

*Artículo Original*

**Crecimiento de *Coelastrum pseudomicroporum* inmovilizada en esferas de alginato y su potencial uso como biosorbente de cafeína**

**María González-Moya<sup>1</sup>, M. Laura Martín<sup>2,3</sup>, R.M. Baena-Nogueras<sup>2</sup>,  
P.A. Lara-Martín<sup>2</sup>, Ana Bartual<sup>1,3\*</sup>.**

<sup>1</sup>Dpto. Biología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

<sup>2</sup>Dpto. Química Física. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales.  
Universidad de Cádiz. Pol. Río San Pedro s/n. 11510, Puerto Real, Cádiz, España.

<sup>3</sup>Centro Andaluz de Ciencias y Tecnologías Marinas (INMAR)  
Universidad de Cádiz. Pol. Río San Pedro s/n. 11510, Puerto Real, Cádiz, España.

\*autor para la correspondencia: ana.bartual@uca.es

**Resumen**

La cafeína es un estimulante del sistema nervioso central que se encuentra en el medio ambiente acuático en concentraciones entre 1 y 293  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Su principal fuente al medio ambiente son los efluentes de agua residual procedentes de depuradoras. Se ha comprobado que su vertido a estas concentraciones en el medio marino puede ocasionar daños sobre los organismos acuáticos, afectando negativamente a la bioconservación de áreas acuáticas cercanas a las zonas de vertido. Durante las últimas décadas las microalgas han sido empleadas como fotomitigadores o fotobiodepuradoras de aguas contaminadas, por ser organismos fotosintéticos capaces de incorporar, y por tanto retirar del medio, distintas sustancias como nitrógeno, fósforo o metales pesados. La retirada de estas microalgas del medio para su potencial utilización suele ser costosa. El uso de microalgas inmovilizadas en esferas de alginato podría suponer una alternativa que facilite dicho proceso. En el presente trabajo se ha evaluado la conveniencia de utilizar una microalga inmovilizada en esferas de alginato como biodepurante de cafeína. Cultivos de *Coelastrum pseudomicroporum* inmovilizada en esferas de alginato fueron expuestos a distintas concentraciones de cafeína (0, 5, 50 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) durante 72 h. Se comprobó que *C. pseudomicroporum* crecía inmovilizados en las esferas de alginato, y que la concentración de cafeína no le afectaba al crecimiento. Respecto a su capacidad de retirar cafeína, los resultados muestran que, si bien no hubo una retirada significativa de este compuesto del medio acuoso tras 72 h de exposición en las menores concentraciones, sí mostraron su potencialidad de uso en la mayor concentración.

Palabras clave: *alginato, cafeína, fotodepuración, fotomitigación, microalgas.*

## Abstract

Caffeine is a potent stimulant of nervous system typically found in aquatic environment in a range between 1 to 293  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This compound is abundant in municipal wastewater effluents, and once at the environment, it has been reported may cause damage on the aquatic organisms affecting natural biodiversity of aquatic areas near these effluents. During last decade, several authors have proposed the use of microalgae as tertiary treatment of wastewaters. It is well known that microalgae can remove nitrogen, phosphorus and heavy metals from the water. Consequently, microalgae provide an interesting biotreatment for wastewaters, coupled with the production of a potentially valuable biomass. Collecting this biomass after treatment could make the process more expensive. An interesting alternative is to use immobilized microalgae in alginate beads for depuration process. In this work we study the use of *Coelastrum pseudomicroporum* immobilized in sodium alginate beads as a good candidate to remove caffeine from municipal wastewater. We demonstrate the suitable growth of this chlorophyte into the beads. Cultures of *C. pseudomicroporum* were exposed to different concentrations of caffeine (0, 5, 50 and 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) during 72 h. *C. pseudomicroporum* growth was not affected by caffeine at all concentrations. Regarding its ability to remove caffeine, although there was no significant withdrawal of this compound from the water after 72 h of exposure at the lowest concentrations, results showed its potential for use at the highest concentration.

Keywords: *alginate beads, caffeine, microalge, photomitigation, photodepuration.*

## 1. Introducción

El avance actual de las técnicas analíticas en el medio acuoso, posibilita la detección y cuantificación de contaminantes denominados emergentes (ECs). Se trata de compuestos presentes en el agua en muy baja concentración, en rangos de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , no regulados (Daughton, 2004), y que parecen tener un efecto relativamente importante en los organismos acuáticos (EPA, 2010; Papa *et al.*, 2013). Clásicamente, los efluentes municipales se habían identificado como la principal fuente de contaminantes convencionales como los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), pesticidas, surfactantes, esteroides, y metales (Gagné *et al.*, 2006). Hoy día, se sabe que también presentes en el agua residual, existe una alta variedad de contaminantes emergentes tales como fármacos y productos de cuidado personal (PPCPs) (Bolong *et al.*, 2009; Blair, 2014),

siendo, las estaciones depuradoras, el punto más importante de su emisión al ambiente acuático (Aguirre-Martínez *et al.* 2013). En estas plantas de tratamiento, los PPCPs pueden eliminarse mediante las operaciones de tratamiento normales según sus características fisicoquímicas, sin embargo, lo más frecuente es que un gran porcentaje del total sea transportado en el efluente y, a menos que no sean degradados en última instancia, se descarguen al medio, llegando tanto a ecosistemas tanto terrestres como marinos (Benoit, 2010). Recientemente, muchos grupos de investigación internacionales e instituciones gubernamentales han dirigido sus esfuerzos a la incorporación de un tratamiento terciario a las aguas residuales, adicional a los tratamientos convencionales, con el objetivo de lograr un mayor nivel de depuración, eliminando grupos específicos de químicos,

como los PPCPs, patógenos, etc., que con las tecnologías tradicionales no son eliminados (Kok-Kwang *et al.*, 2011; Gupta y Thakur, 2015). Durante las últimas décadas se ha estudiado la aplicación de microalgas en procesos de biorremediación (fico-remediación) y depuración de aguas residuales (Abdel-Raouf *et al.*, 2012; El-Sheekh *et al.*, 2016). El procedimiento más común consiste en dejar crecer las microalgas libres en el agua contaminada, permitiendo así que incorporen las sustancias disueltas retirándolas del medio, eminentemente nitrógeno o fósforo (Su, 2012) o metales pesados, algunos de ellos como Zn, Cu, Mn, Ni, o Co, esenciales para su crecimiento (revisado en Suresh, Kumar *et al.*, 2015; Priya *et al.*, 2014). Una vez transcurrido un tiempo de crecimiento en dicho medio, las microalgas son retiradas, dejando el agua libre de estas sustancias. Se sabe, además, que las microalgas son capaces de producir una gran diversidad de moléculas de elevado potencial biotecnológico, siendo utilizadas en nutrición y salud humana, nutrición animal, acuicultura, farmacéutica, cosmética o como fuente de bioenergía (de la Vega Naranjo, 2014, Suresh *et al.*, 2015), por lo que la biomasa obtenida en el procedimiento de biomitigación, podría ser empleada con posterioridad. Cuando se trabaja a escala real, la retirada de estas algas del agua tratada encarece su aplicación como tratamiento terciario de depuración (Jiménez-Pérez *et al.* 2004). En este contexto, existen estudios recientes que plantean el empleo de microalgas inmovilizadas en esferas de alginato, en vez de libres, para su uso como biosorbentes (Peretz *et al.* 2008; de-Bashan y Bashan, 2010; Chen-Lin *et al.*, 2017). La inmovilización de estas microalgas en esferas de alginato constituye una alternativa en estudio ya que resolvería estos

