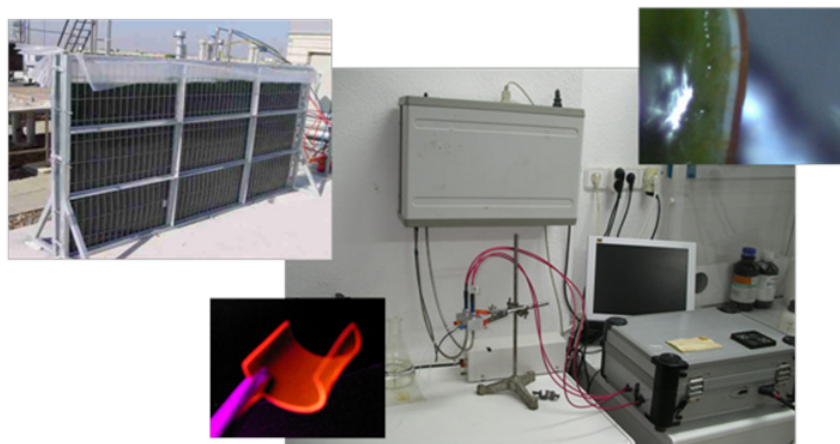


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**BIOSENSORES Y SENSORES LUMINISCENTES PARA
LA DETECCIÓN DE SIMAZINA EN AGUA BASADOS EN
MICROALGAS Y PARA LA MONITORIZACIÓN DE O₂,
CO₂ Y BIOMASA EN CULTIVOS MICROALGARES**



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Haigh Flórez

Director:

Guillermo Orellana Moraleda

Madrid, 2012

A mis abuelos.

“Casi todo lo que realice será insignificante, pero es muy importante que lo haga”

(Mahatma Gandhi)

El trabajo resumido en esta Memoria ha sido realizado en los laboratorios del Grupo de investigación en Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) de la Facultad de CC. Químicas en la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof. Guillermo Orellana, catedrático de Química Orgánica. La financiación de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a dos proyectos independientes, FUTURSEN y SOST-CO₂.

Quiero empezar expresando mi mayor agradecimiento a mi director de tesis, Prof. Guillermo Orellana, por haber confiado en mí y haberme iniciado en el camino de la investigación; pero, sobre todo, por ser un ejemplo como científico, como profesional y como persona.

Agradezco el apoyo de mi familia y amigos durante todos estos años, en especial a mis dos chichas, Juana y Cynthia. Sin vosotras no habría podido terminar.

Quiero agradecer también a los profesores M^a. Cruz Moreno Bondi, David García Fresnadillo, M^a Concepción Pérez Conde, Ana M^a Gutiérrez Carreras y Fernando Navarro Villoslada por haberme ayudado y aconsejado siempre que lo he necesitado.

Agradezco también, cómo no, al resto de los miembros de GSOLFA, presentes y pasados, por su apoyo y compañía, la lista es larga y espero no dejarme a nadie: Ana Belén Descalzo, Bruno Pedras, André Santos, Irene Núñez, Raquel Chamorro, Alexandre Vieira, Rahma Ahmed, Luz Karime Gil, Irene Izquierdo, Elena Benito, Javier Lucas Urraca, Victoria Glez. de Vallejo, Sonia Herranz, Sergio Carrasco, Markel Denet Luaces, Alen Nils Baeza, Mey Liana Wulandari, Elena Benito, Aurélien Auger, Erika Rodríguez, Ruymán Santana, Laura Tormo, Sergio Abad, Silvia Mateos, Pilar Cercós, Clara Cano, Jaime Mateos, Paco Manjón, Gizachew Yeabiyo, Luca Zanella, Kassio M. Gomes de Lima, Nicolás Seclén, Sofia Martins, Silvia Pinheiro, Marta Grande, Silvia Cabañas, Juan López, Jolanta Zdunek, Mónica Álvarez, Klecia Morais, Zhen-He Chen, Khalid Mehmood, Maoel Veiga, Laura Villén, Montserrat Santana, María Moreno, Clara Somoza, Laura Tudela, Cristina García, Freda Chio y, por último, al alma del grupo, Nuria Martín. Habéis sido mucho más que compañeros.

Agradecer también la importantísima colaboración de los miembros del grupo ALBIOTOX (Biotecnología de Microalgas: Producción y Toxicidad) del Dpto. de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid. En especial a los profesores Eduardo Costas y Victoria López, así como a la estudiante de doctorado Cristina de la Hera y a ex miembros del mismo grupo como Héctor Rodríguez, Mónica Rouco o Emilia Maneiro.

Agradezco también la colaboración prestada por la empresa madrileña Ultrason Sistemas (antes Interlab Ingeniería Electrónica), en especial por los doctores Maximino Bedoya y Jesús Delgado, por haber compartido sus conocimientos y experiencia con el dispositivo de medida OPTOSEN[®].

También agradecer al personal del Estación Biológica de Doñana por facilitarnos los modos y medios para realizar medidas de campo con el biosensor microalgal, en especial a la responsable de proyectos Rosa Fernanda Rodríguez Manzano.

Agradezco también la inestimable colaboración prestada por el grupo de investigación IBVF (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla), en especial a la Prof. Mercedes García González y a su colaborador Pepe Moreno.

INDICE

PRÓLOGO	10
OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO GENERAL	12
DESARROLLO DE BIOSENSORES MICROALGARES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA	14
INTRODUCCIÓN	16
1. BIOSENSORES.....	16
2. BIOSENSORES MICROALGARES.....	22
2.1. BIOSENSORES MICROALGARES BASADOS EN LA FOTOSÍNTESIS	24
2.1.1. BIOSENSORES BASADOS EN LA EMISIÓN DE LA CLOROFILA	29
2.1.2. BIOSENSORES BASADOS EN LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO.....	30
2.2. BIOSENSORES BASADOS EN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	31
2.3. UN NUEVO BIOSENSOR MICROALGAR	32
PARTE EXPERIMENTAL	35
1. MEMBRANA CON MICROALGAS INMOVILIZADAS.....	36
1.1. SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES	37
1.2. SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES	38
1.3. MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN	40
2. TRANSDUCTOR.....	41
2.1. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE TRANSDUCTORES ÓPTICOS DE OXÍGENO.....	42
2.2. FABRICACIÓN DEL TRANSDUCTOR DEL BIOSENSOR MICROALGAR	43
2.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DEL TRANSDUCTOR.....	43
3. DISPOSITIVO DE MEDIDA DEL BIOSENSOR MICROALGAR	45
4. COMPONENTES DEL DISPOSITIVO	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1. MICROALGAS	49
1.1. PROCESO DE SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES.....	50
1.2. PROCESO DE SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES.....	51
1.3. CARACTERIZACIÓN DE AMBAS CEPAS.....	53
1.4. INMOVILIZACIÓN	55
2. TRANSDUCTOR DE OXÍGENO	60
2.1. PRINCIPIO DE MEDIDA	60
2.2. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE TRANSDUCTORES ÓPTICOS DE OXÍGENO.....	64
2.2.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SÍLICE.....	64
2.2.2. EFECTO DEL TAMAÑO DE LA PARTÍCULA DE SÍLICE	67

2.2.3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE TIEMPO DE VIDA DE EMISIÓN	68
3. DESARROLLO DEL BIOSENSOR MICROALGAR	70
3.1. FABRICACIÓN DEL TRANSDUCTOR DE OXÍGENO	70
3.2. PRINCIPIO ÓPTICO DE MEDIDA DEL BIOSENSOR MICROALGAR	70
3.3. ANALITO SELECCIONADO	72
3.4. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	74
3.5. CELDA DE MEDIDA Y TERMINAL SENSIBLE	77
3.6. DISPOSITIVO COMPLETO DE MEDIDA.....	79
3.7. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DEL BIOSENSOR	83
3.7.1. SELECCIÓN DE MICROALGAS E INMOVILIZACIÓN DE LAS MISMAS	83
3.7.2. CAUDAL DEL SISTEMA	84
3.7.3. POTENCIA RADIANTE DE LA LUZ ACTÍNICA Y DURACIÓN DE LOS CICLOS LUZ-OSCURIDAD	86
3.7.4. TEMPERATURA.....	88
3.7.5. CONCENTRACIÓN DE MICROALGAS EN LA BIOMEMBRANA.....	90
3.7.6. TIEMPO DE INCUBACIÓN	92
3.7.7. COMPORTAMIENTO DEL BIOSENSOR EN EL LABORATORIO	93
3.7.8. COMPORTAMIENTO DEL BIOSENSOR MICROALGAR CON MUESTRAS REALES E <i>IN SITU</i>	97
CONCLUSIONES.....	99
TRANSDUCTOR LUMINISCENTE DE O₂ DISUELTO	99
BIOSENSOR MICROALGAR DE SIMAZINA	99
PERSPECTIVAS FUTURAS	101
DESARROLLO DE OPTOSENSORES DE PARÁMETROS CLAVE EN REACTORES MICROALGARES PARA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES	102
INTRODUCCIÓN.....	104
1. BIORREACTORES MICROALGARES	104
2. SENSORES DE OXÍGENO MOLECULAR.....	111
2.1. INTRODUCCIÓN.....	111
2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE OXÍGENO.....	112
2.2.1. SENSORES ELECTROQUÍMICOS DE OXÍGENO	112
2.2.2. SENSORES ÓPTICOS DE OXÍGENO	113
2.2.3. NUESTRO SENSOR DE O ₂	114
3. SENSORES DE CO ₂	115
3.1. INTRODUCCIÓN.....	115
3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE CO ₂	116
3.2.1. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA	116
3.2.2. ELECTRODO DE pCO ₂	116
3.2.3. SENSORES ÓPTICOS DE CO ₂	117
3.2.4. UN SENSOR DE CO ₂ AVANZADO	120
4. SENSORES DE BIOMASA MICROALGAR.....	123

4.1. INTRODUCCIÓN.....	123
4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE BIOMASA	123
4.2.1. SENSORES ELECTROQUÍMICOS DE BIOMASA.....	124
4.2.2. SENSORES ÓPTICOS DE BIOMASA	124
4.2.3. NUESTRO SENSOR DE BIOMASA	125
PARTE EXPERIMENTAL.....	126
1. SENSOR DE OXÍGENO.....	128
2. ANALIZADOR DE CO ₂	129
2.1. TRANSDUCTOR DE O ₂	129
2.2. SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)	129
3. SENSOR DE BIOMASA MICROALGAR	130
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
1. SENSOR DE OXÍGENO.....	132
1.1. PRINCIPIO DE MEDIDA	132
1.2. CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR DE O ₂	132
1.3. DISPOSITIVO Y TERMINALES SENSIBLES.....	132
1.4. MEDIDAS IN SITU DE LA CONCENTRACIÓN DE O ₂ DISUELTO	135
2. SENSOR DE CO ₂ DISUELTO	137
2.1. PRINCIPIO ÓPTICO DE MEDIDA	137
2.2. TRANSDUCTORES DE OXÍGENO Y TERMINALES SENSIBLES	137
2.3. TERMINALES SENSIBLES Y CELDA.....	138
2.4. GENERACIÓN DEL ANALITO Y SISTEMA FIA	139
2.5. DISPOSITIVO ANALÍTICO COMPLETO	140
2.6. PLANTEAMIENTO DE LA MEDIDA.....	141
2.7. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ANALIZADOR DE CO ₂	146
2.7.1. SELECCIÓN DE LA RELACIÓN DE CAUDALES	146
2.7.2. CALIBRADO	148
2.7.3. VALIDACIÓN Y REPRODUCIBILIDAD.....	149
2.7.4. MUESTRAS DEL BIOREACTOR EN EL LABORATORIO	150
2.7.5. MEDIDAS EN BIORREACTOR PILOTO	152
3. SENSOR DE BIOMASA MICROALGAR	155
3.1. PRINCIPIO ÓPTICO DE MEDIDA Y TERMINALES SENSIBLES.....	155
3.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA COMPLETO	158
3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA MEDIDA	158
3.3.1. CALIBRADO DE TEMPERATURA	158
3.3.2. PASO ÓPTICO Y CONCENTRACIÓN DE RD3	159
CONCLUSIONES.....	162
REFERENCIAS.....	164

PRÓLOGO

La intensa actividad antropogénica de los últimos dos siglos ha tenido un grave impacto sobre las distintas capas del planeta donde se desarrolla la vida (atmósfera, hidrósfera y litósfera). La preocupación por las consecuencias actuales y futuras de dicha actividad ha sido el foco de numerosos estudios biológicos y fisicoquímicos; dando origen a una nueva ciencia conocida como *biogeoquímica* que estudia las interacciones entre la atmósfera, hidrósfera, litósfera y la biósfera. Esta ciencia, imprescindible para comprender el funcionamiento de los seres vivos y los ecosistemas que constituyen, se ha convertido en esencial para entender la relación entre muchas de las actividades humanas (vertido indiscriminado de residuos químicos, excesos consumistas o combustión de residuos fósiles) y los problemas medioambientales que acarrearán (cambio climático, extinción de especies, deshielo de los polos).

Si durante los dos últimos siglos el ser humano ha jugado un papel fundamental en los cambios biogeoquímicos, el protagonismo de las algas se hace patente desde hace 3.500 millones de años, cuando las primeras cianobacterias comenzaron la transformación de la atmósfera terrestre, entonces pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono, en la mezcla de gases que ha posibilitado la vida terrestre tal y como la conocemos. Actualmente, por ejemplo, se considera que el 75% del oxígeno presente en la atmósfera procede de algas marinas, mientras que los bosques tropicales producen en torno al 20%. Las algas también juegan un papel muy importante en otros ciclos globales como los del nitrógeno, azufre, fósforo o carbono, y solo cabe pensar que su importancia aumentará a medida que las actividades humanas vayan alterando el equilibrio de la naturaleza.

La versatilidad de las algas no ha escapado a la atención del ser humano que, desde la antigua China, las ha utilizado como comida, forraje, fertilizantes o en remedios curativos. En la actualidad el cultivo de **macroalgas** figura como una de las actividades de acuicultura marina más importantes, siendo China el principal productor. De acuerdo con los informes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, siglas de *Food and Agriculture Organization*), entre 1981 y 2002 el cultivo global de macroalgas creció de 3 a 13 millones de toneladas (peso seco).

El cultivo masivo de **microalgas** se ha centrado principalmente en cuatro especies (*Dunaliella*, *Haematococcus*, *Artospira* y *Chlorella*), cultivadas en biorreactores en todo el mundo, pero el número de especies crece a medida que crecen sus aplicaciones. Estos cultivos se utilizan para extraer carotenoides, pigmentos, proteínas y vitaminas que pueden utilizarse en la **producción** de medicamentos, ingredientes cosméticos o complementos alimenticios, tanto para seres humanos como para animales, especialmente en acuicultura. La empresa Cyanotech Enterprise sirve como ejemplo de la buena salud de la industria microalgar, afirmando haber tenido un volumen de ventas de 12 millones de dólares durante el año 2004.¹

El metabolismo de las algas se usa en procesos de **biorremediación** en algunas estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), como la de Patterson (California,

EE.UU.), donde se utiliza para reducir los niveles de metales pesados, nitratos o fosfatos.² La NASA (siglas en inglés de la *National Aeronautics and Space Administration* norteamericana) también ha tenido en cuenta el potencial metabólico de las algas, realizando estudios sobre sistemas de mantenimiento vital en ausencia de gravedad, donde las algas podrían ser utilizadas para reciclar el aire y el agua de plataformas espaciales.²

Otro uso común de las algas es el de servir como biomonitor de la **calidad de aguas**. Los bioensayos con algas han sustituido a otros más tradicionales (con peces), debido a que las algas son más sensibles a ciertos contaminantes (detergentes, metales pesados, herbicidas), además de ser más baratas de cultivar y fáciles de mantener. Por estos motivos no es de extrañar que los bioensayos con microalgas sean de uso común en el análisis de la calidad del agua dentro de Unión Europea.³

Entre las aplicaciones actuales más prometedoras de las microalgas, nos encontramos con la posibilidad de generar **biocombustible** a partir de energía solar y CO₂ atmosférico. Además, se pueden utilizar como secuestradores del CO₂ emitido por las centrales térmicas, evitando así la emisión de gases de efecto invernadero y beneficiándose del comercio de derechos de emisión. El consorcio aeronáutico EADS (siglas en inglés de *European Aeronautic Defence and Space*), ha anunciado recientemente la construcción de un avión supersónico que saldrá a la luz en 2050 y realizará el trayecto Paris-Tokio en dos horas y media utilizando un biocombustible elaborado con algas marinas.



Figura 1. Productos en los que podemos encontrar algún ingrediente proveniente de algas
(Fuente: www.AlgaeIndustryMagazine.com).

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO GENERAL

El desarrollo de esta Tesis Doctoral podría considerarse otra prueba más del creciente interés que despiertan las algas pues, durante los cuatro años de mi trabajo en el Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) de la UCM, he podido participar en dos proyectos totalmente independientes, que tienen como nexo común la presencia de *microalgas*. Las microalgas son así el hilo conductor de esta Tesis, dividida en dos partes claramente diferenciadas en las que las microalgas actúan bien como *herramienta analítica* (Parte 1), bien como *sujeto de análisis* (Parte 2).

Ambos proyectos fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM):

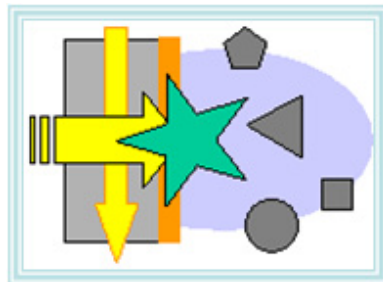
Parte 1: describe el **desarrollo de biosensores microalgares para la monitorización de la calidad de las aguas**, integrado en el ambicioso proyecto “FUTURSEN”, financiado por la Comunidad de Madrid (S0505/AMB-0374) en su IV Plan Regional de Investigación Científica y Técnica (PRICYT). En el desarrollo del biosensor microalgar hemos colaborado estrechamente con el grupo ALBIOTOX (“Biotecnología de microalgas: Producción y toxicidad”) liderado por el Prof. Eduardo Costas Costas, perteneciente a la Facultad de Veterinaria (UCM), y con la empresa madrileña Ultrasen Sistemas (antes Interlab Ingeniería Electrónica) de Torrejón de Ardoz, Madrid.

El biosensor desarrollado que se describe en esta sección utiliza microalgas inmovilizadas como elemento biológico de reconocimiento de pesticidas presentes en el agua, monitorizando la actividad biológica de las algas a través de un transductor óptico-químico, basado en la desactivación de la luminiscencia de compuestos de coordinación de rutenio(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos quelatantes.

Parte 2: describe el **desarrollo de optosensores para la monitorización integral de la actividad biológica en biorreactores microalgares**. Integrado en el consorcio “SOST-CO₂”, financiado por la empresa Ultrasen Sistemas en el marco del proyecto CENIT (*Consortios Estratégicos Nacionales en Investigación Técnica*) CEN-2008-1027 del Centro para el Desarrollo Tecnológico e Industrial (CDTI) del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio de España. En el desarrollo de los diferentes optosensores hemos contado en todo momento con la colaboración del personal científico-técnico de la empresa financiadora (especialmente del Dr. Maximino Bedoya y del Dr. Jesús Delgado) y del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla (especialmente de la Dra. Mercedes García González y sus colaboradores), un centro mixto formado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Sevilla (USE), también participantes en el proyecto CENIT.

Se han desarrollado en esta parte un conjunto de optosensores para monitorizar in situ, en continuo y en tiempo real, algunos de los parámetros más importantes en la operación de biorreactores microalgares para la producción de biocombustible, como son la concentración de oxígeno molecular disuelto, la concentración de biomasa en el medio y la concentración de uno de sus nutrientes principales, el CO₂. Para cada uno de estos tres parámetros se ha desarrollado un sensor óptico diferente, si bien, los tres sensores están basados también en complejos luminiscentes de rutenio(II) con ligandos orgánicos heterocíclicos quelatantes.

DESARROLLO DE BIOSENSORES MICROALGARES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA



INTRODUCCIÓN

1. BIOSENSORES

La disminución de fuentes de agua potable y el deterioro de su calidad se han convertido en objeto de preocupación de las agencias gubernamentales en países desarrollados o en vías de desarrollo. La Unión Europea, por ejemplo, ha intensificado el control de la calidad del agua durante las últimas dos décadas a través de medidas como la Directiva sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas (91/271/EEC) o la Directiva marco del agua (2000/60/EC). Esta presión gubernamental y social sobre el control de la calidad del agua requiere el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, más rápidas y baratas que las actuales, que permitan llevar a cabo análisis continuos, in situ, en tiempo real y extensivos. Estos requerimientos chocan con las características de los métodos establecidos de análisis de aguas (LC/MS, LC/MS-MS, GC/MS o ICP/MS).

El problema de los métodos de laboratorio es que utilizan aparatos voluminosos y delicados que, por lo general, no pueden trasladarse al punto de muestreo y, además, las muestras normalmente requieren un tratamiento previo a la medida. Todo esto provoca un lapso de tiempo entre la toma de la muestra y el conocimiento del resultado que resulta incompatible con las necesidades modernas de *prevención* (alerta temprana), mucho más eficaces y económicas que las medidas de *remediación* una vez que se ha infligido el daño medioambiental. Además, dichos métodos utilizan equipos caros y complejos, que necesitan mano de obra especializada, lo que grava el coste de la medida, resultando en un importante inconveniente en un panorama como el actual que demanda controles masivos. Finalmente, aunque los métodos de laboratorio gozan de extraordinaria sensibilidad, muchas veces son demasiado específicos, por lo que se ven desbordados por el incremento de sustancias, conocidas y desconocidas, que contaminan las aguas, y no ofrecen información sobre la actividad conjunta de las diferentes familias de contaminantes sobre los organismos vivos. Todos estos motivos han impulsado, durante la última década, el desarrollo de nuevos métodos analíticos cuyo objetivo es sustituir o colaborar con los métodos de laboratorio.

Entre las técnicas analíticas emergentes nos encontramos con los **biosensores**, que desde la década de los 70 han ido abriéndose paso en laboratorios repartidos, principalmente, por EE.UU., Europa y Japón.

Un biosensor es *un dispositivo analítico consistente en un material biológico inmovilizado y estrechamente asociado a un transductor compatible, que permite convertir la respuesta biológica (modificada por el analito) en una señal cuantificable.* (Figura 2).⁴

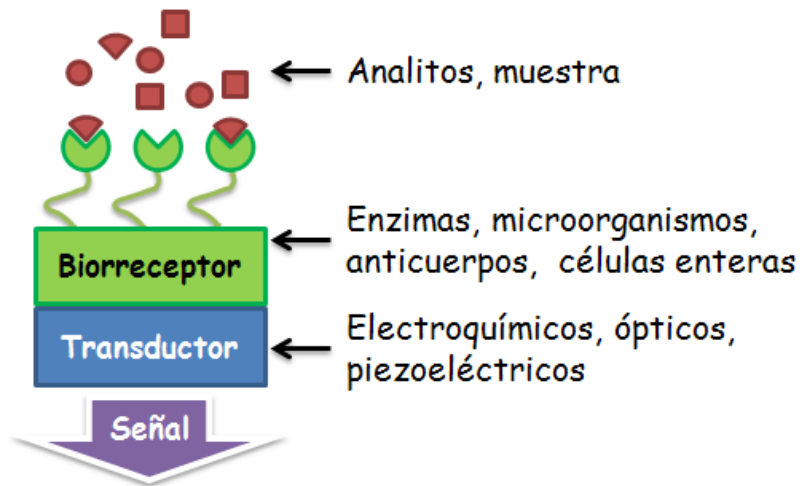


Figura 2 . Esquema conceptual de un biosensor general.

El material biológico inmovilizado es el responsable del **reconocimiento** específico del analito, mientras que los transductores físico-químicos suministran una señal que será amplificada por los componentes eléctricos del sensor. Independientemente de la naturaleza del transductor (óptico, electroquímico, piezoeléctrico,...) y de la naturaleza del material biológico (enzimas, células enteras, anticuerpos, ácidos nucleicos,...), un biosensor tiene como objetivo proporcionar un análisis cuantitativo y/o cualitativo *continuo*, en *tiempo real* e *in situ*.

El enorme potencial de los biosensores reside, tanto en la gran variedad de cada uno de los componentes que los conforman (elementos biológicos y transductores), como en las posibles interconexiones de dichos componentes, o en las diferentes técnicas empleadas para interrogar los transductores. Esta abundancia de materiales y métodos genera un inconveniente menor: la inevitable tarea de clasificar. Realizar una clasificación de los biosensores no es una tarea fácil, puesto que depende del criterio elegido; este criterio podría hacerse sobre la base de cualquiera de los dos componentes del biosensor, el *elemento biológico* o el *transductor* (Figura 3).

También podríamos reducir la clasificación en función del tipo de *interacciones* que se producen entre el analito y el elemento biológico. Así se conocen biosensores de *afinidad* y biosensores *catalíticos*. Mientras que los primeros se basan en interacciones específicas del analito con el receptor biológico (p. ej. un anticuerpo), los últimos se basan en una reacción particular del analito que es acelerada por una biomolécula (normalmente una enzima).

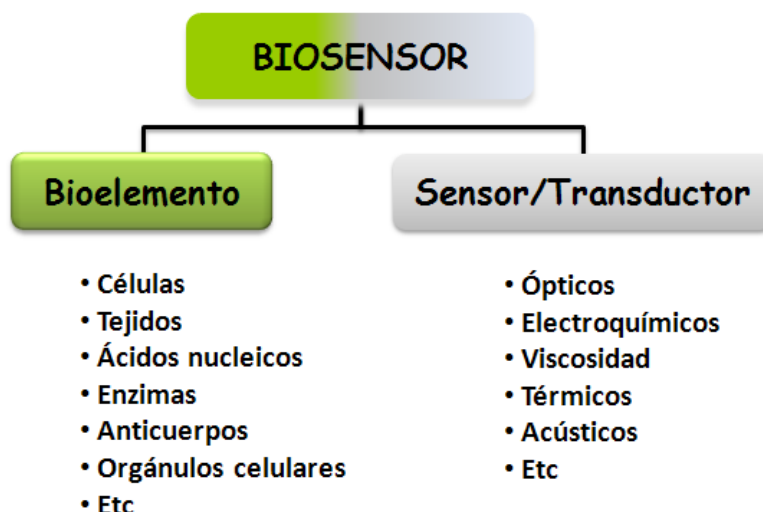


Figura 3. Criterios de clasificación de los biosensores.

Desde nuestro punto de vista, el criterio más lógico para llevar a cabo una clasificación de los biosensores es el basado *en la naturaleza del elemento biológico* de reconocimiento molecular, por lo que tendríamos cuatro grupos principales:

Biosensores enzimáticos. Se valen del alto grado de especificidad de las reacciones enzimáticas. El producto de estas reacciones puede ser detectado directamente o de forma indirecta gracias a un indicador. Son especialmente utilizados en el ámbito clínico (análisis de glucosa, urea, etc.).⁵ Hoy en día cuentan con versiones “biomiméticas”, como los polímeros de impronta molecular (MIPs, acrónimo del término *Molecularly Imprinted Polymers*).⁶

Inmuno-biosensores. Se basan en la interacción específica entre antígenos y anticuerpos. También presentan muchas aplicaciones bioquímicas y clínicas,⁷ así como con versiones artificiales basadas en MIPs.⁶

Biosensores basados en ácidos nucleicos. Aprovechan la afinidad que se produce entre una hebra simple de ADN con su hebra complementaria para formar la doble cadena. Resultan especialmente prometedores en la detección de contaminaciones virales.⁸ Hoy en día cuentan también con versiones “bioinspiradas”, como los que utilizan *aptámeros* como elementos de reconocimiento.⁹

Biosensores celulares (o de célula completa). Monitorizan los efectos de un analito sobre un (micro)organismo intacto (bacteria, hongo, microalga,...). Son muy robustos, por lo que se adaptan fácilmente a las condiciones de medida *in situ*.¹⁰

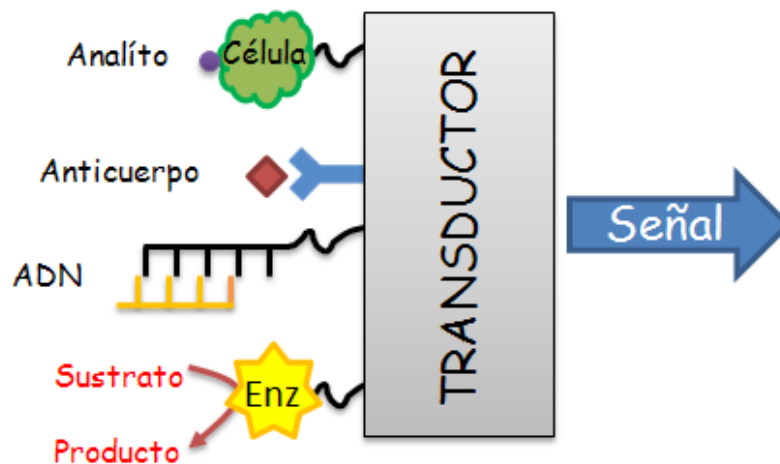


Figura 4. Representación de los principales biosensores, basados en la actividad enzimática (Enz), la unión de cadenas de ácido nucleico (ADN), interacción anticuerpo-antígeno o efecto del analito sobre un metabolismo celular.

