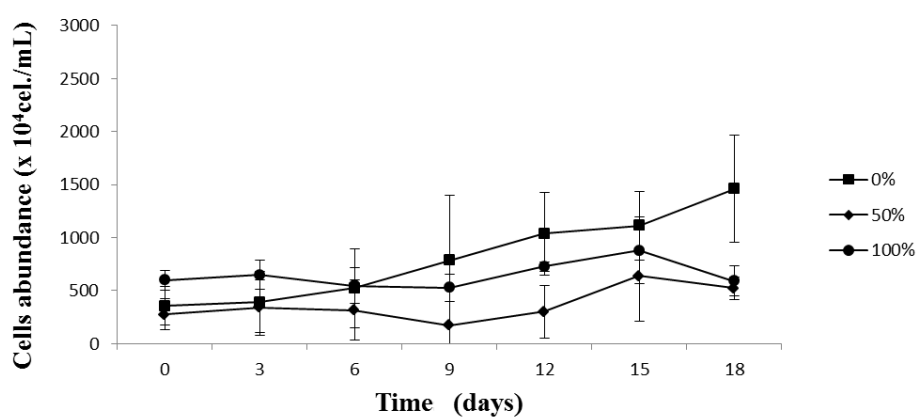


Figure 2 Experiment 2 - Cell abundance (10⁴ cel. mL⁻¹) *Nannochloropsis oculata* pre-adapted to grow produced water, inoculated in culture media with different concentrations of produced water (0, 50 and 100%)

Table 3 Growth rate (μ) of experiments 1 (microalgae not adapted to the effluent) and 2 (with adaptation prior to the effluent) and yield ($X = X_{\max} - X_0$) experiments 1 and 2

	GROWTH RATE			CELL YIELD		
	0%	50%	100%	0%	50%	100%
EXPERIMENT 1	0.13	0.12	0.06	2063	1139	271
EXPERIMENT 2	0.08	0.22	0.09	1102	466	353

The growth rates (μ) determined in the experiments 1 and 2 (Table 3) are smaller than those mentioned by Spolaore *et al.* (2006) (0.86 d^{-1}) but of the same order of that calculated by Converti *et al.* (2009) which achieved $0.13 \mu \text{ d}^{-1}$ using f/2 medium. However, the cell yield reached in both experiments were close to that found by Meinerz (2007) ($2882 \times 10^4 \text{ cel.mL}^{-1}$) especially in the 50% produced water treatment of experiment 1, justifying the use of this effluent as culture media for *Nannochloropsis oculata*.

It is very likely that the physiological stress caused by the compounds present in the produced water generated the lower results achieved in both experiments, although it must be considered that the 50 and 100% treatments of the second experiment showed higher values of μ , similar to the 0%, treatment but with lower biomass production. Factors such as excess of nutrients, presence of metals and other organic compounds may explain the lower biomass production in treatments where produced water was added. However, according to Wood *et al.* (2005) the physiological adjustments necessary for a strain of microalgae being considered acclimated are only achieved after successive transfers in the stressful medium and after several generations after the initial inoculums, when efficient adaptation of the microalgae is achieved for the new growing conditions.

Some algae are able to withstand extreme conditions of salinity, temperature and even contaminants, being a competitive advantage over other more sensitive microalgae. Moreover, many of these algae can produce allelopathic compounds having negative effect on other microalgae species and even other organisms, inhibiting their growth and proliferation. The use of this strategy to manage contamination would be an interesting tool and is a promising way for further microalgae massive production. (Mendes and Vermelho, 2013)

Microalgae of the genus *Nannochloropsis* have already been tested in other effluents, with good results. For example, Bianchini *et al.* (2006) achieved higher growth and biomass of microalgae *N. oculata* in medium with effluent of super-intensive production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, compared to cultures grown in f/2 medium. Jiang *et al.* (2011) also found that, *Nannochloropsis sp* showed better growth rates and biomass production than in

treatments with 50% of domestic sewage and attributed this result to the greater availability of nutrients and light on cultivation.

The influence of different salinities and concentrations of dissolved nutrients (N and P) in the growth rate of *N. oculata* was studied by Meinerz (2007) The author says that despite this microalga being highly adaptable to environmental variations, it can be said that its optimal growth is governed by the interaction of temperature and salinity.

Traditional chemical and mechanical treatments used to clean up produced water are complex and expensive (Tellez *et al.* 2002) and depend very much on the specific characteristics of the generated produced water. On the other hand, the use of microalgae for the purification of produced water may represent an important advance in the bioremediation of this effluent, although further studies are necessary to corroborate this hypothesis.