problemas de aplicación a gran escala (Al-Rub *et al.* 2004, de-Bashan *et al.* 2004, Maity *et al.*, 2014).

En diversos estudios en los que se han utilizado microalgas inmovilizadas se ha comprobado el alto porcentaje de depuración del medio acuoso de nitrógeno (de-Bashan *et al.*, 2004), níquel (Al-Rub *et al.*, 2004), fósforo (Robinson *et al.*, 1989), metales pesados (Moreno-Garrido *et al.*, 2005) o contaminantes orgánicos (Chekroun *et al.*, 2014). Asimismo, su aplicación como tratamiento terciario en la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) y la inhibición de bacterias coliformes (Abdel-Raouf *et al.*, 2012) ha reforzado su gran utilidad en el tratamiento de aguas residuales.

Existen diversos estudios que constatan la presencia de PPCPs, en ecosistemas marinos, concretamente en la Bahía de Cádiz (SO, España) en concentraciones de rango de ppb-ppt (Aguirre-Martinez *et al.*, 2013). Entre estas sustancias se encuentra la cafeína (CAS N° 58-08-2). La cafeína, es un compuesto alcaloide presente en varias semillas de plantas como, café y cacao, hojas de té, bayas de guaraná y nuez de cola (EUFIC, 2007). Es, además, un principio activo muy utilizado en preparaciones farmacéuticas, como analgésicos, preparaciones para tratar migraña, fiebre o bronquitis, y es generalmente añadida a bebidas de uso muy extendido. Su función es estimular el sistema nervioso central (Timson, 1977). Entre las propiedades fisicoquímicas de la cafeína cabe destacar su alta solubilidad en agua, su relativa persistencia en medio acuoso, y un coeficiente de reparto octanol-agua bajo ( $\log K_{ow} -0.628 \pm 0.753$ ) (Nödler *et al.*, 2014), lo que la hace altamente persistente en el medio acuoso. Debido a estas propiedades, y su alto nivel de consumo, su

presencia en sistemas acuáticos llega a ser de un orden superior al resto de contaminantes, siendo incluso empleada como indicador antropogénico en sistemas acuáticos contaminados por aguas residuales (Rodríguez del Rey, 2010; Sotelo *et al.*, 2014).

Esta sustancia ha sido encontrada en el medio en un rango de concentración de 0,01 a 293  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Aguirre-Martínez *et al.*, 2013). En distintos estudios se ha observado que la cafeína produce efectos adversos en

organismos acuáticos, tanto de agua dulce como marina, pertenecientes a ecosistemas donde esta sustancia es vertida (Tabla 1). Igualmente, es bien conocido que el consumo excesivo de cafeína produce impactos negativos en la salud humana, como trastornos del sueño, trastornos cardiovasculares o reducción de tasas de fertilidad (Rivera - Utrilla *et al.*, 2013, Sotelo *et al.*, 2014).

**Tabla 1:** Principales efectos de la cafeína en organismos acuáticos.

| Efectos                 | Concentración mínima ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Organismo                    | Fuente                              |
|-------------------------|---|------------------------------|-------------------------------------|
| Desarrollo y fisiología | 0,6   | <i>Rana pipiens</i>          | Fraker y Smith. 2004                |
| Toxicidad               | <0,1  | <i>Hydra attenuata</i>       | Quinn <i>et al.</i> 2013            |
| Toxicidad               | 0,03  | <i>Coral algae</i>           | Pollack <i>et al.</i> 2009          |
| Toxicidad               | 0,05  | <i>Mytilus californianus</i> | Rodríguez del Rey. 2010             |
| Crecimiento             | 0,1   | <i>Carcinus maenas</i>       | Aguirre Martínez <i>et al.</i> 2013 |

A pesar de ello, la normativa ambiental sobre vertido de contaminantes emergentes, incluida la cafeína, es escasa, y generalmente, sigue la legislación aplicada a los PPCPs y otros contaminantes emergentes basada en el principio de precaución, es decir, evitar su entrada al medio mediante metodologías de fin de línea, como por ejemplo el ozono, filtración por membrana o ultravioleta (Benoit, 2010). En el caso de la cafeína, se han ensayado su retirada del medio acuoso usando nanotubos de carbono (Bahrami *et al.*, 2017) o esferas de hidrogel (Zarzar *et al.*, 2015), si bien hay muy poca bibliografía al respecto.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la posibilidad del empleo de

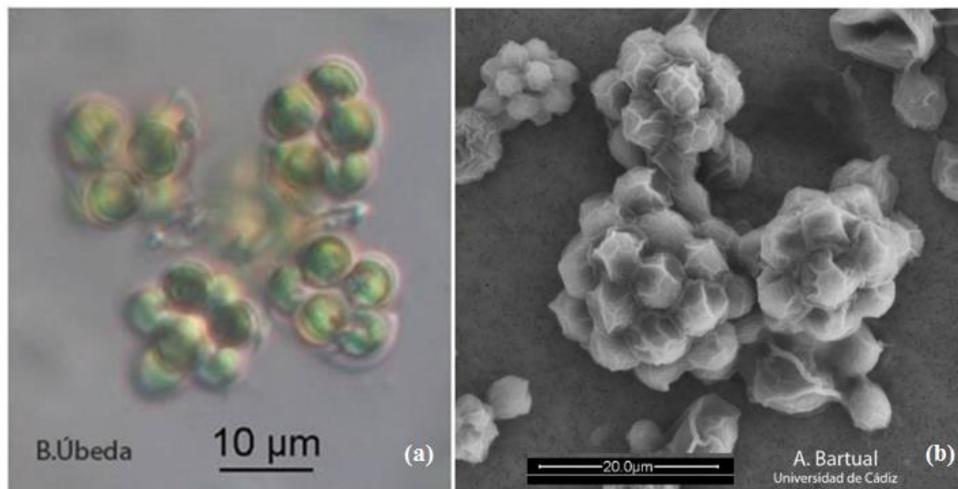
microalgas como depuradoras de la cafeína, pero encapsuladas en esferas de alginato, más fácilmente recuperables tras el proceso de biosorción. Para ello se aisló una microalga clorofita (*Coelastrum pseudomicroporum*) que crece óptimamente en sistemas de agua residual (Ubeda *et al.*, 2017) y se estudió la posibilidad de su crecimiento inmovilizada, así como su posterior utilización como biosorbente de cafeína.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Cultivo stock de *Coelastrum pseudomicroporum*