Aunque en teoría la mayoría de los elementos de la Figura 3 se pueden combinar, en la práctica la selección del transductor está condicionada por la elección del elemento biológico; éste, a su vez, depende del analito que se desea monitorizar y de las condiciones de medida. Si queremos llevar a cabo medidas in situ necesitaremos biosensores robustos y fáciles de mantener durante largos periodos. Por este motivo, aunque las enzimas son los elementos biológicos mayoritarios en la fabricación de biosensores, las células completas resultan con frecuencia mucho más adecuadas para el desarrollo de biosensores de monitorización ambiental.¹¹

Los **biosensores celulares** pueden resultar muy atractivos siempre y cuando los microorganismos utilizados sean fáciles de aislar y manipular (ampliamente disponibles y no tóxicos), de cultivo y mantenimiento barato y, sobre todo, proporcionen información fiable sobre la presencia de los analitos diana. La esencia de un biosensor celular está en conseguir que la actividad del microorganismo sea lo suficientemente sensible al estrés medioambiental que se desea detectar, pero insensible a los cambios físicoquímicos del medio en el que opera, a su propio ciclo celular o a la disponibilidad de nutrientes. No hace falta decir que es imprescindible una correcta integración entre el transductor y la señal biológica.

Las principales **ventajas** de los biosensores celulares se podrían resumir en los siguientes puntos:

- Los biosensores celulares son, normalmente, más baratos que los biosensores basados en enzimas debido a que el cultivo y la recolección de células es más sencillo que el aislamiento y purificación de las enzimas (y más aún de los anticuerpos).
- Las células completas son más tolerantes a cambios importantes de pH, temperatura o concentraciones iónicas que las enzimas purificadas, los anticuerpos o los ácidos nucleicos.

- Las células completas cuentan con la posibilidad de llevar a cabo reacciones multi-etapa, puesto que contienen un gran número de enzimas y co-factores con los que podría interactuar el analito.
- Los biosensores celulares son fáciles de regenerar y mantener; las células pueden recuperarse incluso durante el funcionamiento in situ.
- Normalmente, no es necesario un pre-tratamiento exhaustivo de las muestras.

Entre los **inconvenientes** que puedan limitar el uso de los biosensores celulares, nos encontramos con que:

- A menudo carecen de especificidad por el analito diana, sobre todo en comparación con los biosensores basados en enzimas o anticuerpos.
- Tienen tiempos de respuesta más lentos, en comparación con otros tipos de biosensor.¹²

Cualquiera que sea el biosensor celular, estos deben resolver una serie de **complicaciones** como:

- La inmovilización de las células debe realizarse sin interferir en su actividad biológica y buscando siempre el máximo contacto posible con el transductor seleccionado.
- Las células deben ser alimentadas continuamente para mantener activo su metabolismo.
- Se deben reconstruir las condiciones medioambientales de los organismos vivos, para mejorar el tiempo de vida del biosensor.

La investigación en biosensores es un área de naturaleza *multidisciplinar*, que demanda un conocimiento apropiado en disciplinas tan diversas como la química, la física, la biología o la ingeniería.¹³ Esta afirmación queda personalizada perfectamente en la figura del científico norteamericano Leland C. Clark, conocido como “el padre de los biosensores” que, en 1956, desarrolló un electrodo para la medida de oxígeno disuelto en las aguas (“electrodo de Clark”) que, hasta el presente, ha tenido una enorme aplicación científica y comercial. Algunos años más tarde, en 1962, el propio profesor Clark utilizaría su electrodo de oxígeno como transductor en el desarrollo del primer biosensor de la historia, para la medida de glucosa en fluidos biológicos mediante la monitorización del consumo de oxígeno (disuelto) en la oxidación de la glucosa catalizada por la correspondiente oxidasa.¹⁴ La evolución de este principio de medida se utiliza hoy en día en los medidores de glucosa consumidos cada día por millones de diabéticos e hipoglucémicos en todo el mundo (Figura 5). Aún así, en tan solo los últimos dos años, hemos asistido al abrupto cambio de paradigma de la medida de oxígeno disuelto, en el que los sensores ópticos luminiscentes han desplazado casi por completo al electrodo de Clark.¹⁵ Este cambio se ha debido a la superior robustez de los sensores ópticos (no contienen electrolito) y, sobre todo, a su mucha menor necesidad de mantenimiento (ahorro en costes de personal).



Figura 5. Leland C. Clark (1918–2005), “padre” de los biosensores (*Fuente: www.nae.edu*) y medidor de glucosa moderno (*Fuente: OneTouch® UltraMini®*).

En la actualidad, la aplicabilidad de los biosensores en sectores industriales diversos como el agroalimentario, el medioambiental y especialmente la salud (diagnóstico clínico), convierten a estos dispositivos en productos comercialmente muy atractivos para un mercado en auge que, sólo en el ámbito farmacéutico, se estima en \$6,1 millardos de dólares para el año 2012.¹⁶ Factores como el envejecimiento progresivo de la población, una mayor incidencia de enfermedades crónicas como la diabetes o la obesidad, la demanda de una atención más personalizada, o la necesidad de sistemas de vigilancia de riesgos medioambientales sin duda aumentarán la demanda de biosensores en los próximos años.

2. BIOSENSORES MICROALGARES

Entre las muchas ventajas que presentan las algas como elemento biológico de reconocimiento cabe destacar su enorme variedad, abundancia y ubicuidad. Se estima que el número de especies que entran dentro de la definición de “algas” se encuentra comprendido entre 1 y 10 millones, donde la mayoría son microalgas; entre ellas, se encuentran las *microalgas verdes*, que son el principal componente del fitoplancton. Podemos encontrar microalgas en medio acuático y terrestre, en agua dulce o salada, en el ártico y en las proximidades de volcanes marinos, a pH moderados e incluso en las aguas del Rio Tinto onubense ($\text{pH} \approx 2,2$), lo que nos permite utilizar biosensores microalgares en condiciones impensables para otros microorganismos. Las microalgas son fáciles de aislar, manejar y no suelen producir sustancias tóxicas (con algunas excepciones). Además, su crecimiento y mantenimiento resultan baratos pues tienen pocos requerimientos nutricionales y son, mayoritariamente, organismos autótrofos.

Dos son los grupos principales en los que podemos enmarcar a la inmensa mayoría de los biosensores microalgares desarrollados hasta el momento. La división se hace en función del fenómeno biológico que monitorizan, **fotosíntesis** o **actividad enzimática** (AE). El principio de medida de dichos biosensores se basa en que los analitos que deseamos detectar *inhiban* parcial o totalmente alguno de estos dos procesos biológicos (Figura 6).

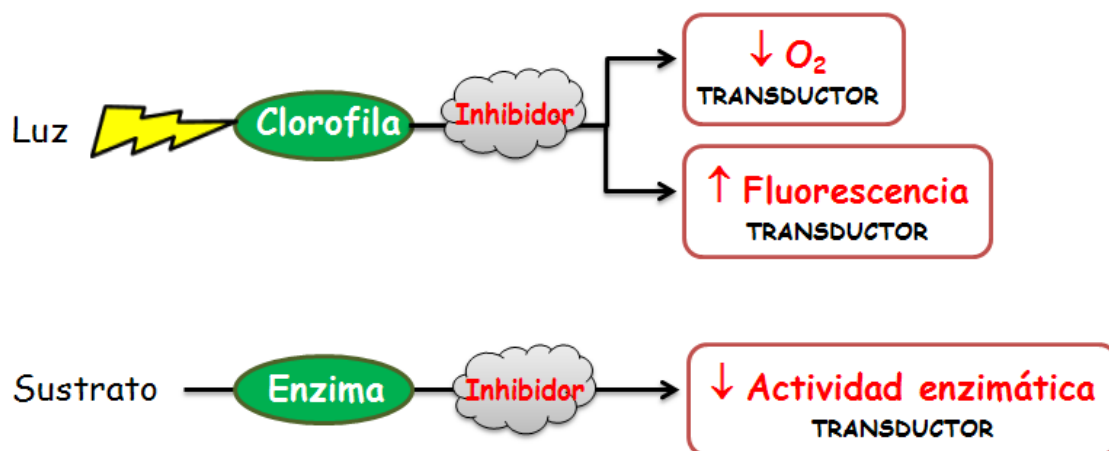


Figura 6. División de los biosensores microalgares en función del principal proceso metabólico que monitorizan y actuación de los analitos objetivo.

La Tabla 1 muestra como, pese a la gran variedad de microalgas de la que hemos hablado, *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) se ha convertido en la especie principal en el desarrollo de biosensores microalgares. Ello se debe a que esta especie tiene una estructura bastante simple, crece durante todo el año, se puede encontrar en casi cualquier clima, se adapta a condiciones de estrés nutricional y es, probablemente, la especie mejor estudiada.¹⁷

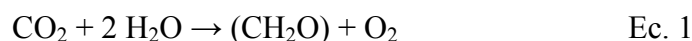
Tabla 1. Trabajos más destacados en la investigación de biosensores microalgas.

Analito	Principio biológico	Principio de medida	Alga	Referencia
Atrazina y endrina	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>S. subspicatus</i>	[18]
Isoproturón, diurón, DNOC	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>C. vulgaris</i>	[19]
Atrazina, simazina, diurón, alachlor glifosato	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>C. vulgaris</i>	[20]
TNT	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>D. chlorelloides</i>	[21]
Simazina, atrazina, propazina, terbutilazina, linurón	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>D. chlorelloides</i> <i>Scenedesmus sp.</i> <i>S. intermedius</i>	[22]
Atrazina, diurón, Ioxinilo, terbutilazina, linurón, prometrina	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>C. reinhardtii</i>	[23]
Diurón	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>C. vulgaris</i>	[24]
Formaldehido Metanol	Fotosíntesis (Fluorescencia)	Óptico	<i>C. vulgaris</i> <i>Klebsormidium</i>	[25]
Atrazina, simazina, Isoproturón, diurón	Fotosíntesis (Fluorescencia) Enzimático	Óptico Conductimétrico	<i>C. vulgaris</i> <i>C. vulgaris</i>	[26]
Atrazina, isoproturón, propanilo, bromoxinilo	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>C. vulgaris</i>	[27]
Atrazina, carbarilo Hg, Cu	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>S. subsalsa</i>	[28]
Atrazina, propazina	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>C. pyrenoidosa</i>	[29]
BMIM-PF ₆	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>S. capricornutum</i>	[30]
Atrazina, DCMU tolueno, benceno	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>C. vulgaris</i>	[31]
Metanol, tetracloroetileno	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>C. vulgaris</i>	[32]
Formaldehido	Fotosíntesis (Oxígeno)	Amperométrico	<i>C. vulgaris</i> <i>P. subcapitata</i> <i>C. reinhardtii</i>	[33]
Cd	Enzimático	Conductimétrico	<i>C. vulgaris</i>	[34]
Zn, Cd	Enzimático	Conductimétrico	<i>C. vulgaris</i>	[35]
Cd, Pb	Enzimático	Óptico	<i>C. vulgaris</i>	[36]

2.1. BIOSENSORES MICROALGARES BASADOS EN LA FOTOSÍNTESIS

La actividad fotosintética es, sin duda, el proceso biológico más utilizado en el desarrollo de los biosensores microalgares (Tabla 1). Ello se debe a que muchos de los contaminantes de interés analítico actúan como inhibidores, parciales o totales, de la actividad fotosintética. Entre éstos encontramos metales pesados, disolventes orgánicos y una gran variedad de herbicidas. Estos últimos se usan masivamente en la industria agrícola para eliminar las “malas hierbas” que compiten con los cultivos de interés. Los herbicidas son compuestos esencialmente tóxicos, muy difíciles de eliminar del terreno donde han sido aplicados y que, con el paso del tiempo, pueden alcanzar acuíferos cercanos suponiendo un riesgo para la salud.³⁷ Por este motivo, la Comunidad Europea ha fijado un umbral de concentración máximo de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada herbicida y $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la suma total de herbicidas presentes en agua potable.³⁸ Los biosensores microalgares intentan proporcionar métodos de análisis rápidos y baratos, que nos permitan conocer rápidamente y de forma continua la calidad de nuestras aguas.

Los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis son los responsables de transformar la energía solar y el CO_2 atmosférico en biomasa y oxígeno molecular, fundamentales para la vida en la Tierra:



Aunque la Ec. 1 que describe el proceso fotosintético es simple, el mecanismo global es muy complejo. La fotosíntesis se realiza en dos etapas, conocidas como *fase luminosa* y *fase oscura*. En la fase luminosa la energía se transforma en ATP (adenosina trifosfato) y en NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), mientras que durante la fase oscura el ATP y el NADPH se utilizan para reducir las moléculas de CO_2 y generar biomasa mediante el ciclo de Calvin (Figura 7).

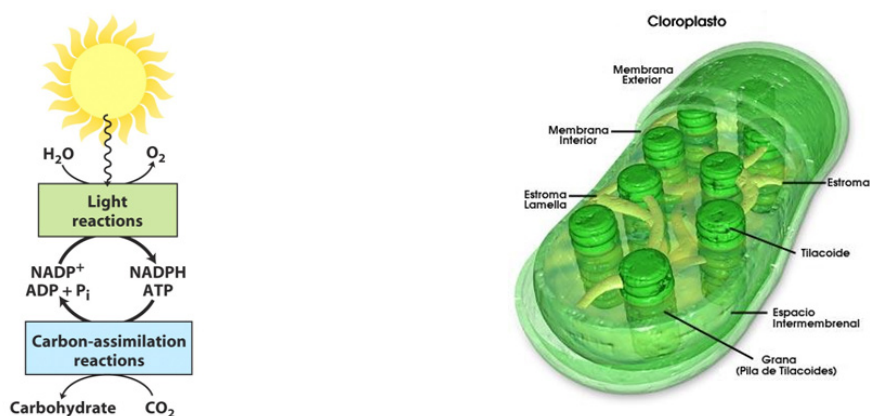
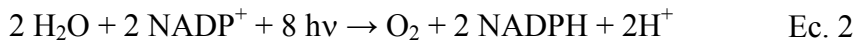


Figura 7. (Izq.) Diagrama del proceso fotosintético total, con las reacciones de la fase luminosa (*light reactions*) y las de la fase oscura (*carbon-assimilation reactions*) (Fuente: D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4^o Ed., Worth Pub., New York; 2004).

(Dcha.) Representación de la estructura de un cloroplasto (Fuente: <http://linux.ajusco.upn.mx/fotosintesis/cloroplasto.html>).

En las células eucariotas, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos, orgánulos intracelulares rodeados por dos membranas, una externa y otra interna. En la membrana interna encontramos unas vesículas llamadas tilacoides, que albergan los complejos enzimáticos y los pigmentos fotosintéticos necesarios para la transformación de la energía luminosa y para la síntesis de ATP y NADPH (Figura 7).

En los tilacoides se hallan dos fotosistemas (fotosistema I y II; **FS-I** y **FS-II**, respectivamente) diferentes pero complementarios, que actúan en tándem oxidando moléculas de agua y reduciendo moléculas de NADP^+ a través de una corriente de electrones impulsada por la energía luminosa (Ec. 2):



Las moléculas de clorofila absorben la energía luminosa (fotones), promoviendo el paso de un electrón a un orbital de energía superior; la molécula de clorofila en estado excitado se convierte en excelente reductor y cede este electrón excitado a un compuesto químico (feofitina, *Pheo*) que actúa como transportador de electrones, el primero de la cadena de transporte. De esta forma, la clorofila queda cargada positivamente y la feofitina negativamente; esta separación de cargas inicia la cadena de reacciones de oxidación-reducción representada en la Ec. 2, que termina con la reducción del NADP^+ (Figura 8).

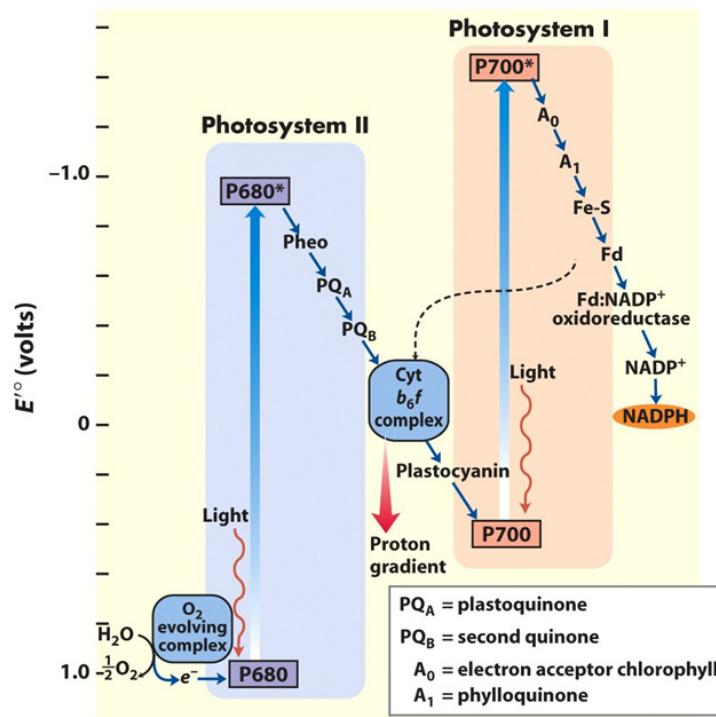


Figura 8. “Diagrama Z” de las reacciones fotosintéticas dependientes de la luz, en las que se produce un transporte de electrones desde el H_2O al NADP^+ (Fuente: D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4º Ed., Worth Pub.. New York; 2004).

La oxidación del agua, que tiene lugar en el FS-II, tiene como misión reemplazar los electrones cedidos por la clorofila a la cadena de electrones. Como consecuencia del

transporte de electrones, se produce un movimiento de protones en contra del gradiente electroquímico, lo que hace aumentar la concentración de protones en la luz del tilacoide (1000 veces superior). Este gradiente electroquímico es una forma de almacenamiento de energía, que será utilizada por la ATP sintetasa para generar moléculas de ATP. La ATP sintetasa es una proteína de la membrana tilacoidal que actúa como canal de iones, de forma que la energía desprendida por los protones al entrar en la matriz mitocondrial, a favor del gradiente, se utiliza para llevar a cabo la fosforilación oxidativa del ADP (Figura 9).

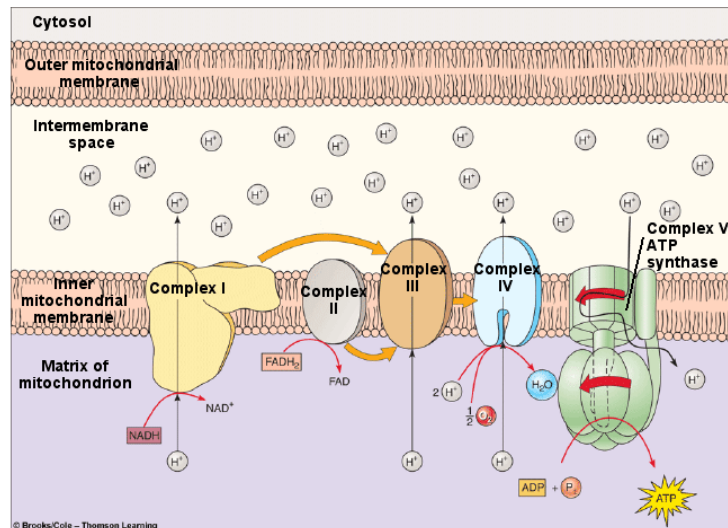


Figura 9. Fase luminosa, generación del gradiente electroquímico ligado al transporte de electrones producido por las reacciones de los PS I y II. (Fuente: Brooks/Cole Thomson Learning).

Como resumen de las reacciones de la fase luminosa, podríamos decir que son un conjunto de procesos que tienen como objetivo transformar la energía luminosa en energía química mediante la formación de los enlaces químicos que transforman las moléculas de NADP^+ y de ADP en moléculas de NADPH y de ATP, respectivamente.

Pero no toda la energía que llega a las moléculas de clorofila se emplea en la fotosíntesis (O_2): si la molécula de clorofila en estado excitado no encuentra un aceptor de electrones, vuelve a su estado basal liberando la energía en forma de luz (**fluorescencia**) y/o de calor. Estos tres procesos (**fotosíntesis, fluorescencia y emisión de calor**) compiten entre sí por la desactivación de las moléculas de clorofila, de forma que si uno de los procesos disminuye, los otros dos aumentan (Figura 10).

Desde el punto de vista fotoquímico, podemos expresar esta relación en función del rendimiento cuántico de cada uno de los procesos que intervienen en la desactivación de las moléculas de clorofila; así tenemos:

Ec. 3

Ec. 4

La Ec. 3 representa el rendimiento cuántico de la desactivación de la molécula de clorofila por emisión de **fluorescencia**, mientras que la Ec. 4 representa el rendimiento cuántico de la desactivación de las moléculas de clorofila por **actividad fotosintética**, donde k_F es la constante de velocidad de decaimiento por fluorescencia, k_D es la constante de velocidad de decaimiento por desactivación térmica y k_P es la constante de velocidad de decaimiento por fotosíntesis. Todo fenómeno físico o químico que afecte a la actividad fotosintética (k_P), favorece la desactivación de las moléculas de clorofila por medio de la emisión de fluorescencia.

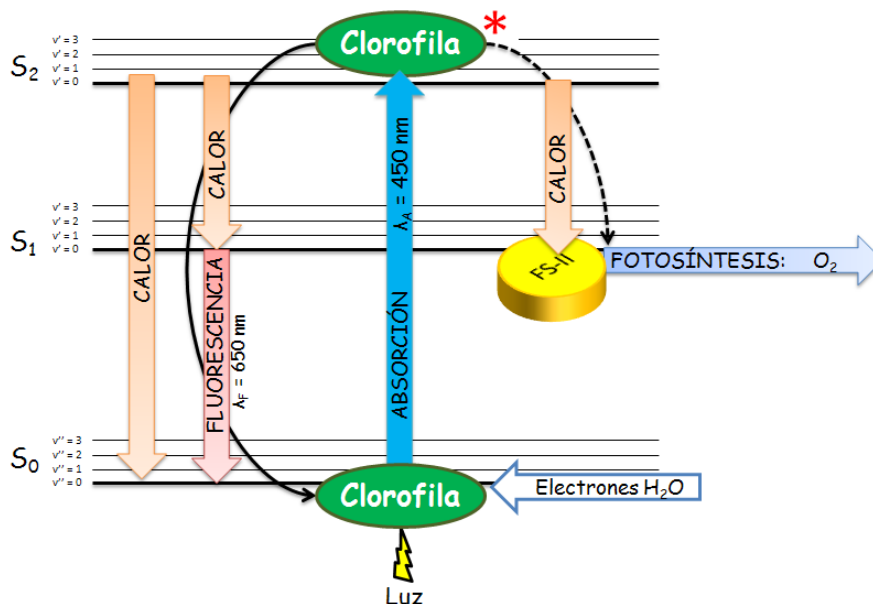


Figura 10. Esquema de la distribución de la energía de las moléculas de clorofila excitadas, en el FS-II, donde la absorción se produce a 450 nm, mientras que la desactivación puede producirse por disipación térmica, emisión de fluorescencia (650 nm) o actividad fotosintética.

De esta forma, podemos encontrar biosensores microalgares ópticos basados en la medida de las variaciones en la emisión de **fluorescencia** [18-26] en presencia del analito y biosensores microalgares electroquímicos que miden variaciones en la concentración de **oxígeno (fotosíntesis)** [26-33].

Alrededor del 50% de los herbicidas tienen como objetivo inhibir el funcionamiento del FS-II; por ejemplo, los herbicidas basados en urea (isproturón, diurón, etc.) o triazina (**simazina**, atrazina, etc.) actúan desplazando la plastoquinona (PQ) de su sitio de unión a la proteína D1, componente del FS-II.³⁹ El FS-II de las microalgas también es sensible a ciertos metales pesados (Cd, Hg, Cu, etc.) y disolventes orgánicos (metanol, formaldehído, etc.), lo que extiende las posibilidades analíticas de los biosensores microalgares.⁴⁰

Por tanto, de forma general, podemos decir que *al aumentar la concentración de inhibidor del FS-II, disminuye la producción fotosintética de oxígeno y aumenta la emisión de fluorescencia*.⁴¹

↑ [INHIBIDOR DEL FS-II] → ↓ [O₂] ↑ FLUORESCENCIA

El protocolo de medida de los biosensores microalgares que monitorizan la actividad del PS-II es similar independientemente del parámetro a medir (**fluorescencia** u **oxígeno** disuelto). Las algas inmovilizadas se someten a ciclos de luz y oscuridad sucesivos, seleccionando la duración de los periodos de luz y oscuridad en función de las características del biosensor. Con ello se busca generalmente reducir los tiempos de medida y mejorar la relación señal/ruido. Durante el ciclo de iluminación se activa el proceso fotosintético, que será monitorizado como señal de fluorescencia (de la clorofila microalgar) u oxígeno. Primeramente se mide la señal fotosintética en ausencia de inhibidores (medio), para generar una línea base; a continuación, se añade la muestra (con el inhibidor), y se determina el grado de inhibición fotosintética; finalmente, se introduce un medio fresco (libre de agentes tóxicos), recuperando el biosensor para medidas futuras (Figura 11).

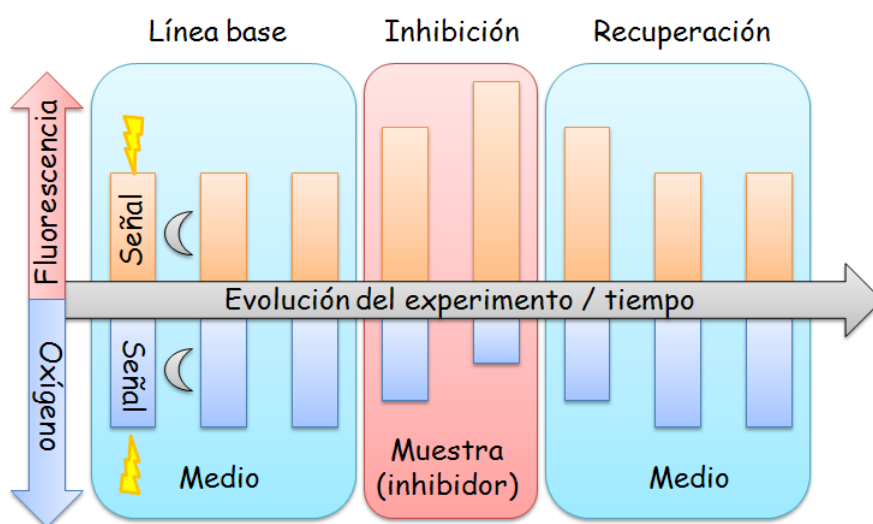


Figura 11. Esquema del protocolo de medida con biosensores basados en la actividad fotosintética. En el esquema podemos observar los tres pasos clave del protocolo de medida: generación de línea base, medida de la muestra y recuperación del biosensor. Los respectivos transductores miden las diferentes respuestas biológicas en ausencia y presencia del contaminante, durante los ciclos de luz y oscuridad.