4. CONCLUSION

The microalgae *Nannochloropsis oculata* showed great potential for cultivation in produced water generated from oil production. Growth in culture media with 50% of the effluent produced significant biomass in rates similar to those achieved in traditional culture systems. The culture in pure produced water (100%) was also possible, although showing smaller microalgae biomass yields. Further studies should be conducted in order to determine the performance of long pre-adapted microalgae, as well as its lipid production, fatty acid profile and other parameters of biotechnological interest as pigments and carbohydrates. Similarly the bioremediation capacity of this microalgae should be determined especially for the removal of metals and organics.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The author Alessandra Arriada has a Scholarship of the ANP - Prh27 (Programa de Recursos Humanos 27 - ANP Agência Nacional do Petróleo) and Paulo Cesar

Abreu is research fellow of the Brazilian Council for Science and Technology (CNPq) of the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation.

6. REFERENCES

- Ahmadun, F.R.; Pendashteh, A.; Abdullah, C.C.; Biak, D.R.; Madaeni, S.S.; Zurina, Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v170, p.530–551, 2009.
- Bianchini, R.; Ohser, S.; Avila, R.; Braga, M.V.; Cunha, P.; Lamarca, C.P.; Santos, M.E. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**; v36, p.760-1767, 2006.
- Borges, L.V.; Morón-Villarreyes, J.A.; D'Oca, M.G.M.; Abreu, P.C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**; v35,p.4449 – 4454, 2011.
- Campos, J.C.; Borges, R.M.H.; Oliveira Filho, A.M., Nóbrega, R.; Sant'Anna, Jr. G. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. **Water Research**; v36,p. 95-104, 2002.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**,v25,p.294-306, 2007.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 393 de agosto de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Converti, A.; Casazza, A.; Ortiz, E.; Perego, P.; Del Borghi, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering Process**; v48, p.1146-1151, 2009.
- Guillard, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, In:Smith, WL & MH Chanley (Eds.) **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Plenum, New York, p.29-60, 1975.

Hansen, B.R.; Davies, S.R.H. Review of Potential Technologies for the Removal of Dissolved Components from Produced Water. **Chemical Engineering Research**; v72, p76-88, 1994.

Jiang, Z.; Shengjun, L.; Xiaolei, F.; Zhiman, Y.; Rongbo, G. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**; v88, p.3336–3341, 2011.

Kao, C.M.; Wang, C.C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Water Research**; v34, p.3413-23, 2000.

Meinerz, L.I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas estuarina e costeira**, Dissertação Mestrado em Aquicultura, Furg, Rio Grande, RS, 2007.

Mendes, L.B.; Cunha, P.C.R.; Montes D'Oca, M.; Abreu, P.C.; Primel, E. Method for removing pollutants from produced water. **US Patent** 7955505 B2, 2010.

Mendes, L.B.; Vermelho, A.B. Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. **Biotechnology for Biofuels** v6,p.152, 2013.

Schelegel, H.G. **General microbiology**, USA. Cambridge University Press, 1986.

Slade, R.; Bauen, A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**; v53,p. 29-38, 2013.

Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran. E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**; v101, p. 87-96, 2006.

Stein, J.R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements, 2th ed. **Cambridge Univ. Press**. 1984.

Stephenson, M.T. Components of produced water: a compilation of industry studies. **Journal of Petroleum Technology**; v44, p548–603, 1992.

Tellez, G.T.; Nirmalakhandan, N.; Gardea-Torresdey, J.L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oil field produced water, **Advances Environmental. Research**; v6, p.455–470, 2002.

Wood, A.M.; Everroad.,R.C.; Wingard, L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen, R. A. Algae Culturing Techniques. United States of America: **Elsevier Inc.**, p.201-209, 2005.

Zar, J.H. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, New Jersey, 1996.

APÊNDICE 2

Production of carbohydrates, lipids and fatty acid composition of the marine microalga *Nannochloropsis oculata* cultivated in Produced Water

Alessandra Abreu Arriada^{a*}, Marcelo Montes D'Oca^b, Lucas Maria^c, Paulo Cesar Abreu^c

^aPost-graduate Program in Biological Oceanography, Federal University of Rio Grande – FURG, RS, Brazil.

^bSchool of Chemistry and Food, Federal University of Rio Grande – FURG, RS, Brazil.

^cInstitute of Oceanography, Federal University of Rio Grande – FURG, RS, Brazil.