Para este estudio, el alga escogida fue una cepa *Coelastrum*, clorofita unicelular perteneciente a la familia *Scenedesmaceae*, orden *Chlorococcales*, clase *Chlorophyceae* (Bourrelly, 1972) aislada del agua de cultivo procedente de raceways o lagunas de cultivo, de 32 m<sup>2</sup> instalados en la planta depuradora de aguas residuales (EDAR El Torno, Chiclana, 36°25'37.340"N-6°9'23.386"W, Cádiz, España). *Coelastrum pseudomicroporum* presenta forma esférica, y se observa bajo microscopio óptico individualmente o en colonias de distinto número de células (Fig. 1a) envueltas en una vaina claramente visible en microscopía electrónica de barrido (Fig. 1b).

Para el desarrollo de los experimentos, la cepa de *C. pseudomicroporum* fue cultivada durante varias generaciones en medio BBM (*Bold's Basal Medium*; (Andersen, 2005) con un pH de 6,6. Las resiembras se realizaron siempre en ambiente estéril ultravioleta, usando matraces y botellas previamente esterilizadas en autoclave. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital (60 r.p.m.) bajo una irradiancia incidente de 250  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se escogió esta irradiancia a partir del estudio de *Úbeda et al.*, (2017), en el cual se demuestra que el crecimiento óptimo de esta cepa entre 200 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El cultivo fue escalado en laboratorio en ambiente estéril hasta conseguir una densidad de 760.000 cel mL<sup>-1</sup>. Éste constituyó el cultivo stock que se emplearía en los experimentos de biosorción.



**Figura 1.** Fotografías que muestran distintas colonias de *Coelastrum pseudomicroporum* a microscopía óptica (con permiso de la autora) (a) y microscopía electrónica de barrido (b).

## 2.2. Fabricación de esferas de alginato

Las esferas que se emplearon en los distintos experimentos se fabricaron con alginato sódico, siguiendo el método de Hertzberg y Jensen (1989), modificado por Moreno-Garrido *et al.*, (2002). Todo el material fue previamente esterilizado en autoclave y manipulado en lámpara ultravioleta. Para la fabricación de las esferas se usó una cámara *Vaccu-Pette/96TM* (Figura 2), mediante la cual el alginato sódico se deja caer a través de 96 pocillos de igual tamaño sobre una solución de 2.5 g de cloruro de calcio en 250 ml de agua milli-Q (en un recipiente de vidrio), en agitación magnética a 60 r.p.m,

durante un tiempo aproximado de 15 minutos. Se consiguen de este modo esferas de estructura estable y muy similares en forma y tamaño, con un diámetro promedio de  $5,3 \pm 0,43$  mm (n=50). El diámetro se midió utilizando un analizador de imagen (*LEICA Application Suite* v. 4.4.0, *LAS* v. 4.4.). Una vez formadas las esferas de alginato, éstas se recogieron con un cedazo y fueron enjuagadas con agua milli-Q para eliminar posibles restos de cloruro de calcio. En todo momento las esferas fueron manipuladas con pinzas y cucharas en ambiente estéril.

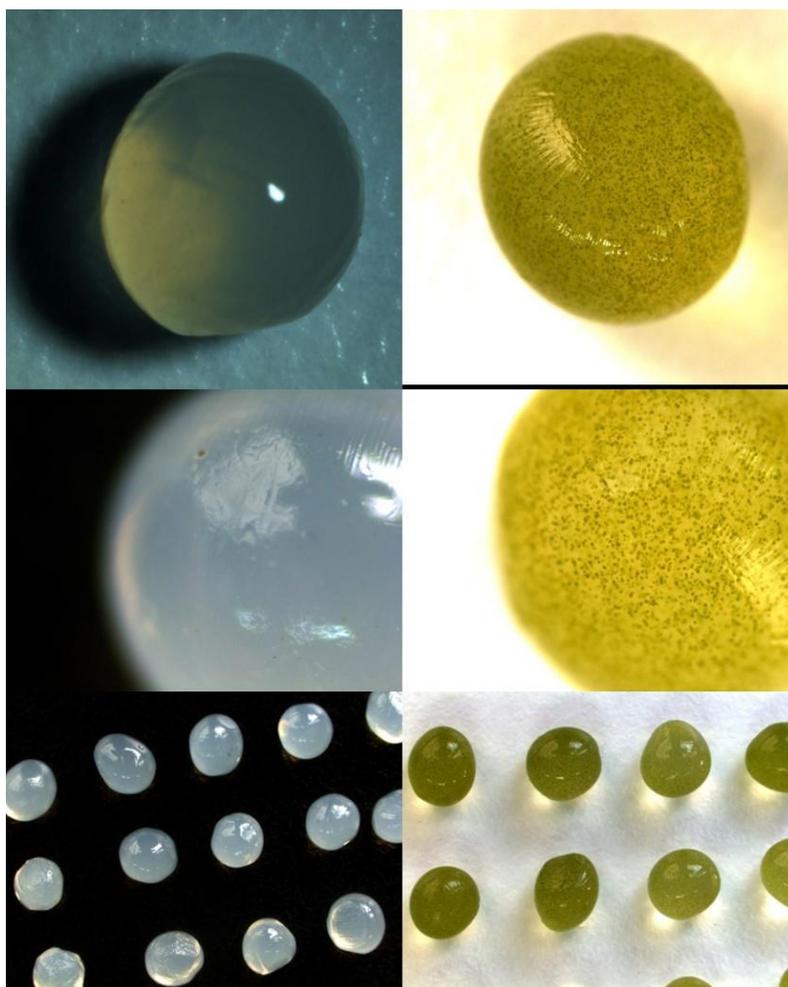


**Figura 2.** Fabricación de esferas en campana en ambiente estéril mediante la cámara *Vaccu-Pette* y la manipulación de esferas de alginato.