Se seleccionan así todos los *parámetros* que pueden *optimizar* la medida: caudal de muestra; tiempo de incubación; carga de biomasa; fuente lumínica que proporcione luz (“actínica”) a de longitud de onda adecuada para cada especie de microalga; la intensidad de la luz, adecuada para mejorar la actividad fotosintética sin llegar a producir daño celular y el tiempo de duración de los ciclos luz/oscuridad.

2.1.1. BIOSENSORES BASADOS EN LA EMISIÓN DE LA CLOROFILA

La fluorescencia emitida por las algas proviene mayoritariamente (ca. 90%) de la emisión de las moléculas de clorofila *a* pertenecientes al FS-II y supone del 3 al 5 % del total de la energía absorbida, a temperatura ambiente y en ausencia de alteraciones químicas o físicas, por el FS-II.⁴²

La emisión de fluorescencia (660–680 nm) se ha convertido en el principio de medida por excelencia en los biosensores microalgares (Figura 12), puesto que proporciona buenos límites de detección y pueden beneficiarse de las ventajas de la fibra óptica. Además, no requieren señales de referencia, a diferencia de los sensores electroquímicos, lo que aumenta la estabilidad de la medida y reduce los costes en la fabricación de la instrumentación. No obstante, son sensibles a todos los fenómenos que atenúen la intensidad de fluorescencia detectada (señal analítica), tales como la posición de la membrana que contiene la biomasa inmovilizada respecto a la luz de excitación, la posible dispersión de luz, la presencia de microalgas externas al biosensor, la edad de la fuente de luz de excitación y el envejecimiento del detector, entre otros factores.

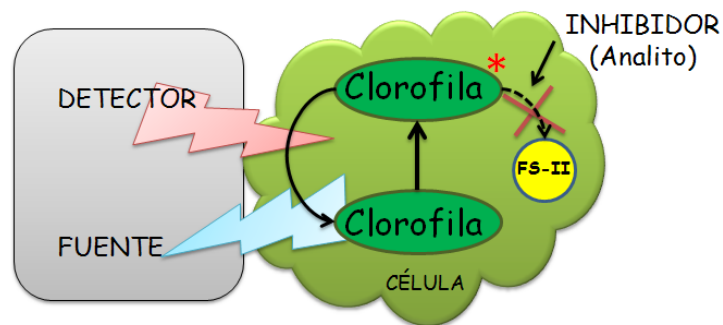


Figura 12. Esquema del funcionamiento tipo de los biosensores microalgares basado en la monitorización de la emisión fluorescente de la clorofila.

Los trabajos que encontramos en la literatura reciente sobre este tipo de biosensores microalgares se han centrado en mejorar el método de inmovilización de las algas, en aumentar la fiabilidad del dispositivo, en miniaturizar y/o abaratar el biosensor o en hacer posible las medidas simultáneas y/o multiparamétricas.

Por ejemplo, Védrine y cols. [19] desarrollaron una celda de flujo con 5 cámaras de medida, donde en cada cámara se encuentran algas inmovilizadas en filtros de microfibras de cuarzo (translúcido). La celda de flujo está diseñada con un sistema rotatorio, controlado electrónicamente, de forma que utilizando una sola fuente de excitación y de detección (fluorímetro) podemos interrogar 5 membranas microalgares a través de una fibra óptica. Las cinco membranas están colonizadas con las mismas microalgas (especie y cepa) y cada membrana es iluminada durante 1 min seguido de 4 min de oscuridad (tiempo durante el cual se ilumina a las otras membranas). De esta manera se consiguen (en 5 min) 5 medidas independientes de la misma muestra, lo que aumenta la fiabilidad del sistema.

La tecnología *sol-gel* de inmovilización de microalgas permite mejorar las propiedades ópticas del soporte. Así, Nguyen-Ngoc y cols. [24] inmovilizaron *C. vulgaris* en una matriz de sílice (translúcida) unida directamente a fibra óptica que la interroga. Con otros soportes, más opacos, es necesario dejar un espacio entre membrana de algas y la fibra óptica, para poder recolectar más eficazmente la fluorescencia de las algas. Este espacio puede afectar la fiabilidad de las medidas, por ejemplo, cuando las muestras presentan turbidez. La matriz silíceica presenta la ventaja de ser biocompatible y químicamente inerte. En la misma línea podemos encontrar el reciente trabajo de Peña et al. [22].

2.1.2. BIOSENSORES BASADOS EN LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO.

Los biosensores microalgares basados en la actividad fotosintética utilizan, mayoritariamente, transductores electroquímicos para seguir la evolución de los niveles de oxígeno molecular en el medio en contacto con el transductor (Figura 13). Los transductores electroquímicos reaccionan con el analito produciendo una señal eléctrica proporcional a la concentración de éste.

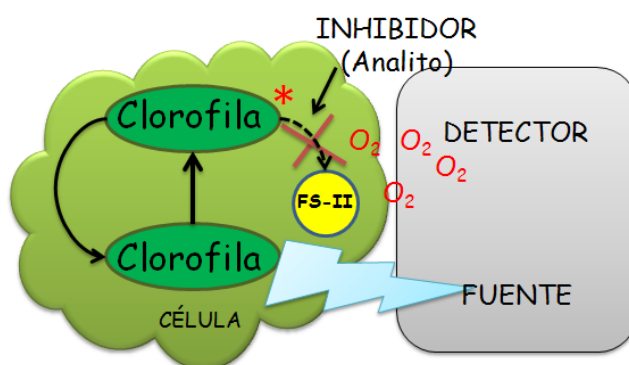


Figura 13. Esquema del funcionamiento de los biosensores microalgares basado en la monitorización del oxígeno producido fotosintéticamente.

El primer biosensor microalga, desarrollado por Pandar y cols. [30] en 1993, utilizaba como transductor un electrodo de Clark. Los trabajos realizados posteriormente tratan de disminuir el tamaño del dispositivo y reducir el coste. Por ejemplo, Shitanda y cols. [31] utilizan electrodos transparentes de ITO (siglas inglesas de *indium tin oxide*) para medir la producción de oxígeno. Las algas se inmovilizan directamente sobre la superficie del electrodo, lo que reduce el tiempo de medida. Estos electrodos son fáciles de depositar sobre otras superficies, lo que permite fabricar sistemas más compactos que los que utilizan electrodos de Clark convencionales.

Zamaleeva y cols. [29] miden la evolución del oxígeno mediante un amperímetro utilizando electrodos serigrafados (*screen-printed*) para reducir el tamaño del dispositivo. El método de inmovilización es lo más ingenioso de este trabajo; las algas se funcionalizan con nanopartículas magnéticas y, por medio de un campo magnético, la masa de microalgas queda inmovilizada sobre la superficie del electrodo.

Como el medio natural de la mayoría de las microalgas es acuático, los biosensores microalgares trabajan normalmente en soluciones acuosas, Naessens y cols. [32] han logrado superar esta barrera utilizando cepas de *C. vulgaris* capaces de sobrevivir sobre la superficie terrestre, siempre que se mantenga cierto grado de humedad (75%). De esta forma, han fabricado un biosensor capaz trabajar con muestras gaseosas para detectar disolventes orgánicos (metanol, tetracloroetileno). El biosensor es una cámara cerrada que mantiene la humedad y evita que el analito se disperse. La actividad fotosintética (O_2) se interroga utilizando un electrodo de Clark.

2.2. BIODENSORES BASADOS EN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Aparte de la actividad fotosintética, también podemos encontrar biosensores microalgares que monitorizan la actividad de enzimas integradas en las células microalgares (Figura 14). La fosfatasa alcalina (FA) es la enzima más usada, ya que es esencial para el metabolismo del fósforo en el crecimiento de las algas. La actividad de la enzima se puede medir añadiendo sustratos específicos cuya transformación, catalizada por las mismas, genera una señal fácilmente cuantificable. Estos biosensores son independientes de los ciclos luz/oscuridad. La actividad de la enzima se mide en presencia y ausencia de contaminantes, generalmente metales pesados.^[26,34-36]

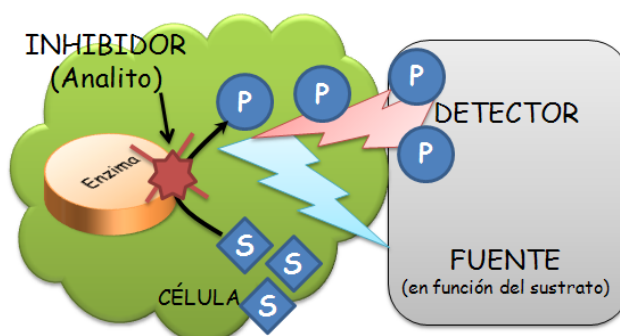


Figura 14. Esquema del funcionamiento tipo de los biosensores microalgares basados en la monitorización de la actividad enzimática. “S” es el sustrato de la reacción bio-catalizada y “P” el producto de la misma; según el sustrato, podemos obtener productos que sean detectados por métodos electroquímicos u ópticos.

Guedri y cols. [34] utilizaron la técnica SAM (siglas en inglés de *self-assembled monolayers*) para inmovilizar una monocapa de algas sobre la superficie de un electrodo de platino. La proximidad entre algas y los electrodos permite medir los cambios en la conductancia local de los electrodos al añadir el sustrato (fosfato de *p*-nitrofenilo) y de esta forma pueden medir la actividad enzimática en presencia y ausencia de cadmio. El objetivo de este trabajo es mostrar un nuevo método de inmovilización que no interfiere con los analitos a medir.

Uno de los problemas más comunes de los sensores electroquímicos es que los electrodos se contaminan rápidamente, por lo que se hace necesario un mantenimiento continuado que supone un importante inconveniente en el desarrollo de biosensores

destinados a su uso prolongado en medidas de campo. Para superar este problema, Chong y cols. [35] han ideado un biosensor que utiliza como transductor un electrodo de diamante que, además de presentar buenas propiedades electroquímicas, tiene una baja absorción de partículas orgánicas. Las células se inmovilizan en membranas de albúmina de suero bovino y el transductor realiza medidas conductimétricas en presencia del sustrato (fosfato de *p*-nitrofenilo).

Durrieu y cols. [36] sustituyen los transductores electroquímicos por transductores ópticos al utilizar el MUP (siglas en inglés de *methylumbelliferyl phosphate*) que, al perder el grupo fosfato en un proceso catalizado por FA, genera el producto fluorescente metilumbeliferona (MUF, siglas en inglés de *methylumbelliferone*). Las moléculas de MUF emiten a 460 nm al ser iluminadas a 350 nm. El transductor es un fluorímetro que recolecta la luz del producto por medio de una fibra óptica.

2.3. UN NUEVO BIOSENSOR MICROALGAR

Ya sea a través de la emisión de fluorescencia, del seguimiento del oxígeno generado o la actividad enzimática, el punto débil de la mayoría de los biosensores microalgares es su baja **selectividad** frente a analitos concretos. Este problema puede solucionarse mediante el principio de que especies, cepas o mutantes *diferentes* presentan diferente sensibilidad frente al mismo contaminante.⁴³ Así, podemos encontrar algunos ejemplos en la bibliografía que utilizan este principio para mejorar la selectividad de sus biosensores microalgares.

Podola y cols. [25] desarrollaron un sensor microalgar que monitoriza la fluorescencia de 3 membranas de algas diferentes, dos cepas de *Klebsormidium nitens* y una de *C. vulgaris* por medio de un fluorímetro “PAM” (siglas en inglés de *pulse amplitude modulation*), especialmente diseñado para medir en dos dimensiones espaciales, de manera que con un solo dispositivo podemos medir la actividad de las cuatro membranas. La diferente sensibilidad de las especies seleccionadas permite al biosensor reconocer los disolventes metanol y formaldehído.

La ingeniería genética puede aportar soluciones para la baja especificidad de los biosensores microalgares pero, aunque es posible encontrar ejemplos de organismos modificados genéticamente (OMG) empleados en campo,⁴⁴ esta tecnología no despierta mucho entusiasmo en la mayoría de los países, incluida la Unión Europea, debido al problema potencial del **flujo/migración genética**.

Altamirano et al. [21] señalan una estrategia en la que, usando de manera inteligente cepas mutantes, logran esquivar la tecnología de ADN recombinante. Las cepas mutantes se obtienen sin necesidad de recurrir a la ingeniería genética. La idea es utilizar *dos cepas de algas de la misma especie* (salvaje y mutante) *con distinta sensibilidad* (“sensible” y “resistente”, respectivamente) a un analito concreto. La diferencia entre la respuesta de ambas cepas proporcionaría la *selectividad* del sistema al analito. Esta estrategia no será aplicada en formato biosensor hasta el trabajo de Peña et al. [22], que describe un biosensor microalgar dotado de sensibilidad frente a

simazina (herbicida). Este biosensor interroga la actividad fotosintética (por fluorescencia) de dos cepas microalgares, inmovilizadas en sol-gel, con distinta sensibilidad al pesticida (denominadas “**sensible**” y “**resistente**”).

El trabajo realizado en esta Tesis, en el marco del proyecto de investigación FUTURSEN, ha tenido como objetivo desarrollar un biosensor microalgar **óptico**, específico para **simazina**, basado en medidas de **oxígeno fotosintético**. Este biosensor prototipo, primero de su especie, ha pretendido, además, servir de banco de pruebas para el desarrollo de futuros biosensores microalgares. No se planteó fabricar un sistema de medida de muestras de laboratorio, sino un sistema suficientemente *robusto* para utilizarse *in situ* en aquellos lugares donde presenta interés (estaciones depuradoras de aguas residuales, estaciones de tratamiento de aguas potables, aguas de zonas protegidas, cursos fluviales, aguas embalsadas, redes de distribución, etc.).

El dispositivo y método de medida se idearon con la intención de superar algunas de las limitaciones típicas de los biosensores microalgares expuestas anteriormente. De esta manera, se ha evitado utilizar la emisión de fluorescencia como señal biológica, puesto que solo permite detectar aquellos compuestos que bloquean el FS-II, lo que reduciría el espectro del biosensor. Otro inconveniente de las medidas de la intensidad de fluorescencia absoluta es que ésta puede verse muy afectada por todos aquéllos factores que modifiquen la luz absorbida por los microorganismos inmovilizados o recibida en el detector, sin que sea posible corregir estas interferencias o derivas de la señal analítica. Además, aunque las medidas de fluorescencia presentan buenos límites de detección, a menudo requieren largos tiempos de estabilización¹⁹ y se ha demostrado recientemente que, en ciertos casos, la presencia del herbicida (p.ej. glifosato) no modifica en igual medida la fluorescencia del PSII y la fotogeneración de O₂ por las microalgas, siendo más sensible esta última a la presencia del analito en las aguas.⁴⁵

La monitorización continua de O₂ en el extremo del transductor pretende solucionar estos problemas, puesto que permite detectar todos aquellos compuestos que comprometan la viabilidad de las microalgas y está sujeta a menos interferencias. Un principio de medida similar se utiliza actualmente en los más avanzados sensores ópticos luminiscentes para la medida *in situ* y en continuo de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO).^{15,46} Como ya se ha indicado, los biosensores microalgares que miden la variación del O₂ fotosintético suelen utilizar transductores electroquímicos, que tienen la desventaja de ser voluminosos y necesitar un mantenimiento frecuente (pues los electrodos se ensucian con facilidad); además, su sensibilidad se ve afectada gravemente por ciertas especies presentes en las aguas (como el sulfuro). Para evitar estos contratiempos, se han utilizado recientemente para otros biosensores transductores **ópticos** basados en películas de silicona teñidas con complejos luminiscentes de rutenio(II) como indicadores de O₂. Un dispositivo optoelectrónico interroga, a través de fibra óptica, los transductores de este gas, que están en íntimo contacto con la masa de microalgas inmovilizadas. El principio óptico con el que interrogamos los transductores de O₂ se basa en medidas *sensibles a la fase de la luminiscencia*, con lo cual evitamos todas desventajas ligadas a las medidas de intensidad.

El pesticida seleccionado para desarrollar el biosensor prototipo fue la **simazina**, un herbicida de la familia de las triazinas cuya actividad se centra en bloquear el transporte de electrones al FS-II.⁴⁷ La especificidad del biosensor se ha conseguido utilizando una estrategia similar a la indicada por Altamirano et al. [21]. Para ello, el dispositivo optoelectrónico está dotado de *dos cabezas* mediante los cuales se monitoriza, simultáneamente, la actividad fotosintética de dos cepas microalgares con distinta sensibilidad a la simazina (“**sensible**” y “**resistente**”). De esta forma, la presencia de simazina en el medio altera únicamente la actividad fotosintética de la cepa sensible, mientras que la presencia de otros herbicidas de distinta estructura, por ejemplo DCMU o diquat, afectará a la actividad fotosintética de ambas cepas.⁴⁸

PARTE EXPERIMENTAL

En este apartado, “diseccionamos” el biosensor desarrollado en esta Tesis en cada uno de sus componentes principales, lo que nos permite tener una visión más clara del dispositivo completo. Podemos dividir el biosensor en cuatro componentes básicos:

- La *membrana* polimérica que contiene las microalgas inmovilizadas encargadas del reconocimiento del analito.
- El *transductor* que transforma la señal químico-biológica en la señal analítica óptica.
- El *sistema sensor* que interroga al transductor óptico, transformando la señal óptica en una señal electrónica.
- El *dispositivo logístico* encargado de (i) transportar y tratar las muestras en su camino hacia los terminales sensibles y (ii) mantener y monitorizar la viabilidad de la biomasa microalgar inmovilizada.

Los dos primeros componentes son la clave de cualquier biosensor y su conjunto se denomina “*terminal sensible*”. Procederemos a detallar el desarrollo de los componentes del mismo, especificando los materiales y reactivos utilizados así como las técnicas de caracterización empleadas.

El trabajo de rastreo y selección de cepas sensibles, así como el crecimiento y aislamiento de las cepas resistentes y la inmovilización de ambas, ha sido realizado por el grupo ALBIOTOX (Biotecnología de microalgas: Producción y toxicidad) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (España), grupo liderado por el Prof. Eduardo Costas.

La fabricación del transductor óptico es fruto de un exhaustivo estudio, descrito en esta Tesis, que nos ha permitido optimizar las propiedades de las moléculas indicadoras de oxígeno en el soporte en que son inmovilizadas, y que ha sido realizado en el Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada (GSOLFA). Asimismo, hemos llevado a cabo la valoración de la actividad de las microalgas inmovilizadas, la optimización del protocolo de medida y la selección de los componentes que hacen posible la operación del biosensor.

1. MEMBRANA CON MICROALGAS INMOVILIZADAS

El grupo ALBIOTOX, de la Facultad de Veterinaria (UCM), realizó todo el trabajo de muestreo, aislamiento de células, crecimiento de clones y selección de cepas.

Los cultivos microalgares se mantienen en disoluciones de BG-11 (Sigma-Aldrich Química, Tres Cantos, Madrid, España) (Tabla 2). Como agente estresante se utilizó simazina (Sigma-Aldrich).

Tabla 2. Componentes del medio de cultivo (BG-11) utilizado para mantener y crecer los cultivos microalgares.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mM)
NaNO ₃	17,65
K ₂ HPO ₄	0,18
MgSO ₄	0,30
CaCl ₂	0,25
Ácido cítrico	0,029
Citrato amónico férrico	0,030
EDTA	0,003
Na ₂ CO ₃	0,19
H ₃ BO ₃	46×10^{-3}
MnCl ₂ ·4H ₂ O	$9,2 \times 10^{-3}$
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$0,77 \times 10^{-3}$
NaMoO ₄ ·5H ₂ O	$1,6 \times 10^{-3}$
CuSO ₄ ·5H ₂ O	$0,32 \times 10^{-3}$
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	$0,17 \times 10^{-3}$

Todo el material fungible utilizado se vende comercialmente esterilizado: placas de 96 pocillos y de 4 pocillos (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca), frascos de cultivo de 25 cm² (Greiner, Bio-One Inc., Monroe, CN, EE.UU.) y pipetas de plástico; además, la manipulación de células se realizó bajo cabinas de flujo laminar (Telstar). La caracterización de las cepas microalgares se realizó a través de microscopio invertido Zeiss Axiovert 35 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania), un espectrofluorímetro (Schimadzu RF-551S, Durisburgo, Alemania), un microscopio óptico McArthur (Kirk Technology, Inglaterra), un fluorímetro ToxY-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemania), un oxímetro (Hansatech, Norfolk, R.U.) y una cámara de Neubauer.

La preparación de las membranas colonizadas con cepas de microalgas sensibles y resistentes forma parte de un proceso continuo que puede resumirse de la siguiente manera:

- Muestro de aguas
- Aislamiento de células
- Crecimiento de clones

- Selección de cepas sensibles
- Selección de cepas resistentes
 - Luria-Delbrück (primera etapa de la selección de cepas resistentes)
 - Ciclo de trinquete (segunda etapa de la selección de cepas resistentes)

Crecimiento de clones

- Inmovilización

La colección de microalgas del grupo ALBIOTOX está formada por especies extraídas y aisladas de **muestras** de aguas recogidas por todo el mundo desde el año 1988.

Para el **aislamiento** de las células microalgares, se tomaron alícuotas de todas las muestras de agua y se depositaron en portaobjetos, donde se seleccionaron y aislaron células individuales gracias a un micromanipulador Eppendorf (Eppendorf Ibérica, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España) acoplado al microscopio invertido (Zeiss Axiovert 35).

De entre las células aisladas se seleccionaron aquellas cepas que mostraron las mejores propiedades para ser utilizadas como futuras herramientas analíticas:

- Crecimiento rápido.
- Resistencia a la manipulación.
- Supervivencia en amplias variaciones ambientales.
- Ausencia de producción de biotoxinas.

El **crecimiento de los clones** seleccionados, tanto para cepas sensibles como para cepas resistentes, se realizó colocando las células aisladas en placas estériles de 96 pocillos, donde se hicieron crecer en medio BG-11. Las placas de 96 pocillos se colocaron en el interior de cámaras de cultivo a 22 °C con una iluminación continua por medio de tubos fluorescentes de luz blanca y una intensidad luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (siglas en inglés de *photosynthetically active radiation*). Trascorridas 2 semanas, el contenido de los pocillos se transfirió a frascos de 25 cm² estériles con 20 mL de BG-11 fresco; los frascos se mantuvieron dentro de las cámaras de cultivo bajo las mismas condiciones de luz y temperatura mencionadas arriba.

1.1. SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES

Cada una de las especies microalgares aisladas y cultivadas fue sometida al proceso de selección de cepas *sensibles*. Los cultivos fueron expuestos durante 5 días a diferentes concentraciones de simazina; transcurridos los 5 días se procedió al conteo celular. Aquellos cultivos que presentaron menores concentraciones celulares, para una misma dosis de simazina, fueron seleccionados como cultivos de las especies/cepas

sensibles. Estos experimentos se realizaron por triplicado para asegurar la validez del método.

La toxicidad de la simazina se estimó calculando la inhibición de la tasa de crecimiento (m) de células aclimatadas a la fase de crecimiento exponencial, en presencia del herbicida, a través de la ecuación de Crow y Kimura (Ec. 5):

Ec. 5

donde N_t y N_0 son el número de algas al principio y al final del experimento, respectivamente, y t es el tiempo que el cultivo está expuesto al herbicida.⁴⁹ De entre las cepas más sensibles, se seleccionaron aquellas que presentaron una respuesta más sensible y rápida a la producción de oxígeno, para lo cual se utilizaron alícuotas de 5×10^5 células, midiendo la producción de oxígeno por medio del oxímetro cada 1, 2, 5, 10, 15 y 30 min.

1.2. SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES

El proceso de selección y aislamiento de cepas cada vez más resistentes se llevó a cabo por medio de dos etapas de selección consecutivas: primero se realizó una variante del **análisis de fluctuación de Luria-Delbrück**, para luego proceder con **ciclos de “trinquete”**. Ambos procedimientos realizados utilizan material estéril, medio de crecimiento BG-11, cámaras de cultivo y flujo laminar.

Las cepas resistentes a simazina fueron obtenidas a partir de los mismos cultivos que se usaron en la selección de las cepas sensibles a este herbicida.

En primer lugar se determinó el valor de la DL_{100} (Dosis Letal 100) de cada una de las cepas utilizadas, lo que permite seleccionar las condiciones estresantes propias del análisis de fluctuación y de los ciclos de trinquete.

Se realizó entonces una modificación en el análisis de Luria-Delbrück para poder aplicarlo a los cultivos microalgares.⁵⁰ El análisis de fluctuaciones de Luria-Delbrück se llevó a cabo por medio de dos baterías de muestras, denominadas “SET 1” y “SET 2”, donde los resultados de la batería SET 2 se utilizaron como control experimental del análisis de fluctuaciones (Figura 15).

Los experimentos de la batería **SET 1** se realizaron con 100 cultivos microalgares; en cada uno de estos 100 cultivos se inocularon, aproximadamente, 100 células en un medio fresco libre del agente estresante, población lo suficientemente baja como para evitar, estadísticamente, la presencia de mutantes resistentes. Los cultivos se mantuvieron en condiciones no estresantes (ausencia de simazina) hasta que su población llegó a las 10^5 – 10^6 células, valor suficientemente grande como para que, estadísticamente, se hubieran desarrollado mutantes resistentes. Es entonces cuando se introdujeron en los 100 cultivos una concentración de agente estresante varias veces superior al LD_{100} .

Las células utilizadas en la batería de muestras **SET 2** fueron de la misma población parental que las del SET 1. La batería del SET 2 se llevó a cabo con 30 cultivos, con una población inicial (10^6 – 10^8 células) lo suficientemente grande como para que, estadísticamente, se dieran mutantes resistentes. Los cultivos del SET 2 fueron directamente expuestos a la misma concentración de agente estresante que la empleada en el SET 1.

Ambos cultivos se mantuvieron durante unos 90 días en presencia del agente tóxico; cada 5 días, el medio viejo fue sustituido por medio fresco con la misma concentración de agente estresante. De esta manera, los cultivos estuvieron siempre en situación de crecimiento exponencial, siendo el compuesto tóxico el único impedimento para el crecimiento de los microorganismos. Transcurridos los 90 días se procedió al conteo del número de células; conteo que permitió seleccionar tanto las cepas más resistentes a simazina, como determinar la naturaleza de las mutaciones (**pre- o post-adaptativa**) que confieren resistencia a las algas frente a la simazina.

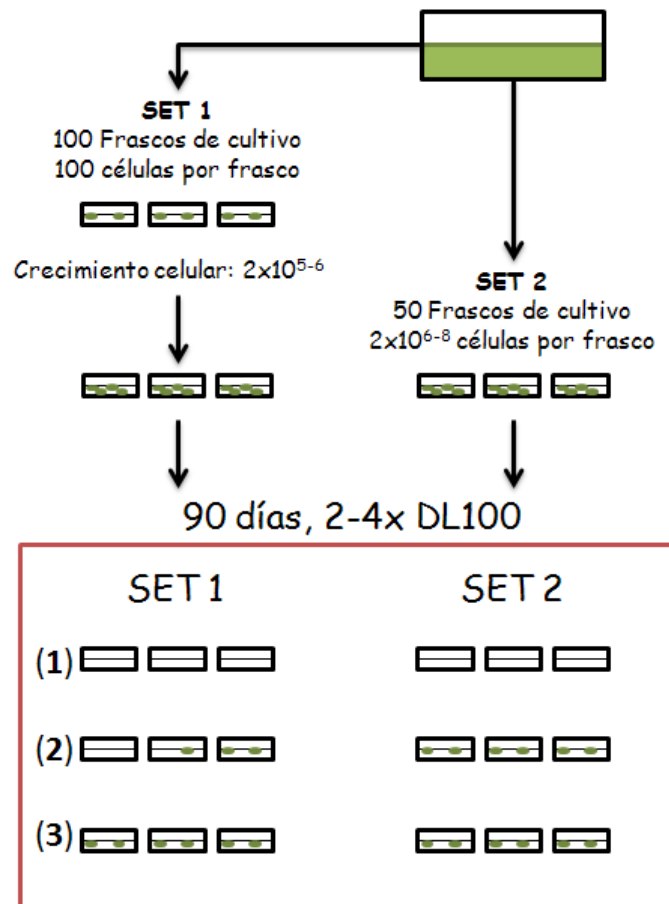


Figura 15. Esquema modificado del análisis de fluctuación descrito por Luria-Delbrück.

