

**EVALUACIÓN DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA  
ECONOMICAMENTE ÚTIL USANDO AGUAS PRODUCIDAS**

**GERARDO SALAS HERRERA**

**TESIS**

Presentado como requisito para  
obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción**

**Universidad Autónoma Agraria**

**Antonio Narro**



Saltillo, Coahuila, México.  
Junio de 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**“EVALUACIÓN DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA  
ECONOMICAMENTE ÚTIL USANDO AGUAS PRODUCIDAS”**

**T E S I S**

**GERARDO SALAS HERRERA**

**Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como  
requisito parcial para optar al grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN  
COMITÉ PARTICULAR**

Asesor Principal:

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor:

Dr. Alejandro Zermeño González

Asesor:

Dr. Martín Cadena Zapata

Asesor:

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor:

M.C. María Argentina Orta Dávila

Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado  
Saltillo, Coahuila, México, junio del 2015

DEDICATORIA

***A mi Familia***

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme sus puertas para embarcarme en este proyecto de vida y para ser orgullosamente un egresado más de esta histórica y honorable institución.

Al personal docente y administrativo que le dan vida al programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción. En especial al Dr. Alejandro Zermeño por su amistad apoyo y orientación.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por aportar los recursos necesarios para hacer este proyecto realidad.

A mi comité de asesoría quienes estuvieron en la mejor disposición para ayudarme a resolver exitosamente este proyecto de investigación.

A Biorganix Mexicana S.A. de C.V. por permitirme desarrollar la fase experimental de este estudio en sus instalaciones. Así como a todo el personal de la empresa que me apoyó en un ambiente laboral de profesionalismo y cordialidad.

A mis amigos y compañeros de maestría que le dieron el lado ameno y relajado a esta etapa de la vida.

De manera muy especial agradezco al Dr. Adalberto Benavides Mendoza, un gran asesor, ejemplo de profesionalismo y dedicación.

## RESUMEN

### **EVALUACIÓN DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA ECONOMICAMENTE ÚTIL USANDO AGUAS PRODUCIDAS**

**POR**

**GERARDO SALAS HERRERA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. JUNIO 2015**

**Dr. Adalberto Benavides Mendoza –Asesor–**

*Palabras clave: Dunaliella, Isochrysis, Nannochloropsis, aguas congenitas, bioremediación.*

Las aguas producidas extraídas por la industria petrolera podrían aprovecharse como medio de cultivo para la producción de microalgas. Además de la biomasa producida, las microalgas podrían disminuir la carga tóxica de algunos compuestos presentes en estas aguas. La obtención de biocombustibles a partir de microalgas es un tema ampliamente estudiado por la alta tasa de crecimiento que presentan con un alto porcentaje de lípidos. Se pueden usar aguas residuales para su cultivo, lo que reduce los requerimientos de agua dulce. Sin embargo aún hay poca información para el aprovechamiento de aguas producidas como medio de cultivo para las microalgas.

En este estudio se evaluó la tolerancia, el crecimiento y la posibilidad de obtener biomasa aprovechable de 3 cepas de microalgas marinas (*Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Nannochloropsis* sp) usando aguas producidas de la cuenca de Sabinas en el noreste de México. El trabajo experimental se dividió en tres etapas. En la primera se seleccionó una fuente de agua producida, en la segunda se evaluó la salinidad del agua producida de la estación Monclova 1 como medio de cultivo y en la tercera se evaluó cuál de las tres cepas presentaba mejor desarrollo en presencia de aguas producidas.

En los tratamientos con agua producida de la estación Buena Suerte las cepas floclaron sin obtener crecimientos con la resiembra, mientras que en los tratamientos con agua producida de la estación Monclova 1 se obtuvieron crecimientos poblacionales con *I. galbana* y *Nannochloropsis* sp. seleccionando esta fuente de agua producida para las siguientes etapas.

En la segunda etapa se verificó la salinidad del agua producida de la estación Monclova 1 disolviéndola hasta obtener una CE de 57, 52.2 y 38.4 mS cm<sup>-1</sup>. En esta etapa no se obtuvieron crecimientos poblacionales aun después de la resiembra, sin embargo *Nannochloropsis* sp. al 20 y 25% de agua producida (57 y 52.2 mS cm<sup>-1</sup>) permaneció en suspensión y con coloración verde en el matraz hasta los 17 días de experimentación.

En la tercera etapa se evaluó el crecimiento de las microalgas en agua salada con presencia de agua producida de la estación Monclova 1 al 3, 5 y 7%. Con *D. tertiolecta*. e *I. galbana* se obtuvieron concentraciones celulares significativamente mayores al disminuir la concentración de agua producida (T > 3% > 5% > 7%). *Nannochloropsis* sp tuvo una concentración celular final mayor en el testigo seguido de las concentraciones al 7 y 5% de agua producida.

Por los resultados obtenidos se concluye que el agua producida de la estación Monclova 1 tiene mayor potencial que el agua de Buena Suerte. De las microalgas evaluadas *Nannochloropsis* sp. fue la más robusta para tolerar la presencia de agua producida de la estación Monclova 1, por lo que es una buena candidata para futuras investigaciones.

## ABSTRACT

### MICROALGAE EVALUATION FOR ECONOMICALLY USEFUL BIOMASS PRODUCTION USING PRODUCED WATER

By

GERARDO SALAS HERRERA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. JUNIO 2015

Dr. Adalberto Benavides Mendoza –*Adviser*–

**Keywords:** *Dunaliella, Isochrysis, Nannochloropsis, congenital water, bioremediation.*

Produced water from the oil industry could be used as culture medium for microalgae production. In addition to the produced biomass, microalgae may decrease the toxic load of some compounds in these waters. Biofuels from microalgae is a widely studied subject, this because the high rate of growth containing a high percentage of lipids. Wastewater can be used as culture medium, which reduces the fresh water requirements. However, there is still few information for the use of produced water as a culture medium.

This study evaluates tolerance, growth and the possibility of obtain usable biomass of 3 strains of marine microalgae (*Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Nannochloropsis* sp), using produced water of the Sabinas basin in the northeast of Mexico. The experimental work was divided in three stages. In the first stage one source of produced water was selected, in the second stage the salinity of produced water from Monclova 1 station was evaluated as culture medium. In the third stage was assessed which of the three strains showed better development in the presence of produced water.

In the treatments with produced water from the Buena Suerte station the strains flocculated without obtaining growths after the second inoculum, while with the treatments of produced water from the Monclova station, cellular growth was detected after the second inoculum with *I. galbana* and *Nannochloropsis* sp. so this source of produced water was selected for the following stages.

In the second stage the salinity of the produced water from the Monclova 1 station was evaluated by dissolving it to obtain an EC of 57, 52.2 and 38.4 mS cm<sup>-1</sup>. At this stage, no cellular growth were obtained even after the second inoculum, however, *Nannochloropsis* sp. at 20 and 25 % of produced water (57 and 52.2 mS cm<sup>-1</sup>) remained in suspension with green color in the flasks up to 17 days of experimentation.

In the third stage, growth of microalgae in salt water with the presence of produced water at 3, 5 and 7% was evaluated. With *D. tertiolecta* and *I. galbana* the cellular concentrations at the end were significantly higher with decreasing the concentration of produced water (T > 3% > 5% > 7%). At the end, *Nannochloropsis* sp. had a higher cellular concentration in the control followed by the concentrations of 7 and 5 % of produced water.

By the results it is concluded that the produced water of the Monclova 1 station has greater potential than that of Buena Suerte station. Between the microalgae assessed *Nannochloropsis* sp. was the most robust to tolerate the presence of produced water from Monclova 1 station, making it a good candidate for future research.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
HIPÓTESIS.....	5
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
<b>III. ARTÍCULO: EVALUACIÓN DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA ECONÓMICAMENTE ÚTIL USANDO AGUAS PRODUCIDAS.....</b>	<b>15</b>
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	31
<b>V. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro 1:</b> Preparación y características de los tratamientos de las 3 etapas experimentales.....	32
<b>Cuadro 2:</b> Variación del pH y CE durante la exposición al 5% de aguas producidas en el experimento 1 .....	32
<b>Cuadro 3:</b> Características de las aguas producidas de acuerdo a la NOM-143-SEMARNAT-2003. Datos tomados de Martel-Valles <i>et al.</i> , (2013) .....	33
<b>Cuadro 4:</b> Tasa de crecimiento en las exposiciones al agua producida de la estación Monclova 1 al 5 % en la etapa 1 .....	33
<b>Cuadro 5:</b> Variación del pH y CE ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) en las exposiciones al agua producida de la estación Monclova 1 diluida al 15, 20 y 25 % con agua destilada.....	34
<b>Cuadro 6:</b> Comparación de la tasa específica de crecimiento de las tres cepas expuestas al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova 1.....	36
<b>Cuadro 7:</b> Máxima concentración celular al final del experimento 3 en las exposiciones al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova 1.....	36
<b>Figura 1:</b> (Imagen) Floculación de las tres cepas en el tratamiento al 5% de agua producida de Buena Suerte en el experimento 1.....	34
<b>Figura 2:</b> (Imagen) Tratamientos con agua producida de Monclova 1 diluida con agua destilada y sembradas con <i>Nannochloropsis sp.</i> .....	34
<b>Figura 3:</b> Variaciones del pH y la CE y curvas de crecimiento poblacional registrados durante el experimento 3 en las exposiciones al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova.....	35

## I. INTRODUCCIÓN

Las aguas producidas generadas por la industria petrolera podrían aprovecharse como medio de cultivo para microalgas, lo que permitiría utilizar un recurso que representa altos costos para su tratamiento y disposición durante la extracción de hidrocarburos. El mayor impacto de su aprovechamiento se esperaría en las regiones con menor disponibilidad de recursos hídricos. Además de los beneficios que se podrían obtener de la biomasa producida, las microalgas podrían disminuir la carga tóxica de algunos compuestos presentes en estas aguas (Bacellar-Mendes *et al.*, 2013) que representan riesgos de contaminación en la región en donde se extraen (Orem *et al.*, 2014). La capacidad de bioremediación de las microalgas ha sido demostrada en otros efluentes removiendo nitrógeno y fósforo de aguas residuales municipales (Shi *et al.*, 2007) y algunos metales pesados de las descargas de la industria minera (Das *et al.*, 2009).

Las microalgas son utilizadas para la obtención de carotenos, ácidos grasos de cadena larga poli-insaturados (Walker *et al.*, 2005) y polisacáridos sulfatados (Raposo *et al.*, 2013). La obtención de biodiesel a partir de microalgas es otro tema ampliamente estudiado (Duong *et al.*, 2012) ya que estos organismos presentan de 4 a 50 % de lípidos en sus células, además de una alta tasa de crecimiento, de dos a 10 veces mayor que la de las plantas terrestres. Esta diferencia es explicada por el hecho de que todas las células son fotosintéticas, pudiendo doblar la población en 6 a 12 h. La producción de microalgas puede darse durante todo el año cuando las condiciones de temperatura, iluminación, disponibilidad de agua y nutrientes son adecuadas, no compiten con la producción de alimentos y son cultivables en aguas residuales aprovechando los nutrientes disueltos en estas (Subramanian *et al.*, 2013).

Los requerimientos de agua para la producción de microalgas son considerables. Yang *et al.* (2011), calcularon que para producir 1 kg de biodiesel se requieren 3726 kg de agua, sin embargo si se utiliza agua de mar o aguas residuales como medio de cultivo para la producción de la biomasa, estos requerimientos se reducen hasta en un 90% y se disminuye la necesidad de algunos nutrientes. Esta alternativa de utilizar aguas residuales para la producción de microalgas con el fin de producir biodiesel ha sido estudiada por varios investigadores (DOE, 2010; Wu *et al.*, 2012), sin embargo aún hay poca información para el aprovechamiento de aguas producidas como medio de cultivo para las microalgas. Con el uso de aguas producidas obtenidas después de un tratamiento Arriada y Abreu (2014) lograron el cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*, mientras que Sullivan *et al.*, (2011) lograron cultivar *Nannochloropsis salina* sin necesidad de tratamiento del agua, utilizando solamente mezcla de fuentes de agua para obtener ciertos niveles de salinidad. Por su parte Hamawand *et al.* (2014) evaluaron la posibilidad de usar el agua extraída con el gas asociado al carbón (Coal Seam Gas) para el cultivo de microalgas, concluyendo que es factible al aplicar previamente ácido acético cómo tratamiento químico.

