

Evaluación de microalgas para la producción de biomasa económicamente útil usando aguas producidas*

Evaluation of microalgae for the production of economically useful biomass using produced water

Gerardo Salas-Herrera¹, Adalberto Benavides-Mendoza^{1§}, Alejandro Zermeño-González¹, Argentina Orta-Dávila² y Félix de Jesús Sánchez-Pérez³

¹Ingeniería de Sistemas de Producción, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315. Teléfono: (844) 411-02-00, Ext. 2353 y 2354. (gsalash@live.com.mx; abenmen@uaaan.mx; azermeno@uaaan.mx). ²Biorganix Mexicana, S.A. de C.V. Dirección: Aiera No 240 Ramos Arizpe, Coahuila, México. C. P. 25903 Tel: (844) 488-26-27. (aortad@gmail.com). ³Departamento de Estadística y Cálculo, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. (fel1925@yahoo.com). [§]Autor para correspondencia: 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 tolera la presencia de agua producida en el medio; sin embargo, al resembrar los tratamientos presento una respuesta de crecimiento poblacional positiva, lo que evidenció la capacidad de bioremediación de esta cepa.

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

Abstract

The production of microalgae for biodiesel and other valuable products is a topic devoting great efforts. However, microalgae production requires large volumes of water and for its sustainable production requires searching for other water sources that do not compete with food production. In this sense produced water generated from the oil industry could be an alternative source of water, so for the present study the adaptation and growth of three microalgae strains halotolerant in two sources of produced water at the Sabinas basin Northeast Mexico were evaluated. It was found that one of the sources of produced water, in the Monclova 1 station, has potential for exploitation using microalgae *Nannochloropsis* sp. which showed greater adaptability to this water being a good candidate for further research. Moreover, *I. galbana* did not tolerate the presence of produced water in the medium; however, when treatments were planted again showed a positive population growth response, showing with this the bioremediation ability of this strain.

Keywords: *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, biodiesel, bioremediation.

* Recibido: septiembre de 2015
Aceptado: diciembre de 2015

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. 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. 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).

Algunas microalgas son utilizadas para la obtención de biodiesel (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, que es 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 3 726 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); 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

Introduction

Produced water generated by the oil industry could be used as a culture medium for microalgae, which would allow using a resource that represents high costs for treatment and disposal during the extraction of hydrocarbons. Besides the benefits to be gained from biomass produced; microalgae can reduce the toxic load of some compounds present in these water (Bacellar-Mendes *et al.*, 2013) that pose risks for pollution in the region where extracted. Bioremediation capacity of microalgae has been demonstrated in other effluents removing nitrogen and phosphorus from municipal wastewater (Shi *et al.*, 2007) and some heavy metal discharges from the mining industry (Das *et al.*, 2009).

Some microalgae are used to produce biodiesel (Duong *et al.*, 2012) as these organisms represent 4 to 50% of lipids in their cells, besides of a high growth rate that is two to 10 times higher than land plants. This difference is explained by the fact that all cells are photosynthetic, being able to double the population in 6 to 12 h. Microalgae production can be carried throughout the year when the conditions of temperature, lighting, water availability and nutrients are adequate, do not compete with food production and can be grown in wastewater taking advantage of dissolved nutrients present on this (Subramanian *et al.*, 2013).

Water requirements for the production of microalgae are considerable. Yang *et al.* (2011) estimated that to produce 1 kg of biodiesel requires 3 726 kg of water; however, if seawater or wastewater is used as culture media for the production of the biomass, these requirements are reduced by up to 90% and reduces the need for certain nutrients. This alternative of using wastewater for the production of microalgae to produce biodiesel has been studied by several researchers (DOE, 2010); however, there is still little information for the use of water produced as culture medium for microalgae.

Using produced water obtained after a treatment Arriada and Abreu (2014) achieved to grow microalgae *Nannochloropsis oculata*, while Sullivan *et al.* (2011) were able to grow *Nannochloropsis salina* without water treatment, using only a mix of water sources to obtain certain level of salinity. Meanwhile Hamawand *et al.* (2014) evaluated the possibility of using water drawn with gas associated to coal (Coal Seam Gas) to grow microalgae, concluding that it is feasible to apply a pre chemical treatment of water with acetic acid.