Para realizar el primer **ciclo de trinquete**, las cepas seleccionadas tras el análisis de fluctuación de Luria-Delbrück fueron divididas en varios cultivos (3 tubos, Figura 16), todos cargados con la misma concentración de algas (3×10^5 células mL^{-1}). Cada uno de los cultivos fue sometido a una concentración diferente de simazina, concentraciones

comprendidas desde el valor de DL_{100} de cada especie hasta $1/3$ de la DL_{100} o $1/10$ de la DL_{100} . Las concentraciones de $1/3$ de la DL_{100} y de $1/10$ de la DL_{100} aseguran el crecimiento de la población incluso en ausencia de mutaciones.

Tras un periodo de crecimiento (14 días), se procedió a contabilizar la concentración de la población de los tres cultivos. Si los **tres cultivos** superaron un valor umbral (que asegure una densidad celular capaz de inocular el siguiente ciclo), el ciclo primero se dio por concluido y se pasó al ciclo segundo, donde la concentración de simazina se multiplicó por 3 (es decir, $1/3 DL_{100}$, DL_{100} y $3 \times DL_{100}$); si, por el contrario, uno de los cultivos celulares no superó este valor umbral, entonces la concentración de simazina durante el ciclo segundo permaneció igual que durante el ciclo primero ($1/10 DL_{100}$, $1/3 DL_{100}$ y DL_{100}).

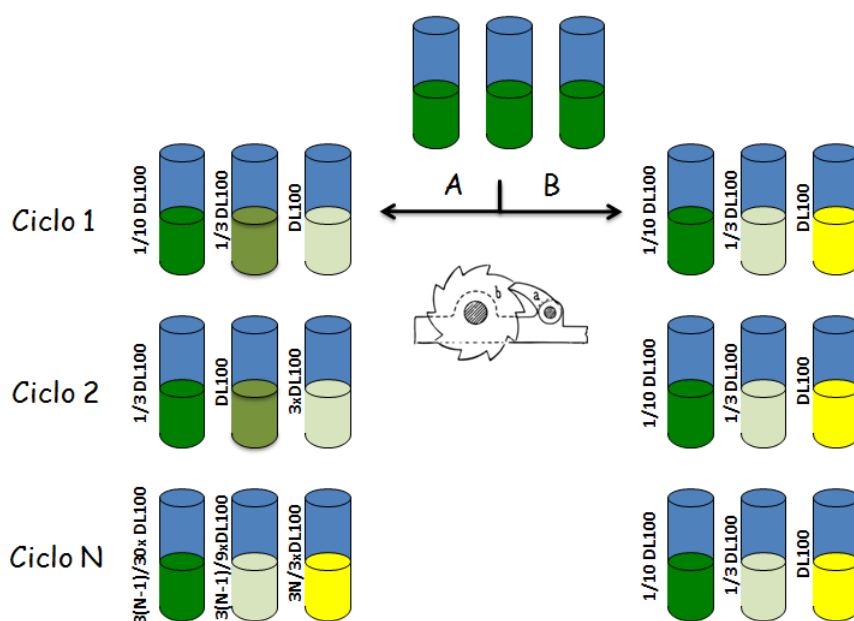


Figura 16. Esquema del protocolo de ciclos de trinquete. Se representan dos casos posibles. A: Se consiguen cepas cada vez más resistentes. B: Las cepas no mejoran su resistencia. El color amarillo representa una concentración celular por debajo del umbral seleccionado; si uno de los tres cultivos queda por debajo de este umbral, se da por concluido el experimento.

Los ciclos se repitieron tantas veces como fue necesario hasta que algún replicado del clon resistente no creció. En ese momento se consideró que la optimización había finalizado.⁵¹

1.3. MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN

Las membranas de ImmobaSil fueron suministradas comercialmente en formatos de 1 y 0,50 mm de grosor, con un diámetro estándar de 10 mm. La empresa suministradora (Cellon S.A., Bascharage, Luxemburgo) nos proporcionó generosamente también un formato especial de 0,25 mm de grosor. El diámetro de las membranas se redujo a 4 mm para adaptarlo al tamaño final del terminal sensible y, seguidamente, se acondicionaron

y esterilizaron antes de ser colonizadas por las cepas microalgares, a través de las siguientes etapas:

- Lavado con agua destilada de las membranas ImmobaSil.
- Esterilización en autoclave (121 °C, 15 min).
- Secado y almacenaje en un recipiente estéril con agua destilada.
- Lavado con medio BG-11 antes de utilizar.

Finalmente, la inmovilización se llevó a cabo en placas de 4 pocillos (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca), depositando los discos de ImmobaSil en el fondo de los pocillos y cubriéndolos con una alícuota de cultivo de 2×10^6 células mL⁻¹ en fase exponencial de crecimiento. Las condiciones de colonización fueron las mismas que las empleadas en la selección de las cepas sensibles y resistentes, esto es, a 20 °C y bajo luz blanca continua de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la región entre 400–700 nm.

La colonización de la membrana se realizó por sedimentación. Tras un periodo de cultivo (7–14 días), las membranas se lavaron con medio BG-11 para eliminar las células unidas superficialmente, dando por concluido el proceso de inmovilización.

Las membranas colonizadas se introdujeron en nuevas placas multi-pocillos, pero con un medio de cultivo BG-11 diluido (1/10), en oscuridad y dentro de una nevera (4 °C), para controlar el crecimiento celular a la espera de ser utilizadas.

Las membranas de silicona porosa colonizadas por microalgas serán denominadas frecuentemente como “*membranas microalgares*”.

2. TRANSDUCTOR

Como transductor opto-químico se seleccionó un indicador luminiscente sensible a la concentración de oxígeno, que se incorpora en el interior de una película delgada de silicona, muy permeable al analito. La molécula sensible al oxígeno es el complejo metálico tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) (utilizado en forma de dicloruro), de aquí en adelante abreviado como RD3. La síntesis del indicador luminiscente RD3 ha sido descrita anteriormente por nuestro grupo.⁵²

En primer lugar se realizó un estudio sobre la influencia de la composición y naturaleza del soporte sobre la respuesta del indicador luminiscente, para lo cual se prepararon diferentes películas indicadoras de silicona con diferentes partículas de relleno. Posteriormente, la información obtenida nos ha permitido preparar una película indicadora con las características óptimas para ser utilizada como transductor de la *actividad biológica* (producción de oxígeno) de las cepas microalgares inmovilizadas en el cabezal biosensor.

2.1. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE TRANSDUCTORES ÓPTICOS DE OXÍGENO

Para desarrollar el mejor transductor óptico de O₂ posible, se realizó un novedoso estudio de los mismos basado en microscopia de fluorescencia de imagen por tiempo de vida (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM).⁵³ El estudio se centró en aquellos factores que afectan a la fabricación del soporte polimérico (películas de silicona) de los sensores luminiscentes de O₂: la naturaleza de la silicona utilizada o el tipo, tamaño y concentración de las partículas (silíceas, en nuestro caso) usadas para rellenar las siliconas. Por medio del FLIM podemos estudiar factores microscópicos que afectan al comportamiento macroscópico de las sondas de O₂.

Los soportes del indicador fueron preparados empleando tres tipos de silicona RTV (*room-temperature vulcanization*) de curado por humedad, representativas de las disponibles comercialmente:

- Dow Corning 732 (DC 732, Wiesbaden, Alemania), con una composición en peso de > 60% dimetilsiloxano, 7–13% sílice amorfa, 5–10% etiltriacetoxisilano y 5–10% metiltriacetoxisilano.⁵⁴
- Dow Corning 3140 (DC 3140, Wiesbaden, Alemania), de curado “neutro”, con una composición en peso de > 60% dimetilsiloxano, 10–30% sílice “trimetilada” y 5–10% metiltrimetoxisilano.⁵⁴
- Krafft 62833 (KF 62833, Guipúzcoa, España), de composición exacta no revelada, pero de curado con liberación de ácido como la DC 732.

Tres tipos de partículas de sílice se añadieron como relleno para la fabricación de los soportes de silicona, donde el diámetro de partícula (d_p) es la característica principal:

- Gel de sílice 60 (Merck, Darmstadt, Alemania), para cromatografía rápida en columna, $d_p = 40\text{--}63\ \mu\text{m}$.⁵⁵
- Gel de sílice Partisil-5 (Whatman, Kent, R.U.), $d_p = 5\ \mu\text{m}$.⁵⁶
- Gel de sílice pirogénica (Sigma 99,8%, Missouri, EE.UU.), $d_p = 0,007\ \mu\text{m}$.⁵⁷

Para la preparación de las películas de silicona, se mezclaron meticulosamente cantidades establecidas de cada silicona y de cada sílice (0%, 5% y 10% de sílice en peso). Las mezclas se extendieron sobre láminas de poliéster transparente (Mylar, 85 x 25 x 0,1 mm, Goodfellow, Huntingdon, R.U.) mediante la técnica de revestimiento conocida en inglés como *knife-coating* con la ayuda de un dispositivo de fabricación propia. Las películas de polímero final se obtuvieron tras un periodo de curación de 15 días a temperatura ambiente. Una vez curadas, se retiraron del soporte de poliéster (mecánicamente) y se determinó el espesor de las membranas con un micrómetro digital, resultando ser de $(150 \pm 25)\ \mu\text{m}$ (para la mayoría de las películas).

Para introducir las moléculas indicadoras de RD3 en las películas de silicona, cada película fue sumergida en una disolución de RD3 (0,25 mM) en diclorometano (grado

HPLC). El diclorometano hincha considerablemente la membrana de silicona, facilitando la entrada del RD3 y la salida de aquellas moléculas de dimetilsiloxano y oligómeros que no han polimerizado. La membrana vuelve a su tamaño original después de tres días de secado al aire a temperatura ambiente.

Las siliconas comerciales se venden por defecto con carga de relleno inorgánico; por ello, para poder fabricar películas de silicona dopadas con RD3 totalmente libres de sílice, recurrimos a una silicona líquida de recubrimiento utilizada normalmente en circuitos electrónicos para protegerlos de la humedad. Esta silicona carece de cualquier tipo de relleno inorgánico:

- Dow Corning 1-2577 (DC 1-2577, Wiesbaden, Alemania), con una composición en peso de > 60% dimetilfenilmetoxisilano, 15–40% tolueno y 3–7% metiltrimetoxisilano.⁵⁴

Para ello se preparó una disolución de RD3 (0,4 mg) en 2,0 mL de diclorometano, de la cual se tomaron alícuotas de 1,0 mL para mezclarlas con 0,5 mL de silicona líquida DC 1-2577. Algunas gotas de esta mezcla se depositaron sobre un porta-muestras de vidrio y se secaron al aire durante 1 día a temperatura ambiente.

2.2. FABRICACIÓN DEL TRANSDUCTOR DEL BIOSENSOR MICROALGAR

Para la fabricación del transductor de oxígeno del biosensor microalgar, se prepararon películas de silicona DC 3140 con una carga del 10% (en peso) de sílice pirogénica y de un espesor de (150 ± 15) μm , a la que se incorporó el indicador luminiscente RD3 (ver apartado anterior).

Finalmente, las películas sensoras recibieron la deposición de una capa de silicona gris (Dow Corning 3145G) en una de sus caras. Después de 72 h de curado al aire y a temperatura ambiente, se midió un espesor total de las películas sensoras compuestas de 250 ± 25 μm .

2.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DEL TRANSDUCTOR

Los espectros de absorción de las diferentes películas de silicona teñidas con el indicador luminiscente se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de doble haz Cary 3-Bio (Varian Inc., Palo Alto, California, EE.UU.), usando como referencia la película de silicona correspondiente sin RD3.

Los espectros de luminiscencia se registraron a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50 (Uberlingen, Alemania).

Las medidas de luminiscencia con resolución temporal de las películas sensibles a O₂ se llevaron a cabo por medio de un equipo FLIM Horiba DynaMic (Piscataway, NJ,

EE.UU.). Este equipo utiliza un microscopio de epifluorescencia confocal (Olympus BX51, NY, EE.UU.) para registrar las imágenes de campo brillante y está equipado con dos objetivos (10X y 40X, Olympus) y una cámara CCD (*charge coupled device*, uEye UI-1450-C, IDS, Alemania) de 1600 x 1200 pixels. Como fuente de excitación se usó un diodo laser Horiba NanoLED-470LH (máximo de longitud de onda de emisión en 463 nm; ancho de pulso de 900 ps; 100 KHz, 50 KHz o 10 KHz de frecuencia de pulsado). Se colocó un filtro interferencial de 470 nm (Chroma HQ470/20x, Rockingham, VT, EE.UU.) en la trayectoria de la fuente de excitación y se situó un espejo dichroico de 490 nm (Olympus Q490DCXR) en el camino óptico de la emisión de la muestra. Se utilizaron filtros de densidad neutra (Thermo-Oriel, Stratford, CT, EE.UU.; A = 1,00) para proteger el detector de aquellas membranas con alta intensidad de emisión. Puesto que los máximos de emisión de las membranas estudiadas están en torno a 630 nm, se utilizó un filtro de corte de banda ancha centrado a 590 nm (CG-OG-590-1,00-3, CVI Technical Optics, EE.UU.); este filtro minimiza la detección de luz de excitación dispersada por la muestra.

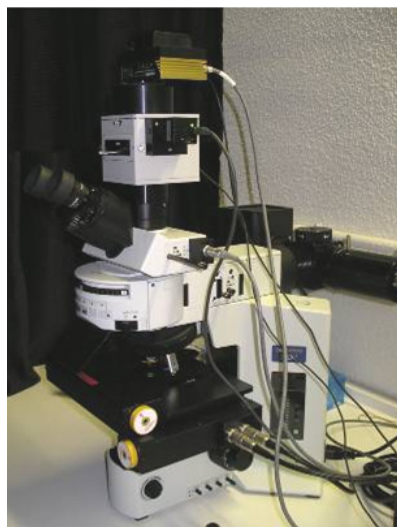


Figura 17. Unidad FLIM del Laboratorio de Fotoquímica Aplicada, Departamento de Química Orgánica, UCM.

El controlador FluoroHub (Horiba), que realiza el conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo (*single photon timing*, SPT), se conectó a un módulo de detección de fotones en la escala de ps (Horiba, TBX-04). Este módulo está equipado con un fotomultiplicador de respuesta rápida en el rojo y un sistema de enfriamiento termoeléctrico para disminuir el ruido electrónico. Para las muestras con tiempos de vida en la escala de los microsegundos, se utilizó un generador de retrasos externo (Ortec 416A, TN, EE.UU.). Los decaimientos de luminiscencia se midieron con ventanas de 10, 20 o 50 μ s hasta acumular un mínimo de 5000 cuentas en el canal de máximo del perfil cinético. Los tiempos de vida de emisión se calcularon ajustando los datos cinéticos experimentales a una función tri-exponencial con término independiente; para realizar el ajuste se utilizó un algoritmo de minimización *grid-search*, propiedad de Horiba, obteniendo valores de χ^2 suficientemente próximos a la unidad.⁵⁸

Las medidas de O₂ se llevaron a cabo a presión ambiente (711 ± 5) Torr en al menos 3 zonas diferentes de la superficie de la película sensora, usando un orificio (*pinhole*) de 200 μm y objetivo 10X, de forma que el área de análisis cubre 300 μm². Los resultados que se presentan son el valor medio de los tres tiempos de vida de emisión promedio con pesada pre-exponencial (τ_m)¹ obtenidos y los correspondientes coeficientes pre-exponenciales de cada una de las componentes.

3. DISPOSITIVO DE MEDIDA DEL BIOSENSOR MICROALGAR

El principio óptico utilizado por el transductor para monitorizar la concentración de oxígeno disuelto, instalado en la cabeza del terminal sensible, se basa en las medidas de detección sensible a la fase de la luminiscencia de un indicador de O₂. Dichas medidas se llevan a cabo por medio de un dispositivo optoelectrónico (Optosen[®]) fabricado específicamente para esta aplicación por la empresa Ultrasen Sistemas (Torrejón, Madrid, España). Esta unidad multicanal dedicada utiliza fibras ópticas bifurcadas para hacer llegar la luz de excitación al indicador luminiscente inmovilizado en un soporte polimérico delgado en el extremo distal de las mismas, y recolectar la luz emitida por éste. Como fuente de excitación se emplean diodos emisores de luz (LEDs, del inglés *light-emitting diodes*) de alta intensidad, cuya emisión está centrada a 470 nm. La luz azul de excitación atraviesa un filtro óptico de banda ancha (a 430 nm) antes de llegar a los terminales sensibles; la luz de la fuente de excitación se modula sinusoidalmente según la selección del usuario (39 KHz en nuestro caso). La emisión de los terminales sensibles llega al fotodetector (un tubo fotomultiplicador compacto de Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón) atravesando un filtro de corte a 590 nm que rechaza por completo la luz dispersa proveniente de la excitación.

4. COMPONENTES DEL DISPOSITIVO

La concentración de biomasa inmovilizada (población microalgar) en cada cabezal del biosensor se monitorizó in situ, en tiempo real, por medio de una cámara CCD (Instaspect IV, 1024 x 256 pixel; Oriel, Stratford, CT, EE.UU.). Esta cámara mide la intensidad de emisión de clorofila (650 nm) como indicador de la concentración celular. La fluorescencia de la clorofila de las microalgas que residen en la membrana polimérica delgada, llega a la cámara CCD atravesando un filtro de corte a 515 nm.

Como fuente de excitación de la actividad fotosintética y de la emisión de la clorofila microalgar, se utilizó un dispositivo LED fabricado específicamente por el Taller Electrónico de la UCM bajo nuestro diseño. Este dispositivo está dotado de dos LEDs de 470 nm (Dragon Eye, Osram, Regensburg, Alemania) que proporcionan luz actínica a las membranas microalgares. La potencia radiante de los LEDs es regulable (*individualmente*) a voluntad de forma continua desde 0 a 145 μW (medido al final de la

1

fibra óptica descrita más bajo). La potencia radiante se midió con un radiómetro Ophir Optronics PD200 (Har Hotzvim, Jerusalén, Israel) equipado con un sensor de fotodiodo. El tiempo de duración de los ciclos luz/oscuridad se controla a voluntad mediante un programa informático desarrollado también por los técnicos especialistas del Taller Electrónico de la UCM.

Para iluminar los cabezales provistos de las correspondientes membranas microalgares con la radiación de los LEDs y conducir de regreso la emisión de la clorofila a la CCD se utilizó un cable de fibra óptica *trifurcado*, especialmente fabricado para este proyecto bajo nuestro diseño por la empresa Polymicro Technologies (Arizona, EE.UU.). El cable está formado por 19 fibras ópticas sílice/sílice multimodo de índice de refracción en escalón y transmisión entre 180–1150 nm (FVP200220240), con 1 m de longitud cada una y 220 μm de diámetro (núcleo de 200 μm) en el interior de una camisa protectora de PVC con *buffer* de poliimida. Las fibras están distribuidas de forma que el cable tenga los 5 extremos necesarios para conectar, mediante conectores estándar SMA905, los dos terminales sensibles (donde se ubican las membranas microalgares con poblaciones sensible y resistente, respectivamente) con la cámara CCD y las dos unidades LEDs del dispositivo de iluminación (Figura 38). Los tres extremos proximales contienen, respectivamente, 9, 19 y 10 fibras; los dos extremos distales que llegan a los cabezales de medida contienen 19 fibras cada uno. Las fibras ópticas están distribuidas al azar en los tres extremos comunes. El diferente número de fibras en los dos extremos proximales conectados a los LEDs azules de excitación se compensa mediante la regulación individual de la potencia radiante de cada uno de ellos.

El programa informático desarrollado por el Taller de Electrónica controla el dispositivo LED de tal forma que la activación de los LEDs se produce de manera secuencial, primero uno de los LED y después el otro. De esta forma podemos, con una única cámara CCD, diferenciar las emisiones de clorofila producidas por las dos membranas microalgares (sensible y resistente).



Figura 18. Fotografía del módulo portátil de excitación de los cabezales del biosensor y de monitorización de la fluorescencia de las microalgas inmovilizadas en los mismos. (a) unidad de iluminación dual LED con control independiente de la potencia radiante de cada uno; (b) detector CCD; (c) colimador de luz provisto de conectores SMA905 para fibra óptica multimodo; (d)-(d'), extremos proximales del cable de fibra óptica trifurcada; (e) espectrógrafo con red de difracción de 600 líneas/mm.

En algunos experimentos, se realizó un estudio del efecto de la temperatura sobre la señal óptica del transductor por medio de un baño termostático (Huber, Offenburg, Alemania).

Se utilizó un controlador electrónico de flujo másico (ICP, Cantoblanco, Madrid, España) para calibrar los sensores luminiscentes de O_2 disuelto (registro de las curvas de Stern-Volmer que reflejan la desactivación bimolecular de la emisión del indicador por el analito). Para el calibrado mediante mezclas sintéticas de gases, se utilizaron cilindros comerciales de nitrógeno molecular comprimido (99,9992%, Carburos Metálicos, Madrid, España) y de oxígeno molecular comprimido (99,99%, Praxair, Madrid, España).

Las muestras de agua, con o sin pesticida, que llegan a la cámara de medida se desoxigenan previamente, en línea, por medio de un desgasificador de dos canales, Gastorr BG-12 (FLOM, Shimadzu Ome City Tokyo, Japón). Este tipo de desgasificadores son utilizados en medidas de HPLC para evitar las interferencias generadas por las burbujas de aire disuelto en la fase móvil. El compacto dispositivo consta de una cámara de vacío de 10,5 mL, un tubo desgasificador, una microbomba de vacío capaz de reducir la presión hasta sólo 100 hPa y un microprocesador que controla el funcionamiento de la bomba.

El sistema de flujo para hacer circular la muestra por el biosensor consta de componentes típicos de sistemas FIA (siglas en inglés de *Flow Injection System*), tales

como tubos de PTFE y conectores apropiados $\frac{1}{4}$ -28 UNF, así como de una bomba peristáltica de velocidad variable (MINIPULS 3, Gilson, Middleton, WI, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. MICROALGAS

Los cultivos de microorganismos atraviesan una serie de etapas perfectamente diferenciadas (Figura 19):

- 1- Primero se produce una fase de **latencia** durante la cual el inóculo se adapta a las condiciones del medio fresco. Durante este tiempo las algas realizan un ajuste metabólico, por lo que su crecimiento resulta moderado.
- 2- Una vez adaptadas al nuevo medio, el cultivo experimenta un **crecimiento exponencial**, favorecido por la abundancia de nutrientes. Durante este periodo la actividad metabólica es máxima.
- 3- El crecimiento de la población provoca una rápida disminución de los nutrientes y de la accesibilidad de la luz, pudiendo haber variaciones bruscas del pH del medio. Todo esto provoca un crecimiento neto nulo, esto es, un estado en el que las células se concentran en sobrevivir en lugar de crecer.
- 4- Finalmente se produce una muerte exponencial del cultivo debido al agotamiento de las reservas de energía.

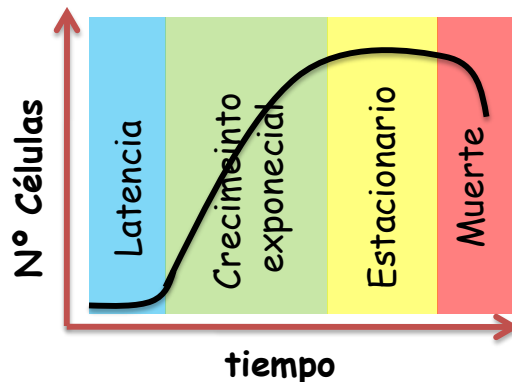


Figura 19. Curva de crecimiento microalgar donde se representan las cuatro fases características del cultivo: latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y muerte.

Con la intención de trabajar con cultivos en su máximo esplendor metabólico (crecimiento exponencial), se realizaron transferencias periódicas, una vez al mes, de un inóculo (ca. 10^5 células) a medio de cultivo fresco (BG-11), de forma que la concentración de nutrientes nunca fuera limitante.

Uno de los pilares de nuestro trabajo ha sido el dotar al biosensor de especificidad a la simazina, evitando el empleo de organismos modificados genéticamente (OMG). Para ello se han seleccionado dos genotipos diferentes (cepas) de la misma especie de microalga, pero con *distintas sensibilidades* a un agente tóxico; las cepas seleccionadas

se denominan, en adelante, “sensibles” y “resistentes”. De entre las especies microalgares muestreadas, aisladas y estudiadas por el grupo ALBIOTOX (Facultad de Veterinaria, UCM, Prof. E. Costas) se seleccionaron aquellas especies capaces de proporcionar, al mismo tiempo, clones especialmente sensibles y clones especialmente resistentes a la simazina. Las especies *Dictyosphaerium chlorelloides* (D.c.) y *Scenedesmus sp.* (S.s.) proporcionaron los mejores resultados, tanto en el aislamiento y desarrollo de cepas sensibles como de cepas resistentes, por lo que fueron escogidas como elementos biológicos de reconocimiento durante los experimentos preliminares del biosensor microalgar.

La especie *Scenedesmus sp.* fue aislada de una muestra de agua procedente de Mauritania (Laguna de La Entrueka), mientras que la especie *Dictyosphaerium chlorelloides* fue extraída de la Reserva Biológica de Doñana (España).

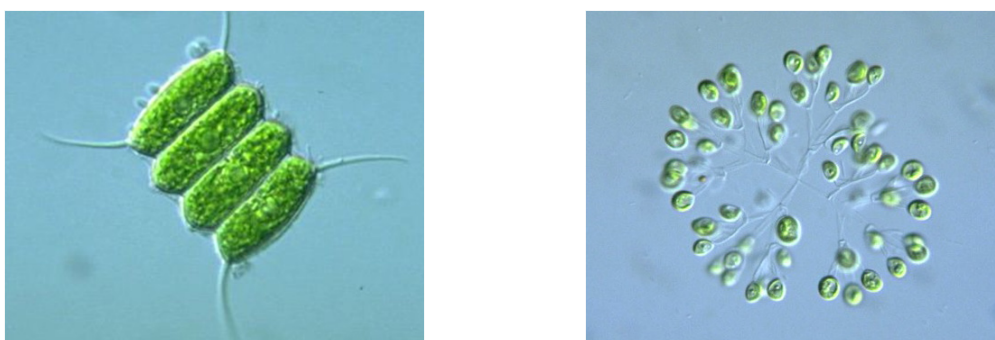


Figura 20. (Izq.) Colonia de 4 células *Scenedesmus* (Fuente: Protist Information Server).

Figura 21. (Dcha.) Colonia de *Dictyosphaerium* (Fuente: Protist Information Server).

El trabajo de selección de cepas sensibles y resistentes se realizó para ambas especies pero, puesto que la especie *D. chlorelloides* mostró mejores condiciones durante el proceso de inmovilización en la membrana de silicona porosa, centramos todo nuestro interés en los resultados ofrecidos por esta especie.

Por ello, los resultados de selección de cepas sensibles y resistentes mostrados a continuación solo hacen referencia a la especie *D. chlorelloides*.

1.1. PROCESO DE SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES

Las cepas más sensibles serán aquellas que de forma natural muestran sensibilidad a las menores concentraciones de la simazina y en menor tiempo, lo que se traduce en una caída, parcial o total, de su actividad fotosintética.

La naturaleza antropogénica de este herbicida hace que cualquier especie microalgar se incluya en el término “sensible”. No obstante, para mejorar la sensibilidad del futuro biosensor, es conveniente seleccionar microalgas procedentes de áreas libres de contaminación (“prístinas”), donde no se haya desarrollado cierta resistencia natural a simazina u otros herbicidas similares en estructura o función. Para ello se realizaron

muestreos de agua procedente de distintas ubicaciones, buscando aislar células de grupos funcionales y taxonómicos diferentes.