Las aguas producidas originalmente son aguas congénitas ubicadas en los estratos profundos de las formaciones geológicas (Martel-Valles *et al.*, 2013; Martel-Valles *et al.*, 2014). Cuando son extraídas durante el proceso de producción de gas o petróleo se les añaden diversas sustancias como surfactantes, geles e inhibidores para facilitar la extracción y es entonces que su composición es modificada y se les llama agua producida (Veil *et al.*, 2004). Su composición es muy variable aun entre sitios de extracción inclusive cercanos y la mayoría de las aguas producidas tienen una salinidad mayor que el agua de mar (Martel-Valles *et al.*, 2013), por lo que se busca su aprovechamiento para el desarrollo de microalgas halotolerantes.

Durante el 2010 en México se obtuvieron  $12.24 \times 10^6 \text{ m}^3$  y para el 2013 se reportaron  $31.91 \times 10^6 \text{ m}^3$  de aguas producidas según el informe de

sustentabilidad de Petróleos Mexicanos (PEMEX, 2013), mientras que en los Estados Unidos de América en el 2007, se generaron aproximadamente  $3.3 \times 10^9$  m<sup>3</sup> de agua producida, en cerca de un millón de pozos productores de petróleo y gas (Veil, 2013), esperándose que aumente su producción doméstica de hidrocarburos en un 44% antes del 2020 (Cueto-Felgueroso y Juanes, 2013). De forma general se espera que la producción no convencional de hidrocarburos aumente de forma dramática en las próximas décadas, requiriéndose un entendimiento de las características regionales del área de explotación para minimizar el impacto ambiental que se pudiera tener (Mauter *et al.*, 2014).

La Cuenca de Sabinas al noreste del país en el estado de Coahuila representa actualmente parte del proyecto más importante en México de extracción de gas no asociado. Sin embargo, la explotación de este recurso va aunado a la extracción de grandes cantidades de aguas producidas que representan riesgos de contaminación a la región donde se extraen (Orem, *et al.*, 2014). En México la NOM-143-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT, 2005), establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a la explotación de hidrocarburos (agua producida). Dicha norma ambiental indica la forma autorizada de realizar la disposición de dicho material, al cual define como agua salada que se encuentra dentro de los espacios porosos de la roca y partículas que forman los acuíferos confinados asociada a la presencia de hidrocarburos. Contiene sales disueltas, como cloruros de calcio y sodio, carbonatos de sodio, cloruros de potasio, sulfatos de calcio o de bario, entre otros; puede incluso contener algunos metales.

Por otra parte, las algas pueden ser la materia prima preferida para la producción de energía de alta densidad para el remplazo de combustibles líquidos. Entre las cualidades de su cultivo que llaman la atención tanto de empresas privadas como de centros de investigación está la posibilidad de utilizar aguas residuales, agua salada y aguas producidas, lo que reduce la competencia con los limitados recursos de agua dulce (DOE, 2010).

En este estudio se evaluó la tolerancia, el crecimiento y la posibilidad de obtener biomasa aprovechable de 3 cepas de microalgas marinas (*Isochrysis galvana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Nannochloropsis* sp) usando aguas producidas obtenidas de la Cuenca de Sabinas en el noreste de México, como una alternativa para la utilización de este potencial recurso hídrico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la viabilidad de microalgas de diferentes especies y cepas con potencial económico para crecer en aguas producidas provenientes de la Cuenca de Sabinas al noreste de México.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar la calidad de diferentes fuentes de agua producida de la industria petrolera para usar como medio de cultivo para microalgas.
- Determinar que cepas tienen mayor potencial para la producción de biomasa utilizando como medio de cultivo agua producida.

## **HIPÓTESIS**

Algunas especies de microalgas de importancia económica tienen la capacidad fisiológica de adaptarse a aguas producidas pudiendo ser una alternativa para el aprovechamiento de este recurso.

## II. REVISION DE LITERATURA

### **Aspectos generales de las microalgas utilizadas en el presente estudio**

Al hablar de microalgas nos referimos a un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos. Sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas son muy variadas, lo que les da características adaptativas a una gran diversidad de hábitats y nichos ecológicos. En el medio natural funcionan como fuente de macromoléculas de valor nutricional en la cadena alimenticia como: carotenoides, ácidos grasos poli insaturados de cadena larga y proteínas (Walker *et al.*, 2005). Diferentes especies requieren diferentes relaciones de nutrientes para su reproducción y algunas especies pueden reproducirse en un amplio rango de concentraciones de nutrientes (Agrawal, 2012). Esto indica una amplia posibilidad para su cultivo según la especie en aguas dulces o saladas pudiéndose aprovechar aguas contaminadas con desechos urbanos, agropecuarios o industriales. Su cultivo es un tema en el que se ha puesto especial atención en las últimas décadas destacando la búsqueda de producción de biocombustibles a partir de su biomasa (NREL, 1998).

Para el presente estudio se consideraron *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.* ya que son cepas reconocidas por su capacidad para producir un alto porcentaje de lípidos y han sido ampliamente estudiadas en cuanto a sus condiciones de cultivo, rangos ambientales de tolerancia, algunas vías metabólicas para la producción de productos de valor económico y la manipulación del medio para favorecerlas. Además es posible encontrar estudios sobre la tolerancia y adaptabilidad de estas a una gran diversidad de ambientes contaminados. En cuanto a su potencial para la producción de biocombustibles las tres cepas son consideradas con alto potencial (Gordon y Seckbach, 2012).



El género *Dunaliella* está conformado por algas verdes halotolerantes pertenecientes al phylum Chlorophyta y a la familia Polyblepharidaceae. Carecen de pared celular rígida y puede crecer en ambientes acuáticos con salinidades de 0.5 a 5 M de NaCl. Estas algas son de interés en muchos aspectos de importancia científica en el área de la fisiología como lo son osmoregulación y función de la H<sup>+</sup>/ATPasa; en aspectos de biotecnología principalmente en la producción de carotenos y glicerol y en la producción de bioenergéticos (Shariati y Hadi, 2011).

Alrededor del mundo en los ambientes hipersalinos la mayor parte de la productividad primaria está sustentada en microalgas del género *Dunaliella*, siendo un organismo modelo para el estudio de la adaptación a ambientes salinos en microalgas. El concepto de solutos compatibles orgánicos para proveer un balance osmótico fue basado en gran parte en el estudio de las especies de este género (Oren, 2005).

*Dunaliella tertiolecta* (Butcher), es la microalga de mayor tamaño considerada en el presente estudio con un volumen celular reportado por Levy *et al.*, (2008) de 310 +/- 110  $\mu\text{m}^3$ , sin embargo este volumen puede variar en función del estrés osmótico provocado por el medio salino disminuyendo en altas salinidades. La respuesta de *D. tertiolecta* al estrés osmótico se da metabolizando glicerol como soluto compatible (Goyal, 2007). La capacidad de crecer en ambientes con altas salinidades y el alto contenido de lípidos intracelulares (60 al 70%) que puede producir hacen que esta microalga sea apropiada para cultivos de larga escala en condiciones a la intemperie (Takagi *et al.*, 2006).

La microalga *Isochrysis galbana* (Parke, 1949), Es marina flagelada perteneciente a la clase Prymnesiophyceae del phylum Chromophytaes. Es ampliamente utilizada en acuicultura ya que tiene buenas cualidades nutricionales, sintetiza y acumula ácidos grasos poli insaturados por lo que es ampliamente utilizada como alimento en estadios larvales de crustáceos, moluscos y peces (Yoshioka *et al.*, 2012). Esta microalga puede crecer

exitosamente en cultivos mixotróficos, pueden tolerar un amplio rango de salinidades en condiciones fototróficas. Puede alcanzar concentraciones de lípidos de hasta 40% del peso seco en condiciones de deficiencia de nitrógeno y al inicio de la fase estacionaria de crecimiento (Roopnarain *et al.*, 2014).

*Nannochloropsis sp.* Es la más pequeña de las microalgas evaluadas en este estudio, su volumen celular fue calculado por Debelius *et al.*, (2009) en  $7.7\mu\text{m}^3$ , y su diámetro puede variar de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , es unicelular de flotación libre. Pertenece a la Clase Eustigmatophyceae, Orden Eustigmatales de la Familia Monodopsidaceae, hay 6 especies aceptadas actualmente dentro de este género (Guiry y Guiry, 2015). Se considera de valor nutricional por su composición bioquímica y es utilizada para la alimentación de rotíferos y alevines en la acuicultura, también es un buen recurso de clorofila a, este género también es reconocido como una fuente potencial de ácidos grasos poli insaturados (20:5  $\alpha$ -3), un ácido graso de importancia para el consumo humano para la prevención de enfermedades (Rocha *et al.*, 2003).

### **El cultivo de microalgas en aguas residuales**

La necesidad de aprovechar las aguas residuales se sustenta en el hecho de que el agua dulce es un recurso finito y su sobre explotación o distribución desigual ha provocado que en la actualidad en el planeta al menos 2.7 billones de personas vivan en embalses que experimentan una escases severa de agua durante por lo menos un mes al año (Hoeskstra *et al.*, 2012). Los requerimientos de agua para la producción de alimentos es una de las principales causas de su creciente escases calculándose que el uso de agua para la agricultura representa alrededor del 70% del agua dulce utilizada a nivel global (Bruinsma, 2009). La disponibilidad de agua en condiciones aceptables es uno de los grandes retos de nuestro tiempo por ser un recurso indispensable para la salud del ser humano, producción de alimentos y la creciente necesidad en los procesos industriales (UNESCO, 2009). La escases de agua se ve reflejada en la limitación de opciones para la producción de energía en países como los Estados Unidos (Grubert y Kitasei, 2010) y la contaminación de este

recurso agrava la situación, estimándose a nivel global que durante el año 2010 alrededor de 1.8 billones de personas utilizó suministros de agua que carecían de protección básica sanitaria contra contaminantes y patógenos (Onda *et al.*, 2012). El tratamiento y reutilización de las aguas residuales representa una estrategia para la preservación de la calidad de las aguas naturales (Sala y Mujeriego, 2001) y su tratamiento o reúso puede darse a través de la producción de biomasa con el cultivo de microalgas, la cual puede ser aprovechada para la producción de una amplia gama de productos reduciendo parcialmente la presión a que está sometido este apreciable recurso.

La producción de microalgas en aguas residuales se basa en el aprovechamiento de nutrientes disueltos, principalmente fósforo y nitrógeno, por lo que se tiene el potencial de disminuir la carga de estos contaminantes (Sriram y Seenivasan, 2012) así como otros contaminantes altamente tóxicos como: metales pesados (Das *et al.*, 2009; Dwivedi, 2012) y elementos radioactivos (Potera, 2011; Fukuda *et al.*, 2014), dependiendo el origen del agua contaminada. Hay un amplio campo de investigación respecto a la bioremediación de aguas utilizando estos microorganismos. Sin embargo el establecimiento de un sistema eficiente y rentable de tratamiento de aguas residuales representa un gran reto tecnológico, sobre todo si se esperan obtener productos de valor con la biomasa generada. Los retos tecnológicos derivan de la ingeniería necesaria para lograr una óptima interacción de las microalgas con las aguas residuales. Los retos biotecnológicos derivan de las capacidades fisiológicas de las microalgas para interactuar con medios contaminados así como favorecer la optimización de las vías metabólicas que favorezcan la producción de metabolitos de interés.