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). 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.

En este estudio se evaluó la tolerancia, el crecimiento y la posibilidad de obtener biomasa aprovechable de tres 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, B. C. Los trabajos

Produced water contains dissolved salts, such as sodium and calcium chloride, sodium carbonate, potassium chloride, calcium sulfates or barium, among others; it may even contain metal ions. Produced waters originally are congenial waters located in the deeper stratas of geological formations (Martel-Valles *et al.*, 2013). When extracted during the gas or oil production process are added various substances such as surfactants, gels and inhibitors to facilitate the extraction and it is then that its composition is modified and is called produced water (Veil *et al.*, 2004). Its composition varies widely between extraction sites even with nearby sites and most produced water has higher salinity than seawater (Martel-Valles *et al.*, 2013), so its use for development of halotolerant algae is sought.

In this study tolerance, growth and the possibility to obtain usable biomass from three marine microalgae (*Isochrysis Galvana*, *Dunaliella tertiolecta* and *Nannochloropsis* sp.) were evaluated using produced water obtained from Sabinas Basin in northeastern Mexico, as an alternative to use this water resource potential.

Materials and methods

For this study, produced water from stations wells Monclova 1 and Buena Suerte located in the Sabinas Basin were used, which received contributions of water from up to 25 adjacent wells to each station and were previously characterized by Martell-Valles *et al.* (2013).

Microalgae evaluated *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galvana* and *Nannochloropsis* sp. obtained from the Institute of Oceanology Research of the Universidad Autonoma of Baja California, Ensenada, BC The experimental work was carried out at the premises of Biorganix Mexicana S. A. de C. V. in the municipality of Ramos Arizpe, Coahuila, Mexico.

The material was previously autoclaved, salt water was filtered with millipore filter of 0.22 μm and sowing was performed under a laminar flow hood previously sterilized in presence of flame. Experiments were performed in 250 ml erlenmeyer flasks with 90 ml culture medium for control and treatments. Seawater was prepared with artificial sea salt (Instant Ocean) dissolving 35 g of salt per liter of distilled water, the nutrient medium F/2 Guillard (Guillard and Ryther, 1962) was used in all treatments.

experimentales se desarrollaron en las instalaciones de Biorganix Mexicana S. A. de C. V. en el municipio de Ramos Arizpe, Coahuila, México.

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 g de sales por litro de agua destilada, se utilizó el medio nutritivo F/2 de Guillard (Guillard y Ryther, 1962) en todos los tratamientos.

Las unidades experimentales fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 20 ± 1 °C con un fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad iluminada con diodos emisores de luz (led) y lámparas de halógeno con una emisión de 7.7 y 14.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente y solo se extrajeron para la toma de muestras para los conteos poblacionales, medición de pH y conductividad eléctrica (CE), regresándolas después de ello a su ubicación original. En estas 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. 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*. (5.53×10^5 , 2.74×10^5 y 0.56×10^5 células 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 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 conductímetro 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 ecuación descrita por García *et al.* (2007), el diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar para minimizar las diferencias que se pudieran tener en el

The experimental units were kept in a growth chamber at 20 ± 1 °C with photoperiod of 12:12 h light:dark illuminated with light emitting diodes (LED) and halogen lamps with an emission of 7.7 and 14.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectively and only extracted to take samples for population counts, measuring pH and electrical conductivity (EC), thereafter returning them to their original location. Under these conditions were kept the primary cultures, which were renewed every 8 days taking 15 ml of inoculum and growing it in 135 ml of artificial seawater with culture medium F/2 keeping them in exponential growth phase. From these crops 10 ml inoculum to sow treatments were taken. Sowing density was dependent on strain size keeping the highest densities with *Nannochloropsis sp* followed by *Isochrysis galbana* and lowest with *Dunaliella tertiolecta* (5.53×10^5 , 2.74×10^5 and 0.56×10^5 cells ml^{-1} respectively). All treatments were made by triplicate.

Population counts were made every 2-3 days performing three counts in Neubauer chamber by experimental unit with a phase contrast microscopy. Mobile strains were previously fixed with a solution of 4% formaldehyde for counting (FAO, 1996). pH and EC measurements were made with a potentiometer and conductivity meter Horiba Laqua twin models B713 and B771 respectively. PAR radiation was measured with a photometric sensor Li-cor quantum Q40808 and dataloguer LI-1400.