### 2.3. Inmovilización de *Coelastrum pseudomicroporum* en esferas de alginato

Para inmovilizar *C. pseudomicroporum* en las esferas, se tomaron 200 mL de cultivo stock de *C. pseudomicroporum*, y se centrifugaron durante 5 minutos. Este concentrado de algas se mezcló con el alginato sódico fabricado del modo explicado en el apartado 3.2. antes de proceder a la fabricación de las esferas.

Una vez mezcladas ambas partes, se siguió el protocolo de fabricación de esferas idéntico al descrito para las esferas sin algas (apartado 3.2.) obteniendo esferas con colonias de algas que serían empleadas para los análisis de biosorción de cafeína como se explicará más adelante (Figura 3), obteniendo una densidad celular inicial de  $50.000 \text{ cel mL}^{-1}$ .



**Figura 3.** Fotografías que muestran las esferas de alginato sin microalgas (columna izquierda) y con las colonias de microalgas en su interior (columna derecha). Escala: 1 mm

Para los recuentos celulares que permitieron realizar el seguimiento del crecimiento algal, de cada botella inoculada con esferas se tomaron 3 esferas de alginato a tiempos 0 y 72 horas. Las esferas fueron disueltas individualmente, sumergiéndolas en 1 ml de una disolución 4 % de bicarbonato de sodio (De Bashan et al. 2004), y sometidas posteriormente a ultrasonidos durante 5 segundos. Una vez disueltas, se calculó densidad celular mediante una cámara Improved-Neubauer contando un mínimo de 400 células por recuento y réplica. La tasa de crecimiento se calculó en base a la siguiente ecuación (Guillard y Sieracki, 2005):

$$N_t = N_0 e^{rt} \quad (1)$$

Donde  $N_t$  es igual a la población final en la última unidad de tiempo;  $N_0$  representa la población al principio del intervalo de tiempo,  $r$  representa la tasa intrínseca de crecimiento, y  $t$ , el tiempo. A partir de esta ecuación, la tasa de crecimiento se obtuvo de la siguiente forma:

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / (t_f - t_0) \quad (2)$$

#### 2.4. Cuantificación de cafeína disuelta

Para la cuantificación de la evolución temporal de la concentración de cafeína disuelta en el medio se tomaron alícuotas de 1.5 mL de cada botella a tiempos 0, 24, 48 y 72 horas. Se inyectaron alícuotas de 10  $\mu$ L en un sistema de cromatografía de ultra resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) tipo *EvoQ Elite* (Bruker). Se utilizó una columna cromatográfica tipo C18 (*Intensity Solo*, 50 mm x 2.1 mm, tamaño de partícula de 2  $\mu$ m) y dos disolventes: agua con ácido fórmico 0.1% (A) y metanol (B). El gradiente utilizado fue (flujo = 0.4 mL min<sup>-1</sup>): 85% A al inicio, disminuyendo hasta 40% en 2 minutos, y vuelta a las

condiciones iniciales en 1 minuto. La identificación y cuantificación de la cafeína se llevó a cabo en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) utilizando las transiciones 195 > 137 y 195 > 139 y una fuente de electrospray en modo ionización positiva con los siguientes parámetros: temperatura de la fuente = 250°C, temperatura de la sonda = 450 °C, flujo de gas en el cono = 20 mL min<sup>-1</sup>, flujo de gas en la sonda = 50 mL min<sup>-1</sup>, flujo de gas en el nebulizador = 60 mL min<sup>-1</sup>, presión del gas de colisión = 2.0 mTorr, voltaje del electrospray = 4500 V. Para la cuantificación de la cafeína se elaboró una recta de calibrado entre 1 y 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> ( $R^2 > 0.995$ ). Estas condiciones son derivadas de un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (Baena-Nogueras *et al.*, 2016).

#### 2.5. Diseño experimental

Para todos los experimentos se emplearon botes *Nunclon* de 200 mL estériles a los que se añadían 100 mL de BBM estéril. Estos botes se mantuvieron en condiciones equivalentes de luz de 250  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y en agitación orbital de velocidad 60 r.p.m, en cámara de cultivo a 19  $\pm$  1°C. Las concentraciones de cafeína empleadas en los ensayos fueron entre 0 (cultivo control), 0.5, 5, 50 y 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, comprendidas en el rango habitualmente encontrado en aguas residuales y en agua de mar (de 0,01  $\mu$ g L<sup>-1</sup> a 293  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) (Aguirre- Martínez et al. 2013). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se comprobó previamente que la concentración de cafeína añadida al medio de cultivo no disminuía durante las 72 h de los ensayos. Empleando los materiales y técnicas descritas anteriormente, se realizaron dos experimentos que permitieron cuantificar la evolución temporal de la concentración de cafeína en el agua de los cultivos en i) en presencia de

esferas sin algas y ii) en presencia de esferas con algas.

i) Se desarrolló un experimento donde 15 botellas *Nunclon* con 100 mL de BBM contaminado con cafeína ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) se expusieron a distinto número de esferas de alginato sódico sin microalgas (triplicados de 50, 100, 150, 200 y 300 esferas) siempre en las condiciones experimentales descritas anteriormente. Se tomaron muestras de 1.5 mL cada 24 horas durante 72 h. Las muestras fueron tomadas en ambiente estéril con pipeta de 5 mL, y conservadas

en tubos *Eppendorf* a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

ii) Se desarrolló un experimento en el que se emplearon 12 botellas *Nunclon* inoculadas cada una con 50 esferas con algas y con concentración crecientes de cafeína (triplicados de 0, 5, 50,  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 4). En este experimento se persiguieron dos objetivos, por un lado, comprobar la viabilidad del crecimiento de *C. pseudomicroporum* en el interior de las esferas de alginato, y por otro, comprobar si la introducción de microalgas en las esferas de alginato inducía la absorción de cafeína del medio.



**Figura 4.** Distribución de las botellas *Nunclon* inoculadas con 50 esferas con algas inmovilizadas en el agitador orbital.

Al igual que en el experimento anterior, se tomaron muestras de 1.5 mL de cada botella a tiempos 0, 24, 48 y 72 h, para determinar la concentración de cafeína. Además, durante esas 72 h se tomaron 3 esferas por botella para los recuentos celulares y seguimiento del crecimiento de *C. pseudomicroporum*, siguiendo las indicaciones de los protocolos USEPA (2012) para ensayos de toxicidad con algas. Las muestras de agua se tomaron en ambiente estéril en lámpara ultravioleta con una pipeta de 5 mL y fueron conservadas en tubos *Eppendorf* a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### **2.6. Tratamiento de datos y análisis estadístico**

El programa utilizado para el tratamiento de datos y análisis estadístico fue *SPSS Statistics 20*. Para la comparación de los datos de crecimiento de *C. pseudomicroporum* en esferas de alginato sódico con los resultados obtenidos por Úbeda *et al.* (2017) se realizó un ANOVA de un factor, habiendo comprobado anteriormente las tres condiciones del modelo: aleatoriedad (test de Rachas), normalidad (test de Shapiro-Wilk), y homocedasticidad (estadístico de Levene). Las diferencias significativas se establecieron con valores de probabilidad de  $p < 0,05$ .