Las condiciones ambientales, presencia de metales y productos químicos pueden inducir estrés oxidativo en las microalgas activando sus mecanismos de defensa que incluyen enzimas y compuestos antioxidantes (Cirulis *et al.*, 2013), en aguas contaminadas con hidrocarburos se pueden presentar adaptaciones fisiológicas y genéticas a través de mutaciones espontáneas (Romero-López *et*

*al.*, 2012), pudiendo encontrar diferencias en la tolerancia a estos contaminantes dentro de una misma especie cuando estas se comparan entre organismos desarrollados en condiciones óptimas y cuando estas son colectadas de medios con presencia de hidrocarburos (Carrera-Martínez *et al.*, 2011), por lo que es importante conocer las capacidades fisiológicas y potenciales de adaptación de las cepas de interés a la variabilidad y características de las aguas residuales para su tratamiento y/o aprovechamiento.

Las aguas residuales domesticas tienen poca variación en cuanto a sus componentes, sin embargo el uso de sistemas de drenaje combinados con el agua de lluvia y la incorporación de drenaje industrial (industria alimenticia, pecuaria, metalmecánica, química, etc.) alteran la concentración de compuestos normalmente esperados con el riesgo de incorporar sustancias tóxicas nocivas al tratamiento del efluente (Noyola *et al* 2013), además se encuentran variaciones en los flujos de agua en escalas de tiempo de horas, semanas y por temporada del año (EPA, 1997). De forma general se maneja el uso de aguas residuales para el cultivo de microalgas dentro del proceso terciario (biológico) en las plantas de tratamiento, donde el efluente presenta menor turbidez (Razzak *et al* 2013). Otras fuentes de agua contaminada que actualmente se buscan aprovechar para la producción de microalgas son las provenientes de la industria de extracción de gas (Sullivan *et al.*, 2011; Hamawand *et al.*, 2014), donde el principal objetivo es la obtención de biomasa para la producción de biodiesel.

Los principales retos de ingeniería de operación para el desarrollo de sistemas de tratamiento de aguas residuales con microalgas son la profundidad (iluminación), turbulencia y el tiempo de retención hidráulica (Larsdotter, 2006). A pesar de que estos pueden ser fácilmente solucionados a nivel de laboratorio, los costos que representan al llevarlos a mayor escala en muchos casos representan una baja rentabilidad (Christenson y Sims, 2011). Los sistemas para la producción de microalgas se pueden dividir de forma muy general en

sistemas abiertos y sistemas cerrados o fotobiorreactores (Razzak *et al.*, 2013), variando notablemente la capacidad del control de las variables del cultivo y los costos de operación entre ambas formas.

Los sistemas de tratamiento de agua con microalgas ofrecen la ventaja del secuestro de CO<sub>2</sub> (Tsai *et al.*, 2012) y producción de biomasa que podría ser utilizada para la obtención de productos como biocombustibles (Razzak *et al.*, 2013), para lo que se requiere un mayor grado de control de variables fisicoquímicas, diseño de sistemas eficientes y selección de organismos que se adapten satisfactoriamente y produzcan los metabolitos de interés. Uno de los sistemas que se ha acercado prometedoramente es el denominado HRAP (High rate algal ponds), considerando el tratamiento de aguas residuales para la remoción de nutrientes, secuestro de CO<sub>2</sub> y producción de biodiesel (Park y Craggs, 2010; Park *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2012), basándose en un sistema abierto de producción, lo que le confiere algunas limitaciones si se quieren cumplir varios objetivos simultáneamente. El uso de fotobiorreactores ofrece un alto grado de control de las variables que afectan su cultivo y se utilizan ampliamente para la producción de biomasa o metabolitos específicos, sin embargo, su incorporación al tratamiento de aguas residuales representa altos costos que implican una baja rentabilidad aún con el valor agregado que se pudiera obtener de productos como el biodiesel (Craggs *et al.*, 2012). Actualmente se han realizado estudios que buscan resolver las limitaciones que se encuentran al querer incorporar estos sistemas al tratamiento de aguas residuales (Udom *et al.*, 2013; Wu, *et al.*, 2012).

### **Aguas producidas de la cuenca de Sabinas**

En México la NOM-143-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT, 2005), establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a la explotación de hidrocarburos (agua producida). Dicha norma ambiental indica la forma autorizada de realizar la disposición de dicho material, al cual define como agua salada que se encuentra dentro de los espacios porosos de la roca y partículas que forman los acuíferos confinados asociada a la presencia de

hidrocarburos. Contiene sales disueltas, como cloruros de calcio y sodio, carbonatos de sodio, cloruros de potasio, sulfatos de calcio o de bario, entre otros; puede incluso contener algunos metales. Estas aguas son modificadas en su composición al ser extraídas durante el proceso de producción de gas o petróleo al añadirles surfactantes geles e inhibidores para facilitar la extracción (Veil *et al.*, 2004), llamándoseles “aguas producidas”. Su composición es muy variable aun entre sitios de extracción cercanos y la mayoría de las aguas producidas pueden presentar una alta salinidad (Martel-Valles *et al.*, 2013).

Las aguas producidas representan un pasivo ambiental de la industria petrolera que podría ser utilizado para la producción de microalgas con las cuales se podrían obtener diferentes productos como biocombustibles y fertilizantes orgánicos entre otros. La producción de estas aguas está ligada a la dependencia que se tiene de hidrocarburos fósiles como energéticos. La disponibilidad de energía es indispensable para el desarrollo económico y social del país. En este sentido México cuenta con yacimientos de gas en la Cuenca de Sabinas, lo que representa un activo de suma importancia para su estabilidad económica (Dávila-Flores, 2013). La Cuenca de Sabinas al noreste del país en el estado de Coahuila y Nuevo León representa actualmente parte del proyecto más importante en México de extracción de gas no asociado. Sin embargo, la explotación de este recurso va aunado a la extracción de grandes cantidades de aguas producidas que representan riesgos de contaminación a la región donde se extraen (Orem *et al.*, 2014).

La extracción de aguas producidas tiene una tendencia a aumentar, por lo que es importante poner atención a su manejo y posible aprovechamiento. Durante el 2010 en México se obtuvieron  $12.24 \times 10^6 \text{ m}^3$  y para el 2013 se reportaron  $31.91 \times 10^6 \text{ m}^3$  de aguas producidas según el informe de sustentabilidad de Petróleos Mexicanos (PEMEX, 2013), mientras que en los Estados Unidos de América en el 2007, se generaron aproximadamente  $3.3 \times 10^9 \text{ m}^3$  de agua producida, en cerca de un millón de pozos productores de petróleo y gas (Veil, 2013), esperándose que aumente su producción doméstica

de hidrocarburos en un 44% antes del 2020 (Cueto-Felgueroso y Juanes, 2013). De forma general se espera que la producción no convencional de hidrocarburos aumente de forma dramática en las próximas décadas, requiriéndose un entendimiento de las características regionales del área de explotación para minimizar el impacto ambiental que se pudiera tener (Mauter *et al.*, 2014).

Las regiones desérticas y semidesérticas de donde se extrae este recurso podrían verse beneficiadas con el aprovechamiento de este recurso. La cuenca de Sabinas abarca un área de 37200 km<sup>2</sup>, situada en la parte central del estado de Coahuila y occidental de Nuevo León, el promedio de profundidad de los yacimientos de gas se encuentran a 3000 metros en yacimientos cretácicos del campo Monclova-Buena Suerte con una saturación de agua variable del 54 a 27 % (Eguiluz, 2007). Esta cuenca se encuentra dentro de la región hidrológica Rio Bravo, la cual presenta años secos con déficit que va desde -3 % hasta -97 %, y períodos de sequía cuya duración varía desde uno hasta 13 años consecutivos. Se considera que, en la mayor parte de la cuenca, el periodo de sequía extraordinaria se extendió prácticamente a lo largo de 14 años (1992-2005), y fue el más severo y prolongado del cual se tiene registro (Ortega-Gaucin *et al.*, 2011). Durante el periodo de 1996 al 2005 hubo escases severa de agua en esta región durante 7 meses por cada año. Esto originó pérdidas económicas, agrícolas y de aproximadamente 4,000 empleos anuales (Hoekstra *et al.*, 2012). En este sentido el gobierno de México público en el Diario Oficial de la Federación del día 5 de abril del 2013, una serie de acuerdos en los que suspende provisionalmente el libre alumbramiento de una serie de acuíferos de diferentes regiones hidrológicas administrativas, quedando dentro del acuerdo los acuíferos de la Región Carbonífera, Paredón, Sabinas-Parras y Monclova, entre otros, ubicados en la región hidrológica Rio Bravo. Por otra parte, el agua obtenida en la extracción de gas, podría ser utilizada en actividades agrícolas o industriales en la región semidesértica (Eguiluz *et al.*, 2003).

La opción más importante para el aprovechamiento de las aguas producidas pudiera ser dentro de la industria que las produce. Las actividades de exploración y explotación del gas shale requieren de grandes volúmenes de agua, por lo que el reusó del agua producida podría darse principalmente en estas actividades disminuyendo la competencia por el agua para otras actividades en la región, esta actividad se realiza con el 90% del agua producida en la cuenca de Marcellus en Estados Unidos de Norte América, mientras que en la cuenca de Barnett, la cantidad de producción supera la que se utiliza por lo que se inyecta a pozos profundos, la cantidad de solidos suspendidos en aguas producidas es un factor limitante para la compatibilidad de los aditivos químicos utilizados en el fracking, por lo que su reutilización no siempre es factible hasta ahora (Mauter *et al.*, 2014). En México los reportes de inyección de agua producida (agua congénita) en el año 2012 y el 2013 fueron 98 % y 67.59% respectivamente, según datos tomados del informe de sustentabilidad de Petróleos Mexicanos (PEMEX, 2013).

Otra alternativa para el uso de aguas producidas es la producción agrícola mediante un previo tratamiento para disminuir la salinidad (Gui-Hong y Sjursen, 2013). En este sentido el cultivo de tomate en invernadero con estas aguas es posible, previa caracterización e identificación de las fuentes más factibles y la disolución de aguas que presenten mayor riesgo para la producción de este cultivo (Martel-Valles *et al.*, 2013). La producción de microalgas es otra de las opciones que se estudian actualmente debido principalmente a los beneficios de la industria de las microalgas, su habilidad para crecer en ambientes complejos, las técnicas de cosecha en uso y las propiedades de los lípidos extraíbles (Hamawand *et al.*, 2014).



**III. Artículo:** EVALUACIÓN DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA ECONÓMICAMENTE ÚTIL USANDO AGUAS PRODUCIDAS

# EVALUACIÓN DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA ECONÓMICAMENTE ÚTIL USANDO AGUAS PRODUCIDAS

## Microalgae evaluation for the production of economically usable biomass using produced water

**Gerardo Salas-Herrera<sup>1</sup>, Adalberto Benavides-Mendoza<sup>1\*</sup>, Alejandro Zermeño-González<sup>1</sup>, Argentina Orta-Dávila<sup>2</sup>, Félix de Jesús Sánchez-Pérez<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ingeniería de Sistemas de Producción, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Blvd. Antonio Narro s/n, Buenavista. Saltillo. Coahuila, México. C.P. 25315. Teléfono: (844) 411-02-00, Ext. 2353 y 2354. ([gshalash@live.com.mx](mailto:gshalash@live.com.mx), [abenmen@uaaan.mx](mailto:abenmen@uaaan.mx), [azermeno@uaaan.mx](mailto:azermeno@uaaan.mx)). <sup>2</sup>Biorganix Mexicana, S.A. de C.V. Dirección: Aiera No 240 Ramos Arizpe, Coahuila, México. C.P. 25903 Tel: (844) 488-26-27. <sup>3</sup>Departamento de Estadística y Cálculo, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. ([fel1925@yahoo.com](mailto:fel1925@yahoo.com)). \*Autor para correspondencia: [abenmen@uaaan.mx](mailto:abenmen@uaaan.mx).