To calculate the specific growth rate the equation described by García *et al.* (2007) was used, the experimental design was randomized complete block to minimize the differences in growth that could be caused by the lighting conditions in the growth chamber. Mean comparison test Duncan. Data was analyzed using "R" (R Development Core Team, 2013).

To evaluate the capability of microalgae to tolerate and thrive in produced water the work was divided into two experiments (Table 1), the treatments were sow again after 7 to 10 days using the initial sowing as a pretreatment to reduce possible toxic load supplied by produced water (Das *et al.*, 2009; Bacellar-Mendes *et al.*, 2011). Produced water dilutions and concentrations used were selected based on preliminary test. The growth rate in the second experiment phase was estimated at 4 time periods, 0-9, 9-18, 18-29 and 29-36 days after the experiment began.

crecimiento ocasionadas por las condiciones lumínicas dentro de la cámara de crecimiento. 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 el trabajo se dividió en dos experimentos (Cuadro 1), los tratamientos se sembraron transcurridos de 7 a 10 días utilizando la siembra inicial como pretratamiento para disminuir la posible carga tóxica aportada por el agua producida (Das *et al.*, 2009; Bacellar-Mendes *et al.*, 2011). Se trabajó con diluciones del agua producida y las concentraciones utilizadas se seleccionaron en base a pruebas preliminares. La tasa de crecimiento en la segunda etapa experimental 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.

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

Table 1. Treatment preparation of the two experimental stages; pH and EC correspond to that recorded in the treatments before planting.

Etapa y Objetivo	Origen AP	Vol. AP	Vol. agua salada	Vol. agua dest.	Vol. inóculo	Vol. re-siembra	CE (mS cm ⁻¹)	pH
1: Selección de AP	BS	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: 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.

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 después de dos días de la exposición (Cuadro 2), la CE de los tratamientos mostró una ligera disminución de poco más de 2 mS cm⁻¹ hacia el final. Todas las cepas floccularon 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 flocculante. La flocculación de las microalgas pudo deberse a la presencia de iones de

Results and discussion

Experiment 1: Selection of produced water

In water treatment from Buena Suerte at 5% reported a change in pH from 6.8 to slightly above 8 after two days of exposure (Table 2), EC from the treatments showed a slight decrease of just over 2 mS cm⁻¹ towards the end. All strains flocculated forming a precipitate in the bottom of the flask (Figure 1), without achieving growth of microalgae when culture medium was re-inoculated and without identifying the flocculant. Flocculating microalgae could be due to the presence of metal ions, which have the ability to neutralize cell surface negatively charged, some ions having this effect in microalgae derive from aluminum sulfate and ferric chloride (Udhaya *et al.*, 2014), the pH of the culture

medium not only affects the charge of cell surface of microalgae, but also the action of chemical flocculants. The decrease of EC in this case could be due to precipitation of some ions along with the flocculation of microalgae. The increase in pH can be explained by the contribution of OH⁻ by the cells of living and dead microalgae, as has been reported in natural environments (Li *et al.*, 2008).

When treatments were sown again with produced water from Buena Suerte station at seven days there were no changes EC and pH; however, there was no growth in any of the three strains. Martel-Valles *et al.* (2013) reported higher average on middle petroleum fraction content in produced from Buena Suerte (103.2 mg ml⁻¹). Toxic effects of diesel have

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 floculantes químicos. 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 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 con agua producida de la estación Buena Suerte 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 mg ml⁻¹). Se han reportado efectos tóxicos del 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.

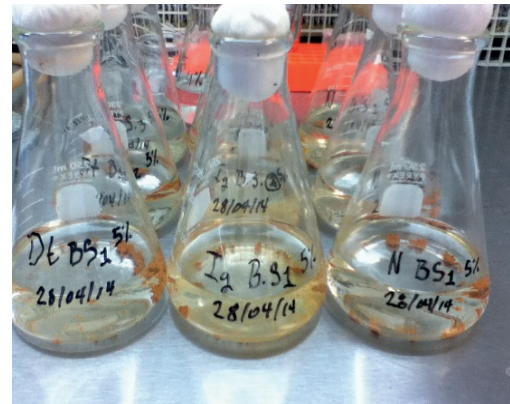


Figura 1. Floculación de *D. tertiolecta*, *I. galbana* y *Nannochloropsis* sp. en el tratamiento con 5% de agua producida de Buena Suerte en el experimento 1.