Tel: +55 5332336509; Fax: +55 5332336601.

Italia Ave. km 8. Carreiros Campus. PO Box 474 - Rio Grande / RS – Brazil.

Postal Code: 96201-900.

email:alessandraarriada@hotmail.com

ABSTRACT

The marine microalga *Nannochloropsis oculata* was first inoculated in culture medium containing increasing concentrations (0, 50, 100%) of Produced Water (PW). The microalgae showed a lipid yield (% dry weight) of 41.2%, 36.5% and 28.2%, respectively. Fatty acid profile presented increasing C18:1c and decreasing C20:5 contents parallel to PW concentration. Further, *N. oculata* cultivated in 100% PW were re-inoculated in culture with 0, 50 and 100% PW. Lipid yields were 38.2, 31.7 and 26.6%, with higher content of lipids per cell. There was a predominance of reserve fatty acids like C14:0 and C16:0 and the occurrence of the more stable C18:1t, probably due to adverse culture conditions. Particulate and dissolved extracellular sugars were measured in this experiment. For different treatments (0, 50 e 100%) cells presented 140.67 mg/L, 176.36 mg/L

and 85.65 mg/L of particulate and 5.68 mg/L, 0.76 mg/L and 3.45 mg/L of extracellular sugars, respectively.

Keywords: Produced water; Microalgae; *Nannochloropsis oculata*; lipids; sugars, petroleum.

1. INTRODUCTION

Oil exploration is one of the most important industrial activities of modern society, with many applications in the chemical industry, in addition to fuel production. However, this activity generates an important effluent called production water, produced water (PW), or formation water, which is extracted along with the oil. This geological water has high concentrations of impurities such as inorganic salts, aliphatic and aromatic hydrocarbons, phenols, metals and elements used in the separation of water from oil in the production line. In addition, the large amounts of sodium chloride (NaCl) in produced water also create a significant concern regarding its disposal (Campos *et al.*, 2002). The treatment of this water before disposal is necessary to avoid environmental impacts and to meet the specific legislation. However, such treatment generates more costs for the entire chain of oil production.

The amount and characteristics of PW depend on the geological formation of the reservoirs, the age of the oil well and the procedure used for the oil extraction. The quantity of PW may reach up to 90% of the total extracted volume, greatly exceeding the volume of produced oil (Hansen and Davies, 1994). In offshore areas, the produced water can be injected back into the oil wells, but in most cases PW is discarded directly into the ocean, which has great capacity for

dilution of this effluent. However, in onshore fields, which represent approximately 23% of Brazilian oil production (Campos *et al.*, 2010.), this wastewater must be treated before disposal, and if so, must meet the legal requirements of effluents characteristics disposed in the coastal region (CONAMA, 2007). Even in the case of re-injection into the wells, the PW must be treated in order to remove compounds such as suspended solids, gases, and bacteria, which induce the corrosion of pipes and parts (Stephenson, 1992).

With the advancement of oil and gas technologies and the growing concern for the environment, bioremediation techniques have been used to improve the management and treatment of this and other effluents.

Bioremediation is the use of microorganisms to remove, or convert the contaminants into less toxic components. Organisms such as bacteria, fungi and microalgae have been used in various bioremediation procedures (Kao and Wang, 2000).

Microalgae are photosynthetic unicellular organisms that form the basis of the food chain in most aquatic environments. These microorganisms have important applications in the food and pharmaceutical industries and, more recently, have been suggested as an alternative for the production of biofuels, especially biodiesel (Chisti, 2007). Besides the lipids, the sugars produced by microalgae can also be used to produce biofuels (Slade and Bauen, 2013). Biomass of microalgae and their extracts contain substances such as polyunsaturated fatty acids, proteins and pigments with immune-stimulatory and antioxidant properties, as well as enzymes, antibiotics and vitamins.

The production of biodiesel has received considerable attention in recent years because it is biodegradable, renewable and non-toxic. This fuel is currently produced from animal fat or from the seed oil of higher plants. Nevertheless, microalgae have been recently considered as a potential raw material due to its high photosynthetic efficiency, rapid growth and high biomass production (Miao and Wu, 2006). However, the technology for large-scale production of this organism still has some limitations, most related to the high cost of producing and recovering the biomass (McGiniis, 2007). The high cost of nutrients, such as nitrogen and phosphorus, used in culture media is certainly a limiting factor for mass production of microalgae, and is an obstacle to the expansion of this economic activity. Moreover, the use of nutrients for the production of microalgae would directly compete with agriculture if the production were to meet the biodiesel demand of most countries.