## RESUMEN

La producción de microalgas para la obtención de biodiesel y otros productos de valor es un tema al que se le dedican grandes esfuerzos. Sin embargo la producción de microalgas requiere grandes volúmenes de agua y para que su producción sea sustentable se requiere de buscar otras fuentes de agua que no compitan con la producción de alimentos. En este sentido las aguas producidas generadas por la industria petrolera podrían ser una fuente de agua alternativa por lo que para el presente estudio se evaluó la adaptación y el crecimiento de tres cepas de microalgas halotolerantes en dos fuentes de agua producida de la cuenca de Sabinas al noreste de México. Se encontró que una de las fuentes de agua producida, de la estación Monclova 1, tiene potencial para su aprovechamiento utilizando la microalga *Nannochloropsis* sp. que presentó mayor adaptabilidad a esta agua siendo una buena candidata para futuras investigaciones. Por otra parte, *I. galbana* no tolero la presencia de agua producida en el medio, sin embargo, al resembrar los tratamientos

presento una respuesta de crecimiento poblacional positiva, lo que evidencia la capacidad de bioremediación de esta cepa.

**Palabras clave:** *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *biodiesel*, *bioremediación*.

### **Abstract**

The microalgae production to obtain biodiesel as well as valuable products is an issue in which are devoting great efforts. However, the microalgae production requires large volumes of water and to make it sustainable other water sources that do not compete with food production is required. For this reason produced water generated by the oil industry could be an alternative source, for that in the present study, growth and adaptability of three strains of halotolerant microalgae were evaluated in two produced waters sources from the Sabinas basin at the northeast of Mexico. One of the sources of produced water, from Monclova 1 station, was found to have potential for use using the microalga *Nannochloropsis sp.* which presented greater adaptability to this water, making it good candidate for future research. On the other hand, *I. galbana* does not tolerate the presence of produced water in the medium, however, after a second inoculum, presented a positive response of population growth, which demonstrates the capacity of bioremediation of this strain.

**Index words:** *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *biodiesel*, *bioremediation*.

### **INTRODUCCIÓN**

Las aguas producidas generadas por la industria petrolera podrían aprovecharse como medio de cultivo para microalgas, lo que permitiría utilizar un recurso que representa altos costos para su tratamiento y disposición durante la extracción de hidrocarburos. El mayor impacto de su aprovechamiento se esperaría en las regiones con menor disponibilidad de

recursos hídricos. Además de los beneficios que se podrían obtener de la biomasa producida, las microalgas podrían disminuir la carga tóxica de algunos compuestos presentes en estas aguas (Bacellar-Mendes *et al.*, 2013) que representan riesgos de contaminación en la región en donde se extraen (Orem *et al.*, 2014). La capacidad de bioremediación de las microalgas ha sido demostrada en otros efluentes removiendo nitrógeno y fosforo de aguas residuales municipales (Shi *et al.*, 2007) y algunos metales pesados de las descargas de la industria minera (Das *et al.*, 2009).

Las microalgas son utilizadas para la obtención de productos de carotenos, ácidos grasos de cadena larga poli-insaturados (Walker *et al.*, 2005) y polisacáridos sulfatados (Raposo *et al.*, 2013). La obtención de biodiesel a partir de microalgas es otro tema ampliamente estudiado (Duong *et al.*, 2012) ya que estos organismos presentan de 4 a 50 % de lípidos en sus células, además de una alta tasa de crecimiento, de dos a 10 veces mayor que la de las plantas terrestres. Esta diferencia es explicada por el hecho de que todas las células son fotosintéticas, pudiendo doblar la población en 6 a 12 h. La producción de microalgas puede darse durante todo el año cuando las condiciones de temperatura, iluminación, disponibilidad de agua y nutrientes son adecuadas, no compiten con la producción de alimentos y son cultivables en aguas residuales aprovechando los nutrientes disueltos en estas (Subramanian *et al.*, 2013).

Los requerimientos de agua para la producción de microalgas son considerables. Yang *et al.* (2011), calcularon que para producir 1 kg de biodiesel se requieren 3726 kg de agua, sin embargo si se utiliza agua de mar o aguas residuales como medio de cultivo para la producción de la biomasa, estos requerimientos se reducen hasta en un 90% y se disminuye la necesidad de algunos nutrientes. Esta alternativa de utilizar aguas residuales para la producción de microalgas con el fin de producir biodiesel ha sido estudiada por varios investigadores (DOE, 2010; Wu *et al.*, 2012), sin embargo aún hay poca información para el aprovechamiento de aguas producidas como medio de

cultivo para las microalgas. Con el uso de aguas producidas obtenidas de una planta de tratamiento Arriada y Abreu (2014) lograron el crecimiento de la microalga *Nannochloropsis oculata*, mientras que Sullivan *et al.*, (2011) lograron cultivar *Nannochloropsis salina* sin necesidad de tratamiento del agua, utilizando solamente mezcla de fuentes de agua para obtener ciertos niveles de salinidad. Por su parte Hamawand *et al.* (2014) evaluaron la posibilidad de usar el agua extraída con el gas asociado al carbón (Coal Seam Gas) para el cultivo de microalgas, concluyendo que es factible aplicando un tratamiento químico previo del agua usando ácido acético.

Las aguas producidas contienen sales disueltas, como cloruros de calcio y sodio, carbonatos de sodio, cloruros de potasio, sulfatos de calcio o de bario, entre otros; puede incluso contener iones de metales. Las aguas producidas originalmente son aguas congénitas ubicadas en los estratos profundos de las formaciones geológicas (Martel-Valles *et al.*, 2013; Martel-Valles *et al.*, 2014). Cuando son extraídas durante el proceso de producción de gas o petróleo se les añaden diversas sustancias como surfactantes, geles e inhibidores para facilitar la extracción y es entonces que su composición es modificada y se les llama agua producida (Veil *et al.*, 2004). Su composición es muy variable aun entre sitios de extracción inclusive cercanos y la mayoría de las aguas producidas tienen una salinidad mayor que el agua de mar (Martel-Valles *et al.*, 2013), por lo que se busca su aprovechamiento para el desarrollo de microalgas halotolerantes.

Durante el 2010 en México se obtuvieron  $12.24 \times 10^6 \text{ m}^3$  y para el 2013 se reportaron  $31.91 \times 10^6 \text{ m}^3$  de aguas producidas según el informe de sustentabilidad de Petróleos Mexicanos (PEMEX, 2013), mientras que en los Estados Unidos de América en el 2007, se generaron aproximadamente  $3.3 \times 10^9 \text{ m}^3$  de agua producida, en cerca de un millón de pozos productores de petróleo y gas (Veil, 2013), esperándose que aumente su producción doméstica de hidrocarburos en un 44% antes del 2020 (Cueto-Felgueroso y Juanes, 2013).

En este estudio se evaluó la tolerancia, el crecimiento y la posibilidad de obtener biomasa aprovechable de 3 cepas de microalgas marinas (*Isochrysis galvana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Nannochloropsis* sp) usando aguas producidas obtenidas de la Cuenca de Sabinas en el noreste de México, como una alternativa para la utilización de este potencial recurso hídrico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el presente estudio se utilizaron muestras de agua producida provenientes de las estaciones de pozos Monclova 1 y Buena Suerte ubicados en la Cuenca de Sabinas, las cuales recibían aportes de agua de hasta 25 pozos aledaños a cada estación y fueron caracterizados previamente por Martell-Valles *et al.* (2013).

Las microalgas evaluadas fueron *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galvana* y *Nannochloropsis* sp obtenidas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California. Los trabajos experimentales se desarrollaron en las instalaciones de Biorganix Mexicana SA de CV en el municipio de Ramos Arizpe, Coahuila cuyas coordenadas geográficas son 25° 32' latitud norte, 100° 57' longitud oeste a una altitud de 1380 msnm.

Todo el material utilizado fue previamente esterilizado en autoclave, el agua salada fue filtrada con filtro Millipore de 0.22 µm y las siembras se realizaron en una campana de flujo laminar previamente esterilizada y en presencia de flama. Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 90 ml de medio de cultivo para los testigos y tratamientos. El agua salada se preparó con sales de mar artificiales (Instant Ocean) disolviendo 35 gr de sales por litro de agua destilada, se utilizó el medio nutritivo F/2 de Guillard (Guillard y Ryther, 1962) en todos los tratamientos. Durante los bioensayos las unidades experimentales fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 20 +/- 1°C con un fotoperiodo de 12:12 horas luz/obscuridad iluminada con diodos emisores de luz (led) y lámparas de halógeno con una emisión de 7.7 y

14.3  $\mu\text{ mol/m}^2/\text{s}$  respectivamente y solo se extrajeron para la toma de muestras para los conteos poblacionales, medición de pH y conductividad eléctrica (CE), regresándolas a su ubicación original después de los registros. En estas mismas condiciones se mantuvieron los cultivos primarios, los cuales se renovaron cada 8 días tomando 15 ml de inóculo y sembrándolo en 135 ml de agua de mar artificial con medio F/2 manteniéndolos en fase de crecimiento exponencial para la siembra de los tratamientos. De estos cultivos se tomaron 10 ml de inóculo para la siembra de los tratamientos. La densidad de siembra fue dependiente del tamaño de la cepa, teniendo las mayores densidades con *Nannochloropsis sp* seguido de *Isochrysis galbana* y las menores con *Dunaliella tertiolecta*. ( $5.53 \times 10^5$ ,  $2.74 \times 10^5$  y  $0.56 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  respectivamente). Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. Los conteos poblacionales se realizaron cada 2 a 3 días haciendo 3 conteos en cámara Neubauer por unidad experimental con la ayuda de un microscopio de contraste de fases. Las cepas móviles fueron previamente fijadas con una solución de formol al 4% para su conteo (FAO, 1996).

Las mediciones de pH y CE se realizaron con un potenciómetro y un conductivímetro marca Horiba Laqua twin modelos B713 y B771 respectivamente. La radiación PAR fue medida con un sensor de radiación fotométrica Li-cor quantum modelo Q40808 y un dataloguer LI-1400.

Para el cálculo de la tasa específica de crecimiento se utilizó la siguiente ecuación (García *et al.*, 2007):

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

donde  $x_1$  y  $x_2$  es el número de células en los tiempos en días  $t_1$ ,  $t_2$ , respectivamente.

El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar para minimizar las diferencias que se pudieran tener en el crecimiento ocasionadas por las condiciones lumínicas dentro de la cámara de crecimiento ubicando al

primer bloque iluminado directamente con las lámparas de halógeno (con  $14.3 \mu \text{ mol/m}^2/\text{s}$ ), el segundo bloque quedo situado al centro de la cámara de crecimiento (con  $4.2 \mu \text{ mol/m}^2/\text{s}$ ) y el tercer bloque hacia el fondo con incidencia directa de la luz led (con  $7.7 \mu \text{ mol/m}^2/\text{s}$ ), de tal manera que todos los tratamientos quedaran expuestos a las diferentes condiciones lumínicas y de esta manera poder bloquear las diferencias en iluminación. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan. Los datos fueron analizados con el programa "R" (R Development Core Team, 2013).

Para la evaluación de la capacidad de las microalgas para tolerar y desarrollarse en aguas producidas se realizaron 3 experimentos (Cuadro 1).

Primer experimento: Se evaluó cual de las dos procedencias de agua producida mezclada al 5% (v/v) con agua de mar artificial mostraba un mejor desarrollo de las microalgas. La mezcla fue necesaria ya que en un trabajo previo se demostró que las aguas producidas aplicadas sin dilución son tóxicas para las plantas (Martel-Valles *et al.*, 2013). Este mismo experimento fue útil para evaluar el efecto de la presencia de las microalgas sobre el pH y CE de la mezcla de agua salada y agua producida. Transcurridos siete días después de la primera siembra se resembraron las microalgas en cada tratamiento para evaluar el crecimiento después de haberse modificado el medio de cultivo con la siembra inicial. El experimento duró en total 11 días y con los resultados de esta etapa se seleccionó el agua producida proveniente de la estación Monclova para los siguientes experimentos.

Segundo experimento: Se buscó aprovechar la composición propia del agua producida, por lo que se diluyó hasta obtener una CE cercana a la del agua de mar ( $48 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (Nwoye *et al.*, 2014). Se mezcló el agua producida con agua destilada, a una concentración de 25, 20 y 15% de agua producida, obteniendo una CE de 57, 52.2 y  $38.4 \text{ mS cm}^{-1}$  respectivamente. Estas mezclas con diferente CE se aplicaron en el medio nutritivo f/2 y constituyeron los tratamientos en donde se sembraron las microalgas, los tratamientos fueron



resembrados a los 7 días de haberse iniciado, teniendo el experimento una duración de 17 días.