Figure 1. *D. tertiolecta*, *I. galbana* and *Nannochloropsis* sp flocculation in treatment with 5% of produced water from Buena Suerte in experiment 1.

been reported in marine microalgae at concentrations of 1 to 5 ppm (Mahoney and Haskin, 1980), so the presence of middle petroleum fraction thus the presence of flocculating agents in produced water from Buena Suerte station, could be the main factors limiting its use to grow microalgae.

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

Table 2. pH and EC variation during exposure at 5% of produced water in experiment 1.

Tratamiento	Cepa	Población inicial x10 ⁵	Población día 9 x 10 ⁵	pH inicial	pH 2° día	pH 7° día	CE inicial (mS cm)	CE final (mS cm)
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	10.7	8.15	8.4	8.33	46.05	44.8
	<i>N. sp.</i>	5.53	14.9	8.15	8.33	8.36	46.05	44.8
Monclova 1	<i>D. t</i>	0.56	0.37	7.9	8.2	7.93	54	52.9
	<i>I. g</i>	2.74	2.1	7.9	7.29	8.1	54	53.2
	<i>N. sp.</i>	5.53	3.23	7.9	7.26	8.16	54	52.8
Buena Suerte	<i>D. t</i>	0.56	0	6.8	8.1	8.23	47.1	44.4
	<i>I. g</i>	2.74	0	6.8	8.03	8.2	47.1	45
	<i>N. sp.</i>	5.53	0	6.8	8.1	8.16	47.1	44.4

D.t= *D. tertiolecta*; *I.g*= *I. galbana* y *N. sp.*= *Nannochloropsis* sp.

Por otro lado al preparar los tratamientos al 5% de agua producida de la estación Monclova 1 se registró una CE de 54 mS cm⁻¹ y un pH de 7.9. La CE de estos tratamientos estuvo por encima de los 46.2 mS cm⁻¹ registrados en el medio para los testigos, siendo este un medio hiperosmótico que pudo ser un

Furthermore by preparing treatments at 5% of produced water from Monclova 1 station an EC of 54 mS cm⁻¹ and a pH of 7.9 was recorded. EC of these treatments was above 46.2 mS cm⁻¹ recorded in the culture medium for control, being this a hyperosmotic medium which could be a stress

factor más de estrés aunado a la presencia de otros componentes como metales e hidrocarburos en las aguas producidas. 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 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 alta salinidad provoca un desbalance iónico a las células 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 3), este crecimiento pudo deberse a una disminución en la carga tóxica por el efecto de biorremediación por las microalgas al inicio del experimento. Entre las características físico-químicas del agua producida de la Estación Monclova 1 reportadas por Martel-Valles *et al.*, (2013) que pudieran limitar el crecimiento de las microalgas está la gran cantidad de sólidos disueltos totales ($153,000 \text{ mg L}^{-1}$) y la presencia de metales pesados (Pb, 1.77; Ni, 1.22; Cd, 0.37; Cu, 0.148 y Cr, 0.39 mg L^{-1}). La biorremediación 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).

factor coupled with the presence of other components such as metals and hydrocarbons in produced water. In treatments with *I. galbana* and *Nannochloropsis* sp. pH showed a slight decrease at the beginning of the experiment and increased slightly over 8 towards the end of this, this variation in pH could be the result of exchanging ions of cells with hyperosmotic medium.

High salinity causes ionic imbalance to cells by water loss, causing an overproduction of species reactive to oxygen that causes oxidative stress. Resilience capacity to stress varies from one species of microalgae to another and involves the induction of antiporters as those of H^+/Na^+ and the protection of photosynthetic systems with antioxidants (Martínez-Roldán *et al.*, 2014).