De entre las cepas *D. chlorelloides* aisladas podemos ver en la Figura 22 algunas respuestas que sirven como ejemplo representativo del protocolo seguido en la determinación de la cepa más sensible a simazina, donde se incluye la cepa 20 que fue seleccionada como la cepa más sensible de la especie *D. chlorelloides*.

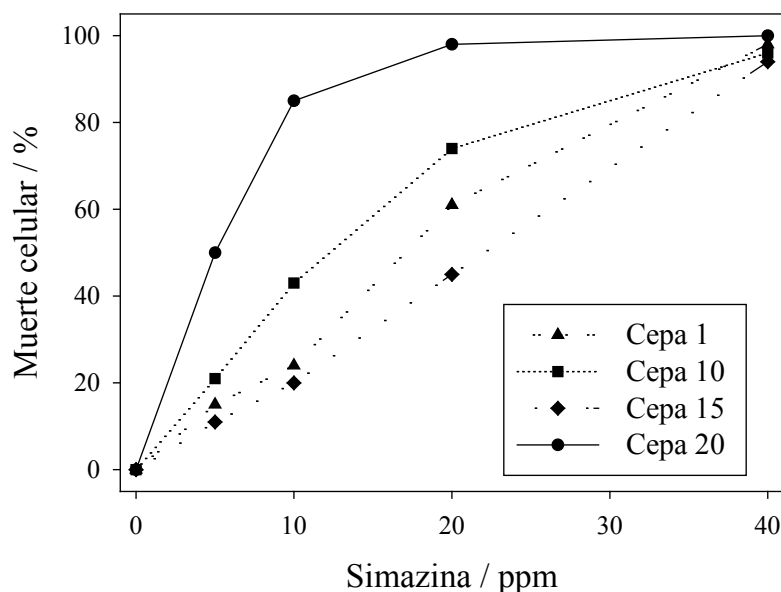


Figura 22. Muestra la diferente sensibilidad de distintas cepas de *D. chlorelloides* representado el % de de células vivas tras 100 h de incubación con concentraciones crecientes de simazina.

Los cultivos de la cepa 20 presentaron mayores tasas de muerte celular para las mismas concentraciones de simazina que los cultivos de otras cepas. Esta cepa además fue utilizada como punto de partida en el aislamiento de clones con mayor resistencia.

1.2. PROCESO DE SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES

Como hemos indicado anteriormente, la especificidad del biosensor requiere la presencia de células con la mayor resistencia posible a la simazina, es decir, que su actividad fotosintética no se modifique sustancialmente en presencia de concentraciones significativas de este pesticida.

El proceso de selección y aislamiento de cepas cada vez más resistentes se llevó a cabo por medio de dos etapas de selección consecutivas: primero se realizó una variante del **análisis de fluctuación de Luria-Delbrück** para luego proceder con **ciclos de “trinquete”**. La primera etapa de selección (*análisis de fluctuaciones*) permite identificar mutantes resistentes a la simazina, mientras que el(los) ciclo(s) de trinquete permiten seleccionar organismos que acumulan más de una mutación que confiere resistencia al compuesto tóxico. De esta forma se obtienen cepas que muestran una resistencia aumentada al tóxico diana para impartir especificidad al biosensor. Si la selección se efectuase únicamente mediante el análisis de fluctuación Luria-Delbrück o

únicamente mediante los ciclos de trinquete, la población celular resultante contendría una mezcla de cepas sensibles y resistentes, lo que sería inaceptable para el desarrollo un biosensor como el que es objeto de este trabajo.

La cepa resistente a simazina se obtuvo a partir de la cepa 20. Esta cepa fue seleccionada para llevar a cabo el análisis de fluctuación de Luria-Delbrück. Para ello, fue necesario determinar primero su DL_{100} , encontrándose que, para una concentración de 80 ppm y transcurridas 48 h, la densidad celular de los cultivos de la cepa 20 fue de 0% ($DL_{100} = 80$ ppm, para simazina).

Una vez determinado el DL_{100} , se realizó la variante del análisis de fluctuación de Luria-Delbrück, descrito anteriormente, que permite determinar la naturaleza de las mutaciones que confieren la resistencia de las cepas al agente estresante. La Figura 15 presenta los tres resultados posibles para el análisis de fluctuaciones de Luria-Delbrück, dependiendo del origen de las mutaciones que confieren la resistencia:

(1) La primera de las tres posibilidades, es que no se haya producido ningún tipo de mutación y todos los cultivos mueran, con lo que el experimento finaliza.

(2) La segunda posibilidad es que las mutaciones que generan la resistencia a simazina sean *pre-adaptativas*, esto es, no tienen relación con la presencia del agente tóxico; entonces, las mutaciones son totalmente aleatorias y en cada uno de los 100 cultivos (SET 1) tendremos situaciones completamente distintas:

- No se ha dado la mutación y el cultivo muere.
- La mutación se ha dado en los primeros ciclos reproductivos (cuando la población es cercana a las 10^2 células), de manera que cuando la población llega a 10^5 y se introduce el agente selectivo, tenemos un gran número de células dotadas de resistencia.
- La mutación se ha dado en los últimos ciclos reproductivos (cuando la población es cercana a las 10^5 células) y el número de células resistentes es pequeño al introducir el medio estresante.

En este caso el cociente entre la varianza y el valor medio de las poblaciones microalgas será mucho mayor que uno (**varianza/media $\gg 1$**), puesto que los valores tendrán una gran dispersión (varianza).

(3) La última posibilidad es que las mutaciones sean consecuencia de las condiciones del medio (*adaptativas*): los 100 cultivos del SET 1 tendrán las mismas posibilidades de desarrollar esa resistencia, por lo que su varianza y su media serán similares y su cociente estará próximo a uno (**varianza/media ≈ 1**).

El experimento del SET 2 sirve como control ya que, al inocular una cantidad tan grande de microalgas inicialmente, la varianza será probablemente baja, debido a que incluso en el caso de que las mutaciones sean pre-adaptativas la concentración de algas de partida favorece, estadísticamente, la presencia de mutantes en todos los cultivos.

Si el cociente varianza/media del SET 1 es considerablemente mayor que el del SET 2, podemos asegurar que las mutaciones aparecen de forma pre-adaptativa. Si por el contrario ambos cocientes son similares, se confirmaría que las mutaciones aparecen como consecuencia de la presencia del compuesto tóxico.

El conteo de células de los cultivos de los SET 1 y SET 2, realizado tras los 90 días de cultivo en condiciones estresantes, viene resumido en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación de datos estadísticos para los experimentos de cultivo de *D. chlorelloides* en presencia de simazina (SET 1 y SET 2).

	SET 1	SET 2
Número de cultivos	100	50
Número de microalgas por cultivo		
0	54	0
$<10^3$	20	0
10^3-10^4	10	20
10^3-10^5	15	30
$>10^5$	1	0
Ratio varianza/media	> 40	1,3
Número de microalgas resistentes	1 por cada 4×10^7	

Puesto que la fluctuación, relación varianza/media, del SET 1 es muy alta (> 40) y la del SET 2 es muy baja (< 2), podemos afirmar que las microalgas resistentes al agente tóxico se originan a partir de **mutaciones previas (pre-adaptativas)** a la incorporación de la simazina que confieren resistencia a dicho agente tóxico.⁵⁹

El éxito que determina la evolución de especies resistentes a un determinado compuesto depende tanto del volumen de la población utilizada, como de la duración del cultivo en condiciones de estrés o de la concentración del analito estresante. El problema es que altas concentraciones del analito estresante producen bajos niveles de población. Por este motivo, la segunda etapa del proceso de selección de la población microalgar se realiza por medio de los denominados **ciclos de trinquete**, un experimento diseñado como situación de compromiso entre las exigentes condiciones de crecimiento y el mantenimiento de poblaciones con un volumen lo suficientemente grande. Esta técnica requiere un protocolo de ciclos consecutivos que tiene como intención avanzar hacia la selección de cepas cada vez más resistentes al agente tóxico, donde los cultivos son sometidos en cada ciclo a condiciones de mayor o igual estrés, nunca menor (de ahí la denominación de ciclos de “trinquete”) (Figura 16).

1.3. CARACTERIZACIÓN DE AMBAS CEPAS

La Figura 23 muestra las diferencias en la actividad fotosintética (producción de O_2) de dos alícuotas de la **cepa sensible** a simazina (cepa 20), donde una alícuota no ha entrado en contacto con simazina mientras que la otra ha sido incubada con 5 ppm de

simazina. Ambas alícuotas proceden del mismo cultivo parental (cepa 20) y contienen la misma concentración celular (5×10^5 células mL^{-1}).

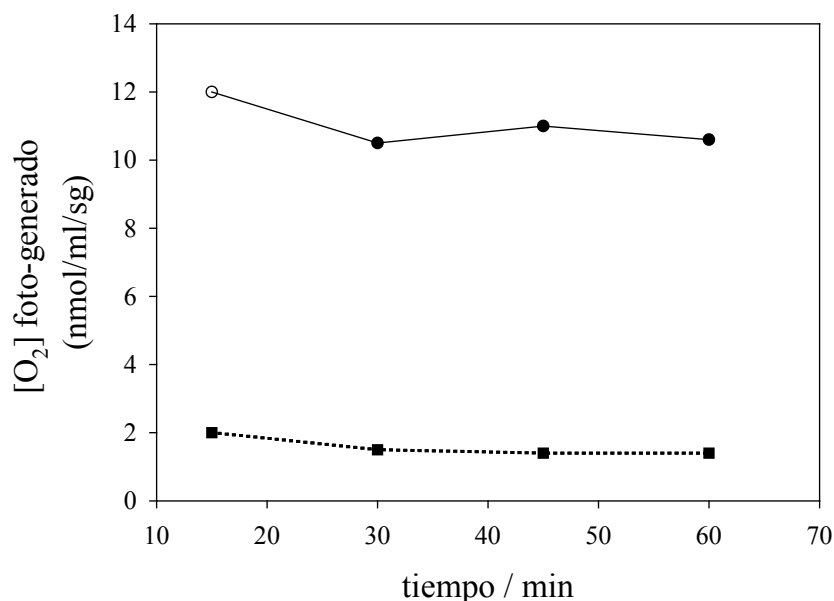


Figura 23. Medida de O₂ foto-generado (oxímetro) para una alícuota de microalgas sensibles a simazina (cepa 20), en ausencia de simazina (●) y presencia de 5 ppm de simazina (■).

La Figura 23 (■) muestra como la incubación de **microalgas sensibles**, con 5 ppm de simazina, disminuye la actividad fotosintética (> 70%).

La Figura 24 muestra, sin embargo, la actividad fotosintética (producción de O₂) de dos alícuotas de la **cepa resistente** a simazina, donde una alícuota no ha entrado en contacto con simazina mientras que la otra ha sido incubada con 5 ppm de simazina.

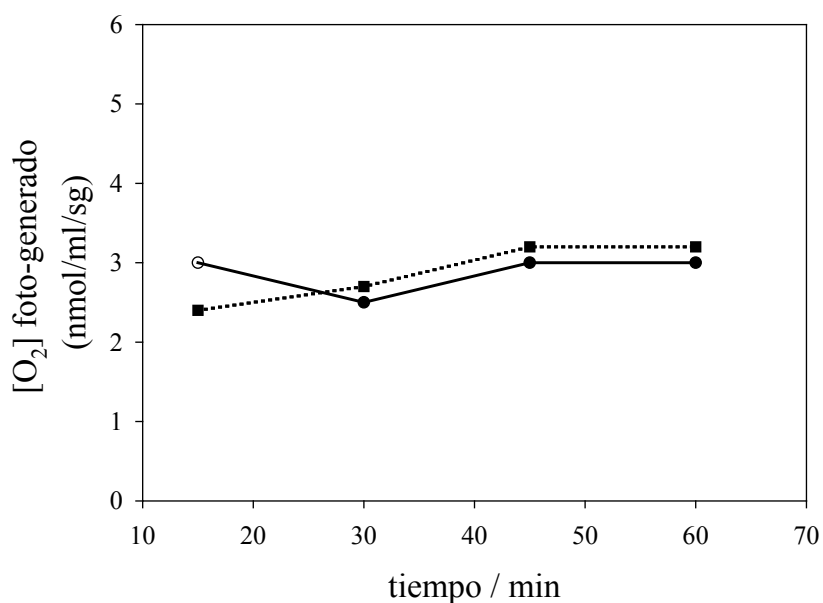


Figura 24. Medida de O₂ foto-generado (oxímetro) para una solución de cepas resistentes a simazina, en ausencia de simazina (●) y presencia de 5 ppm de simazina (■).

La Figura 24 muestra cómo la alícuota de microalgas resistente mantiene la misma actividad fotosintética tanto en ausencia como en presencia de simazina (5 ppm). Ambas alícuotas proceden del mismo cultivo parental y contienen la misma concentración celular (5×10^5 células mL⁻¹).

El principio de **especificidad** del biosensor desarrollado recae sobre la diferente actividad fotosintética que presentan las cepas sensibles y resistente en presencia de simazina (Figura 23 y Figura 24, respectivamente).

La comparación entre la Figura 23 y la Figura 24 aporta otro dato importante, a tener en cuenta en la fabricación del biosensor: para una misma concentración de microorganismos (5×10^5 células mL⁻¹) y en ausencia de simazina, la actividad fotosintética (producción de O₂) de las microalgas pertenecientes a la cepa resistente es mucho menor que la de las microalgas pertenecientes a la cepa sensible (70% menor). Esto puede ser debido a que las mutaciones que confieren resistencia a las células frente a la simazina también afectan a su actividad fotosintética.

Las mutaciones responsables de la resistencia a simazina alteran también la capacidad de reproducción de éstas. Así, si la tasa de división celular de las microalgas sensibles es de aproximadamente $1,0 \pm 0,1$ cada 24 h, encontramos que para microalgas resistentes a simazina, cada 24 h, tenemos una tasa de división de aproximadamente $0,5 \pm 0,2$ (tanto en ausencia como en presencia de simazina). Esta característica ha de ser tomada en cuenta durante el proceso de inmovilización de las células microalgares en la membrana de silicona porosa, para conseguir que ambas membranas microalgares (sensible y resistente) tengan una concentración celular parecida independientemente de su sensibilidad a la simazina.

1.4. INMOVILIZACIÓN

Una vez seleccionas las cepas de interés, el siguiente paso para la fabricación del biosensor consiste en realizar la inmovilización del material biológico. Existe una gran variedad de métodos para llevar a cabo la inmovilización de microalgas,⁶⁰ pero muchos de ellos se han desarrollado para cultivos con aplicaciones industriales y no pueden aplicarse en biosensores. La selección del soporte de inmovilización depende de las particularidades de cada biosensor; en nuestro caso, se seleccionaron aquellos materiales que:

- Permitan el libre acceso de los nutrientes que mantienen el cultivo, así como la salida de los compuestos generados como consecuencia de su actividad fotosintética.
- No afecten gravemente a la viabilidad del cultivo.
- Sean lo más translúcidos posibles para favorecer la iluminación del cultivo y, con ella, incrementen la señal biológica a monitorizar.
- No interfieran en la interacción señal biológica-transductor.

- No presenten una barrera a la difusión del mediador (O₂) entre el soporte del microorganismo y el soporte del transductor.
- Permitan el libre acceso del analito que se desea determinar.

Diversos soportes cumplen con *algunas* de estas condiciones: así, podemos encontrar gelatina (Cultispher 25G, HyClone), celulosa (Cytocell, Pharmacia), polietileno (Cytoline 1 and 2, Pharmacia), colágeno (Microsphere, Cellex Biosciences), vidrio (Siran, Schott), copolímeros acrílicos de acrilamidas o etileno/ácido acrílico, terpolímeros acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS), etilvinilacetato (EVA), nitrocelulosas, poliacrilonitrilo (PAN), polímeros y copolímeros de polipropileno o poliestireno, politetrafluoroetileno (PTFE) u otros polímeros fluorados, poli(alcohol vinílico) (PVA), etc.

En la literatura también podemos encontrar biosensores que de una forma u otra han logrado evitar la utilización de soportes. Entre ellos tenemos el biosensor de Zamaleeva y cols. [29] que funcionaliza las células con partículas magnéticas para retenerlas por medio de un campo electromagnético o el de Guedri y cols. [34], que inmovilizan una monocapa de algas sobre la superficie de un electrodo (transductor) por medio de la técnica de autoensamblado.

Dados los estrictos requisitos que debe satisfacer simultáneamente un soporte polimérico para el óptimo funcionamiento del biosensor y basándonos en la experiencia previa de nuestro grupo en la fabricación de biosensores para la medida de la DBO de las aguas [15,46], el soporte finalmente seleccionado para la inmovilización de las células microalgas fue *silicona porosa hidrofílica* (comercializada para cultivos celulares eucariotas con el nombre de ImmobaSilTM). Las siliconas son un material que se adapta perfectamente a las necesidades de nuestro biosensor puesto que son extremadamente permeables al oxígeno, lo que facilita la actividad del transductor, tienen buenas propiedades ópticas, se mecanizan fácilmente y son químicamente inertes. Además, el transductor de oxígeno utiliza también una película de silicona como soporte, de modo que la compatibilidad entre ambos soportes es perfecta, pudiendo ser unidos químicamente de forma sencilla.

Una propiedad característica de las membranas de silicona porosa (ImmobaSilTM), es su tamaño de poro (ca. 50 x 150 μm), que permite inmovilizar las microalgas por un método físico denominado “barco dentro de la botella”, por las similitudes con esta manualidad. Las células individuales penetran en el interior de la membrana a través de los poros y quedan atrapadas al formarse las colonias, de mayor tamaño (ver Figura 25 y Figura 26).

Las membranas ImmobaSil se han empleado anteriormente (2003) como soporte en el desarrollo de biosensores bacterianos, sin que se haya descrito ningún inconveniente derivado del uso de estas siliconas.^{46,61}

Entre las muchas especies estudiadas por el grupo ALBIOTOX, dos especies (*D. chlorelloides*. y *Scenedesmus sp*) destacaron especialmente por su capacidad de producir tanto cepas sensibles, como cepas altamente resistentes a simazina. Fue el

proceso de inmovilización el que inclinó la balanza del lado de la especie *D. chlorelloides*. Las dos especies colonizan fácilmente en las membranas de silicona porosa, creando lo que denominamos “membranas microalgares”, de un color verde brillante más o menos intenso dependiendo de la carga de biomasa (Figura 25, inferior). El problema surge cuando las membranas microalgares se instalan en la cámara de medida y se someten al flujo de muestra/medio. Mientras que la membranas colonizadas por microalgas de la especie *D. chlorelloides* conservan intacta su población celular, las colonizadas con la especie *Scenedesmus sp.* se lavaban completamente al poco tiempo de ser instaladas en el interior de la cámara de medida. El lavado de las membranas microalgares, en su caso, puede apreciarse visualmente y se comprueba gracias a las medidas de fluorescencia de las microalgas inmovilizadas registradas por la cámara CCD. La pérdida de biomasa en las membranas de *Scenedesmus sp.* se comprobó para caudales comprendidos entre 0,25 y 1,0 mL min⁻¹, compatibles con las condiciones de medida.

La explicación de por qué las membranas microalgares de *Scenedesmus sp.* resultan lavadas y no las de *D. chlorelloides* podría estar en el propio método de inmovilización y en las diferencias morfológicas de estas dos especies. Para realizar la inmovilización se deposita una alícuota del cultivo deseado sobre la membrana ImmobaSil; las células individuales se introducen lentamente en los poros de la membrana de silicona por sedimentación (Figura 25, superior izq.) y crecen formando colonias de gran tamaño que quedan atrapadas en el interior de los poros. Si bien es cierto que ambas especies crecen formando colonias, éstas se diferencian tanto su forma como en el número de células por colonia (Figura 20 y Figura 21).

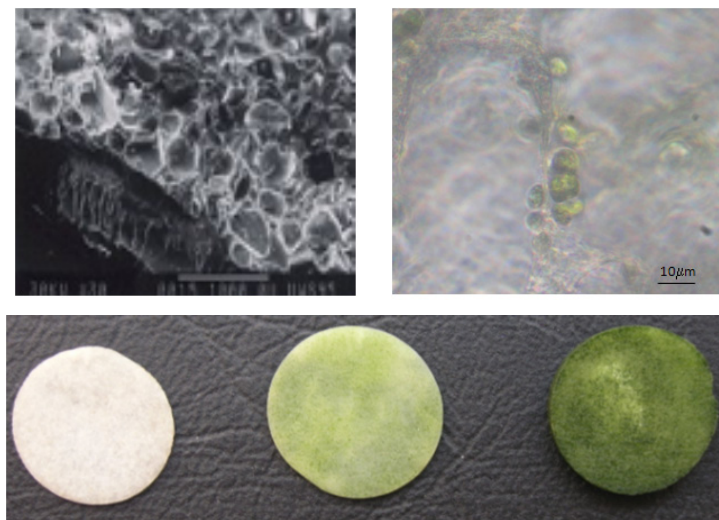


Figura 25. Imagen al microscopio de una membrana de silicona porosa donde el tamaño de poro es de ca. 50 x 150 μm (superior izq.). Colonias microalgares colonizando poros de la membrana ImmobaSil (superior dcha.). Fotografía de tres membranas ImmobaSil después de (0, 5 y 15) días (de izquierda a derecha) de incubación en las condiciones descritas previamente (inferior).

La especie *Scenedesmus* forma generalmente colonias de 2, 4, 8 o 16 células, unidas pared con pared, en formación lineal o en zigzag. Las colonias se forman al romperse la pared celular de la célula madre y son de tamaño pequeño (10 μm).² Esto hace que las colonias sean muy compactas y por lo tanto escapen de los poros de la membrana cuando son arrastradas por el flujo de la muestra (Figura 20).

Las células de *Dictyosphaerium* crecen formando colonias con forma de racimo, embebidas en mucílago (Figura 21). Las ramas que mantienen la estructura crecen radialmente desde el centro de la colonia, en lo que se cree son los restos de la pared celular de la célula madre.² Las células individuales son de tamaño pequeño (3–10 μm), pero las colonias pueden crecer superando su tamaño en varios órdenes de magnitud, quedando las colonias atrapadas en el interior de los poros de la membrana ImmoBaSil (ca. 50 x 150 μm). En la Figura 26 podemos observar los primeros pasos en el desarrollo de una colonia de *D. chlorelloides*.

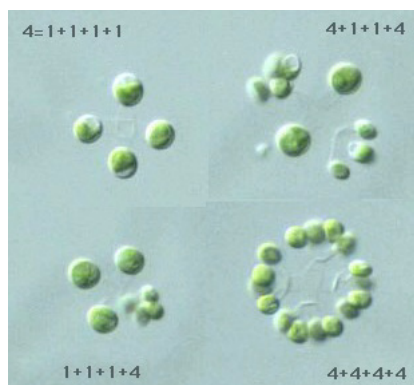


Figura 26. Agrupación de fotos que siguen la evolución de una colonia de *Dictyosphaerium*, cada célula madre da lugar a 4 células hijas que crecen radialmente desde la posición de la célula madre (Fuente: Protist Information Server).

La gran ventaja en el proceso de inmovilización que presenta la especie *D. chlorelloides* frente a *Scenedesmus sp.*, se ve reforzada por los estudios de sensibilidad frente a simazina llevados a cabo por el grupo ALBIOTOX, que indican una mayor sensibilidad a la simazina por parte de las cepas sensibles de *D. chlorelloides*. Estos estudios se llevaron a cabo midiendo la emisión de fluorescencia de cultivos en disolución de ambas especies (cepas sensibles) en presencia de simazina. Dicha fluorescencia se midió por medio de un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada (PAM, siglas en inglés de *pulsed amplitude modulation*).

La especie *Dictyosphaerium* ha sido utilizada también en el trabajo de M. Altamirano et al. [21] en el que se indica la estrategia a seguir para dotar de selectividad a los biosensores microalgares.

El comportamiento de ambas especies se ha descrito también recientemente por E. Peña et al. [22] en el desarrollo de su biosensor microalga, donde también se reporta una mayor sensibilidad e intervalo posible de trabajo para la especie *D. chlorelloides*. Sin embargo, el método de inmovilización utilizado por estos autores fue por medio de

materiales silíceos de tipo sol-geles, mucho menos porosos, no habiendo descrito pérdidas de carga microalgar para la especie *Scenedesmus*.

La Figura 27 muestra el espectro de fluorescencia de una membrana de silicona porosa colonizada por células de la especie *Dictyosphaerium*.

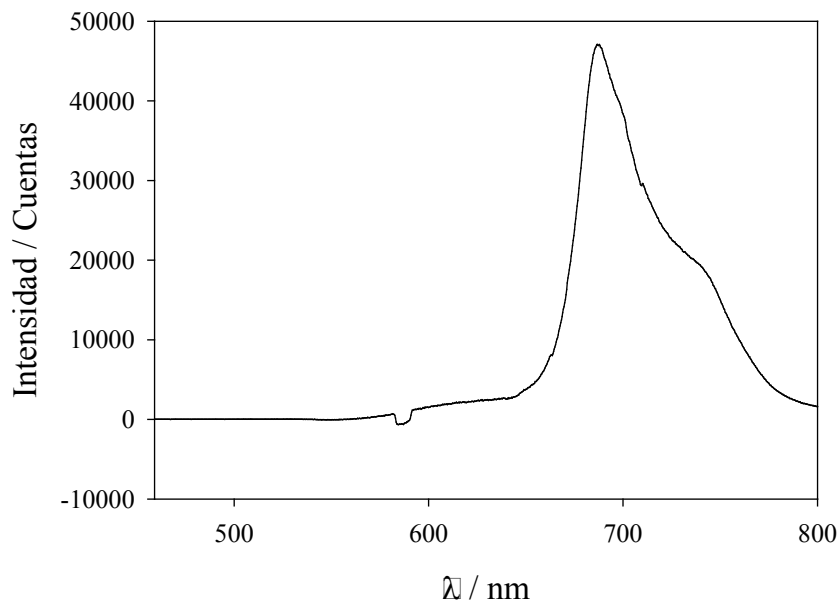


Figura 27. Espectro de emisión de una membrana de silicona porosa ImmobaSil™ colonizada con células de la especie *Dictyosphaerium chlorelloides*. Rendija: 600 μm. Intensidad de excitación: 442 nm.

2. TRANSDUCTOR DE OXÍGENO

La medida de O_2 es uno de los parámetros de mayor importancia en áreas tan diversas como medioambiente, industria o medicina.^{12,62,63} Durante muchos años el método analítico por excelencia en la determinación de oxígeno se ha basado en su reducción electroquímica a través del electrodo de Clark, o de dispositivos mejorados. Estos electrodos son sensibles, estables y reproducibles; además el mercado oferta una gran variedad de formatos para poder aplicarlos en diferentes condiciones. Pero, como cualquier otra técnica analítica, también cuenta con una lista de inconvenientes como consumir el analito (inconveniente en medidas en pequeños volúmenes con bajos caudales de muestra), requerir un frecuente mantenimiento del cabezal sensor, mostrar interferencias en aguas sulfuradas, o las dificultades técnicas que supone su miniaturización. Por todo ello, durante los 2–3 últimos años, los sensores de O_2 basados en luminiscencia han desplazado a los sensores electroquímicos.¹⁵ Estos sensores optoquímicos son fáciles y baratos de miniaturizar, no consumen analito, tienen tiempos rápidos de respuesta, son robustos, requieren escaso mantenimiento y, a diferencia de los sensores electroquímicos, no se ven influidos por los campos eléctricos. Además, el auge y abaratamiento de la tecnología de fibras ópticas ha permitido que este tipo de sensores salgan de los laboratorios y lleguen al mercado. Tanto es así, que hoy en día la mayoría de los fabricantes de dispositivos para la monitorización medioambiental ofrecen, como mínimo, un modelo de sensor óptico para realizar medidas de oxígeno disuelto (OD) en agua.⁶⁴

2.1. PRINCIPIO DE MEDIDA

La luminiscencia es una de las herramientas ópticas más poderosas en el desarrollo de técnicas analíticas, debido a que puede utilizar medidas de color, intensidad o tiempo de vida de emisión, diversificando de esta manera las estrategias de análisis químico. Los sensores basados en luminiscencia utilizan generalmente la información obtenida de los espectros de emisión procedentes de los indicadores luminiscentes, previamente excitados.