En el tercer experimento se hicieron las exposiciones utilizando un 3, 5 y 7% de agua producida combinada con agua de mar (artificial), ya que según los resultados del experimento 1 y pruebas preliminares la tolerancia de estas microalgas se encontraba alrededor de estas concentraciones. La salinidad del agua para la dilución del agua producida en esta etapa se redujo a  $36.6 \text{ mS cm}^{-1}$ . La duración de los experimentos fue de 36 días para las cepas de *D. tertiolecta* e *I. galbana* y de 39 días para *Nannochloropsis sp.* En esta etapa se resembraron los tratamientos con 5 ml de inóculo en la fase de crecimiento exponencial a los 9 días de iniciados los bioensayos. La tasa de crecimiento para esta etapa se calculó en 4 periodos de tiempo, 0 a 9, 9 a 18, 18 a 29 y 29 a 36 días después de iniciado el experimento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimento 1: Selección del agua producida.

En los tratamiento con agua de Buena Suerte al 5% se registró un cambio en el pH de 6.8 a ligeramente arriba de 8.0 después de dos días de la exposición (Cuadro 2), la CE de los tratamientos mostraron una ligera disminución de poco más de 2 mS/cm hacia el final. Todas las cepas floclaron formando un precipitado en el fondo del matraz (Figura 1), sin lograr crecimientos de las microalgas al reinocular el medio y sin identificar al agente floclante. La floclación de las microalgas pudo deberse a la presencia de iones de metales, los cuales tienen la capacidad de neutralizar la superficie celular cargada negativamente, algunos de los iones que tienen este efecto en las microalgas se derivan del sulfato de aluminio y del cloruro férrico (Udhaya *et al.*, 2014), el pH del medio de cultivo afecta no solo la carga de la superficie celular de las microalgas, sino también la acción de los floclantes químicos. Los mecanismos más comunes que originan la floclación son: neutralización de cargas, la formación de un parche electroestático, puentes entre polímeros o

coloides cargados y la superficie de dos partículas y por la precipitación masiva de un mineral atrapando partículas en suspensión. Estos mecanismos pueden actuar independientemente o en conjunto (Vandamme *et al.*, 2013). La disminución en la CE en este caso pudo deberse a la precipitación de algunos iones junto con la floculación de las microalgas. El aumento en el pH puede explicarse por el aporte de  $\text{OH}^-$  por parte de las células de microalgas vivas y muertas, tal como ha sido reportado que ocurre en medios naturales (Li *et al.*, 2008). Al resembrar los tratamientos a los siete días no se registraron nuevos cambios en la CE y el pH, sin embargo no se obtuvo crecimiento de ninguna de las tres cepas. Martel-Valles *et al.* (2013) reportaron un alto contenido de hidrocarburos de fracción media en el agua producida de la estación Buena Suerte ( $103.2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) (Cuadro 3). Se han reportado efectos tóxicos de diésel en microalgas marinas en concentraciones de 1 a 5 ppm (Mahoney y Haskin, 1980), por lo que la presencia de hidrocarburos de fracción media así como la presencia de agentes floculantes en el agua producida de la Estación Buena Suerte, pudieran ser los principales factores que limiten su aprovechamiento para el cultivo de microalgas.

Por otro lado al preparar los tratamientos al 5% de agua producida de la estación Monclova 1 se registró una CE de  $54 \text{ mS cm}^{-1}$  y un pH de 7.9. La CE de estos tratamientos estuvo por encima de los  $46.2 \text{ mS cm}^{-1}$  registrados en el medio para los testigos, siendo este un medio hiperosmótico que pudo ser un factor más de estrés aunado a la presencia de otros componentes como metales e hidrocarburos en las aguas producidas. Los tratamientos con *D. tertiolecta* tuvieron una variación muy ligera del pH durante los 7 días de exposición (Cuadro 2). En contraste en los tratamientos con *I. galbana* y *Nannochloropsis sp.* el pH presentó una ligera disminución al inicio del experimento y aumento ligeramente por encima de 8.0 hacia el final de este, esta variación en el pH pudiera ser consecuencia del intercambio de iones de la células con el medio hiperosmótico. La exposición de microalgas a altas salinidades se vio reflejada en la disminución de la tasa de crecimiento, esta disminución puede ser atribuida al desbalance iónico que las células presentan

por la pérdida de agua, lo que origina una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno que originan estrés oxidativo. La capacidad de recuperación frente al estrés es variable de una especie de microalga a otra, e involucra la inducción de antiporters como los de  $H^+/Na^+$  y la protección de los sistemas fotosintéticos con antioxidantes (Martínez-Roldán *et al.*, 2014).

Al resembrar los tratamientos con agua de la estación Monclova 1 con 10 ml de inóculo se lograron crecimientos poblacionales de *I. galbana* y *Nannochloropsis sp.* (Cuadro 4), este crecimiento pudo deberse a una disminución en la carga tóxica por el efecto de bioremediación por las microalgas al inicio del experimento. Entre las características físico-químicas del agua producida de la Estación Monclova 1 que pudieran limitar el crecimiento de las microalgas está la gran cantidad de sólidos disueltos totales y la presencia de metales pesados (Cuadro 3). La bioremediación con microalgas de aguas contaminadas con metales pesados se da en dos fases, la primera es la adsorción, un proceso biofísico que puede completarse en segundos a pocos minutos y puede llevarse a cabo aún en células no viables, después se da la absorción que es la internalización de los iones metálicos al citoplasma celular y es dependiente del metabolismo (Dwivedi, 2012). Considerando los resultados obtenidos se decidió continuar la experimentación con el agua producida de la estación Monclova 1 y descartar el agua producida de la estación Buena Suerte, ya que con esta última se requerirían estrategias diferentes para buscar su aprovechamiento como medio de cultivo. A pesar de no haber obtenido crecimientos de *D. tertiolecta* al seleccionar el agua producida, se consideró la cepa para las siguientes etapas ya que los resultados obtenidos para esta cepa no pueden ser explicados totalmente por los tratamientos con las aguas producidas. Es probable que *D. tertiolecta* aún no se adaptara a la baja iluminación. Se manejó esta iluminación ya que podría aumentar las posibilidades de adaptación a estas aguas tomando en cuenta que el incremento de esta al igual que la temperatura podrían aumentar la toxicidad provocada por hidrocarburos en algunas algas (Lewis y Pryor, 2013) y las aguas producidas con las que se realizaron los experimentos contenían

principalmente hidrocarburos de fracción ligera (103.2 y 1.8 mg L<sup>-1</sup>) y grasas y aceites (18.10 y 10.40 mg L<sup>-1</sup>) para las aguas de Buena Suerte y Monclova respectivamente (Cuadro 3).

### **Experimento 2: Evaluación de la salinidad en el agua producida de la estación Monclova 1 para sustentar el cultivo de las microalgas.**

De la dilución del agua producida de la estación Monclova al 25, 20 y 15 % se obtuvieron los tratamientos con una CE de 57, 52.2 y 38.4 mS cm<sup>-1</sup> y un pH de 5.8, 5.2 y 5 respectivamente, mientras que el testigo presentó una CE de 40.5 mS cm<sup>-1</sup> y un pH de 8.2. El pH en los tratamientos aumentó ligeramente después de la exposición de las microalgas tanto después de la siembra como después de resembrar los tratamientos, mientras que la CE disminuyó después de la siembra y después de resembrar los tratamientos solo disminuyó en las exposiciones de *Nannochloropsis sp.* aumentando en los tratamientos con *I. galbana* y *D. tertiolecta* (Cuadro 5). No se lograron crecimientos de ninguna de las cepas aún después de resembrar los tratamientos de *D. tertiolecta* e *I. galbana* a los 7 días de exposición y *Nannochloropsis sp.* a los 10 días. El monitoreo de este experimento se extendió a 17 días desde la siembra, ya que *Nannochloropsis sp.* permaneció en suspensión y con coloración verde en el matraz siendo más notorio en las concentraciones de 20 y 25% (Figura 2), sin embargo al no obtener crecimiento poblacional se suspendió el experimento.

Entre los múltiples factores que pudieron haber afectado la adaptabilidad de las microalgas a los tratamientos con agua producida de la estación Monclova 1 está el bajo valor del pH, la composición iónica de la mezcla y el posible efecto de toxicidad de algunos de los metales u otros compuestos presentes en el agua producida (Cuadro 3). En cuanto al pH registrado de 5 a 5.8 al inicio pudiera no ser un factor limitante si fuera la única variable fuera de las condiciones cercanas a las ideales presentes en el testigo. Sobre ello Kaplan *et al.* (1986) reportaron que en un rango de pH de 5 a 9 no hay un efecto significativo en la tasa de crecimiento de *I. galbana*, siendo el pH la única variable de estudio. Sin embargo, en este experimento están en juego otros

factores de estrés aportados por las aguas producidas. En las exposiciones al 5% de agua producida de la estación Monclova 1 de la etapa experimental 1 pudo corroborarse un efecto de bioremediación con la siembra inicial que favoreció el crecimiento en la resiembra, sin embargo, en esta etapa disminuyó el pH de los tratamientos lo que pudo originar la disminución de los sitios de adsorción de iones metálicos por las microalgas. El pH del medio aumenta con el secuestro de iones metálicos en 0.1 a 1 unidades (Dwivedi, 2012), esta relación entre pH y concentración de agua producida pudieron ser los factores que más limitaron el desarrollo de las microalgas en estas condiciones. Por otra parte, la aparente permanencia en la viabilidad de los tratamientos con *Nannochloropsis sp.* pudo deberse en parte a la ventaja que le aporta el pequeño tamaño celular de esta cepa, permitiendo una superficie activa más grande por unidad de biomasa y mayor densidad de siembra. Otro factor que pudo favorecer el proceso de bioremediación al aumentar la concentración de agua producida en la dilución fue el pH de 5.8 al 25 %, en comparación con el pH de 5 al 15 %, lo que pudo aumentar la capacidad de adsorción de las células como se comentó anteriormente. Si bien es posible que la carga tóxica haya disminuido más en las concentraciones más elevadas de aguas producidas en los tratamientos con *Nannochloropsis sp.*, la CE en estos tratamientos también fue de  $57 \text{ mS cm}^{-1}$  que comparado con  $40.5 \text{ mS cm}^{-1}$  del testigo y  $44 \text{ mS cm}^{-1}$  del agua de mar, constituye un tratamiento hiperosmótico. Martínez-Roldán *et al.* (2014), reportan que *Nannochloropsis sp.* responde al aumento en la salinidad de 27 (testigo) a  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl con un decremento en la concentración de clorofila a, reduciendo hasta en un 60% la eficiencia de los fotosistemas, disminuyendo el crecimiento celular y la tasa fotosintética neta. Por lo que la alta salinidad reflejada en la CE de los tratamientos al 20 y 25% podría ser el factor que finalmente impidió el crecimiento de *Nannochloropsis sp.* después de la resiembra en estos tratamientos.

### **Experimento 3: Viabilidad de las microalgas en presencia de agua producida de la estación Monclova 1**

La interacción de las microalgas con el medio se evidencia en las variaciones de pH y CE de los tratamientos. Los cambios más marcados fueron en los primeros cuatro días de exposición (Figura 3-A), donde el pH disminuye después de la siembra y aumenta hacia el cuarto día con una baja más pronunciada en la concentración del 7% de agua producida, donde el aumento del pH fue más lento. Esta variación en el pH es similar a la encontrada en la etapa 1, solo que en esta ocasión se detectó en las tres cepas. Por otra parte la CE presentó fluctuaciones en los primeros cuatro días con una tendencia a disminuir y con las fluctuaciones más marcadas en la concentración al 7% de agua producida. Estas variaciones no reflejan directamente el crecimiento poblacional de las cepas estudiadas (Figura 3-B), sino que son el resultado de la interacción fisicoquímica y metabólica de las células con el tratamiento.