By re-sowing the treatments with produced water from Monclova 1 station with 10 ml of inoculum achieved populational growths of *I. galbana* and *Nannochloropsis* sp. (Table 3), this growth could be due to a decreased toxic load by the effect of bioremediation from microalgae at the beginning of the experiment. Among the physico-chemical characteristics of produced water from the Monclova 1 station reported by Martel-Valles *et al.* (2013), which could limit the growth of microalgae, the large amount of total dissolved solids ($153,000 \text{ mg L}^{-1}$) and the presence of heavy metals (Pb, 1.77; Ni, 1.22; Cd, 0.37; Cu 0.148 and Cr, 0.39 mg L^{-1}). Bioremediation with microalgae of waters contaminated with heavy metals occurs in two phases, the first is adsorption, a biophysical process that can be completed in seconds to a few minutes and can be carried out even in non-viable cells, then absorption occurs which is internalisation of metal ions into cell cytoplasm and is dependent on metabolism (Dwivedi, 2012).

Cuadro 3. 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.

Table 3. Growth rates in exposures to produced water from Monclova 1 station at 5% (Stage 1), the treatments showed population growth after replanting the treatment.

Tratamiento	Cepa	Densidad inicial	Densidad máxima	Tiempo de crecimiento	TEC
Testigo	<i>Dunaliella t.</i>	0.56	nd	*	nd
Testigo	<i>Isochrysis g.</i>	2.743	10.7	9 días	0.144
Testigo	<i>Nannochloropsis</i> sp.	5.533	19.333	9 días	0.14
Monclova 1	<i>Dunaliella t.</i>	0.42	nd	*	nd
al 5%	<i>Isochrysis g.</i>	6.1	11.067	4 días	0.148
resiembra	<i>Nannochloropsis</i> sp.	8.9	29.467	4 días	0.299

**D. tertiolecta* no mostró crecimiento en esta etapa. TEC= tasa específica de crecimiento.

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.

Apesar de no haber obtenido crecimientos de *D. tertiolecta* aun en los testigos al seleccionar el agua producida, se consideró la cepa para la siguiente etapa 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). Acerca de esto Martel-Valles *et al.* (2013) reportaron para las aguas producidas de las estaciones Buena Suerte y Monclova un contenido de hidrocarburos de fracción media de 103.2 y 1.8 mg L⁻¹ y de grasas y aceites de 18.1 y 10.4 mg L⁻¹ respectivamente.

Experimento 2: viabilidad de las microalgas en presencia de agua producida de la estación Monclova 1

La interacción de las microalgas con el medio se evidenció en las variaciones de pH y CE de los tratamientos. Los cambios más marcados ocurrieron en los primeros cuatro días de exposición (Figura 2), en donde el pH disminuyó después de la siembra y aumentó hacia el cuarto día con una baja más pronunciada en la concentración del 7% de agua producida, siendo en este caso más lento el aumento del pH. 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 la tasa de crecimiento poblacional de las cepas estudiadas (Cuadro 4), sino que son el resultado de la interacción fisicoquímica y metabólica de las células con el tratamiento.

Considering the results obtained it was decided to continue experimenting with produced water from Monclova 1 station and discard the produced water from Buena Suerte station, because the latter would require different strategies to find its use as culture medium. Despite not having obtained growth of *D. tertiolecta* in control by selecting produced water, the strain was considered for the next stage as the results obtained for this strain cannot be fully explained by treatments with produced water. It is likely that *D. tertiolecta* did not adapt to low lighting.

This lighting was handled as it could increase the possibilities of adaptation to these waters taking into account that the increase of this as for temperature could increase the toxicity caused by hydrocarbons in some algae (Lewis and Pryor, 2013). In this regard Martel-Valles *et al.* (2013) reported for produced water from Buena Suerte and Monclova an oil content of petroleum middle fraction of 103.2 and 1.8 mg L⁻¹ and fats and oils of 18.1 and 10.4 mg L⁻¹ respectively.

Experiment 2: viability of microalgae in the presence of produced water from Monclova 1 station

Microalgae interaction with the environment was evidenced by changes in pH and EC of the treatments. The most marked changes occurred in the first four days of exposure (Figure 2), where pH decreased after planting and increased towards the fourth day with a steeper decrease in the concentration of 7% of produced water, being in this case slower the increase of pH. This variation in pH is similar to that found in stage 1, only that in this time it was detected in all three strains. Moreover, EC showed fluctuations in the first four days with a tendency to decline and with the most pronounced fluctuations in the concentration at 7% of produced water. These changes do not directly reflect population growth rate of the strains under study (Table 4), but are the result of the physicochemical and metabolic interactions of cells with treatment.