It is well known that production water has high concentrations of phosphorus and nitrogen (Ahmadun *et al.*, 2009). Therefore, this effluent could be used to grow algae, representing an important alternative to the culture media normally used in the large-scale production of microalgae, contributing to reduce the costs and environmental impacts of this oil industry effluent. Moreover, the growth of microalgae in PW could contribute to purify the effluent, as well as to produce bioelements with a high commercial value.

Researchers at the Laboratory of Phytoplankton and Marine Microorganisms of the Federal University of Rio Grande (FURG) isolated thirteen species of microalgae capable of growing in produced water and removing pollutants from effluent (Mendes *et al.*, 2010). However, these species do not

have high production rates. Therefore, it would be interesting to evaluate other species of microalgae already employed in aquaculture that are resistant to adverse culture conditions, and produce high levels of biomass and elements of commercial value.

The marine microalga *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) shows high growth rates, and is extremely resistant to extreme culture conditions. This microalga produces, among other elements, large amounts of polyunsaturated fatty acids such as EPA (C20:5) (Borges *et al.*, 2011), which is of great interest to the pharmaceutical and food industries, and produces large amount of intracellular and extracellular polysaccharides (Campos *et al.*, 2010).

This microalgae is able to grow in produced water (Arriada and Abreu, *in press*), however, it has not yet been reported whether their growth in a stressful environment, such as produced water, can interfere with its ability to produce lipids and sugars.

2. MATERIALS AND METHODS

The experiments were performed with the marine microalga *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae), obtained from the microalgae collection of the Laboratory of Phytoplankton Ecology and Marine Microorganisms of FURG (code NANNOCUL-1). The microalga was initially grown in f/2 medium (salinity 25) (Guillard, 1975), being periodically inoculated in this culture medium in proportion 3:10, until the LOG phase was reached. The process was repeated until the culture reached a volume of 9L. This volume was divided into three treatments (1L triplicates) with different concentrations of

produced water: 1) 0% - 100% f/2 growth medium; 2) 50% - 50% f/2 growth medium and 50% PW and 3) 100% - 100% PW (Table 1). The produced water used in the experiment was collected in the Unit of Processing and Treatment of Fluids - Petrobras, Guamaré, Northeast Brazil. The PW had salinity 5, 2.1 mg L⁻¹ of ammonia, 1000 mg L⁻¹ of chlorides, 0.005 mg L⁻¹ of nitrite and 0.05 mg L⁻¹ of nitrate.

In the second experiment, the microalgae grown in pure produced water in the first experiment (100% treatment) was inoculated (3:1) in the produced water to a volume of 9L. When it reached log phase after 7 days, the culture was once more distributed in the treatments 0%, 50% and 100%, as described above.

Table 1 *Nannochloropsis oculata* in three (3) treatments with different concentrations of produced water

Treatment	Microalgae Inoculum (L)	f/2 medium (L)	Produced water (L)	Total volume (L)
0%	0.3	0.7	-	1
50%	0.3	0.35	0.35	1
100%	0.3	-	0.7	1

Both experiments lasted 19 days and were kept in a growth chamber (model 347-CDG, Fanem), with a photoperiod of 12L:12D, temperature of 25 °C and irradiance of 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

To evaluate the cell growth of *Nannochloropsis oculata* in produced water, samples were collected every two days from each treatment and the cells were

counted (cel./mL) in a *Neubauer* chamber, using a transmitted light binocular Nikon microscope, with a magnification of 100x.

When the cells reached the stationary phase, the cultures were centrifuged at a temperature of 4°C and speed of 3000 rpm for 30 minutes (centrifuge Excelsa® 4 MOD 280R) for the concentration of the produced biomass. The biomass was washed with a solution of 0.5 M ammonium formate and centrifuged again for 30 minutes at the same speed. The drying of this biomass was then performed in an oven at 60°C for 24h.

The lipid was extracted using the Bligh and Dyer (1959) method, adapted by D'Oca *et al.* (2011). The dried biomass (0.5 g) was placed in a test tube (three replicates) with 1.5 mL of a 2:1 mixture of chloroform:methanol. The solution was sonicated in an ultrasonic bath (Unique UltraCleaner model 1400A - 40kHz, 120W) for 20 minutes. Then, the mixture was centrifuged for three minutes at 3000 rpm. The extraction was repeated three times for each tube. The liquid phase was transferred to pre-weighed vials. The solvent was evaporated under vacuum in a rotary evaporator. The samples were then taken to a heater to complete the evaporation of the solvent, and weighed again after cooling down. The total lipid fraction was calculated by gravimetric difference.