La primer respuesta de las microalgas al exponerlas al medio es la interacción de la pared celular con los iones disueltos, así como una tendencia a la deshidratación y contracción celular en caso de que el medio sea hiperosmótico, dentro de este proceso de estabilización de las células en relación al medio se pudieron originar los cambios registrados en cuanto al pH y la CE, entre mayor fue la concentración de agua producida, mayor fue la exigencia metabólica para que las microalgas lograran su homeostasis, esto se vio reflejado en la tasa de crecimiento alcanzada a los nueve días en *D. tertiolecta* y *Nannochloropsis sp.*, donde la mejor tasa de crecimiento se registró en los testigos seguidos del tratamiento de *D. tertiolecta* al 3%. Las tasas de crecimiento más bajas y sin diferencias significativas se detectaron en *Nannochloropsis sp* al 3, 5 y 7% y *D. tertiolecta* al 5 y 7%. Por otra parte *I. galbana* no presento crecimiento en ninguno de los tratamientos a excepción del testigo (Cuadro 6).

Se resembraron los tratamientos a los 9 días, aumentando la CE hacia el día 15 para mantenerse con ligeras variaciones hasta el final del experimento,

terminando con una CE ligeramente menor a la inicial del experimento. El pH tuvo una tendencia gradual a aumentar hasta el día 28 de experimentación, estas variaciones pueden estar ligadas al crecimiento poblacional de las cepas por la toma de carbón inorgánico para la fotosíntesis y nutrientes del medio.

Después de resembrar los tratamientos hubo una buena respuesta de *I. galbana*, en los tratamientos con 3 y 5 % de agua producida, mientras que al 7% de agua producida esta cepa solo mostró crecimiento hasta el tercer período de tiempo (18 a 29 días), habiendo logrado crecimientos en los tres tratamientos aunque con una densidad celular final con diferencias significativas entre cada tratamiento y menor conforme aumentó la concentración de aguas producidas (Cuadro 7). Este mismo efecto en la reducción de la concentración celular en respuesta al aumento en la concentración de AP fue detectado con *D. tertiolecta*, solo que el crecimiento se registró durante el primer periodo de tiempo (0 a 9 días) y después de resembrar los tratamientos no se detectó una mejora sustancial en la tasa de crecimiento decayendo la población en la exposición al 7% de AP, lo que sugiere que en esta cepa se generó una deficiencia, posiblemente por la interacción del medio nutritivo con el agua producida más que un efecto de toxicidad. La mejor respuesta a la presencia de AP se detectó con *Nannochloropsis sp.* al presentar una tasa de crecimiento positiva en los tratamientos durante todo el experimento, aunque muy baja en comparación con la que se obtuvo con el testigo en el primer periodo, se mantuvo constante obteniendo una mayor densidad celular final en el testigo seguido de los tratamientos al 7 y 5% y con la menor concentración y sin diferencias significativas con los tratamientos de 3 y 5% de AP (Cuadro 7).

La toxicidad producida por metales pesados disueltos en el medio está en función de la densidad celular. Debelius *et al.* (2009) utilizaron el termino de cuota tóxica celular (toxic cellular quota) como la masa de metal por célula, en el caso del  $\text{Cu}^{++}$  al aumentar la densidad celular menos cobre es adsorbido por unidad de superficie de pared celular, por lo que hay menor trastorno en la división celular, esto explicaría un aumento en la toxicidad de un metal al

disminuir la densidad celular. La densidad de siembra fue mucho menor en los tratamientos de *Dunaliella t.* ( $0.86 \times 10^5$  cel ml<sup>-1</sup>) que con *Isochrysis g.* ( $5.46 \times 10^5$  cel ml<sup>-1</sup>) y que *Nannochloropsis sp* ( $22.96 \times 10^5$  cel ml<sup>-1</sup>), esto por la gran diferencia en el tamaño de las células que hay entre estas tres cepas, lo que podría representar una ventaja para las microalgas más pequeñas al momento de interactuar la superficie celular con el medio adverso al presentar una mayor superficie de adsorción por unidad de biomasa. El tamaño de las células también afecta la susceptibilidad de las microalgas a la contaminación con hidrocarburos aromáticos poli cíclicos, siendo más susceptibles las células de menor volumen (Echeveste *et al.*, 2010), en este aspecto habría que evaluar el efecto de la densidad celular para verificar si existe alguna ventaja o desventaja en el cultivo de las células más pequeñas en presencia de estos contaminantes. Aunque en el presente estudio no se identificaron los factores del agua producida que ocasionaron un efecto toxico en las microalgas, se evidencia la interacción de las microalgas y principalmente de *Isochrysis g* con este posible factor de toxicidad que de alguna manera fue bloqueado por la siembra inicial y permitió el crecimiento de la misma cepa al resembrar el medio.

En este estudio destacan los resultados obtenidos con *Nannochloropsis sp* la cual es considerada como una buena candidata para la producción de lípidos con miras hacia la producción de biodiesel utilizando otras fuentes de aguas residuales (Jiang *et al.*, 2011). Roleda *et al.* (2013) destaca a *Nannochloropsis oculata* como la cepa más robusta entre seis especies de microalgas oleaginosas para crecer y acumular lípidos en un amplio rango de condiciones ambientales. En los resultados obtenidos por Arriada y Abreu (2014) con *Nannochloropsis oculata* expuesta a aguas producidas en Brasil al 50 y 100% reportan tasas de crecimiento del 0.12 y 0.06 respectivamente, mientras que para el testigo reportan una tasa de crecimiento de 0.13, con una duración experimental de 18 días. En el presente estudio se obtuvo la máxima tasa de crecimiento de 0.19 en el primer periodo (Cuadro 6) para los testigos, mientras que los tratamientos presentaron su máxima tasa de crecimiento en los periodos de tiempo 2 y 3 siendo de 0.10, 0.078 y 0.089 para los tratamientos



al 3, 5 y 7%, con una duración experimental de 36 días. La variabilidad de las características fisicoquímicas de las aguas producidas es un factor determinante para su posible aprovechamiento en la producción de microalgas, como se puede apreciar por los resultados obtenidos en este trabajo con el agua producida de la estación Buenas Suerte y Monclova 1 y su contraste con los resultados del trabajo con aguas producidas de Brasil.

## **CONCLUSIONES**

La opción del agua producida de la estación Monclova 1 tiene mayor potencial para su aprovechamiento que el agua producida de la estación Buena Suerte. La cepa de *Isochrysis galbana* presentó la mejor recuperación después de la resiembra en los tratamientos al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova 1, por lo que su potencial podría ser para la bioremediación. *Isochrysis galbana* así como *Dunaliella tertiolecta* disminuyeron su tasa de crecimiento y densidad poblacional final en relación directa con el aumento en la concentración de aguas producidas a diferencia de *Nannochloropsis sp*, la cual presentó la menor concentración celular en el tratamiento con la menor concentración de agua producida, lo que la convierte en una buena candidata para estudios posteriores para el aprovechamiento de este recurso.

**Cuadro 1:** Preparación de los tratamientos de las 3 etapas experimentales. El pH y la CE corresponden al registrado en los tratamientos antes de la siembra.

Etapa y Objetivo	Origen AP	Vol. AP ml	Vol. agua salada	Vol. agua dest.	Vol. inóculo	Vol. re siembra	CE mScm <sup>-1</sup>	pH
1: Selección de AP	B.S.	5 ml	85 ml	0 ml	10 ml	10 ml	47.1	6.8
	M1	5 ml	85 ml	0 ml	10 ml	10 ml	54	7.9
	Testigo	0 ml	90 ml	0 ml	10 ml	0 ml	46.2	8.2
2: Evaluación de salinidad en AP M1	M1	15 ml	0 ml	75 ml	10 ml	10 ml	38.4	5
	M1	20 ml	0 ml	70 ml	10 ml	10 ml	52.2	5.2
	M1	25 ml	0 ml	65 ml	10 ml	10 ml	57	5.8
	Testigo	0 ml	90 ml	0 ml	10 ml	0 ml	40.5	8.2
3: Viabilidad de microalgas en presencia AP	M1	3 ml	87 ml	0 ml	10 ml	5 ml	42.8	7.8
	M1	5 ml	85 ml	0 ml	10 ml	5 ml	46.8	7.7
	M1	7 ml	83 ml	0 ml	10 ml	5 ml	49	7.6
	Testigo	0 ml	90 ml	0 ml	10 ml	0 ml	36.6	8.2

AP: Agua producida, CE y pH registrados en los testigos y tratamientos antes de inocular las microalgas, BS: Agua producida de la estación Buena Suerte, M1: Agua producida de la estación Monclova 1.

**Cuadro 2:** Variación del pH y CE durante la exposición al 5% de aguas producidas en el experimento 1.

Tratamiento	Cepa	Población		pH inicial	pH 2° día	pH 7° día	CE inicial mS/cm	CE final mS/cm
		n inicial x10 <sup>5</sup>	Población día 9 x 10 <sup>5</sup>					
Testigo	<i>D. t</i>	0.56	0.41	8.15	8.33	8.36	46.05	44.34
	<i>I. g</i>	2.74	10.70	8.15	8.40	8.33	46.05	44.8
	<i>N. sp.</i>	5.53	14.90	8.15	8.33	8.36	46.05	44.8
Monclova 1	<i>D. t</i>	0.56	0.37	7.90	8.20	7.93	54	52.9
	<i>I. g</i>	2.74	2.10	7.90	7.29	8.10	54	53.2
	<i>N. sp.</i>	5.53	3.23	7.90	7.26	8.16	54	52.8
Buena Suerte	<i>D. t</i>	0.56	0.00	6.80	8.10	8.23	47.1	44.4
	<i>I. g</i>	2.74	0.00	6.80	8.03	8.20	47.1	45
	<i>N. sp.</i>	5.53	0.00	6.80	8.10	8.16	47.1	44.4

*D.t:* *D. tertiolecta*, *I.g:* *I. galbana* y *N. sp:* *Nannochloropsis sp.*

**Cuadro 3:** Características de las aguas producidas de acuerdo a la NOM-143-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT-2005). Las concentraciones se expresan en mg L<sup>-1</sup> con excepción del pH. Tomado de Martel-Valles *et al.* (2013).

Parámetro	Buena Suerte	Monclova 1	Parámetro	Buena Suerte	Monclova 1
pH	4.43	6.5	P total	<0.30	0.30
Hidr. fracc. ligera	<0.30	<0.30	N Kjeldahl	30.50	66.90
Hidr fracc, media	103.2	1.80	Nitritos	0.06	<0.02
DBO	12553.00	499.3	Nitratos	4.34	0.93
Hidr. fracc. Pesada	<4.10	<4.10	Zn <sup>+2</sup>	0.78	0.17
Solidos sedimentables	<1.10	<0.10	Pb <sup>+2</sup>	<0.50	1.77
Materia flotante	Ausente	Ausente	Ni <sup>+2</sup>	<0.10	1.22
Solidos totales	10760.00	153750.00	Cd <sup>+2</sup>	<0.05	0.37
Sólidos disueltos tot.	10732.00	153750.00	Cu <sup>+2</sup>	<0.10	0.148
Sólidos suspendidos tot.	28.00	<9.00	Hg <sup>+2</sup>	<0.001	<0.001
Solidos volátiles totales	6110.00	20570.00	As <sup>+3</sup>	<0.001	<0.001
Suma de nitrógenos	34.9	67.83	Cr <sup>+3</sup>	<0.10	0.39
Grasas y aceites	18.10	10.40			

**Cuadro 4:** Tasas de crecimiento en las exposiciones al agua producida de la estación Monclova 1 al 5% (Etapa 1), los tratamientos presentaron crecimiento poblacional hasta después de resembrar el tratamiento.