Para el análisis de los datos de crecimiento en función de distintas concentraciones de cafeína, se realizó un análisis de la varianza utilizando un ANOVA de un factor, complementando con los tests de Tukey y Dunnett. Con anterioridad al ANOVA, se comprobaron las distintas condiciones (aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad). Se determinaron las correlaciones entre variables utilizando el test de correlaciones de variables de

Pearson. Las diferencias significativas se establecieron con valores de probabilidad de  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Tasas de crecimiento de *Coelastrum pseudomicroporum* inmovilizada en esferas de alginato**

La tasa de crecimiento de *C. pseudomicroporum* inmovilizada en esferas de alginato en condiciones control fue de  $0.56 \pm 0.032 \text{ d}^{-1}$ . Esta tasa fue significativamente inferior (ANOVA;  $p < 0,05$ ) a la obtenida por Úbeda *et al.* (2017) para cultivos de *Coelastrum* libre en el medio en condiciones de temperatura y luz equivalentes a las empleadas en este trabajo ( $1.23 \pm 0.8 \text{ d}^{-1}$ ). Respecto al efecto de la cafeína en el crecimiento de *C. pseudomicroporum* esferificada, no se observaron diferencias significativas (ANOVA,  $p > 0,05$ ) de *C. pseudomicroporum* cultivada en las distintas concentraciones de cafeína, con respecto al control (sin cafeína) (Tabla 2).

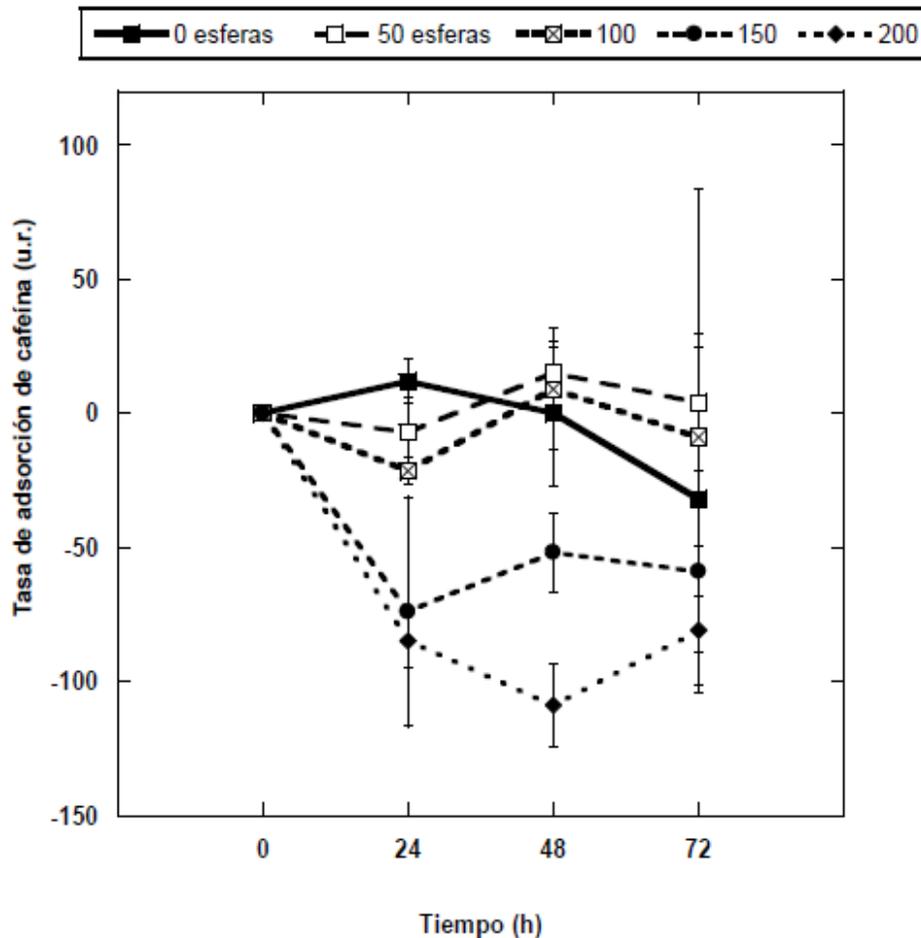
#### **3.2. Análisis de la concentración de cafeína en el medio en presencia de distinto número de esferas de alginato sódico sin alga**

La concentración de cafeína en el medio a las 24, 48 y 72 h, mostró mucha variabilidad en los tratamientos con mayor número de esferas de alginato, esto es, 150, 200, 300 esferas (Figura 5). Se consideró que el número de esferas idóneo por su estabilidad en los resultados para ser utilizado en los experimentos con alga fue 50 esferas, pues no se observaron variaciones significativas en la concentración de cafeína respecto al control.

**Tabla 2:** Tasas de crecimiento de *Coelastrum pseudomicroporum* esferificada expuesta a distintas concentraciones de cafeína.

| Concentración de cafeína<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Tasa de crecimiento<br>( $\text{d}^{-1}$ ) |
|--|--|
| 0  | $0.561 \pm 0.032$                          |
| 5  | $0.536 \pm 0.014$                          |
| 50   | $0.496 \pm 0.099$                          |
| 500  | $0.576 \pm 0.024$                          |

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar de  $n=3$  cultivos para cada condición.