Los sensores ópticos de O_2 se basan en la determinación de la desactivación producida por las moléculas de O_2 sobre la emisión de un indicador. Estos sensores monitorizan los parámetros de la luminiscencia (intensidad, tiempo de vida o medidas sensibles a la fase) de complejos metálicos (Ru, Pd, Pt, Ir) de coordinación con porfirinas o ligandos poliazaheteroaromáticos quelantes, siendo los complejos de rutenio(II) los más ampliamente estudiados como moléculas indicadoras de O_2 .⁶⁵ Esto se debe a las ventajas que presentan algunas de sus propiedades fisicoquímicas, como por ejemplo:

- Su absorción (200–550 nm) presenta una intensa banda en la región visible, lo que permite la utilización de fuentes de excitación baratas (sobre todo desde el

desarrollo de los LEDs azules). Lo mismo se podría decir para su banda de emisión en el rojo (600–850 nm) y de los detectores que se pueden utilizar.

- Amplios desplazamientos de Stokes (> 150 nm), que permiten separar la luz de excitación de la luz emitida por medio de filtros de bajo coste (coloreados).
- Tiempos de vida de emisión relativamente altos (0,1–7,0 μ s) en comparación con las moléculas puramente orgánicas, que incrementan la sensibilidad fotoquímica del método y permiten la utilización de sistemas de detección baratos basados en la medida del desfase de la luminiscencia. Más adelante explicaremos con más detalle las ventajas que presentan las medidas de detección sensibles a la fase.
- Una importante estabilidad química y fotoquímica, imprescindible para fabricar sensores que pretenden ser utilizados de una forma continua y durante largos periodos de tiempo.
- Su capacidad para ser inmovilizados en los soportes deseados mediante la síntesis de ligandos orgánicos con la funcionalidad adecuada para tal fin y la combinación de diversos ligandos orgánicos sobre el centro metálico.

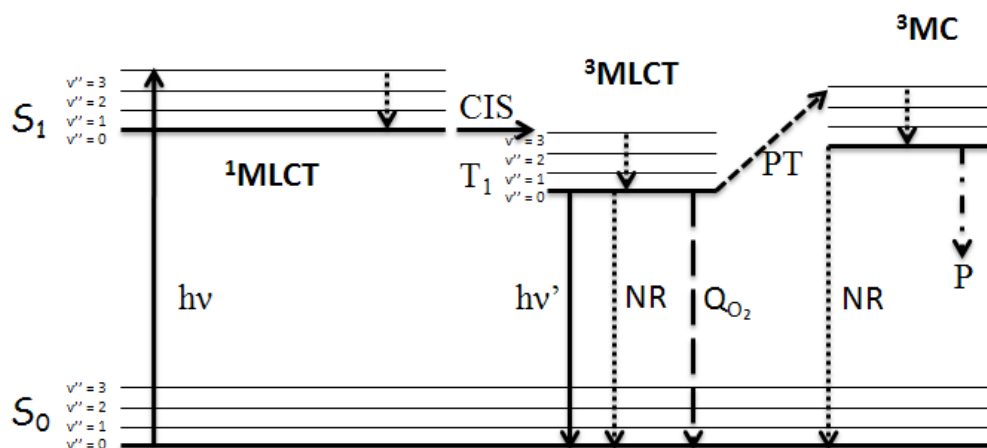


Figura 28. Diagrama de Jablonski para un complejo de Ru(II) típico. Las flechas continuas implican procesos *radiativos* (absorción o emisión de luz); las flechas punteadas, desactivaciones *no radiativas* (NR); la flecha punto-línea, *descomposición* del indicador; la flecha discontinua (Q_{O_2}), la *desactivación bimolecular* debida al O_2 (en ausencia de otros agentes); CIS, *cruce intersistemas*; MLTC, transferencia de carga metal-ligando; RV, *relajación vibracional*; S_0 , estado fundamental singlete; S_1 , estado excitado singlete; T_1 , estado excitado triplete; P, productos de descomposición fotoquímica; PT, *promoción térmica*.

La emisión luminiscente de los complejos de Ru(II) tiene un color característico rojo-anaranjado, producido por la transición electrónica de regreso al estado fundamental de la banda de absorción de menor energía correspondiente a la transferencia de carga del metal al ligando (MLCT, Figura 28),⁶⁶ donde el rendimiento cuántico de luminiscencia (Φ_L) para el tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) (RD3) llega a 0,40 (a temperatura ambiente y en ausencia de oxígeno).⁶⁷ Gracias a la presencia del átomo de Ru(II), el proceso de cruce intersistemas desde el estado

electrónico excitado de mínima energía singlete al correspondiente triplete es extraordinariamente eficiente ($\eta_{ISC} \sim 1$) y, por la misma razón, el tiempo de vida del estado triplete (μs) es inferior al de los típicos tripletes de moléculas puramente orgánicas (ms) aunque considerablemente mayor que el de los singletes (ns). Ello hace que su sensibilidad a la **desactivación bimolecular** (*quenching*) por O_2 sea muy superior al de estos últimos pero inferior al de los típicos tripletes, proporcionando una situación ideal para ser utilizados como indicadores luminiscentes de este analito a las concentraciones típicas del mismo en fase acuosa a presión atmosférica (ca. 8 mg L^{-1}).

Los procesos de desactivación de las moléculas de rutenio(II) en estado excitado triplete ($^3\text{MLTC}$) compiten entre sí, de forma que si aumenta la contribución de un proceso, disminuye la de los otros. La desactivación producida por una interacción bimolecular (desactivación producida por un desactivador o *quencher*) puede detectarse como un descenso en la intensidad de emisión o en el tiempo de vida del indicador excitado. Ambos parámetros pueden relacionarse cuantitativamente con la concentración de desactivador (Q) presente, gracias a la ecuación de Stern-Volmer, fundamental en la descripción de procesos fotoquímicos.⁶⁸

$$\text{---} \qquad \qquad \qquad \text{Ec. 6}$$

$$\text{---} \qquad \qquad \qquad \text{Ec. 7}$$

$$\text{Ec. 8}$$

La Ec. 6 representa la relación entre la concentración de desactivador (O_2) y el tiempo de vida a la concentración de oxígeno dada (τ_{O_2}), τ_0 es el tiempo de vida del estado excitado en ausencia de oxígeno y K_{SV} la denominada “constante de Stern-Volmer”. Si se trata exclusivamente de un proceso de desactivación bimolecular *dinámica* (esto es, desactivado y desactivador no se encuentran pre-asociados antes de la llegada del fotón de excitación), dicha constante es igual al producto de la constante de velocidad del proceso de desactivación bimolecular por el O_2 (k_{O_2}) y τ_0 . Además, en éstas condiciones, la Ec. 7 también puede utilizarse para describir la relación de Stern-Volmer, donde I_0 es la intensidad de luminiscencia del indicador en ausencia de O_2 y I_{O_2} la intensidad de emisión del indicador a la concentración de O_2 dada. En realidad, la Ec. 7 puede escribirse siempre que exista la misma proporcionalidad directa entre el área bajo la curva del espectro de emisión del indicador (*rendimiento cuántico* de emisión) y la altura de su máximo (*intensidad* de emisión) a cualquier concentración de desactivador.

La desactivación del estado excitado $^3\text{MLCT}$ de los complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos quelantes por el O_2 tiene lugar, principalmente, a través de un mecanismo de transferencia de energía por intercambio electrónico (“tipo Dexter”) con formación de oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$). La contribución de éste es tanto más importante cuanto menor sea la constante dieléctrica del medio ya que, en

medio acuoso, por ejemplo, aumenta la participación del mecanismo competitivo de transferencia electrónica con formación de anión superóxido (O_2^-) y la forma oxidada del complejo de Ru(II).^{52,69} No obstante, la contribución de este último mecanismo disminuye, incluso en agua, en el caso de complejos de Ru(II) fuertemente oxidantes en su estado excitado, como por ejemplo aquellos formados por tres ligandos orgánicos que contienen, cada uno, 1 o 2 anillos de pirazina como entidades quelantes.

Un sensor de O_2 ideal debe ser sensible, selectivo, robusto, fácil de calibrar y estable durante largos periodos de tiempo. Estas propiedades no dependen únicamente del indicador seleccionado ya que el proceso de *inmovilización* en un soporte polimérico orgánico o inorgánico, que las moléculas indicadoras deben sufrir para poder ser utilizadas como parte del sensor, puede alterar algunas de estas propiedades.⁷⁰ Una de las consecuencias más características del proceso de inmovilización de las moléculas indicadoras es la pérdida de linealidad en la relación de Stern-Volmer (Figura 29).

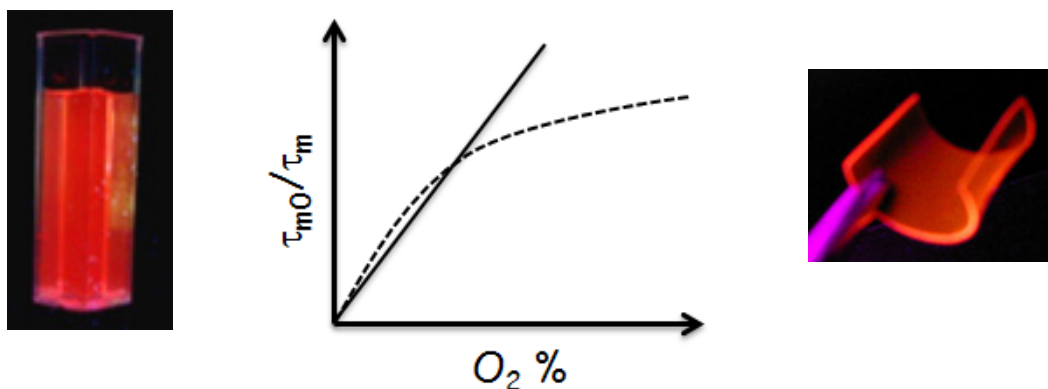


Figura 29. Fotografía de una disolución de RD3 en agua iluminada bajo luz UV (izq.). Fotografía de una membrana de silicona teñida con RD3 iluminada bajo luz UV (dcha.). La figura central es una representación de Stern-Volmer que muestra diferentes comportamientos: en línea continua se muestra la relación entre la concentración de oxígeno y el cociente de tiempos de vida de emisión del indicador (τ_0/τ , en ausencia y presencia de O_2) para una disolución de RD3; la línea discontinua representa el comportamiento típico para la desactivación por el O_2 de los complejos inmovilizados (ver más abajo), donde la presencia de microentornos rompe la linealidad de la relación de Stern-Volmer.

En disolución todas las moléculas indicadoras tienen el mismo microentorno y todas presentan la misma accesibilidad a las moléculas de O_2 . Por ello, tienen los mismos tiempos de vida, lo que da lugar a una relación de Stern-Volmer lineal (la disolución entera se comporta como una sola molécula indicadora de dicho gas). Por el contrario, el proceso de inmovilización produce *heterogeneidad* en el sistema, generando diferentes microentornos alrededor de las moléculas indicadoras, que puede tener como resultado una diferente accesibilidad de las moléculas de oxígeno a las mismas (diferentes valores de k_{O_2}). Además, el proceso de inmovilización genera microentornos con diferente polaridad, lo que también afecta a los tiempos de vida de emisión, incluso en ausencia de O_2 (diferentes valores de τ_0).⁷¹ Otro factor que puede generar heterogeneidad en el sistema es una baja solubilidad del indicador en el soporte, lo que

provocaría la precipitación o segregación de las moléculas indicadoras en forma de micro/nanocristales en los que se produce auto-desactivación del estado excitado, afectando a los tiempos de vida de emisión, incluso en ausencia del analito.⁷²

Uno de los materiales más utilizados como *soporte polimérico* de las moléculas indicadoras de Ru(II) en la fabricación de sensores de O₂ han sido las películas delgadas de **silicona**, debido a su alta permeabilidad (solubilidad × difusión) al O₂.⁷³ Las siliconas comerciales suelen llevar incorporadas partículas inorgánicas de “relleno” (en inglés, *fillers*) que tienen como función dar rigidez y consistencia a la película de polímero una vez curada. Un efecto adicional de estas partículas inorgánicas, que tienen una gran influencia en el desarrollo de sensores de O₂, es el aumento de la solubilidad de los complejos de Ru(II) catiónicos y de las moléculas de O₂, así como una cierta disminución del coeficiente de difusión de este último.⁷⁴ Otro factor adicional que introducen las partículas de relleno y que influye en el desarrollo de este tipo de sensores, es que aumentan aún más el grado de heterogeneidad del sistema. Entre las partículas de relleno habituales podemos encontrar vidrio en polvo, sílice, caolinita, moscovita, etc.

2.2. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE TRANSDUCTORES ÓPTICOS DE OXÍGENO

A pesar de que dicha variedad de microentornos ha sido considerada teóricamente como la causante de la pérdida de linealidad en la relación de Stern-Volmer, nunca hasta ahora se había podido demostrar visualmente. Con la ayuda del microscopio confocal de imagen por tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) hemos podido visualizar, por primera vez, la presencia de dichos microentornos con diferentes tiempos de vida y su influencia en la monitorización de O₂ con sensores luminiscentes. Se realizó, para ello, un estudio centrado en aquellos factores que afectan a la heterogeneidad del soporte, factores como la naturaleza de la silicona o el tipo, tamaño y concentración de las partículas usadas para rellenar las siliconas. Por medio del FLIM podemos estudiar factores microscópicos que afectan al comportamiento macroscópico de las películas indicadoras de O₂ tales como:

- El efecto de la concentración de sílice
- El efecto del tamaño de las partículas de sílice
- El efecto de la naturaleza de las partículas de relleno.

2.2.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SÍLICE

La Tabla 4 registra los valores de absorción y emisión de diferentes películas de silicona teñidas con RD3. Las películas de la Tabla 4 se diferencian en el tipo de silicona (DC 3140 y DC 732) y en la concentración de sílice pirogénica empleada (como partícula de relleno).

Tabla 4. Datos de absorción y emisión de diferentes películas de silicona teñidas con RD3 bajo atmósfera de aire. Las adiciones de sílice pirogénica se expresan en % de peso.

Silicona	% peso total de sílice añadida	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ [nm] ^a	A_{\max}^{b}	[Ru] [mM] ^c	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ [nm] ^a	$I_{L\max}$ [au] ^b
DC 3140	0	454	0,016	0,022	608	275 ^d
	5	450	0,063	0,085	610	425 ^d
	10	448	0,44	0,60	611	862 ^d
DC 732	0	446	0,46	0,62	611	240 ^e
	5	448	1,24	1,7	619	518 ^e
	10	449	2,91	3,9	636	443 ^e

^a Incertidumbre: ± 1 nm. ^b Incertidumbre 5%. ^c Concentración aproximada de RD3 usando $\epsilon_{\max} = 29500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. ^d Rendijas excitación/emisión: 10/7. ^e Rendijas excitación/emisión: 10/5.

En ausencia de sílice añadida, la película de DC 732 presenta valores de absorbancia considerablemente mayores que la de DC 3140 (Tabla 4), lo que corresponde a una mayor concentración del complejo RD3 para la película de DC 732. Esto se debe a que la silicona comercial de DC 3140 contiene, por defecto, hasta un 30% de sílice trimetilada (**apolar**), mientras que la silicona comercial DC 732 contiene, por defecto, entre un 7% y un 13% de sílice amorfa (**polar**). La mayor polaridad de la silicona comercial de DC 732 explica el por qué de la mayor solubilidad del RD3.

Al aumentar la carga de sílice polar añadida aumenta el carácter polar de la película para ambos tipos de silicona y, como consecuencia, crece la concentración de RD3 relativa en cada una de las películas (Tabla 4). En el caso de la película DC 732 cargada con un 10% de sílice añadida (aprox. 20% sílice total), este crecimiento en la luminiscencia se rompe, mostrando un ligero descenso. Esto puede ser debido a la presencia de procesos de auto-absorción por el solapamiento de la banda de absorción y emisión del indicador como consecuencia de las altas concentraciones de RD3.⁷⁵ Además, en esta película sensora (DC 732, 10% sílice añadida) se produce un desplazamiento en la banda de emisión de unos 15 nm.

Utilizamos el microscopio FLIM para investigar el efecto de las distintas concentraciones de sílice en el tiempo de vida de emisión de las películas preparadas, tanto en ausencia (Tabla 5), como en presencia de O₂ (Tabla 6). En ambos experimentos se midieron tiempos de vida de emisión en tres zonas distintas de cada muestra (película de silicona teñida).

Tabla 5. Componentes y valores medios de los tiempos de vida de emisión de las películas de silicona teñidas con RD3, bajo atmósfera de N₂. La sílice pirogénica incorporada se mide en % de peso.

Silicona	% peso total sílice añadida	τ_1 [μ s] (%)	τ_2 [μ s] (%)	τ_3 [μ s] (%)	τ_m [μ s] ^b
DC 3140	0	0,37 (25)	2,77 (34)	7,40 (41)	4,04
	5	0,42 (13)	3,40 (36)	7,62 (51)	5,19
	10	0,39 (10)	3,72 (43)	7,85 (47)	5,30
DC 732	0	0,51 (11)	3,16 (35)	7,47 (54)	5,17
	5	0,54 (6)	3,82 (53)	7,87 (41)	5,26
	10	0,51 (12)	2,98 (47)	6,21 (41)	4,02

^a Incertidumbre máxima: 15% (τ_1), 5% (τ_2), 3% (τ_3) y 2% (τ_m); $\chi^2 < 1,1$ en cada ajuste. ^b

En la Tabla 5 se observan los diferentes tiempos de vida de las películas preparadas, en ausencia de O₂. Las componentes se obtienen tras un ajuste multiexponencial y el tiempo de vida promedio se calcula a partir de las mismas. Siempre se recogieron decaimientos multiexponenciales, lo que indicaría la presencia de diferentes microentornos en las películas de silicona. Aunque las cinéticas de extinción se ajustan a una función tri-exponencial, en realidad tenemos con seguridad más de tres microentornos. La componente más corta (τ_1) correspondería a aglomeraciones (microcristales) de moléculas de RD3 donde se producen fenómenos de auto-desactivación (*self-quenching*). Las otras dos componentes corresponderían a complejos de RD3 en zonas hidrófobas, ricas en silicona (τ_2), y en zonas más hidrófilas, ricas en sílice (τ_3).

Casi todas las muestras presentan τ_m similares; sólo hay dos muestras que se salen de la tendencia:

- En el caso de la película DC 3140 (0% sílice pirogénica), el fuerte carácter hidrófobo de esta película podría ser la causa, pues se sabe que cuanto menos polar es el medio en el que se encuentra la molécula de RD3, menor es su tiempo de vida.⁷⁶
- En el caso de la película DC 732 (10% sílice pirogénica) la respuesta estaría en la alta concentración de RD3, ya mencionada, y la auto-desactivación mediante procesos de aniquilación triplete-triplete (*triplet-triplet annihilation*) entre moléculas próximas en estado excitado, con la consecuente reducción de su tiempo de vida.⁷⁷

En la Tabla 6 se observan los diferentes tiempos de vida de las películas preparadas en presencia de O₂.

Tabla 6. Componentes y valores medios de los tiempos de vida de emisión de las películas de silicona, teñidas con RD3, bajo atmósfera de aire ($P_{\text{atm}} = 911$ Torr). Las adiciones de sílice pirogénica se miden en % de peso.

Silicona	% peso total de sílice añadida	τ_1 [μs] (%)	τ_2 [μs] (%)	τ_3 [μs](%)	τ_m [μs] ^b
DC 3140	0	0,20 (29)	1,09 (47)	3,30 (24)	1,36
	5	0,25 (29)	0,88 (58)	2,93 (13)	0,96
	10	0,28 (29)	0,84 (59)	2,58 (12)	0,88
DC 732	0	0,37 (37)	0,95 (54)	2,68 (9)	0,88
	5	0,33 (39)	0,73 (52)	1,96 (9)	0,68
	10	0,34 (29)	0,92 (58)	2,39 (14)	0,95
KF 62833	0	0,33 (29)	1,07 (52)	3,42 (19)	1,30
	5	0,30 (38)	0,93 (51)	2,86 (11)	0,90
	10	0,35 (41)	0,86 (51)	2,53 (8)	0,77

^a Incertidumbre máxima: 15% (τ_1), 10% (τ_2), 5% (τ_3) y 5% (τ_m). ^b

Como regla general, cuanto mayor es el contenido de sílice, mayor es la concentración de O_2 disuelto en la película de silicona y, por tanto, menor es el tiempo de vida de emisión de los complejos de RD3. Dicho comportamiento se observa para las películas de DC 3140 y de KF 62833, independientemente de la carga de sílice pirogénica (Tabla 6). Esto mismo ocurre para las películas DC 732 de menor concentración de sílice añadida (0% y 5%) pero no para la película que contiene un 10% de sílice añadida, donde se observa un ligero aumento en el tiempo de vida de emisión con respecto a la anterior (5%). La explicación estaría en los procesos de auto-absorción, ya comentados en el análisis de los espectros de absorción y emisión de la Tabla 4, siendo un fenómeno bien conocido.⁷⁵

2.2.2. EFECTO DEL TAMAÑO DE LA PARTÍCULA DE SÍLICE

En la Tabla 7 se observan los diferentes tiempos de vida de luminiscencia de películas de silicona DC 3140 cargadas con diferentes tipos de sílice (como partícula de relleno) en presencia y ausencia de O_2 . Factores como la relación superficie/volumen, tamaño de poro, tamaño de partícula, etc., pueden influir las características de los microentornos y, por tanto, el tiempo de vida del estado excitado de las moléculas indicadoras.

No se observan diferencias significativas entre la sílice tipo “cromatografía rápida” (*flash*, 50 μm) y la de tipo Partisil (5 μm), por tener tamaños similares; sin embargo, la sílice nanométrica (pirogénica) confiere mayores tiempos de vida, tanto en ausencia como en presencia de oxígeno, lo que indica diferencias intrínsecas del material.

Tabla 7. Componentes y valores medios de los tiempos de vida de emisión de las películas de DC 3140, teñidas con RD3 y cargadas con diferentes tipos de sílice, tanto bajo atmósfera de N₂ como bajo atmósfera de aire ($P_{\text{atm}} = 911$ Torr). La concentración de sílice añadida se mantiene constante (10% en peso).

Tipo de sílice	%O ₂	τ_1 [μs] (%)	τ_2 [μs] (%)	τ_3 [μs] (%)	τ_m [μs] ^b
Flash	21	0,20 (27)	0,70 (61)	2,05 (12)	0,72
Partisil	21	0,27 (30)	0,75 (61)	2,33 (20)	0,75
Pirogénica	21	0,28 (29)	0,84 (59)	2,58 (12)	0,88
Flash	0	0,33 (22)	2,98 (37)	7,57 (42)	4,31
Partisil	0	0,18 (23)	2,39 (25)	7,08 (52)	4,33
Pirogénica	0	0,39 (10)	3,72 (43)	7,58 (47)	5,30

^a Incertidumbre máxima: 15% (τ_1), 10% (τ_2), 5% (τ_3) y 5% (τ_m).^b

2.2.3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE TIEMPO DE VIDA DE EMISIÓN

Fabricamos una película de silicona teñida con el complejo RD3 sin carga de sílice para dificultar la solubilidad de las moléculas de RD3 y facilitar así la formación de cristales de tamaño microscópico (Figura 30a); para ello utilizamos una silicona comercial carente de sílice (DC 1-2577). Con la ayuda del microscopio confocal seleccionamos un área de la película que presentara zonas de gran heterogeneidad y, por medio del dispositivo FLIM, medimos tanto la intensidad como el tiempo de vida de emisión del área seleccionada haciendo un barrido con el láser de excitación de 11 x 8 pixeles (Figura 30b,c).

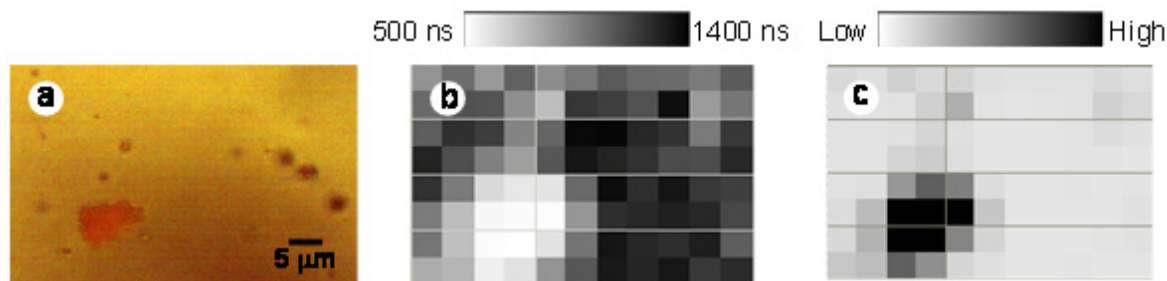


Figura 30. (a) Imagen de luminiscencia en el microscopio confocal, de la muestra de silicona teñida; (b) imagen FLIM de la misma muestra; (c) imagen de la intensidad de emisión de la misma muestra, extraída de la imagen FLIM, bajo atmósfera de N₂.

La imagen de microscopía óptica (Figura 30a) muestra la presencia de varios cristales de RD3, que se forman debido a la baja solubilidad del complejo de rutenio(II) en la película de silicona con un contenido nulo de sílice. En la Figura 30(c) se observa cómo la intensidad de emisión de los cristales es mayor que la de las moléculas de RD3 disueltas, debido a que estos primeros están formados por una alta concentración de moléculas luminiscentes. No obstante, la imagen de la Figura 30(b) demuestra cómo el tiempo de vida medio de estos cristales es menor que el de las moléculas disueltas, debido a los procesos de auto-desactivación (*self-quenching*) o de aniquilación triplete-triplete (*triplet-triplet annihilation*) mencionados más arriba.

Los resultados de este trabajo han sido publicados en la revista *Langmuir* de la American Chemical Society [53].

3. DESARROLLO DEL BIOSENSOR MICROALGAR

3.1. FABRICACIÓN DEL TRANSDUCTOR DE OXÍGENO

La información obtenida del estudio de optimización del apartado anterior fue crucial para la fabricación del transductor de oxígeno utilizado para monitorizar la actividad fotosintética (producción de O₂) de las membranas microalgares.

Como indicador de oxígeno se utilizó el mismo complejo de Ru(II), RD3, cuya sensibilidad al oxígeno disuelto es óptima en la región de interés. Se seleccionaron las partículas de sílice pirogénica como partículas de relleno de la película de silicona, puesto que sirven para producir películas luminiscentes indicadoras con una mayor excursión de tiempos de vida de emisión ($\Delta\tau_m$) al pasar del 0% al 21% de O₂ en N₂ (Tabla 7).

La información recogida en la Tabla 5 y en la Tabla 6 permite comparar los valores de excursión de tiempo de vida de emisión ($\Delta\tau_{m(0-21\%)}$) entre las películas indicadoras fabricadas con diferentes siliconas (DC 3140, DC 732 y KF 62833) y con diferentes concentraciones de sílice pirogénica añadida (0%, 5% y 10%). Como se observa en dichas tablas, la película DC 3140 (10% sílice pirogénica añadida) y la de DC 732 (5% sílice pirogénica añadida) presentan los mayores valores de excursión de la señal (4,42 μ s y 4,58 μ s, respectivamente). Finalmente, se seleccionó la indicadora fabricada con DC 3140 (más 10% de sílice añadida) como transductor del biosensor microalgar debido a sus superiores propiedades mecánicas, propiedades que facilitan la fabricación y extienden la durabilidad de los terminales sensibles.

Dado el carácter óptico del transductor empleado, se hizo imprescindible evitar las interferencias producidas por la fuerte emisión de fluorescencia proveniente de la clorofila de las células microalgares. Esto se logra aplicando adicionalmente una fina capa de silicona gris (DC 3145G) sobre la cara de la película indicadora de O₂ que está en contacto directo con la membrana microalgar. Como se detalla más adelante, esta capa opaca impide eficazmente la excitación de la clorofila microalgar.