Tratamiento	Cepa	Densidad inicial	Densidad máxima	Tiempo de crecimiento	TEC
Testigo	<i>Dunaliella t.</i>	0.560	nd	*	nd
Testigo	<i>Isochrysis g.</i>	2.743	10.700	9 días	0.144
Testigo	<i>Nannochloropsis sp.</i>	5.533	19.333	9 días	0.140
Monclova 1	<i>Dunaliella t.</i>	0.420	nd	*	nd
al 5%	<i>Isochrysis g.</i>	6.100	11.067	4 días	0.148
resiembra	<i>Nannochloropsis sp.</i>	8.900	29.467	4 días	0.299

\**D. tertiolecta* no mostro crecimiento en esta etapa. TEC: Tasa especifica de crecimiento.

**Cuadro 5:** Variación del pH y CE ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) en las exposiciones al agua producida de la Estación Monclova 1 diluida al 15 20 y 25 % con agua destilada. *D.t:* *D. tertiolecta*, *I.g:* *I. galbana* y *N. sp:* *Nannochloropsis sp.*

		Inicio	3er día	Resiembra	Final	Inicio	3er día	Resiembra	Final
Testigo	<i>D. tertiolecta</i>	8.20	8.16	8.07	8.26	40.5	39.5	45.2	44.5
M 15%	<i>D. tertiolecta</i>	5.00	6.23	6.77	6.75	38.4	35.4	43.1	39.0
M 20%	<i>D. tertiolecta</i>	5.20	6.69	6.89	6.93	52.2	48.5	54.3	52.2
M 25%	<i>D. tertiolecta</i>	5.80	6.69	6.96	7.06	57.0	54.2	57.0	58.2
Testigo	<i>I. galbana</i>	8.20	8.23	8.53	8.22	40.5	39.5	45.3	43.9
M 15%	<i>I. galbana</i>	5.00	6.52	7.16	6.43	38.4	35.2	41.7	39.0
M 20%	<i>I. galbana</i>	5.20	6.56	7.09	6.65	52.2	48.5	54.4	51.6
M 25%	<i>I. galbana</i>	5.80	6.60	7.06	6.96	57.0	54.2	57.9	57.3
Testigo	<i>Nannochl. sp</i>	8.20	8.09	8.42	7.89	40.5	38.9	36.4	43.1
M 15%	<i>Nannochl. sp</i>	5.00	6.56	7.65	5.78	38.4	36.3	33.8	40.1
M 20%	<i>Nannoch. sp</i>	5.20	6.59	7.36	5.49	52.2	49.0	43.4	52.7
M 25%	<i>Nannoch. sp</i>	5.80	6.79	7.26	6.60	57.0	54.6	47.3	56.6



**Figura 1:** Flocculación de *D. tertiolecta*, *I. galbana* y *Nannochloropsis sp.* en el tratamiento con 5% de agua producida de Buena Suerte en el experimento 1.

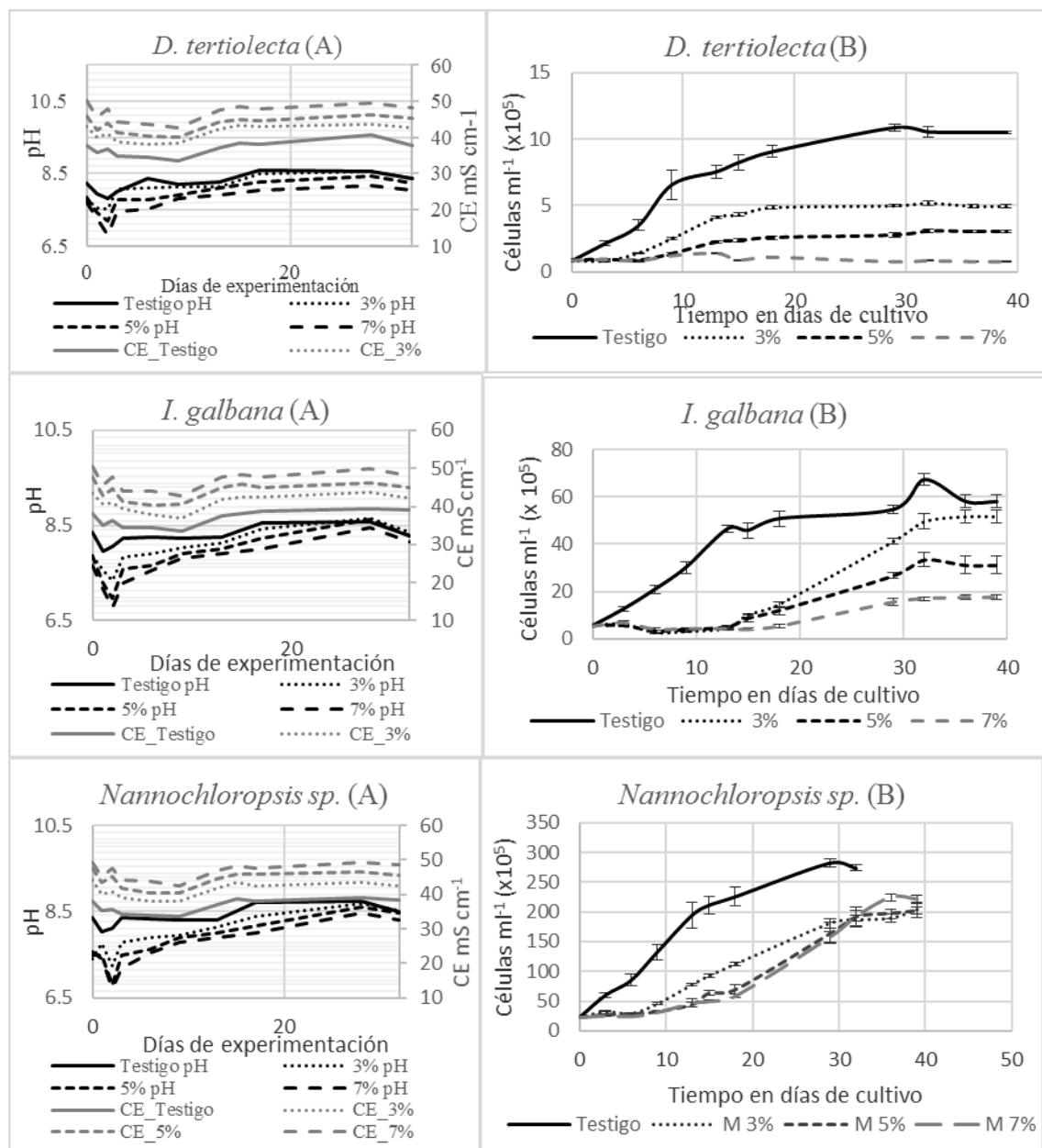
**Figura 2:** Tratamientos de agua producida de Monclova 1 diluida con agua destilada y sembrada



con *Nannochloropsis sp.* en el experimento 2. De izquierda a derecha: Testigo, 15, 20 y 25% de agua producida (40.5, 38.4, 52.2 y 57 mS/cm respectivamente), a los 14 días de la siembra y 4 días de haberse resembrado, Nótese que al aumentar la

concentración de agua producida en los tratamientos permaneció más tiempo la coloración verde, este fenómeno solo se detectó con *Nannochloropsis sp.*

**Figura 3:** Variaciones del pH y la CE (A) y curvas de crecimiento poblacional (B), registrados durante el experimento 3 en las exposiciones al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova 1, se anexan barras de error estándar en las curvas de crecimiento.



**Cuadro 6:** Comparación de la tasa específica de crecimiento de las tres cepas expuestas al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova 1 en 4 periodos de tiempo dentro del experimento 3. *D. t.* (*Dunaliella tertiolecta*), *I. g.* (*Isochrysis galbana*) *N. sp.* (*Nannochloropsis sp.*). Letras iguales sin diferencias significativas dentro del periodo de tiempo (Duncan  $p \geq 0.05$ ).

Tratamiento	Periodo 1 Día 0 al 9	Periodo 2 Día 9 al 18	Periodo 3 Día 18 al 29	Periodo a Día 29 al 36
<i>D. t.</i> Testigo	0.214 a	0.046 b	0.017cd	-0.005 bc
<i>D. t.</i> Monclova al 3%	0.118 b	0.059 b	0.003de	-0.001 bc
<i>D. t.</i> Monclova al 5%	0.0490 c	0.044 b	0.006cd	0.015 abc
<i>D. t.</i> Monclova al 7%	0.037 c	-0.041 c	-0.033e	0.004 bc
<i>I. g.</i> Testigo	0.186 a	0.060 b	0.027cd	-0.022 c
<i>I. g.</i> Monclova 3%	-0.075 e	0.133 a	0.098a	0.032 ab
<i>I. g.</i> Monclova 5%	-0.045 de	0.084 ab	0.081a	0.013 abc
<i>I. g.</i> Monclova 7%	-0.027 d	-0.019 c	0.102a	0.021 ab
<i>N. sp.</i> Testigo	0.191 a	0.061 b	0.022cd	0.000 bc
<i>N. sp.</i> Monclova 3%	0.076 c	0.100 ab	0.043bc	0.007 bc
<i>N. sp.</i> Monclova 5%	0.040 c	0.060 b	0.078ab	0.031 ab
<i>N. sp.</i> Monclova 7%	0.034 c	0.050 b	0.090a	0.051 a

**Cuadro 7:** Máxima concentración celular obtenida al final del experimento 3 en las exposiciones al 3, 5 y 7% de agua producida de Monclova 1, letras iguales sin diferencias significativas (Duncan  $p \geq 0.05$ ).

Tratamiento	<i>Dunaliella t</i>	<i>Isochrysis g.</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>
Testigo	10.89 a	67.28 a	282.67 a
Monclova 3%	5.00 b	49.72 b	189.06 c
Monclova 5%	2.77 c	33.44 c	196.89 bc
Monclova 7%	1.37 d	17.00 d	224.39 b

## V. LITERATURA CITADA

- Arriada, A.A. and Abreu, P.C. 2014. Nannochloropsis oculata Growth in Produced Water: an Alternative for Massive Microalgae Biomass Production. *Brazilian J. Pet. Gas.* 8(3):119-125.
- Bacellar-Mendes, L.B.; Rodrigues-Cunha, P.C.; Montes D'Oca, M.G.; Abreu, P.C. and Primel, E.G. 2011. Method for Removing Pollutants from Produced Water. United States Patent No. US 7955505 B2.
- Bruinsma, J. 2009. The Resource Outlook To 2050. *Water* 24-26.
- Cabanelas, I.T.D.; Arbib, Z.; Chinalia, F.A.; Souza, C.O.; Perales, J.A.; Almeida, P.F.; Druzian, J.I. and Nascimento, I.A. 2013a. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Appl. Energy.* 109: 283-290.
- Cabanelas, I.T.D.; Ruiz, J.; Arbib, Z.; Chinalia, F.A.; Garrido-Pérez, C.; Rogalla, F.; Nascimento, I.A. and Perales, J. 2013b. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. *Bioresour. Technol.* 131: 429-36.
- Carrera-Martinez, D.; Mateos-Sanz, A. Lopez-Rodas, V. and Costas, E. 2011. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquat. Toxicol.* 101: 342-350.
- Christenson, L. and Sims, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29: 686-702.
- Cirulis, J.T.; Scott, J.A. and Ross, G.M. 2013. Management of oxidative stress by microalgae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91: 15-21.
- Craggs, R.J.; Benemann, J. and Lundquist, T. 2012. Wastewater treatment pond algal production for biofuel. *In: R. Gordon, J. Seckbach, (eds), Sci. Algal Fuels.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp 425-445.
- Cueto-Felgueroso, L. and Juanes, R. 2013. Forecasting long term gas production from shale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(49):19660-19661.