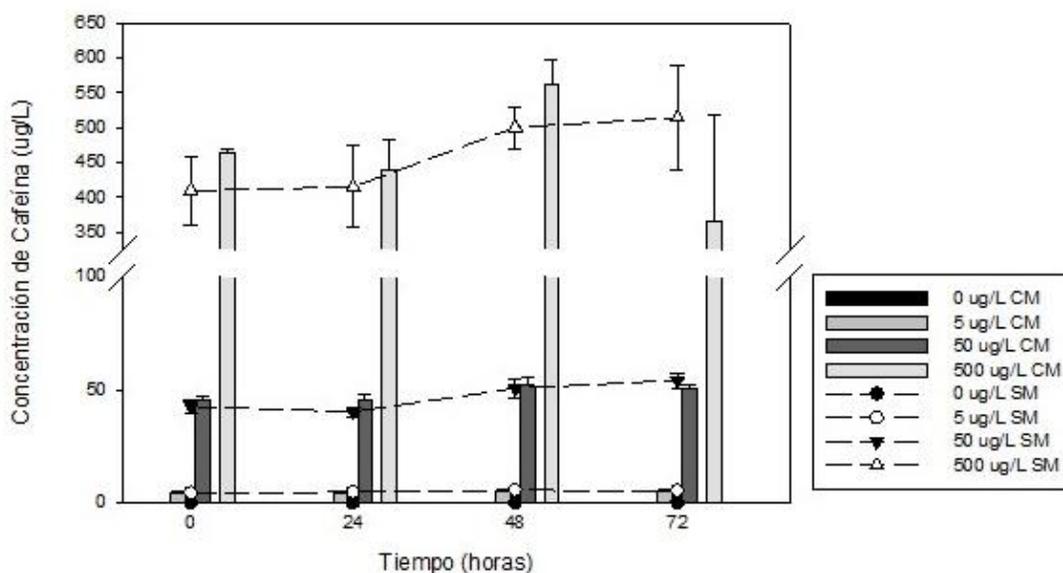


**Figura 5:** Tasa de desaparición de cafeína disuelta en botellas *Nunclon* con 200 mL de medio en presencia de 0, 50, 100, 150 y 200 esferas de alginato sin algas.

### 3.3. Variación de la concentración de cafeína en medio acuoso con microalgas inmovilizadas en esferas de alginato sódico

Los resultados del análisis de las muestras del cultivo control (sin cafeína) mostraron que la concentración en el medio de cafeína no aumentó en el tiempo, por lo que se descartó la posibilidad de liberación de cafeína al medio por parte del alga. Este análisis se realizó puesto que diversos autores han recomendado considerar dicha la posibilidad de que un alga proveniente de aguas residuales como la que hemos utilizado, hubiera podido acumular cafeína en su medio original y actuar como fuente de cafeína en un medio no contaminado (Díaz-Garduño *et al.*, 2017). Tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración de cafeína después del

tratamiento con esferas de alginato sin microalgas, lo que descarta que la cafeína se adsorbiera a las paredes de las esferas de alginato. Por otro lado, en el caso de la exposición de 50 esferas con alga inmovilizada a las distintas concentraciones de cafeína no se observaron porcentajes de eliminación de cafeína del medio significativos en las primeras 24 - 48 h para la mayor parte de las concentraciones ensayadas (Figura 6), sin embargo, sí se apreció un disminución de la concentración de cafeína, en el tratamiento con esferas de alginato conteniendo microalgas, para la concentración de exposición de cafeína más alta (500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a las 72 horas alcanzándose un valor de (366.4  $\pm$  152.8  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).



**Figura 6.** Concentración de cafeína disuelta a las 24, 48 y 72 h de adición en triplicados de botellas con 50 esferas de alginato inoculadas con microalga (CM) y con 50 esferas de alginato sin microalgas (SM). La concentración inicial de cafeína fue de 0, 5, 50 ó 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4. DISCUSIÓN

La capacidad biorremediadora de las microalgas en cultivo ha sido claramente demostrada por diversos autores, siendo muy eficientes en la retirada de nitrógeno y fósforo (Griffiths, 2009; Boelee *et al.*, 2012) metales pesados (Travieso *et al.*, 1996) y otros contaminantes orgánicos (Matamoros *et al.*, 2015), permitiendo la generación de biomasa algal de un modo sostenible. En la última década se han comenzado a estudiar en estos procesos el uso de microalgas inmovilizadas en geles como alginato o quitosano (Tam y Wong, 2000; González y Bashan, 2000; Hameed, 2007). Mayoritariamente se ha empleado el género *Chlorella* para la retirada de nutrientes del agua, como técnica de biorremediación, aunque también se ha demostrado su utilidad para la retirada de hidrocarburos aromáticos (Tam *et al.*, 2010). Esta posibilidad abre la opción de abaratar el proceso de concentración de la biomasa algal, por ser mucho más sencilla su recolección, si bien, son pocas las especies algales en las que se ha observado un crecimiento óptimo inmovilizadas en esferas. En el presente trabajo demostramos que *Coelastrum pseudomicroporum* es capaz de crecer inmovilizada en esferas incluso en presencia de contaminantes como cafeína. Úbeda *et al.*, (2017) estudiaron el efecto de la irradiancia en la tasa de crecimiento de *Coelastrum pseudomicroporum* cultivada libre y en idénticas condiciones de temperatura y fotoperiodo a las empleadas en nuestro trabajo. Estos autores, concluyeron que *Coelastrum* alcanzaba su tasa de saturación de crecimiento ( $1.23 \pm 0.8 \text{ d}^{-1}$ ) a irradiancias entre  $100\text{-}400 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Bouterfas *et al.*, (2006) obtuvieron resultados similares para otra cepa de *Coelastrum*, estableciendo una tasa óptima de crecimiento a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $200$

$\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiancia de aproximadamente  $1.5 \text{ d}^{-1}$ . En el presente trabajo observamos que la tasa de crecimiento *C. pseudomicroporum* inmovilizada en esferas de alginato es significativamente menor (ANOVA,  $p < 0,05$ ) frente a su crecimiento libre en el medio, disminuyendo casi en un 50% con respecto a la tasa de crecimiento obtenida por Úbeda *et al.* (2017). Este resultado es previsible, pues, por un lado, la inmovilización en un medio más denso que el agua, disminuye la movilidad y por tanto es probable que ralentice el proceso de división mitótica. Por otro lado, la absorción de nutrientes del medio puede verse también ralentizada, disminuyendo su crecimiento. Por último, una tercera razón que ha podido afectar a dicho crecimiento, es que la esfera de alginato actúa como barrera entre la luz y la microalga, por lo que, aun siendo la irradiancia incidente sobre los cultivos de  $200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , la luz que realmente recibe la microalga dentro de la esfera debe ser menor. Resultados similares fueron obtenidos por Aguilar-May y Saavedra (2009). Ruiz Marín *et al.* (2010) estudiaron el crecimiento de dos especies de microalgas inmovilizadas en alginato: *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* sin encontrar diferencias significativas en el crecimiento de ambas en forma libre e inmovilizada. Del mismo modo, Jiménez-Pérez *et al.* (2004) compararon el crecimiento en forma libre e inmóvil en alginato sódico de *Scenedesmus intermedius* y *Nannochloris sp.*, encontrando que el crecimiento de *Scenedesmus intermedius* disminuía tras la inmovilización, y en cambio en *Nannochloris sp* no existían diferencias significativas en crecimiento. Estos datos permiten suponer que, dependiendo de la especie, la inmovilización afectará de un modo u otro al crecimiento, tal como publicaron Moreno-Garrido *et al.* (2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo son novedosos en este sentido, pues no hay ningún trabajo publicado en el que se haya empleado *Coelastrum pseudomicroporum* inmovilizada en esferas y demostramos su posible cultivo de este modo, siendo además una especie que crece óptimamente en agua residual, lo que abarata su coste. Además, como demostramos en este trabajo, su tasa de crecimiento no se vio afectada por la presencia de concentraciones de cafeína entre 5 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabla 1). Estas concentraciones de cafeína son del rango de concentraciones habitualmente encontradas en efluentes de aguas residuales (Aguirre-Martínez *et al.* 2013) y en el medio acuático. Estos resultados permiten considerar a la microalga *C. pseudomicroporum* como idónea para ser empleada en la retirada de otros contaminantes en el medio acuoso, ya que no se ha observado que la cafeína tenga efectos adversos sobre ella, como sí se ha observado para otras especies como microalgas *Isochrysis galbana* y *Pseudokirchneriella subcapitata* (Aguirre-Martínez *et al.*, 2015).