The extracted lipid was esterified based on the method described by Metcalfe and Schmidt (1961) and the fatty acid profile was characterized by gas chromatography (GC) with detection by mass spectrometry (MS). The analyses were performed on a GCMS-QP2010Plus chromatographic system (Shimadzu) equipped with a split/splitless injector coupled with the mass detector. The detector operation temperature was: 280°C at the interface and 230°C at the

source. The detection used a complete scan from m/z 30 to m/z 500 with a scan time of 0.20 seconds. The ionization mode used was electron impact at 70 eV. The operation conditions of the gas chromatograph were: injector, 250°C; column, 80°C (initial temperature, 0 min); followed by a gradient of 10° C/min to 180° C; and then 7° C/min to a final temperature of 330° C; gas flow of 1.3 mL/min, pressure of 88.5 kPa, average linear velocity of 42 cm/s and injection volume of 1 mL with a split ratio of 1:100. The column was a Restek Crossbond 5% Dimethyl polysiloxane/95% diphenyl (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The methyl esters of fatty acids were identified by comparison with known standards and quantified by the method of area standardization.

To determine the production of carbohydrates, 25ml aliquots were drawn from each treatment and centrifuged. The supernatant was reserved, while the precipitated cells were washed three times and re-suspended in fresh medium. The quantification of carbohydrates both in the supernatant (extracellular carbohydrates) and the precipitated cells was performed using the phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*,1956). The carbohydrates in the precipitated cells had to be previously concentrated in fiber glass filters GF/F (Whatman) and subjected to an acidic extraction (Myklestad and Haug ,1972).

The results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons (Zar, 1996) ($p \leq 0.05$) using the *Statistica software for Windows*. Homocedasticity of the data was previously tested, and appropriate transformations (logarithmic) were performed when necessary.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of lipid yield found in experiment 1 were $41.24\% \pm 2.45$, in 0% of produced water; $36.54\% \pm 1.67$ and $28.21\% \pm 1.18$ for 50% and 100%, respectively (Fig. 1). There were no significant differences among treatments ($P > 0.05$), indicating that cultivation in produced water did not affect the production of lipids by *N. oculata* even in high concentrations of the effluent. Moreover, the values of lipid yield obtained for *N. oculata* in this study are similar to the ones reported by Sheng Y. *et al.* (2009) (22.7%), Borges (2011) (16.2%) and Lourenço (2006) (18%) with this same species.

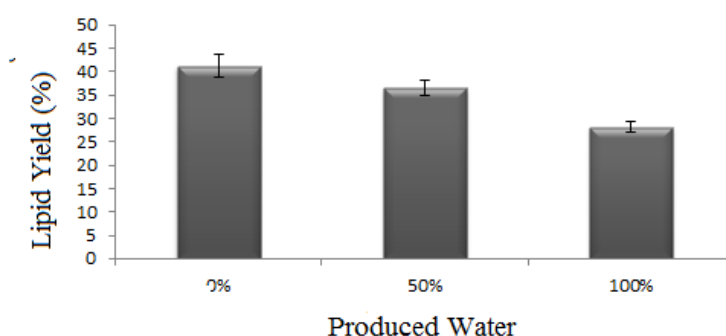


Figure 1. Lipid yields *Nannochloropsis oculata* (Experiment 1)

The fatty acids profiles showed differences among treatments, with increasing content of the oleic acid (C18:1c) and decreasing percentages of EPA (C20: 5) with increasing content of PW. Besides, microalgae of the three treatments showed similar contents of reserve saturated fatty acids such as palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1), as seen in Table 2. The high concentrations of EPA occur when there is excess of nutrients and favorable culture conditions, such as that found during the microalga logarithmic growth phase. In optimal growing

conditions microalgae usually synthesize more membrane lipids (polar), which are mainly formed by polyunsaturated fatty acids, such as EPA (Hoshida *et al.*, 2005).