The first response of microalgae when exposed to the culture medium is the interaction of the cell wall with dissolved ions, as a tendency to dehydration and cell shrinkage if the medium is hyperosmotic, within this stabilization process of cells regarding to the medium could originate the changes related to pH and EC. The greater the concentration of produced water, the metabolic demand was higher for

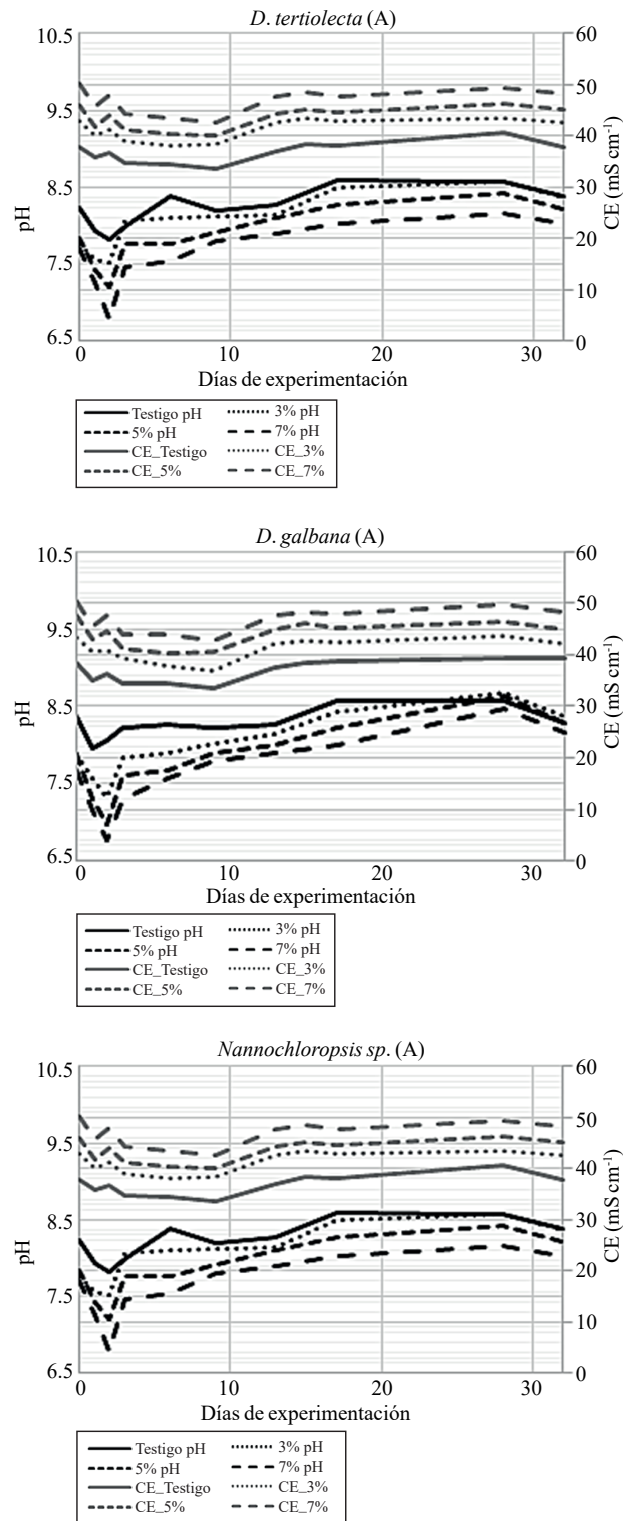


Figura 2. Variaciones del pH y la CE, registrados durante el experimento 2 en las exposiciones al 3, 5 y 7% de agua producida de la estación Monclova 1.

Figure 2. Changes in pH and EC, recorded during experiment 2 in exposures at 3, 5 and 7% of produced water from Monclova 1 station.