Respecto a la capacidad biorremediadora de *C. pseudomicroporum* inmovilizada en esferas, los resultados no son significativos para la cafeína (Figura 5) con las densidades celulares empleadas. Si bien, sí que se observó una tendencia a la disminución de cafeína en la concentración mayor, por lo que entendemos que con una densidad celular mayor por esfera esta significancia sería mayor. Zarzar *et al.* (2015) han demostrado la utilidad del empleo de esferas de alginato para retirar cafeína disuelta en agua y han evaluado las mejores condiciones para que sea efectiva. Es de esperar, sin embargo, que la adición de microalgas en las esferas pueda hacer más eficiente la adsorción de otros elementos del agua que el alga incorporaría

(ej.: nutrientes y metales). El uso de esferas de gel con microalgas puede ser así, una técnica de biorremediación eficiente para determinadas sustancias que abarataría además la producción y concentración de biomasa algal. Además, puede ser extensivo a otros contaminantes orgánicos y microalgas (Matamoros *et al.*, 2015), que ya se han visto crecer óptimamente en dicho hidrogel, como *Chlorella* o *Scenedesmus*. Aun no habiendo encontrado diferencias significativas de la retirada de cafeína del medio por parte de la microalga *C. pseudomicroporum*, no se descarta esta microalga como una buena candidata para su inmovilización y uso como biosorbente, ya que se ha comprobado que crece inmovilizada en las esferas de alginato, que mejora la retirada de cafeína frente a esferas sin microalga y que constituye un método que puede abaratar el cultivo de microalgas, respetuoso con el medio ambiente.

## 5. Conclusiones

*Coelastrum pseudomicroporum* crece inmovilizada en las esferas de alginato sódico, aunque su tasa de crecimiento es significativamente menor que la tasa de crecimiento encontrada en la misma especie no inmovilizada.

La concentración de cafeína no afecta significativamente al crecimiento de *Coelastrum pseudomicroporum* en un rango entre 5 y 500  $\mu\text{g/L}$ .

La introducción de 50 esferas de alginato sódico sin microalgas en 200 mL de medio no contribuye significativamente a la retirada de cafeína del medio.

La utilización de *C. pseudomicroporum* inmovilizada en esferas de alginato no retira cafeína de modo significativo, si bien, en altas concentraciones hay una tendencia a su disminución pudiendo ser potencialmente viable como biosorbente de

otros fármacos de mayor capacidad adsorbente.

## 6. Reconocimientos

Este trabajo se ha realizado en el contexto del Proyecto IPT-2011-1344-920000 del subprograma *Innpacto 2011*, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) del Gobierno de España y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Open Access: *This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0) which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.*

## 7. Referencias

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3): 257-275.
- Aguilar-May, B., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Lizardi, J., & Voltolina, D. 2007. Growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH. *Journal of Applied Phycology* 19(2): 181-183.
- Aguirre-Martínez, G. V., Del Valls, T. A., & Martín-Díaz, M. L. 2013. Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research* 87-88: 1-11.
- Aguirre-Martínez, G. V., Owuor, M. A., Garrido-Pérez, C., Salamanca, M. J., Del Valls, T. A., & Martín-Díaz, M. L. 2015. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 120: 75-85.
- Al-Rub, F. A. A., El-Naas, M. H., Benyahia, F., & Ashour, I. 2004. Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. *Process Biochemistry* 39(11): 1767-1773.
- Andersen, R.A. Ed, 2005. *Algal culturing techniques*. 1<sup>st</sup> edition. Ed. Elsevier Academic Press. London. 577 pp.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F. 2017. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research* 128:2-11.
- Baena-Nogueras, R.M, Pintado-Herrera M.G, González-Mazo E., Lara P.M. 2016. Determination of Pharmaceuticals in Coastal Systems Using Solid Phase Extraction (SPE) followed by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Current Analytical Chemistry* 12(3): 183-201.
- Bahrami, M., Amiri, M.J., Koochaki, S. 2017. Removal of caffeine from aqueous solution using multi-wall carbon nanotubes: kinetic, isotherm, and thermodynamics studies. *Pollution* 3(4): 539-552.
- Benoit, R. ed. 2010. Pharmaceuticals in the environment: *Current knowledge and need assessment to reduce presence and impact*. European Commission.
- Blair, B.D. 2014. The occurrence, fate, environmental impact and management implications of pharmaceutical and personal care products in wastewater and the environment. Doctoral Thesis. University of Wisconsin Milwaukee. 220 pp.
- Boelee, N.C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C.J.N., Wijffels, R.H. 2012. Scenario analysis of nutrient removal