Table 2. Fatty acids profile (Experiment 1)

FATTY ACIDS	PRODUCED WATER (%)		
	0%	50%	100%
C14:0	6.9	7	5.1
C15:0	0.6	0.6	0.6
C16:1	24.6	23.5	24.6
C16:0	28.6	27.2	28.7
C18:2	2.9	3.4	2.9
C18:1c	13.7	14.3	22.5
C18:1t	2.4	1.4	1.4
C18:0	1.4	1.4	2.5
C20:4	3.3	3.5	2.2
C20:5	15.7	17.8	9.6
C17:0	0	0	0
C20:1	0	0	0
C20:0	0	0	0
C22:0	0	0	0
C22:6	0	0	0

As for the lipid yields in experiment 2, with the microalgae adapted to produced water, the values were of 38.24 ± 5.39 in 0% of the produced water; 31.70 ± 0.2 and 29.69 ± 0.43 in 50% and 100%, respectively (Fig. 2). Statistical differences were found among all treatments ($P < 0.05$). Lipid yield values in this adaptation experiment were very similar to those of experiment 1. However, when the concentration of lipid was standardized by the final cell density of the second experiment (1459×10^4 cells/mL in 0%, 523×10^4 cells/mL in 50% and 592×10^4 cells/mL in 100%), it is observed a higher amount of lipid per cell (2621×10^4 g/cell in 0%, 4865×10^4 g/cell in 50% and 3340×10^4 g/cell in 100%), indicating that cells were producing lipid as reserve and not as cell membrane constituents (Gushina and Harwood, 2009). This hypothesis is supported by the smaller

amount of monounsaturated fatty acids such as palmitoleic (C16:1), and polyunsaturated such as EPA (C20:5). There was an increase in saturated fatty acids such as palmitic and octadecanoate, as well as the presence of oleic (C18:1c) and elaidic acid (C18:1t), normally found in cells that produce greater contents of lipid as reserve substances. It is also important to highlight that the trans form of the oleic fatty acid (C18:1t) was probably the result of the production of a more stable fatty acid as a response to the stressful condition found in culture media with produced water. The production of C18:1t only occurred after the microalgae being cultivated in pure PW. However, despite of unfavorable conditions it can be said that the *N. oculata* cultivation in produced water led to a good lipid production, probably due to the high availability of nutrients in PW.

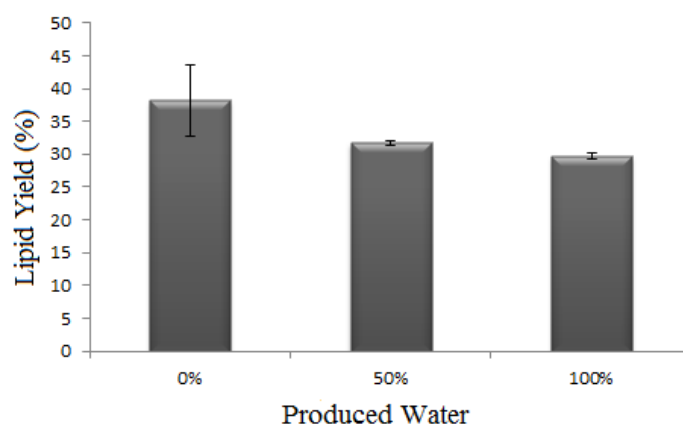


Figure 2. Lipid yields in experiment 2, and the difference between treatments *Nannochloropsis oculata* without adaptation to the effluent.

Table 3. Fatty acids profile (Experiment 2).

FATTY ACIDS	PRODUCED WATER (%)		
	0%	50%	100%
C14:0	10.43	2.77	7.52
C15:0	1.49	0.5	2.3
C16:1	19.5	12.35	13.36
C16:0	36.19	22.16	27.33
C18:2	1.83	14.42	4.51
C18:1c	20.93	8.24	6.3
C18:1t	1.9	22.64	18.18
C18:0	6.26	9.66	8.67
C20:4	0	0	0
C20:5	0	1.39	0
C17:0	1.93	1.56	3.07
C20:1	0	1.44	0
C20:0	0	1.64	3.26
C22:0	0	1.24	5.5
C22:6	0	0	0

The results of intra- and extracellular carbohydrates (%) for the various treatments in Experiment 2 with the adapted microalgae are shown in Figure 3. For the treatment with 0% of PW there was a production of 140.67 mg/L of intracellular and 5.68 mg/L of extracellular carbohydrates. For 50% and 100%, the amounts of intracellular carbohydrates were 85.65 and 176.36 mg/L. For extracellular carbohydrates, we have measured 0.76 and 3.45 mg/L for 0, 50 and 100% treatments, respectively. There were significant differences ($P < 0.05$) between treatments 50 and 100% for the intracellular carbohydrates. For extracellular, there were significant differences between treatments 0 and 50%, but between 50 and 100% or 0% and 100 there were no significant differences ($P > 0.05$). Comparatively, the results of this study are higher than those quoted by Campos *et al.* (2010) that measured 11 $\mu\text{g/mL}$ (intracellular) and Maguyon and Capareda, 2013 (6.87% of intracellular carbohydrates) and also Templeton *et al.*, 2012 (8%) and Cheng *et al.*, 2008 that found 72, 6% of total carbohydrates for the species *Nannochloropsis oculata*.