3.2. PRINCIPIO ÓPTICO DE MEDIDA DEL BIOSENSOR MICROALGAR

El principio óptico de medida utilizado para interrogar la película indicadora de O₂ (transductor) se basa en determinaciones del tiempo de vida de luminiscencia de la misma; de esta forma se evita toda incertidumbre o deriva de la señal analítica asociada a las medidas de intensidad de emisión absoluta, provenientes del envejecimiento de la fuente de emisión y del detector, el lavado del indicador contenido en las membranas y la fotodegradación del indicador (esta última, siempre que el proceso de fotodescomposición no genere productos que emitan en la región del indicador).

El tiempo de vida de emisión de un indicador es una propiedad intrínseca e independiente del estado de la fuente de emisión o del detector, pero requiere una instrumentación más compleja (y cara) que la utilizada en las medidas de intensidad de luminiscencia. Éstas pueden realizarse mediante la detección en tiempo real de la señal de emisión (i.e. en el *dominio del tiempo*) o mediante la técnica de detección sensible a la fase de la señal de emisión (i.e. en el *dominio de frecuencias*).⁷⁸ La complejidad de los dispositivos que miden el tiempo de vida de emisión es mayor para aquellas moléculas que presentan tiempos de vida muy cortos (ns), especialmente si se desea llevar a cabo medidas en el dominio de tiempo. Los largos tiempos de vida de emisión de las películas indicadoras seleccionadas (5,3 μs y 0,88 μs para el 0% y 21% de O₂, respectivamente) nos permite realizar medidas de **detección sensible a la fase** con componentes electrónicos de coste asequible, mediante un método de medida que utiliza una tecnología más sencilla, barata y compacta que la necesaria para las medidas de tiempo de vida en equipos de laboratorio descritas en el apartado anterior (SPT).

La unidad optoelectrónica Optosen[®] (Ultrasen Sistemas, Madrid), responsable de realizar las medidas de detección sensible a la fase, contiene una fuente de excitación azul LED (470 nm) para iluminar las moléculas indicadoras. Esta fuente de excitación se modula sinusoidalmente a frecuencias adecuadas para el intervalo de tiempos de vida del indicador (kHz), por lo que las moléculas indicadoras emiten, a su vez, ondas de luz roja moduladas con la misma frecuencia que las de excitación, pero desfasadas respecto a éstas debido al tiempo de vida finito del estado excitado emisor (Figura 31).

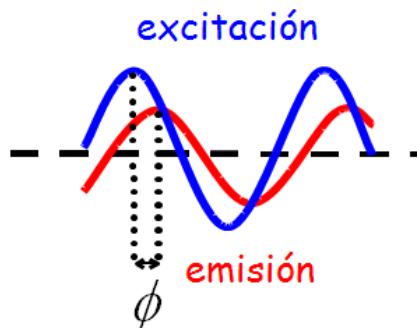


Figura 31. Representación esquemática del desfase de la emisión de un compuesto fotoluminiscente al ser excitado por una radiación excitada sinusoidalmente.

Las moléculas de O₂ desactivan eficazmente de forma dinámica el estado excitado de los complejos de rutenio(II) principalmente mediante un mecanismo de transferencia de energía por intercambio electrónico,⁵² disminuyendo el tiempo de vida del estado excitado del complejo y, por lo tanto, disminuyendo también el desfase entre las ondas de excitación y la de emisión (Figura 31). La Ec. 9 proporciona la relación entre el desfase (ϕ) y el tiempo de vida de emisión de fluorescencia (τ):⁷⁸

$$\tan\phi = 2\pi f\tau \quad \text{Ec. 9}$$

siendo f la frecuencia de modulación de la radiación de excitación (39 kHz, en nuestro caso). Por medio de la Ec. 6 (página 62) y de la Ec. 9, podemos relacionar la señal

analítica (desfase de la señal, ϕ) con la concentración de O_2 en el medio y realizar un calibrado como el que se muestra en la Figura 32.

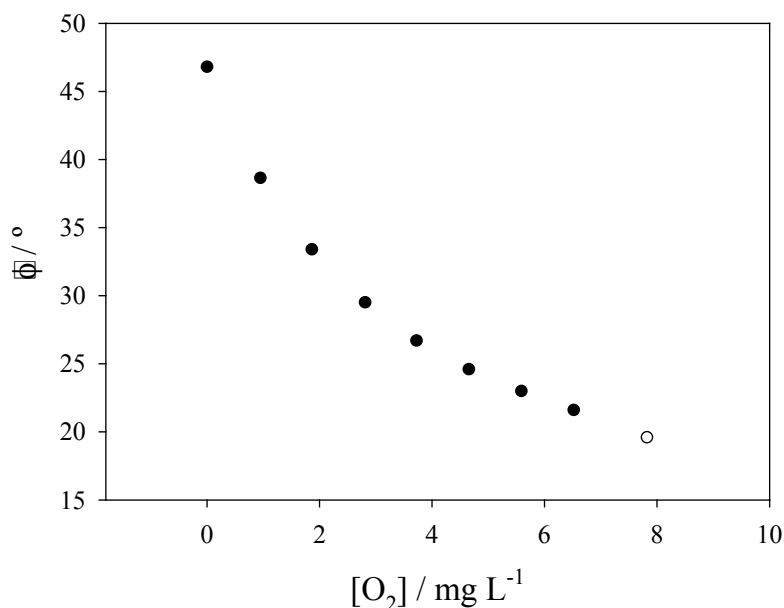


Figura 32. Curva dosis-respuesta típica para una película indicadora de DC 3140 (10% de sílice pirogénica). El calibrado se realizó en un baño termostático a $(25,0 \pm 0,1)$ °C y variando la concentración de O_2 disueltos en agua mediante un controlador de flujo másico.

3.3. ANALITO SELECCIONADO

El biosensor desarrollado en este trabajo de Tesis fue concebido como un banco de pruebas para la detección selectiva de contaminantes capaces de afectar a la actividad fotosintética de una población de algas inmovilizada.

El contaminante seleccionado para demostrar la funcionalidad y optimizar el diseño del biosensor microalga fue un herbicida de la familia de las triazinas comercializado bajo el nombre de simazina. La simazina es un ingrediente activo de herbicidas comerciales como Princep Caliber 90[®] (90%), Princep Liquid[®] (42%) o alguicidas como Aquazine[®] (83%).

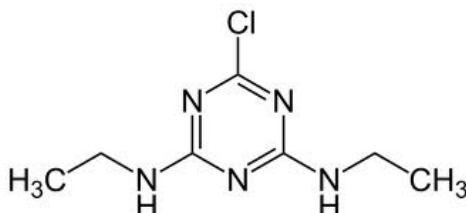


Figura 33 . Representación de la molécula de simazina (6-cloro, *N,N'*-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina).

La simazina, al igual que el resto de herbicidas de la familia de las triazinas (atrazina, cianazina, etc.) o los basados en ureas (isoproturón, diurón, etc.), actúa desplazando a la plastoquinona (PQ) de su sitio de unión a la proteína D1, componente del FS-II.39 Ha sido ampliamente utilizada para controlar las malas hierbas en cultivos de frutas, cereales, cítricos, flores decorativas y árboles de Navidad. Puede ser aplicada como un herbicida no-selectivo (5–20 kg por hectárea) o selectivo (1–4 kg por hectárea).⁷⁹ Estos compuestos perduran durante 2–7 meses en la tierra después de su aplicación, pero las sequías pueden hacer que este tiempo aumente en un factor de 2 o más lo que aumenta el riesgo de extenderse a fuentes de agua potable por escorrentía, filtrado o evaporación.⁸⁰

Los estudios realizados sobre la toxicidad de este compuesto han tenido diferente repercusiones según las agencias gubernamentales; están actualmente prohibidos (aunque se siguen utilizando ilegalmente) en los países de la UE (directiva EU 91/414/EEC), debido a sus potenciales efectos como agentes disruptores del sistema endocrino, pero en otros países como EEUU o Japón lo consideran no dañino para los seres humanos a niveles inferiores a 4 µg L⁻¹ en agua potable.⁸¹

La detección de estos pesticidas se realiza normalmente por medio de cromatografía de gases ligada a espectrometría de masas (CG-EM) o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).^{82,83} También es común realizar bioensayos de toxicidad: los realizados con peces han sido sustituidos por los ensayos de algas debido a que estos últimos son más rápidos, baratos y sensibles (Tabla 8).

Tabla 8. Sensibilidad a la simazina de distintas especies de algas y peces.

Especie (alga)	Ensayo	Concentración	Ref.
<i>Chlorococcum</i>	50% disminución del crecimiento	2,5 µg L ⁻¹	84
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	50% disminución del crecimiento	4,0 µg L ⁻¹	84
Especie (pez)	Ensayo	Concentración	Ref.
<i>Pez sol</i>	LC ₅₀ , 48 h	130 mg L ⁻¹	85
<i>Trucha arcoíris</i>	LC ₅₀ , 96 h	2,8 mg L ⁻¹	86

El biosensor microalgar desarrollado pretende ser una herramienta analítica que permita realizar un control in situ, frecuente y económico, para detectar la presencia de simazina, por ejemplo, en aguas fluviales, de un embalse, de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), efluentes industriales y similares. En el caso de que la muestra sospechosa de contener el agente tóxico sea sólida (por ejemplo, alimentos o muestras de suelo), es necesario efectuar una extracción de moléculas solubles en solventes acuosos, de forma que dicho extracto se pueda aplicar al biosensor. Este biosensor podría ser aplicado incluso en las plantas de producción de simazina para monitorizar el rendimiento y pureza de la síntesis.

La selectividad del biosensor hacia la simazina viene conferida por los procesos de selección de las cepas microalgares explicados en la sección experimental, pero prácticamente no existe limitación en lo que se refiere a los analitos que pueden ser

usados para la selección de cepas de microalgas resistentes y sensibles y que, por tanto, pueden ser detectados con el biosensor microalgar en tanto que dichos compuestos tengan un efecto tóxico frente a la microalga y que produzcan una inhibición de la fotosíntesis. Ejemplos ilustrativos de estos tipos de compuestos incluyen herbicidas (por ejemplo simazina, DCMU, glifosato), fungicidas (por ejemplo 2-fenilfenol, azaconazol, azoxistrobina, carboxina, cimoxanila, ciproconazol, dodina, epoxiconazol, etridiazol, fenfuram, ferimzona, flusilazole, flutriafol, fuberidazole, furalaxil, furametpyr, imazalil, metalaxil, metasulfocarb, metominostrobin, miclobutanilo, ofurace, oxadixilo, oxicarboxina, acetato de fenilmercurio, propiconazol, prothioconazol, pirimetanilo, piroquilon, tetraconazol, tiabendazol, triciclazol), insecticidas (abamectina, acetamiprida, aldicarb, azadirachtina, azamethiphos, bendiocarb, carbarilo, carbofurano, clotianidina, criolita, dazomet, dimetilvinfos, DNOC, benzoato de emamectina, etiofencarb, dibromuro de etileno, fenamiphos, fenobucarb, fipronil, flonicamida, imidacloprida, isoprocarb, lufenuron, metidation, isotiocianato de metilo, metlocarb, pirimicarb, propoxur, pimetozina, piridafention, clorantraniliprol (Renaxapyr™), sabadilla, spinosad, sulcofuron-sodio, tiacloprid, tiametoxam, tiofanox, triazamato, XMC y xylylcarb), raticidas (cloralosa, clorofacmona, coumatetralil y estriknina), toxinas (por ejemplo microcistina LH), antibióticos (por ejemplo fluoroquinolonas), metales pesados (por ejemplo cobre,⁸⁷ cromo o plomo) y similares.

3.4. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Como se indicó en la Introducción a este trabajo, la selectividad es el principal inconveniente que afecta a los biosensores *celulares*; por este motivo, tales dispositivos se utilizan normalmente para determinar la calidad global de una muestra de agua, sin atender a la composición concreta de los elementos que alteran esa calidad. De esta forma, los biosensores celulares pueden actuar como herramientas auxiliares complementarias de métodos analíticos más poderosos.

El biosensor desarrollado tiene como objetivo fundamental probar el principio de medida que permite identificar **selectivamente** la presencia de un contaminante, o una familia de contaminantes similares, en agua. El principio de medida de este biosensor reúne un conjunto de características novedosas que permitió solicitar una patente española (P2007011905) y sus posteriores extensiones con la patente europea (EP2177905) y mundial (WO2009013370).

El biosensor desarrollado monitoriza, simultáneamente, la actividad fotosintética (producción de O₂) de dos membranas microalgares colonizadas por sendas cepas diferentes de la misma especie microalgar (*Dictyosphaerium chlorelloides*). Una membrana está colonizada por células de la *cepa sensible a simazina* (CSS) y la otra por células de la *cepa resistente a simazina* (CRS); la combinación de ambas señales proporciona la especificidad del biosensor, según ilustra la Tabla 9. La actividad fotosintética de las membranas microalgares es inducida por el dispositivo LED del biosensor que proporciona la necesaria luz actínica. El estatus de dicha actividad se

monitoriza mediante el transductor opto-químico del nivel de O₂ en las proximidades de las membranas microalgares.

A menudo nos referiremos a cada uno de los canales como *canal CSS* y *canal CRS*, en función de la membrana microalgar que monitorizan (sensible y resistente, respectivamente).

Tabla 9. Protocolo y principio de medida del biosensor microalgar.

Muestra que llega al terminal sensible de cabeza dual	Contaminante	Cepa microalgar	
		CSS	CRS
1. BG-11	Ninguno	[O ₂] _{CSS}	[O ₂] _{CRS}
2. Agua	(a) Ninguno	≈ [O ₂] _{CSS}	≈ [O ₂] _{CRS}
	(b) Simazina	↓ [O ₂] _{CSS}	≈ [O ₂] _{CRS}
	(c) Otro/s	↓ [O ₂] _{CSS}	↓ [O ₂] _{CRS}
3. BG-11	Ninguno	Recuperación de la señal inicial	

El protocolo de medida comienza con la obtención de una **línea base** para ambos canales (Tabla 9, 1.). Esto se logra midiendo el O₂-fotogenerado por ambas membranas microalgares en contacto con medio de cultivo (BG-11) circulante libre de contaminantes.

Una vez estabilizada la respuesta de ambos canales, se introduce el caudal de la muestra problema que atraviesa sucesivamente los dos cabezales durante un tiempo previamente determinado, y se compara la respuesta de ambos canales ópticos, pudiendo darse tres situaciones diferentes (Tabla 9, 2; a, b, c):

a. La muestra está libre de contaminantes o, de haber algún contaminante, éste no presenta una concentración susceptible de afectar a ninguna de las poblaciones microalgares (CSS o CRS). En este caso, la señal de ambos canales (resultante de la concentración de O₂-fotogenerado cada una de las membranas microalgares) permanecería constante con respecto a la de la línea base (≈ [O₂]_{CSS}, ≈ [O₂]_{CRS}).

b. La muestra contiene simazina, agente inhibidor del transporte de electrones en el FS-II y, por tanto, de la actividad fotosintética. La producción de O₂ en la membrana CSS se vería disminuida (suprimida para concentraciones elevadas del herbicida). El grado de inhibición dependerá de la concentración de simazina en la muestra y del tiempo de exposición a ésta (↓[O₂]_{CSS}). Por el contrario, la producción de O₂ en la membrana CRS permanecería inalterada (o alterada en mucho menor grado), debido a la naturaleza resistente a simazina de la cepa seleccionada (≈ [O₂]_{CRS}).

c. Finalmente, la muestra puede contener otro/s contaminante/s que resulten tóxicos para el metabolismo de ambas especies, lo que afectaría tanto a la señal del canal CSS como a la del CRS; en este caso, la actividad fotosintética de ambas membranas se vería inhibida (↓[O₂]_{CSS}, ↓[O₂]_{CRS}).

Una vez analizada una muestra contaminada, la viabilidad de las microalgas se puede recuperar por medio de un caudal de medio de cultivo (BG-11) libre de contaminantes (Tabla 9, 3.); de esta manera el biosensor queda preparado para la siguiente muestra.

El efecto causado por la concentración de un agente tóxico en la muestra problema se mide como el % de inhibición de la actividad fotosintética con respecto a la actividad fotosintética de la denominada línea base (Tabla 9, 1.), quedando representado por la ecuación siguiente (Ec. 10):

$$\text{Ec. 10}$$

donde $[O_2]_{BG-11}$ es el valor medio del O_2 -fotogenerado por la membrana microalgar (CSS o CRS) en un medio libre de contaminante y bajo las condiciones de medida seleccionadas, y $[O_2]_i$ es el O_2 -fotogenerado por la membrana microalgar (CSS o CRS) tras un tiempo de incubación en presencia de una muestra problema y bajo las mismas condiciones de medida.

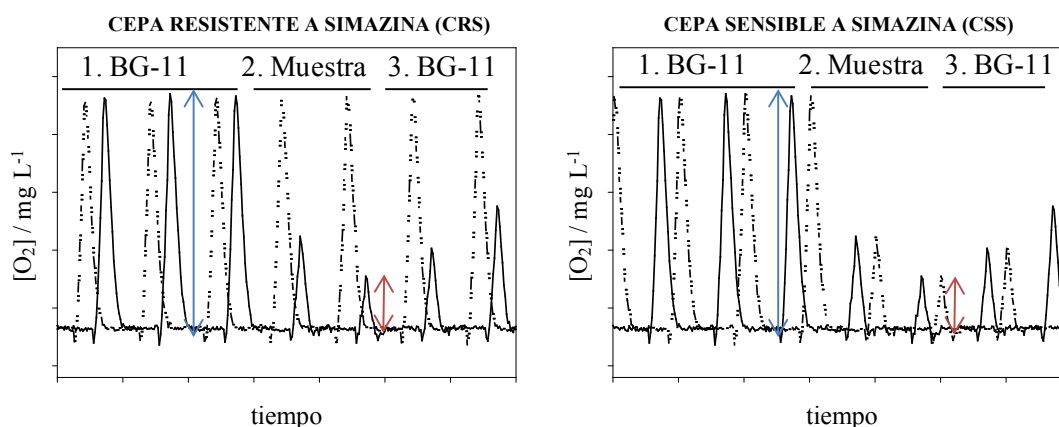


Figura 34. Izquierda: representación de la respuesta de una membrana CRS en presencia de una muestra que únicamente contiene simazina (---) y en presencia de una muestra que contiene otro inhibidor de la actividad fotosintética (-). Derecha: respuesta de una membrana CSS en presencia de una muestra que únicamente contiene simazina (---) y en presencia de una muestra que contiene otro inhibidor de la actividad fotosintética (-).

La Figura 34 muestra la respuesta del cabezal biosensor dual a las distintas posibilidades contempladas en la Tabla 9, para ambas cepas microalgares, en presencia de simazina (---) y de otros contaminantes (-). También podemos observar los componentes de la Ec. 10, donde $[O_2]_{BG-11}$ viene representada por la **doble flecha azul** y $[O_2]_i$ por la **doble flecha roja**.

3.5. CELDA DE MEDIDA Y TERMINAL SENSIBLE

La Figura 38 muestra un esquema del biosensor microalgar completo. El núcleo de este biosensor está constituido por una celda de medida, de acero inoxidable, especialmente diseñada por nosotros para cumplir con las necesidades del método de medida. Se trata de una celda de flujo que consta de dos cámaras de medida paralelas e independientes entre sí (Figura 36).

Denominamos **terminal sensible** al conjunto formado por la membrana microalgar y la película indicadora de O_2 . Para evitar la contaminación microbiológica de los terminales sensibles, se utilizó una membrana semipermeable (celulosa) que permite la entrada de nutrientes y analitos pero evita la entrada de bacterias, hongos, microalgas,....

La Figura 35 resume la disposición de cada una de las cámaras de medida gemelas; éstas poseen un cuerpo cilíndrico en el que se acomodan las películas indicadoras (**h**), membranas microalgares (**g**) y membranas de celulosa (**f**).

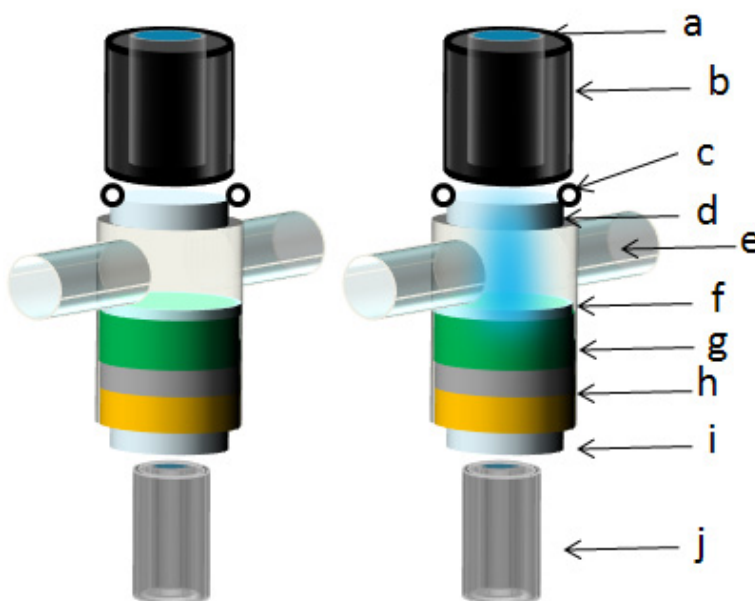


Figura 35. Esquema de los terminales sensibles y disposición de las cámaras de medida: a, terminal de la fibra óptica trifurcada; b, tornillo perforado; c, junta tórica; d, ventana plástica; e, tubería de muestra; f, membrana de celulosa; g, membrana microalgar; h, membrana transductora opto-química; i, ventana de sílice fundida industrial; j, extremo de la fibra óptica que conduce al equipo de medida Optosen®.

La parte “inferior” (según Figura 35) de la cada cámara de medida está sellada por medio de una ventana de sílice fundida o vidrio (**i**), que nos permite interrogar el transductor de O_2 por medio de una fibra óptica (**j**) conectada a la unidad optoelectrónica (Optosen®). La ventana está sellada al cuerpo metálico de la celda de medida por medio de un adhesivo epoxídico. La capa gris (opaca) de la película

indicadora de oxígeno se sitúa en contacto directo con la membrana microalgar, de forma que la fluorescencia de la clorofila no afecte a las medidas sensibles a la fase.

La parte “superior” (según Figura 35) de la cámara de medida es la parte móvil por la que se introducen los diferentes componentes del terminal sensible. Esta parte queda cerrada por medio de una ventana plástica transparente (**d**) presionada por una junta tórica (**c**) y un tornillo (**b**). El tornillo está perforado de forma que la fibra óptica trifurcada (**a**) lo atraviesa y se apoya sobre la ventana polimérica (**d**).

Un canal transversal (**e**) permite la entrada y salida del caudal en la cámara de medida. Estos canales están completamente aislados del exterior, exceptuando la toma y vertido de la muestra en los extremos opuestos de cada canal (Figura 38).

La dualidad de la celda de medida permite monitorizar simultáneamente la actividad fotosintética de las dos membranas microalgares (CSS y CRS), por medio de sendas películas indicadoras de O₂ idénticas.

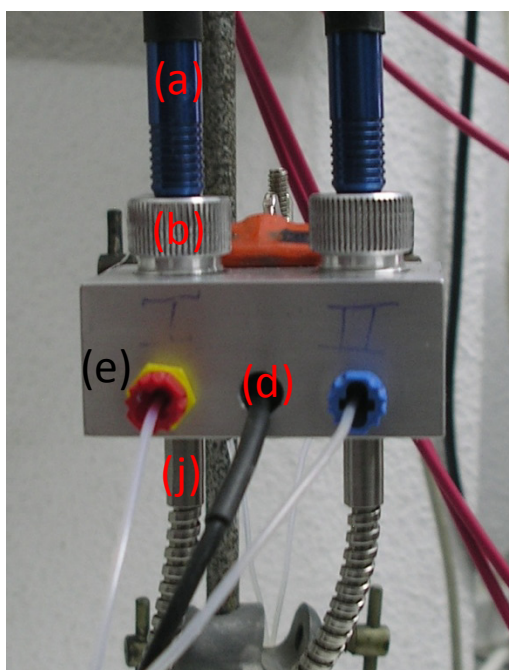


Figura 36. Fotografía de la celda medida, donde se diferencia: **a**, un extremo de la fibra trifurcada; **b**, tornillo perforado; **j**, extremo de la fibra del Optosen[®]; **d**, sonda de temperatura; **e**, canal del caudal de la muestra.

Durante el transcurso del proyecto se realizaron hasta 4 celdas de medida diferentes; cada nueva versión supuso una mejora en las condiciones de mantenimiento de las membranas microalgares, en el sistema de interrogación de las mismas o en el aislamiento de los terminales sensibles frente al exterior. La Figura 36 muestra la fotografía de la última y más prometedora celda de medida. Todas ellas diseñadas por nosotros y fabricadas por el Taller Mecánico de la UCM.

A lo largo de este proyecto los terminales sensibles también han evolucionado para formar un solo cuerpo. Al ser los soportes de ambos componentes (membrana

microalgar y película del transductor) del mismo material, **silicona**, resultó sencillo unirlos químicamente por medio de una silicona que actúe de agente adhesivo. A este formato del terminal sensible lo denominamos como “*terminal sandwich*” y mejoran la robustez del sistema sin que podamos indicar ningún inconveniente notable (Figura 37).

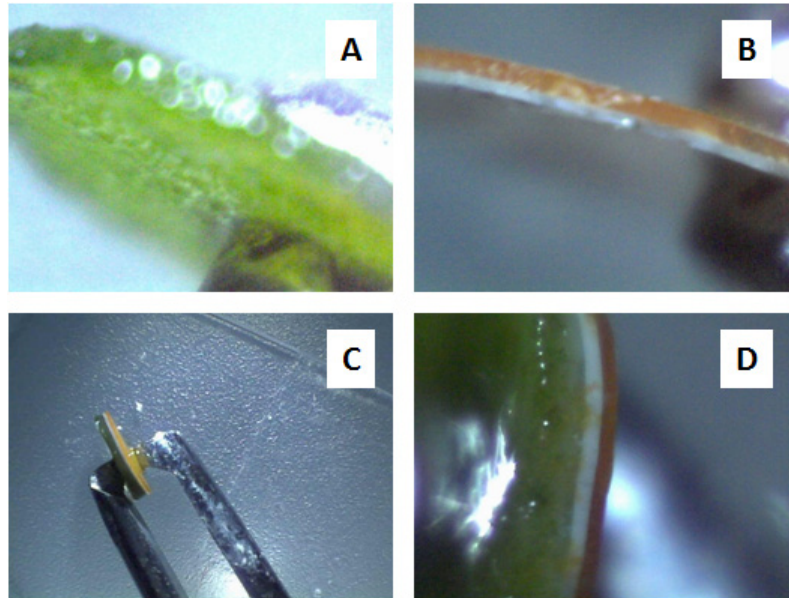


Figura 37. Imágenes tomadas con un microscopio digital de campo brillante (Digital Blue) a 60X y 200X. A, membrana de silicona porosa colonizada por algas. B, película indicadora de oxígeno (cara aislante de color gris y cara indicadora de color naranja). C, terminal *sandwich*, donde la película indicadora y la membrana porosa se han unido por medio de una silicona adherente. D, otra imagen de un terminal *sandwich*.

Antes de desarrollar los terminales *sandwich*, la membrana microalgar y la película indicadora se colocaban simplemente en contacto directo dentro de la cámara de medida; la configuración de la propia cámara mantenía unidas ambas membranas pero, en ocasiones, el sistema se descolocaba y el transductor dejaba de estar en íntimo contacto con la membrana microalgar, ocasionando problemas en las medidas que tenían que ser interrumpidas.

3.6. DISPOSITIVO COMPLETO DE MEDIDA

Las membranas microalgares alojadas en la celda de medida se iluminan con pulsos de luz actínica, en ciclos de luz/oscuridad, para estimular su actividad fotosintética. La luz actínica es proporcionada, a través de la fibra óptica trifurcada (**g**), por el dispositivo LED (**h**). Las dos unidades LED del dispositivo (**h**) están integradas en un solo cuerpo; en la Figura 38 las unidades aparecen separadas para simplificar el esquema.