- Das, B.K.; Roy, A.; Koschorreck, M.; Mandal, S.M.; Wendt-Potthoff, K. and Bhattacharya, J. 2009. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Res.* 43(4):883-894.
- Dávila-Flores, A. 2013. Impactos económicos del aprovechamiento de los yacimientos de gas natural de la Cuenca de Burgos mediante el esquema de contratos de obra pública financiada. *Estud. Demogr. Urbanos Col. Mex.* 28: 123-166
- Debelius, B.; Forja, J.M.; DelValls, A. and Lubián, L.M. 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72(5):1503-1513.
- Department of Energy (DOE). 2010. National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program. Fishman, D.; Majumdar, R.; Morello, J.; Pate, R. and Yang, J. (Eds). College Park, Maryland, U.S. 140 p.
- Duong, V.T.; Li, Y.; Nowak, E. and Schenk, P.M. 2012. Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. *Energies.* 5:1835-1849.
- Dwivedi, S. 2012. Bioremediation of heavy metal by algae: current and future perspective. *J. Adv. Lab. Res. Biol.* 3(3):195-199.
- Echeveste, P.; Agustí, S. and Dachs, J. 2010. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. *Environ. Pollut.* 158(1):299-307.
- Eguiluz, S. 2007. Exploración petrolera cuantitativa, ejemplos y resultados de los estudios de plays en la Cuenca de Sabinas Coahuila, México. *GeoCiencia* 1: 8-35
- Eguiluz, S. and Torres, N.A. 2003. Coalbed Methane Resources of the Sabinas Basin, Coahuila, México. *In: C. Bartolini, R.T. Buffler, and J. Blickwede, (eds). The Circum-Gulf of Mexico and the Caribbean: Hydrocarbon habitats, basin formation, and plate tectonics: AAPG Memoir 79, p. 395–402.*
- Environmental Protection Agency (EPA). 1997. Wastewater Treatment Manuals. Management. Ardcavan, Wexford, Ireland.131 p.



- Food and Agriculture Organization (FAO). 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *In* FAO Fisheries Technical Paper. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (Eds). Rome, Italy. 361:295 p.
- Fukuda, S-Y.; Iwamoto, K.; Atsumi, M; Yokoyama, A.; Nakayama, T.; Ishida, K-I.; Inouye, I. and Shiraiwa, Y. 2014. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. *J. Plant. Res.* 127: 79-89.
- García, F.; Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D. 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresour. Technol.* 98(7):1359-1365.
- Gordon, R. and Seckbach, J. 2012. *The Science of Algal Fuels*. Springer. 517 p.
- Goyal, A. 2007. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant. Physiol. Biochem.* 45: 705-710.
- Grubert, E. and Kitasei, S. 2010. How Energy Choices Affect Fresh Water Supplies : A Comparison of U . S . Coal and Natural Gas How Energy Choices Affect Fresh Water Supplies. *Water* 2: 21 p.
- Gui-Hong, L. and Sjursen, H.P. 2013. Characteristics of produced water during coalbed methane (CBM) development and its feasibility as irrigation water in Jincheng , China. Characteristics of CBM water. *J. Coal. Sci. Eng.* 19: 369-374.
- Guillard, R.R. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Can. J. Microbiol.* 8(2):229-239.
- Guiry, M. and Guiry, M.G. 2015. *AlgaBase*. World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galw., <http://www.algaebase.org>
- Hamawand, I.; Yusaf, T. and Hamawand, S. 2014. Growing algae using water from coal seam gas industry and harvesting using an innovative technique: A review and a potential. *Fuel.* 117:422-430.
- Hoekstra, A.Y.; Mekonnen, M.M.; Chapagain, A.K.; Mathews, R.E. and Richter, B.D. 2012. Global monthly water scarcity: Blue water footprints versus blue water availability. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0032688.

- Jiang, L.; Luo, S.; Fan, X.; Yang, Z. and Guo, R. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. *Appl. Energy*. 88:3336-3341.
- Kaplan, D.; Cohen, Z. and Abeliovich, A. 1986. Optimal Growth Conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9:37-48.
- Larsdotter, K. 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *VATTEN* 62: 31-38
- Levy, J.L.; Angel, B.M.; Stauber, J.L.; Poon, W.L.; Simpson, S.L.; Cheng, S.H. and Jolley, D.F. 2008. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquat. Toxicol.* 89: 82-93.
- Lewis, M. and Pryor, R. 2013. Toxicities of oils, dispersants and dispersed oils to algae and aquatic plants: review and database value to resource sustainability. *Environ. Pollut.* 180:345-367.
- Li, S.X.; Hong, H.S.; Zheng, F.Y. and Deng, N.S. 2008. Effects of metal pollution and macronutrient enrichment on the photoproduction of hydroxyl radicals in seawater by the alga *Dunaliella salina*. *Mar. Chem.* 108:207-214.
- Mahoney, B.M. and Haskin, H.H. 1980. The effects of petroleum hydrocarbons on the growth of phytoplankton recognized as food forms for the eastern oyster, *Crassostrea virginica* GMELIN. *Environ. Pollut.* 22:123-132.
- Martel-Valles, F.; Benavides-Mendoza, A.; Mendoza-Villarreal, R.; Zermeño-González, A. and Juárez-Maldonado, A. 2014. Agronomic Use of Produced Water in Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* L.) Under Greenhouse Conditions. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 30:365-377.
- Martel-Valles, J.F.; Benavides-Mendoza, A.; Valdez-Aguilar, L.A.; Juárez-Maldonado, A. and Ruíz-Torres, N.A. 2013. Effect of the Application of Produced Water on the Growth, the Concentration of Minerals and Toxic Compounds in Tomato under Greenhouse. *J. Environ. Prot.* 4(7):138-146.
- Martínez-Roldán, A.J.; Perales-Vela, H.V.; Cañizares-Villanueva, R.O. and Torzillo, G. 2014. Physiological response of *Nannochloropsis* sp. to saline stress in laboratory batch cultures. *J. Appl. Phycol.* 26(1):115-121.
- Mauter, M.S.; Alvarez, P.J.J.; Burton, A.; Cafaro, D.C.; Chen, W.; Gregory, K.B.; Jiang, G.; Li, Q.; Pittock, J.; Reible, D. and Schnoor, J.L. 2014. Regional variation in water-related impacts of shale gas development and

implications for emerging international plays. *Environ. Sci. Technol.* 48: 8298-8306.

National Renewable Energy Laboratory (NREL). 1998. A look back at the U. S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. Report 328 p.

Noyola, A.; Morgan-Sagastume, J.M. y Guereca, L.P. 2013. Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales., 1.a ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 140 p.

Nwoye, C.I.; Nwosu, I.E.; Nwakpa, S.O.; Odo, J.U.; Ede, S.E. and Idenyi, N.E. 2014. Predictability of the electrical conductivity of in situ sea water as a function of its pH. *J. Ocean. Res.* 2(2):23-27.

Onda, K.; Lobuglio, J. and Bartram, J. 2012. Global access to safe water: Accounting for water quality and the resulting impact on MDG progress. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9: 880-894

Orem, W.; Tatu, C.; Varonka, M.; Lerch, H.; Bates, A.; Engle, M.; Crosby, L. and McIntosh, J. 2014. Organic substances in produced and formation water from unconventional natural gas extraction in coal and shale. *Int. J. Coal Geol.* 126:20-31.

Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* 1:2

Ortega-Gaucin, D.; Rendón-Pimentel, L.; Bravo-Morales, I. y Olivares-Alva, R. 2011. SEQUÍAS HIDROLÓGICAS EN LA CUENCA DEL RÍO BRAVO. *Ing. Agric. y Biosist.* 3: 41-48.

Park, J.B.K. and Craggs, R.J. 2010. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Sci. Technol.* pp 633-639.

Park, J.B.K.; Craggs, R.J. and Shilton, A.N. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102: 35-42

Petróleos Mexicanos (PEMEX). 2013. Informe de Sustentabilidad. México, D.F. 180 p.

Potera, C. 2011. Desechos peligrosos. Algas de los estanques aíslan el estroncio 90. *Salud Pública Mex.* 53: 363-364.

- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Raposo, M.F.J.; De Morais, R.M.S.C. and De Morais, A.M.M.B. 2013. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Mar. Drugs*. 11:233-252.
- Razzak, S.A.; Hossain, M.M.; Lucky, R.A.; Bassi, A.S. and de Lasa, H. 2013. Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 27: 622-653.
- Rocha, J.M.S.; Garcia, J.E.C. y Henriques, M.H.F. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol. Eng.* 20: 237-242.
- Roleda, M.Y.; Slocombe, S.P.; Leakey, R.J.G.; Day, J.G.; Bell, E.M. and Stanley, M.S. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour. Technol.* 129:439-449.
- Romero-Lopez, J.; Lopez-Rodas, V. and Costas, E. 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquat. Toxicol.* 124-125: 227-237.
- Roopnarain, A.; Gray, V.M. and Sym, S.D. 2014. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 156: 408-411.
- Sala, L. and Mujeriego, R. 2001. Cultural eutrophication control through water reuse. *Water Sci. Technol.* pp 109-116.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2005. «Norma Oficial Mexicana NOM-143- SEMARNAT-2003, Que Establece las Especificaciones Ambientales para el Manejo de agua Congénita Asociada a Hidrocarburos,» Diario Oficial de la Federación, México. 1-12.
- Shariati, M. and Hadi, M.R. 2011. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*. *In: Progres in. Molecular and Environmental Bioengineering. - From Analysis and Modeling to Technology Applications.* Carpi, A. (Eds). 447-506.

- Sheehan, J.; Dunahay, T.; Benemann, J. and Roessler, P. 1998. A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. doi: 10.2172/15003040.
- Shi, J.; Podola, B. and Melkonian, M. 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: An experimental study. *J. Appl. Phycol.* 19:417-423.
- Sriram, S. and Seenivasan, R. 2012. Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. *J. Algal. Biomass. Util.* 3: 9-13
- Subramanian, S.; Barry, A.N.; Pieris, S. and Sayre, R.T. 2013. Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. *Biotechnol. Biofuels.* 6:150p.
- Sullivan, E.J.J.; Dean, C.; Laur, P. and Viszoly, A. 2011. Treatment and Use of Oil and Gas Produced Water as a Media Substrate for Algae Cultivation for Biofuels. *In 56<sup>th</sup> Annual New Mexico Water Conference. "New Water New Energy: A Conference Linking Desalination and Renewable Energy"*. Dec. 13-14, 2011. Alamogordo, New Mexico, U.S.
- Takagi, M.; Karseno and Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 223-226
- Tsai, D.D-W.; Ramaraj, R. and Chen, P.H. 2012. Growth condition study of algae function in ecosystem for CO<sub>2</sub> bio-fixation. *J. Photochem. Photobiol. B* 107: 27-34.
- Udom, I.; Zaribaf, B.H.; Halfhide, T.; Gillie, B.; Dalrymple, O.; Zhang, Q. and Ergas, S.J. 2013. Harvesting microalgae grown on wastewater. *Bioresour Technol* 139: 101-106.
- Udhaya, R.L.B.B. and Sandhya, S. 2014. Evaluation of chemical flocculation-electro flocculation for harvesting of halotolerant microalgae. *Int. J. Environ. Sci.* 4:899-905.
- Vandamme, D.; Foubert, I. and Muylaert, K. 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.* 31:233-239.

- Veil, J. 2013. Water Associated with Oil and Management and Water Needs. *In: Reliable Mine Water Technology*. Wolkersdorfer, C.; Brown, A. and Figueroa, L. (eds). Golden, CO, USA. 1229-1234.
- Veil, J.A.; Elcock, M.G.P.D.; Robert, J. and Redweik, J. 2004. A White Paper Describing Procedure Water from Production of Crude Oil, Natural Gas, and Coal Bed Methane. U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory. 87 p.
- Walker, T.L.; Purton, S.; Becker, D.K. and Collet, C. 2005. Microalgae as bioreactors. *Plant. Cell. Rep.* 24:629-41.
- Wu, L.F.; Chen, P.C.; Huang, A.P. and Lee, C.M. 2012. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresour. Technol.* 113:14-18.
- Yang, J.; Xu, M.; Zhang, X.; Yang, J.; Xu, M.; Zhang, X.; Hu, Q.; Sommerfeld, M. and Chen, Y. 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresour. Technol.* 102:159-165.
- Yoshioka, M.; Yago, T.; Yoshie-Stark, Y.; Arakawa, H. and Morinaga, T. 2012. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 338-341: 111-117.