In all treatments with PW, we have observed that concentrations of intra- and extracellular carbohydrate were high. Intracellular carbohydrates can be produced as reserve or structural material. Little is known about the biological function of extracellular carbohydrates, which may well be abundant in certain growing conditions such as depletion or excess nutrients. The excretion of these compounds usually increases from the stationary to the senescence growth phases (Reviere, 2006).

Some microalga such as *Conticribra weissflogii* growing under unfavorable conditions such as high temperature or nutrient limitation, accumulate carbohydrates instead of lipids (Shifrin and Chisholm, 1981; Harrison et al, 1990). Recht *et al.* (2012) found 18% of intracellular carbohydrate under nitrogen starvation. On the other hand, the excess nitrogen may stimulate higher protein production in some species, as well as a reduced synthesis of carbohydrates and lipids (Lourenço *et al.*, 2004).

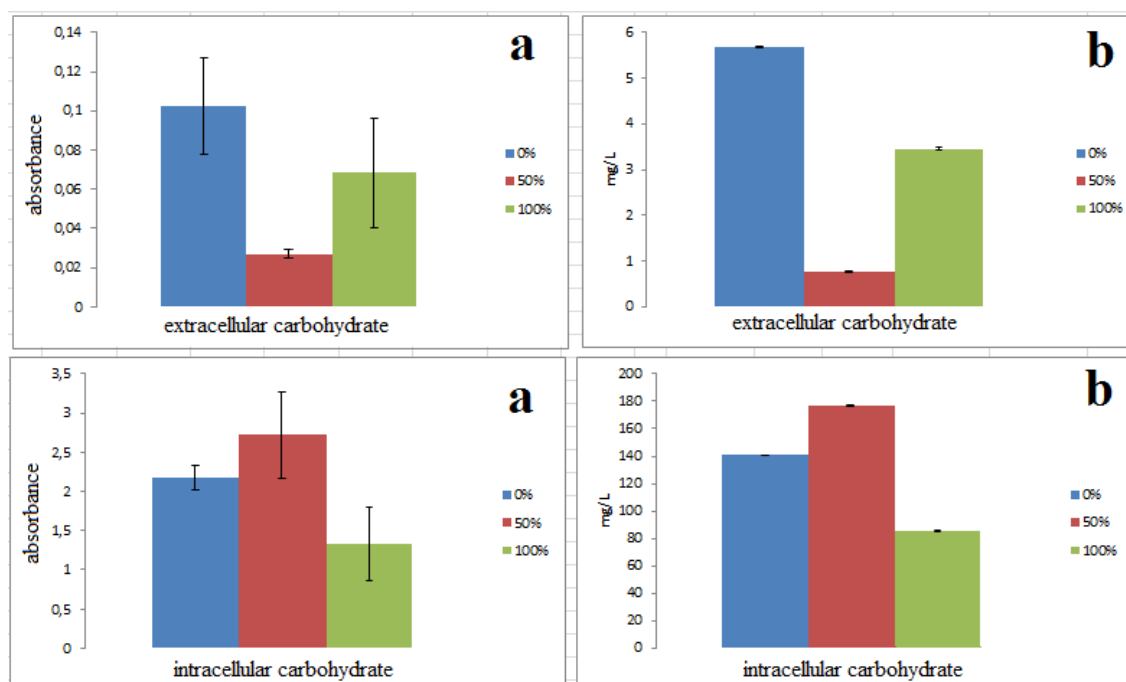


Figure 3. Intracellular and extracellular carbohydrate in absorbance (a) and in mg/L (b). Blue for the treatment at 0%, red and green for 50% and 100%, both results from experiment 2.

4. CONCLUSION

Nannochloropsis oculata has a great potential for cultivation in produced water. Its growth in culture medium with 50% water production showed similar rates to those achieved in laboratory culture media traditionally used for the species. Growth in 100% water production was also possible, although it demonstrated a lower cell growth. However in this case *N. oculata* produced more lipid and sugar probably as reserve substances to survive under unfavorable conditions. In both cases, the use of PW can be a feasible and economic alternative for large-scale production of this marine microalgae.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The author Alessandra Arriada has a Scholarship of the ANP - Prh27 (Programa de Recursos Humanos 27 - ANP Agência Nacional do Petróleo) and Paulo Cesar Abreu is research fellow of the Brazilian Council for Science and Technology (CNPq) of the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation.