Cuadro 4. 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 cuatro periodos de tiempo dentro del experimento 2. D. t: (*Dunaliella tertiolecta*), I. g: (*Isochrysis galbana*) N. sp= (*Nannochloropsis sp*). Letras iguales sin diferencias significativas dentro del periodo de tiempo (Duncan $p > 0.05$).

Table 4. Comparison of specific growth rate of the three strains exposed at 3, 5 and 7% of produced water from Monclova 1 station in four time periods within experiment 2. D. p: (*Dunaliella tertiolecta*), I. g (*Isochrysis galbana*) N. sp.= (*Nannochloropsis sp*). Equal letters without significant differences within time period (Duncan $p > 0.05$).

Tratamiento	Periodo 1 Día 0 al 9	Periodo 2 Día 9 al 18	Periodo 3 Día 18 al 29	Periodo 4 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%	0.049 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	0.06 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 bc
<i>N. sp.</i> Monclova 3%	0.076 c	0.1 ab	0.043bc	0.007 bc
<i>N. sp.</i> Monclova 5%	0.04 c	0.06 b	0.078ab	0.031 ab
<i>N. sp.</i> Monclova 7%	0.034 c	0.05 b	0.09a	0.051 a

La primera 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 mantuvieran su homeostasis, esto se vio reflejado en la tasa de crecimiento alcanzada a los nueve días en *D. tertiolecta* y *Nannochloropsis sp.*, en 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 dentro de este periodo en *Nannochloropsis sp* al 3, 5 y 7% y *D. tertiolecta* al 5 y 7%. Por otra parte *I. galbana* no presentó crecimiento en ninguno de los tratamientos a excepción del testigo en los primeros 9 días de experimentación (Cuadro 4).

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

microalgae to maintain their homeostasis, this was reflected in the growth rate achieved at nine days in *D. tertiolecta* and *Nannochloropsis sp.*, where the best growth rate was recorded in control followed by treatment of *D. tertiolecta* 3%. The lowest growth rates and no significant differences were detected within this period in *Nannochloropsis sp* at 3, 5 and 7% and *D. tertiolecta* at 5 and 7%. On the other hand *I. galbana* showed no growth in any of the treatments except for control in the first 9 days of the experiment (Table 4).

After replanting the treatments there was a better response from *I. galbana* in treatments with 3 and 5% of produced water, while at 7% of produced water this strain only showed growth until the third period of time (18 to 29 days), having achieved growth in the three treatments although with a final cell density with significant differences between each treatment and smaller as concentration of produced water increased (Table 5). This same effect of decreased cell concentration in response to increased concentration of produced water was detected with *D. tertiolecta*, only that growth was recorded during the first time period (0 to 9 days).

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 5). Este mismo efecto en la reducción de la concentración celular en respuesta al aumento en la concentración de agua producida fue detectado con *D. tertiolecta*, solo que el crecimiento se registró durante el primer periodo de tiempo (0 a 9 días).

For *D. tertiolecta* after replanting the treatments no substantial improvement was detected in growth rate, a declining population when exposed to 7% of produced water, suggesting that a deficiency was generated in this strain, possibly by the interaction of the nutrient medium with produced water, than a toxic effect. The best response to presence of produced water was detected with *Nannochloropsis sp.* showing a positive growth rate in treatments throughout the experiment, although very low compared with that obtained with

Cuadro 5. Máxima concentración celular obtenida al final del experimento 2 en las exposiciones al 3, 5 y 7% de agua producida de Monclova 1. Letras iguales sin diferencias significativas (Duncan $p > 0.05$).

Table 5. Maximum cell concentration obtained at the end of experiment 2 in exposures at 3, 5 and 7% of produced water from Monclova 1. Equal letters without significant differences (Duncan $p > 0.05$).

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	b	49.72	b	189.06	c
Monclova 5%	2.77	c	33.44	c	196.89	bc
Monclova 7%	1.37	d	17	d	224.39	b

En el caso de *D. tertiolecta* 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 agua producida, 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 agua producida 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%, (Cuadro 5).

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 toxica celular (toxic cellular quota) como la masa de metal por célula, en el caso del 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

control in the first period, remained constant obtaining a higher cell density in the control followed by treatment at 7 and 5%, (Table 5).