- from municipal wastewater by microalgal biofilms. *Water* 4(2):460-473
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T. 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options of their removal. *Desalination* 239: 229-246.
- Bourrelly, P. 1972. Les Algues d'eau douce. Incitation à la Systématique. Tome I: Les Algues Vertes. Société Nouvelle Des éditions Bouée, Paris, 516 pp
- Bouterfas R., Belkoura M., Dauta, A. 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake *Limnetica* 25(3): 647-656.
- Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., et al. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(2): 464-469.
- Checkroun, K., Sánchez E., and Baghour, M. 2014. The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *International Research Journal of Public and Environmental Health* 1(2): 19-32.
- Chen-Lin Soo, Cheng-Ann Chen, Othman Bojo, Yii-Siang Hii. 2017. Feasibility of Marine Microalgae Immobilization in Alginate Bead for Marine Water Treatment: Bead Stability, Cell Growth, and Ammonia Removal. *International Journal of Polymer Science* Vol. 2017, Article ID 6951212.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental and Health Perspectives* 107: 907-938.
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J., Morey, T., & Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: A novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research* 38(2): 466-474.
- De-Bashan, L.E. y Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects, *Bioresource Technology* 101(6): 1611-1627.
- De la Vega Naranjo, M. 2015. Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva. 125 pp.
- European Food Information Council (EUFIC), 2007. *Caffeine and health*. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/en/nutrition/functional-foods/artid/caffeine-health/>
- El-Sheekh, M.M., Farghl A. A., Galal, H.R., Bayoumi, H.S. 2016. Bioremediation of different types of polluted water using microalgae. *Rendiconti Lincei* 27(2): 401-410.
- EPA. Treating Contaminants of Emerging Concern: A Literature Review Database. 2010.
- Fraker, S.L. y Smith, G.R. 2004. Direct and Interactive Effects of Ecologically Relevant Concentrations of Organic Wastewater Contaminants on *Rana pipiens* Tadpoles. *Environmental Toxicology* 19(3):250-6.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C. Salazar, M. 2006. Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 143 (4): 388-393.
- González, E.L. and Y. Bashan. 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4): 1527-1531.

- Griffiths, E.W. 2009. Removal and utilization of wastewater nutrients for algae biomass and biofuel. Doctoral Thesis. Utah State University.
- Guillard, R.R. L. and Sieracki, M. S. 2005. Counting cells in cultures with the light microscope. In: *Algal culturing techniques*. Ed: R.A. Andersen. Elsevier Inc. 578 pp.
- Gupta, A., Thakur, I.S. 2015. Biodegradation of wastewater organic contaminants using *Serratia* sp. ISTVKR1 isolated from sewage sludge. *Biochemical Engineering Journal* 102:115-124.
- Hameed, M.S.A. 2007. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *African Journal of Biotechnology* 16: 1185-1191.
- Hertzberg S., Jensen A. 1989. Studies of Alginate-immobilized marine microalgae. *Botanica Marina* 32:267-273
- Jiménez-Pérez, M.V, Sánchez-Castillo, P., Romera, O., Fernández-Moreno, D., Pérez-Martínez, C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 392-398.
- Kok-Kwang Ng, Yu-Chen Lin, A., Tsung-Hsien, Y., Cheng-Fang, L. 2011. Tertiary treatment of pharmaceuticals and personal care products by pretreatment and membrane process. *Sustainability & Environmental Research* 21(3): 173-180.
- Maity, J. P., Bundschuh, J., Chien-Yen, C., Bhattacharya, P. 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy* 78: 104-113.
- Matamoros, V., Gutiérrez-Martínez, R., Ferrer, I., Bayona, J.M. 2015. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials* 288: 34-42.
- Moreno-Garrido, I., Campana, O., Lubián, L. M., & Blasco, J. 2005. Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine Pollution Bulletin* 51(8–12): 823-829.
- Moreno – Garrido, I., Codd, G.A., Gadd, G.M., Lubián, L.M. 2002. Cu and Zn accumulation by calcium alginate immobilized marine microalgal cells of *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae). *Ciencias Marinas* 28(1): 107-119.
- Nödler, K., Tsakiri, M., Licha, T. 2014. The impact of different proportions of a treated effluent on the biotransformation of selected micro-contaminants in river water microcosms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11: 10390-10405
- Papa, E., Kovarich, S., Gramatica, P. 2013. Prediction of the competitive interaction of emerging halogenated pollutants with human transthyretin. *Environmental Research* 24: 333e349.
- Peretz, S., y Cinteza, O. 2008. Removal of some nitrophenol contaminants using alginate gel beads. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 319(1–3): 165-172.
- Pollack, K., Balazs, K., Oguntaseitan, O. 2009. Proteomic Assessment of Caffeine Effects on Coral Symbionts. *Environmental Sciences Technologies* 43: 2085-2091.
- Priya, M., Gurung, N., Mukherjee, K., & Bose, S. (2014). Microalgae in removal of heavy metal and organic pollutants from soil. In S. Das (Ed.), *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 521-539). Oxford: Elsevier.

- Quinn B., Gagné F., Blaise C. 2013. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarians, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*. 389: 206-314.
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93(7): 1268-1287.
- Robinson, P. K., Reeve, J. O., & Goulding, K. H. 1989. Phosphorus uptake kinetics of immobilized chlorella in batch and continuous-flow culture. *Enzyme and Microbial Technology* 11(9): 590-596.
- Rodríguez del Rey, Zoe. 2010. Occurrence and Concentrations of Caffeine in Seawater from the Oregon Coast and Potential Effects on the Dominant Mussel, *Mytilus californianus* Doctoral Thesis. Portland State University.
- Ruíz-Marín, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1): 58-64
- Sotelo, J. L., Ovejero, G., Rodríguez, A., Álvarez, S., Galán, J., & García, J. 2014. Competitive adsorption studies of caffeine and diclofenac aqueous solutions by activated carbon. *Chemical Engineering Journal* 240: 443-453.
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. 2012. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species, *Bioresource Technology* 124: 157-162.
- Suresh Kumar, K., Dahms, H., Won, E., Lee, J., & Shin, K. 2015. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 329-352.
- Tam, N.F.Y. y Wong, Y. S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution* 107: 145-151.
- TEKNIKER. 2010. Memoria Técnica Justificativa. Contaminantes emergentes en el agua. Caracterización, degradación, y monitorización. Tekniker, empresa de generación y aplicación de la tecnología y el conocimiento. URL: [http://www.uragentzia.euskadi.eus/u81-0003/es/contenidos/informacion/fuente/es\\_fuente/adjuntos/TEKNIKER\\_2010.pdf](http://www.uragentzia.euskadi.eus/u81-0003/es/contenidos/informacion/fuente/es_fuente/adjuntos/TEKNIKER_2010.pdf)
- Timson, J. 1977. Caffeine. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 47(1): 1-52
- Travieso, L., Benitez, F., Weiland, P., Sánchez, E., Dupeyrón, R., Domínguez, A.R. 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Technology* 55: 181-186.
- Úbeda B., Gálvez, J.A., Michel, M., Bartual A. 2017. Microalgae cultivation in urban wastewater: *Coelastrum* cf. *pseudomicroporum* as a novel carotenoid source and a potential microalgae harvesting tool. *Bioresource Technology* 228: 210-217.
- USEPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. In: *Environmental Monitoring Systems Laboratory*, Office of Research and Development, fifth ed. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 20460.
- Zarzar, A., Hong, M., Llanos B., Navarro A. 2015. Insights into the Eco-Friendly Adsorption of Caffeine from Contaminated Solutions by Using Hydrogel Beads. *Environmental Analytical Chemistry* 2:4.