6. REFERENCES

- [1] Campos JC, Borges RMH, Oliveira Filho AM, Nóbrega R, Sant'Anna Jr. G. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. *Water Res* 2002; 36:95-104.
- [2] Hansen BR, Davies SRH. Review of Potential Technologies for the Removal of Dissolved Components from Produced Water. *Chem Engin Res* 1994;72:76-88.
- [3] Campos VB, Barbarino E, Lourenço SO. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Cienc Rural* 2010; 40:339-347.
- [4] CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 393 de agosto de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- [5] Stephenson MT. Components of produced water: a compilation of industry studies. *J Pet Technol* 1992; 44:548–603.
- [6] Kao CM, Wang CC. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Water Res* 2000; 34:3413-23.

- [7] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 2007; 25:294-306.
- [8] Slade R, Bauen A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass Bioenergy* 2013; 53:29-38.
- [9] Miao XL, Wu QY. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technol* 2006; 97:841-46.
- [10] McGinnis KM, Dempster TA, Sommerfeld MR. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *J Appl Phyco* 1997; 19: 19-24.
- [11] Ahmadun FR, Pendashteh A, Abdullah CC, Biak DR, Madaeni SS, Zurina ZA. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *J Hazard Mater* 2009;170: 530–551.
- [12] Mendes LB, Cunha PCR, Montes D'Oca M, Abreu PC, Primel E. Method for removing pollutants from produced water. US Patent 7 2010; 955:505 B2.
- [13] Borges LV, Morón-Villarreyes JA, D'Oca MGM, Abreu PC. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass Bioenerg* 2011; 35:4449 – 4454.
- [14] Arriada AA, Abreu PC. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water an alternative for massive microalgae biomass production. *In press*.
- [15] Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, In: Smith WL & MH Chanley (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum, New York, 1975; p.29-60.

- [16] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37: 911-917.
- [17] D'Oca MGM, Viêgas CV, Lemões JS, Miyasaki EK, Morón-Villarreyes JA; Primel EG; Abreu PC. Production of FAMES from Several Microalgal Lipidic Extracts and Direct Transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass Bioenerg* 2011; 35:1533-1538.
- [18] Metcalfe L, Schmitz A. The Rapid Preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 1961;33(3): 363.
- [19] Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analy Chem* 1956; 28:350-356.
- [20] Mykkestad S; Haug A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Jour Experimental Mar Bio and Eco* 1952; 9:125-136.
- [21] Zar JH. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, 1996.
- [22] Sheng-YC, Chien-Ya K, Ming-Ta T, Seow-chin O, Chiun-Hsun C, Chih-Sheng L. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bior Tech* 2009;100: 833-838.
- [23] Lourenço SO. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. RiMa, São Carlos 2006, 588p.
- [24] Hoshida H, Ohira T, Minematsu A, Akada R, Nishizawa Y. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J Appl Phycol* 2005;17: 29-34.

- [25] Guschina IA, Harwood JL. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry in: Arts MT, Brett MT and Kainz MJ (eds) Lipids in aquatic ecosystems. Springer New York 2009; p.1-24.
- [26] Maguyon MCC, Capareda SC. Evaluating the effects of temperature on pressurized pyrolysis of *Nannochloropsis oculata* based on products yields and characteristics. *Energy Conversion and Management* 2013; 76: 764-773.
- [27] Templeton MQ, Wychem SV, Hymann D, Laurens LML. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography* 2012; 1270:225– 234.
- [28] Cheng WC, Chen HH, Hsueh HT, Chu H. CO₂ fixation by Marine Microalgae and its Potential Bioenergy Composition at Conditions of Nitrogen Deficiency. National Cheng Kung University, Department of Environmental Engineering, Taiwan ; 2008.
- [29] Reviers B. Biologia e filogenia das algas, *Artmed* 2006; 280p.
- [30] Shifrin NS, Chisholm SW. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology* 1981; 17: 374-384.
- [31] Harrison PJ, Thompson PA, Calderwood, GS. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 1990; 2:45-56.
- [32] Recht L, Zarka A, Boussiba S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012; 94:1495-1503.

- [33] Lourenço SO. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Europ Jour Phyc* 2004; 39:17-32.