The toxicity induced by heavy metals dissolved in culture medium is in function of cell density. Debelius *et al.* (2009) used the term toxic cellular quota as the mass of metal per cell, in the case of Cu^{++} by increasing cell density less copper is adsorbed per unit area of cell wall surface, so there is less disorder in cell division, this would explain the increased toxicity of the metal by decreasing cell density. The sowing density was much lower in treatments of *Dunaliella t* ($0.86 \times 10^5 \text{ cel ml}^{-1}$) than with *Isochrysis g* ($5.46 \times 10^5 \text{ cel ml}^{-1}$) and that *Nannochloropsis sp.* ($22.96 \times 10^5 \text{ cel ml}^{-1}$), this for the big difference in cell size between the three strains, which could be an advantage for smaller microalgae when interacting the cell surface with an adverse medium by presenting a higher adsorption surface per unit biomass.

Although in this study were not identified the factors of produced water that caused a toxic effect on microalgae, the interaction of microalgae was evident and mainly from *Isochrysis g* with this possible factor or toxicity factors

$\times 10^5$ cel ml^{-1}) que con *Isochrysis g* (5.46×10^5 cel ml^{-1}) y que *Nannochloropsis sp.* (22.96×10^5 cel ml^{-1}), 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.

Aunque en el presente estudio no se identificaron los factores del agua producida que ocasionaron un efecto tóxico en las microalgas, se evidenció la interacción de las microalgas y principalmente de *Isochrysis g* con este posible factor o factores de toxicidad que de alguna manera fue mitigado 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.* y sobre ello 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 reportaron 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 4) para los testigos, mientras que los tratamientos presentaron su máxima tasa de crecimiento en los periodos de tiempo 2 y 3 siendo de 0.1, 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 físicoquímicas 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

that somehow was mitigated by the Initial planting and allowed the growth of the same strain when replanted the medium.

In this study highlights the results obtained with *Nannochloropsis sp.* and in this regard Roleda *et al.* (2013) points out *Nannochloropsis oculata* as the most robust strain among six species of oleaginous microalgae to grow and accumulate lipids over a wide range of environmental conditions. In the results obtained by Arriada and Abreu (2014) with *Nannochloropsis oculata* exposed to produced water in Brazil at 50 and 100% reported growth rates of 0.12 and 0.06 respectively, whereas control recorded a growth rate of 0.13, with an experimental period of 18 days. In this study the maximum growth rate of 0.19 in the first period (Table 4) was obtained with control, while treatments showed their maximum growth rate in the time periods 2 and 3 being 0.1, 0.078 and 0.089 for treatments at 3, 5 and 7%, with an experimental period of 36 days. The variability of the physicochemical characteristics from produced water is a determining factor for their possible use in the production of microalgae, as it can be appreciated in the results obtained in this work with the produced water from Buena Suerte and Monclova 1 station and its contrast with the results of the research with produced water in Brazil.

Conclusions

The option of produced water from Monclova 1 station has greater potential for use than produced water from Buena Suerte station. *Isochrysis galbana* strain had the best recovery after replanting the treatments at 3, 5 and 7% of produced water from Monclova 1 station, so its potential could be for bioremediation. *Isochrysis galbana* and *Dunaliella tertiolecta* decreased their growth rate and final population density in direct relation with the increase in the concentration of produced water unlike *Nannochloropsis sp.*, which had the lowest cell concentration in the treatment with the lowest concentration of produced water, which makes it a good candidate for further studies for use of this resource.

End of the English version



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.

Literatura citada

- Arriada, A. A and Abreu, P. C. 2014. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *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.
- 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.
- 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.
- 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.
- García, F.; Freile-Pelegrián, Y. and Robledo, D. 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bio. Technol.* 98(7):1359-1365.
- Guillard, R. R. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Can. J. Microbiol.* 8(2):229-239.
- 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.
- 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, 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.
- 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.
- 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. *Bio. Technol.* 129:439-449.
- 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.
- 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.* 6:150 p.
- Sullivan, E. J. J.; Dean, C.; Laur, P. and Vizsolay, A. 2011. Treatment and use of oil and gas produced water as a media substrate for algae cultivation for biofuels. *In*: 56th 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.
- 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.
- 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.
- 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. *Bio. Technol.* 102:159-165.