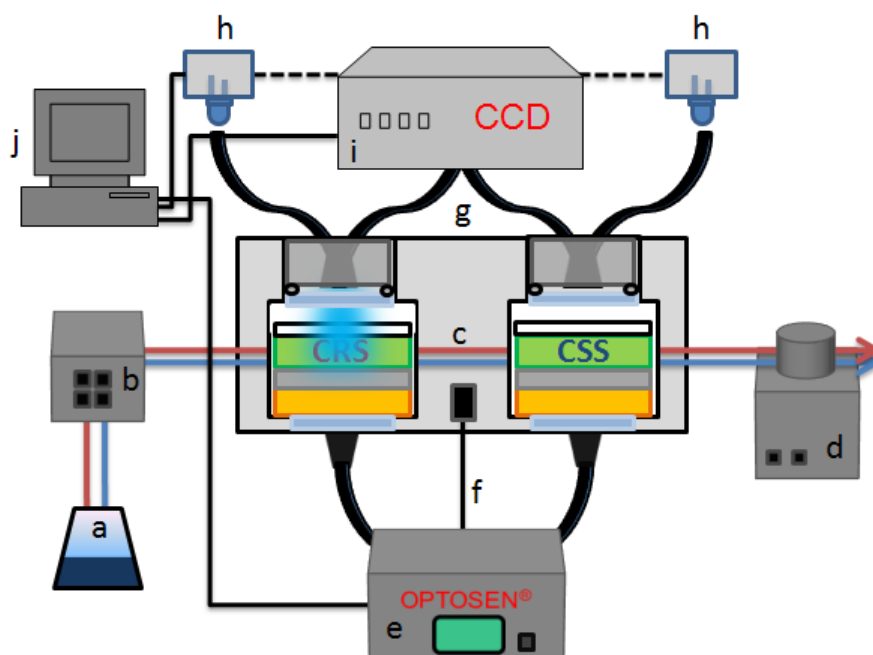


Figura 38. Esquema del biosensor microalga completo. a, toma de muestras; b, degasificador; c, celda de medida; d, bomba peristáltica; e, Optosen®; f, sonda de temperatura; g, fibra óptica trifurcada; h, dispositivo LED; i, detector CCD LFA-1000; j, ordenador de control.

La fluorescencia emitida por las moléculas de clorofila es recolectada por la fibra óptica trifurcada (g) y conducida al detector CCD (i), donde la intensidad de emisión es utilizada para monitorizar en tiempo real la estabilidad de la carga de biomasa inmovilizada en cada membrana microalga. La concentración de algas inmovilizadas se describe como la intensidad de la señal registrada por la cámara CCD (cuentas). Para que la cámara CCD pueda distinguir la fluorescencia proporcionada por cada una de las membranas microalgares, es necesario que los ciclos de luz/oscuridad de ambos canales estén ligeramente desfasados de forma que, mientras una membrana está siendo iluminada, la otra permanece en oscuridad; esto no supuso ningún problema técnico gracias al programa informático y al *hardware* asociado desarrollado íntegramente por el Taller Electrónico de la UCM (Figura 38).

El ciclo de iluminación activa la producción de O₂-fotogenerado por las microalgas inmovilizadas; éste llega al transductor de O₂, que es continuamente interrogado por la unidad opto-electrónica (e). El *software* del dispositivo opto-electrónico permite transformar la señal óptica (desfase) en concentración de O₂ disuelto (mg L⁻¹). El equipo Optosen® dispone de una sonda de temperatura (f) que se introduce en una cavidad especial de la celda de medida y permite corregir las desviaciones de la señal óptica (desfase) producidas por las variaciones de temperatura (Figura 38).

Finalmente, el biosensor dispone de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) encargado de tomar el medio/muestra e impulsarlo a través del cabezal biosensor. Para ello se utiliza una bomba peristáltica (d), que hace pasar la corriente de muestra por un degasificador (b) en su camino hacia la cámara de medida (Figura 38).

La Figura 39 muestra una fotografía del dispositivo prototipo completo en las instalaciones del grupo GSOLFA en la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM. La nomenclatura de los componentes de la Figura 38 se corresponde con la de la Figura 40.

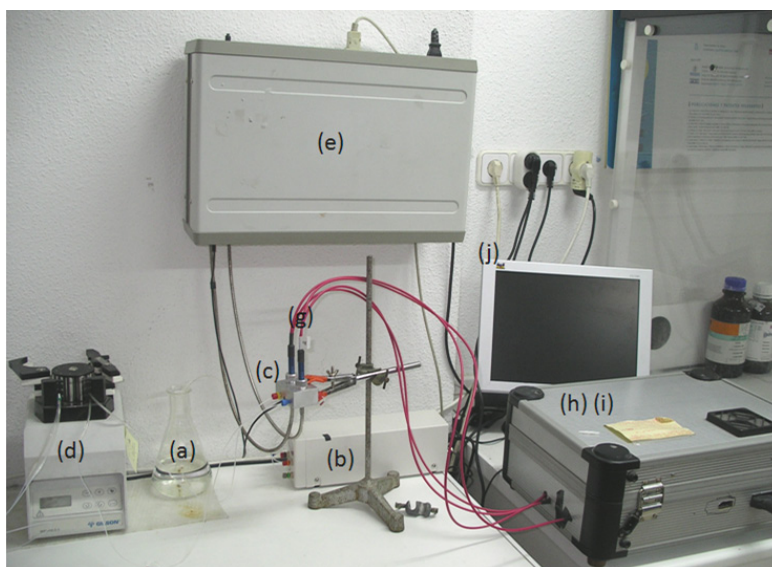


Figura 40. Fotografía del biosensor microalga completo: a, toma de muestras; b, degasificador; c, celda de medida; d, bomba peristáltica; e, Optosen[®]; f, sonda de temperatura; g, fibra trifurcada; h, dispositivo LED; i, cámara CCD; j, ordenador de adquisición de datos.

Las muestras, así como el medio que genera la línea base, sufren un tratamiento de degasificación en línea antes de entrar en las cámaras de medida. El objetivo de esta degasificación es que la corriente de agua que entra en la celda de medida tenga la menor concentración de O₂ disuelto (OD) posible. De esta forma, el O₂ medido por el transductor será, mayoritariamente, el producido por las microalgas. La degasificación de la muestras/medio es imprescindible para alcanzar los menores límites de detección posibles, debido a que el transductor de O₂ presenta una menor sensibilidad para la concentración de OD de una muestra normalmente aireada (Figura 41).

El transductor de O₂ presenta mayor sensibilidad (pendiente) en la zona próxima a 0 mg L⁻¹ (Figura 41, línea continua) mientras que, para una muestra normalmente aireada (OD = 8,42 mg L⁻¹, para 25 °C y 1 atm), el transductor estaría trabajando en la zona de menor sensibilidad (Figura 41, línea discontinua).

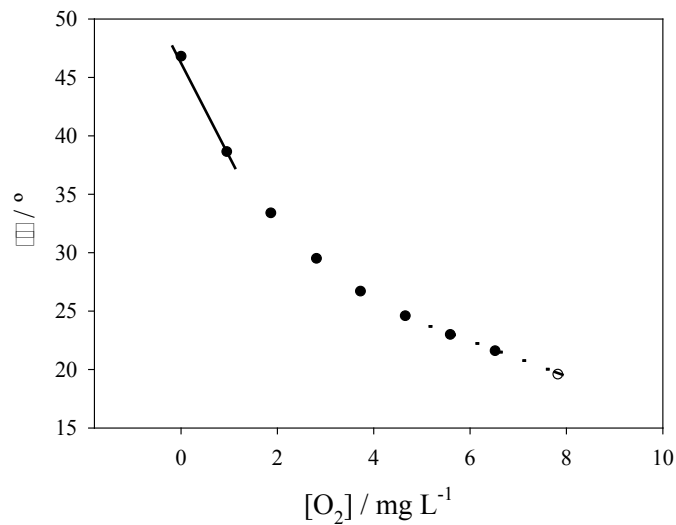


Figura 41. Comportamiento del transductor de oxígeno en medio acuoso (25°C, 1 atm).

El sistema de degasificación evolucionó durante el desarrollo del biosensor. Las primeras pruebas se hicieron con adición de sulfito sódico y fueron rápidamente descartadas, puesto que este potente antioxidante, además de reaccionar con las moléculas de oxígeno, resultaba tóxico para las microalgas inmovilizadas. Otro método para eliminar la concentración de O₂ disuelto en una muestra líquida es desplazándolo con una corriente de nitrógeno o argón. Este método es perfectamente válido y ha sido utilizado durante buena parte del proyecto, pero requiere de cilindros de gases comprimidos de gran tamaño no aptos para trabajar en medidas de campo; además, una utilización prolongada de las mismas supone un coste adicional del sistema biosensor. Finalmente, se optó por utilizar un degasificador de HPLC (Gastorr BG-12) de pequeño tamaño (dimensiones: 94 x 78 x 285 mm; peso: 2,0 kg; 100 hPa) y de bajo coste que permite realizar el proceso de degasificación en línea. De esta forma, la mayor parte del O₂ medido por el transductor procede de la actividad fotosintética.

La Figura 42 muestra cómo al iniciar un experimento y activar el degasificador, el terminal sensible registra una rápida desoxigenación en la cámara de medida, pasando de valores típicos para una muestra aireada (7–8 mg L⁻¹), hasta una desoxigenación casi total (Figura 42, **a**). La luz actínica activa la fotosíntesis y con ella la generación de O₂ (Figura 42, **b**); al terminar el pulso de luz actínica la muestra desoxigenada, que atraviesa la cámara de medida, vuelve a reducir la concentración de O₂ en las proximidades del terminal sensible (Figura 42, **c**).

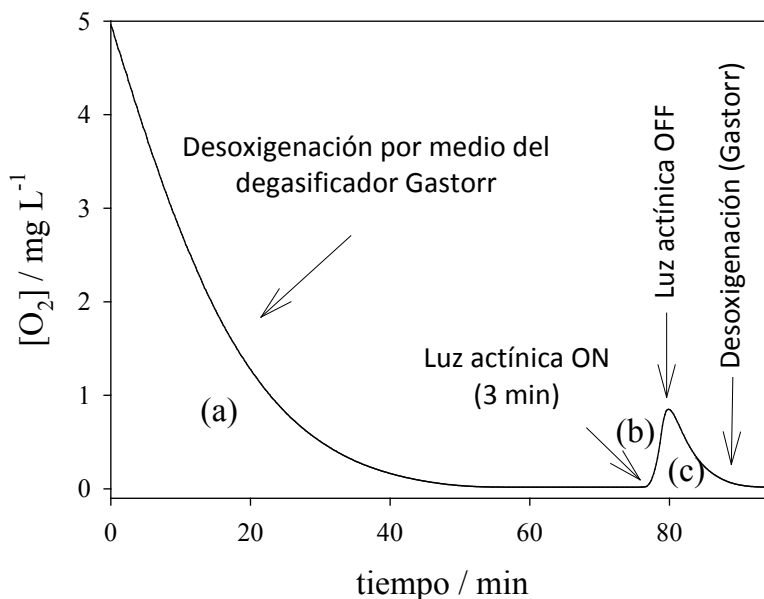


Figura 42. Medida de OD de uno de los terminales sensibles del biosensor microalgar; **a**, cuando el degasificador acaba de ser activado; **b**, durante un pulso de 3 min de luz actínica; **c**, durante la recuperación del pulso de 3 min.

El biosensor microalgar desarrollado por Cho y cols. [30] utiliza también una desoxigenación previa (con mezclas N_2/CO_2); los estudios realizados en ese trabajo concluyen que el proceso de desoxigenación no influye en forma alguna en la actividad fotosintética de las microalgas.

3.7. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DEL BIOSENSOR

3.7.1. SELECCIÓN DE MICROALGAS E INMOVILIZACIÓN DE LAS MISMAS

El proceso de inmovilización es uno de los más complicados en el desarrollo de un biosensor. El soporte seleccionado para acomodar la carga de microalgas debe ser compatible con el bioelemento, evitar pérdidas de biomasa, permitir la interacción entre el analito y las células, permitir la iluminación por parte de la luz actínica y facilitar la interacción entre el segundo analito y el transductor. El soporte seleccionado para llevar a cabo la inmovilización de las microalgas fue una membrana de silicona porosa (ImmobaSil™).

Como ya se ha indicado, la naturaleza de las colonias *Dictyosphaerium chlorelloides* favorece su inmovilización frente a la especie *Scenedesmus sp.* La empresa suministradora de las membranas ImmobaSil™ (Cellon, LU) dispone de dos grosores comerciales, 1 y 0,5 mm. Debido al interés que despertó este proyecto, Cellon nos suministró un lote de membranas de un grosor (0,25 mm) inferior al de las membranas comerciales. Las tres membranas fueron colonizadas y situadas en la celda de medida para poder estudiar el efecto del grosor del soporte microalgar sobre la respuesta del biosensor (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de O₂ medido por el transductor en contacto con membranas ImmobaSil™, de 1, 0,5 y 0,25 mm de grosor, colonizadas con soluciones de 2 x 10⁶ células mL⁻¹. Pulsos de luz actínica de 1 min o de 3 min de duración y 145 μW de potencia radiante a la salida de la fibra óptica. Caudal de 0,75 mL min⁻¹.

Pulso de luz actínica (min)	Grosor de la membrana (mm)	O ₂ -fotogenerado (mg L ⁻¹)	Tiempo de respuesta (min)	Tiempo de recuperación (min)
1	0,25	0,16	3	10
	0,5	0,09	5	13
	1	0,07	5	15
3	0,25	0,88	5	17
	0,5	0,23	5	17
	1	0,10	6	20

Todos los datos de la Tabla 10 fueron realizados utilizando el mismo transductor de O₂ (misma unidad). Estos datos demuestran que, al reducir el grosor del soporte microalgar, mejora la sensibilidad del transductor. Esto se debe a que se reduce la distancia entre el elemento biológico y el transductor, de forma que se mejora la interacción del segundo analito (O₂) con este último. Como consecuencia de estos resultados, las membranas de ImmobaSil™ de 0,25 mm fueron seleccionadas para realizar el resto de optimizaciones del biosensor.

Estas membranas han sido utilizadas por periodos de hasta 2 meses conservando inalterada su carga de biomasa.

3.7.2. CAUDAL DEL SISTEMA

La medida se realiza por medio de un flujo continuo de medio (*línea base*) o muestra (*señal*); el sistema de flujo abierto mejora la estabilidad de la señal al asegurar que la concentración del analito no va a disminuir, como podría suceder en un sistema cerrado. La selección del caudal de la corriente de muestra resulta complicada: por una parte, un caudal elevado disminuye el tiempo desde que se toma la muestra hasta que las microalgas empiezan a incubarse con el analito de interés;¹⁹ por otra, la eficacia del sistema de desoxigenación es inversamente proporcional al caudal de la muestra que lo atraviesa (Figura 43). Ambos factores deben tenerse en cuenta para optimizar las condiciones de medida.

Las muestra/medio de cultivo se introduce en el desgasificador donde atraviesa una membrana semipermeable situada en el interior de una cámara de vacío (100 h Pa). La eficacia de la desoxigenación depende del tiempo que la muestra permanezca en el interior de la cámara de vacío; por ello, a menor caudal, mayor desoxigenación. La Figura 43 muestra cómo, a partir de 1 mL min⁻¹ de agua, el proceso de desoxigenación se vuelve gradualmente menos eficaz, motivo por el cual se evitó trabajar a caudales superiores a dicho valor.

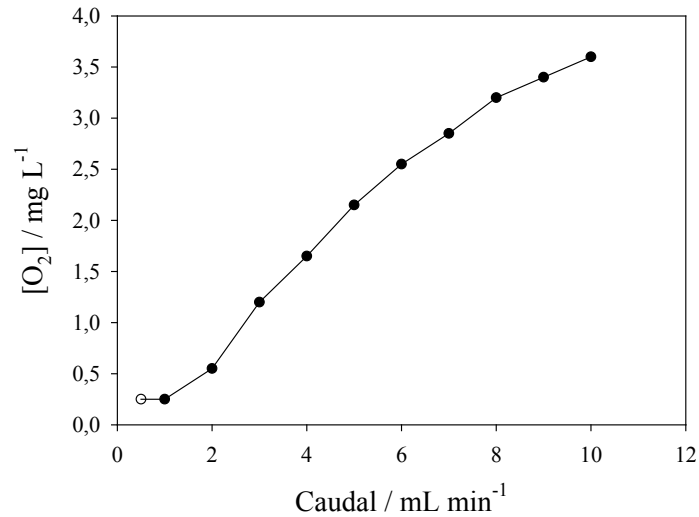


Figura 43. Relación entre el caudal de agua y el O₂ residual medido con el sensor luminiscente, utilizando un desgasificador Gastorr BG-12 (FLOM Co., Japón).

El caudal también influye en el tiempo de recuperación de la línea base, una vez terminado el pulso de luz actínica, lo que controla la frecuencia de medida de la actividad fotosintética (tiempo entre pulsos de luz actínica).

Tabla 11. Relación entre el caudal de la muestra/medio y el tiempo de recuperación de la señal analítica. Membrana ImmoBaSil™ de 0,25 mm de grosor, colonizada con una solución de 2×10^6 células mL⁻¹. Membrana microalgar de 7000 cuentas (CCD). Fuente de excitación de 470 nm, 145 μW, ciclo de iluminación 3/17 min.

Caudal (mL min ⁻¹)	Pulso (min)	Tiempo de recuperación (min)
0,0	1,5	9
0,25	1,5	6
0,50	1,5	5
0,75	1,5	4
1,00	1,5	4

Finalmente se seleccionó un caudal de 1 mL min⁻¹ por ser el caudal que supone una situación de compromiso óptima entre la desoxigenación de la muestra, que mejora la sensibilidad del transductor y el tiempo de recuperación de la señal analítica, permitiendo aumentar la frecuencia de medida.

3.7.3. POTENCIA RADIANTE DE LA LUZ ACTÍNICA Y DURACIÓN DE LOS CICLOS LUZ-OSCURIDAD

Hay dos propiedades de la luz de vital importancia para activar el metabolismo de las algas: calidad espectral e intensidad.

El dispositivo LED de luz actínica utilizado tiene una banda de emisión centrada en **470 nm**, ideal tanto para estimular la actividad fotosintética como para excitar la fluorescencia de las moléculas de clorofila.

La elección de la **intensidad de la luz actínica** depende de la carga de biomasa de las membranas microalgares. La intensidad de la luz actínica seleccionada debe intentar favorecer la mayor actividad fotosintética posible, para tener la mayor señal analítica posible pero también evitar fenómenos adversos, producidos por un exceso de intensidad lumínica, como son la foto-inhibición (reversible) o el daño celular (irreversible).⁸⁸ Para los valores de potencia de las unidades LED empleadas en el desarrollo del biosensor (20–145 μW), los fenómenos de foto-inhibición o daño celular comentados arriba únicamente suceden para concentraciones microalgares muy bajas (\approx 1000 cuentas CCD).

La Tabla 12 muestra cómo, al aumentar la intensidad del LED, aumenta la actividad fotosintética.

Tabla 12. Relación entre la potencia de la luz actínica y el O_2 -fotogenerado, los pulsos de luz fueron de 3 min y las medidas se realizaron por triplicado.

Potencia radiante del LED azul a la salida de la fibra óptica (μW)	O_2 -fotogenerado (mg L^{-1})
145	$0,93 \pm 0,03$
120	$0,87 \pm 0,06$
100	$0,84 \pm 0,01$
80	$0,76 \pm 0,01$
60	$0,65 \pm 0,06$
40	$0,55 \pm 0,06$
20	$0,34 \pm 0,05$

La proporción y duración de los ciclos **luz/oscuridad** depende de la señal analítica (producción de oxígeno) que se necesite producir y de la frecuencia de medida que se desee obtener.

En la Figura 44 se observa que, cuanto mayor es el tiempo de iluminación actínica, mayor es la señal analítica (producción de O_2) y, a su vez, mayor es el tiempo necesario para desoxigenar la cámara de medida (periodo de oscuridad) al terminar el pulso de luz. De esta manera, para una concentración microalgar dada, tiempos de iluminación prolongados necesitan mayores tiempos de oscuridad, lo que afecta a la frecuencia con

que se pueden realizar las medidas. Este biosensor fue desarrollado con el objetivo de poder realizar medidas con una frecuencia mínima de 20 min.

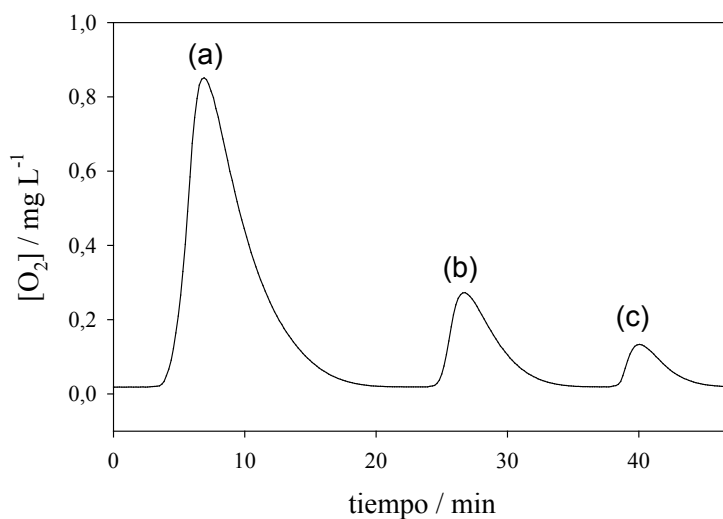


Figura 44. Señal analítica registrada por el biosensor para una misma membrana microalga colonizada con *D. chlorelloides* (7000 cuentas CCD), con pulsos de luz actínica (470 nm, 145 μ W) de 3, 2 y 1 min (**a**, **b** y **c**, respectivamente).

Además, hay que tener en cuenta las limitaciones que impone el transductor de O₂. El método de medida y el comportamiento del transductor obligan a seleccionar cuidadosamente la señal de referencia usada como línea base, es decir, la señal analítica (producción de O₂) en ausencia del agente contaminante. Esta señal depende, entre otros factores, de la duración del pulso de luz actínica.

En la Figura 45 se observa que la máxima sensibilidad del transductor se encuentra en la zona comprendida entre 0 y 1 mg L⁻¹ de O₂ disuelto, por lo que el tiempo de iluminación debe estar ajustado de manera que la línea base no rebase el valor de 1 mg L⁻¹. Por ejemplo, si la línea base (señal del biosensor en ausencia del analito) se sitúa en la zona de 1–2 mg L⁻¹, la sensibilidad del biosensor se reduce un 35%.

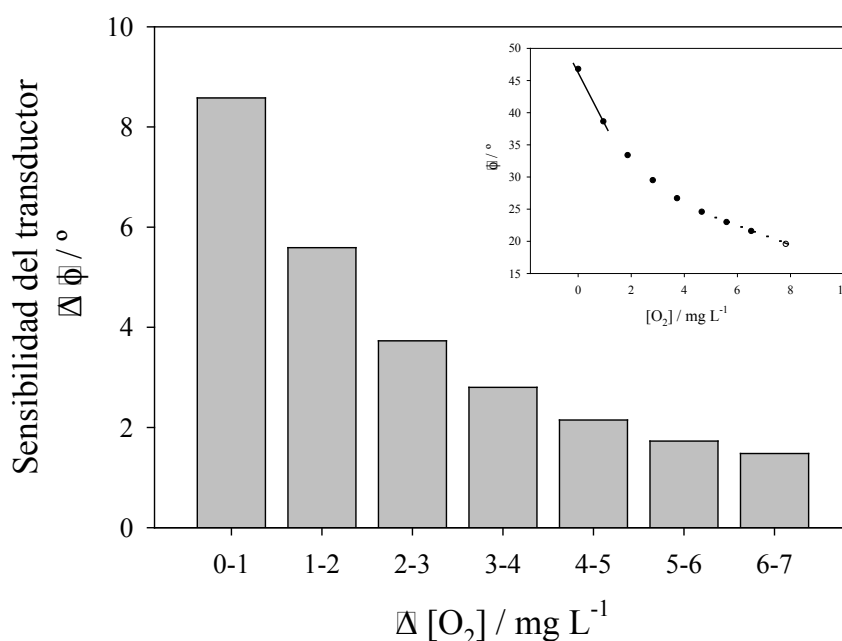


Figura 45. Sensibilidad del transductor. Señal analítica expresada como excursión del desfase ($\Delta\phi$), en función del tramo de oxígeno disuelto. En la esquina superior derecha se observa otra vez la Figura 41, como ayuda suplementaria para entender el comportamiento del transductor.

Finalmente, ambas membranas microalgares (sensibles y resistentes), fueron iluminadas alternativamente durante ciclos **luz/oscuridad** de **3 y 17 min**, respectivamente. Este tiempo fue elegido en función de las concentraciones de microalgas con las que trabaja el biosensor y con la intención de:

- Generar una señal analítica lo suficientemente grande.
- Aumentar la frecuencia de medida.
- Aprovechar las mejores condiciones del transductor.
- Proporcionar una buena relación señal/ruido.

3.7.4. TEMPERATURA

La relación entre el tiempo de vida de emisión de los complejos de rutenio con ligandos poliazaheteroaromáticos y la temperatura ambiental, es de sobra conocida.⁸⁹ Para corregir las desviaciones en los tiempos de vida de emisión, producidas por la temperatura, el equipo Optosen[®] utiliza:

- Una sonda de temperatura, introducida en el cuerpo de la celda de medida, que registra los valores de temperatura con la misma frecuencia que registra los valores de desfase.
- Un *software* que utiliza los valores de temperatura, registrados por la sonda, para corregir los valores de desfase. El *software* del Optosen[®] requiere una serie de

datos de temperatura, OD y desfase para corregir la señal de desfase con la temperatura y proporcionar el valor de OD corregido. Estos valores se obtienen de un calibrado previo del transductor optoquímico de OD, explorando las condiciones que consideramos posibles para los parámetros de temperatura, OD y desfase (Figura 46). El *software* interpola los valores reales con los valores introducidos para proporcionar el valor de OD ya corregido.

Se consideró un intervalo de temperatura de la muestra de agua entre 15 y 45 °C, donde el desfase de la señal decrece 0,15° por grado de temperatura. El calibrado del transductor se realizó en ausencia de la membrana microalgar, controlando la temperatura por medio de un baño termostático y regulando la concentración de OD por medio de un controlador de flujo másico.

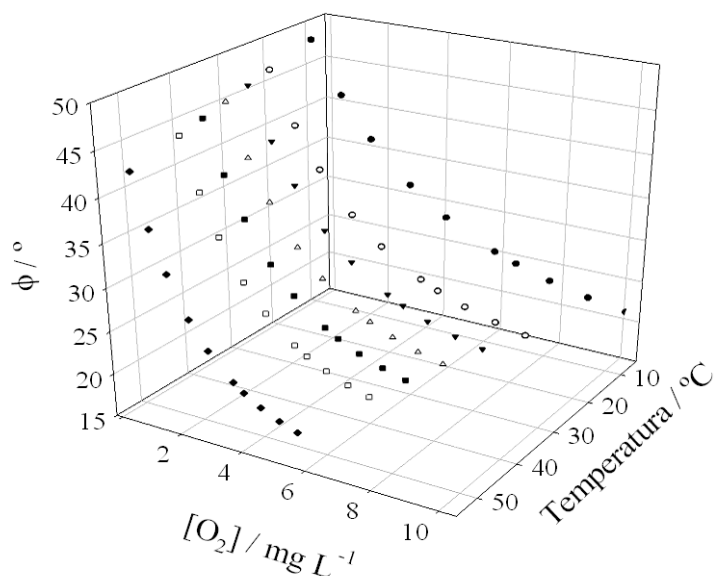


Figura 46. Relación entre la señal analítica (desfase, ϕ), la temperatura de la muestra y la concentración de O_2 disuelto.

La Figura 46 muestra la relación entre el transductor opto-químico y la temperatura, aunque la temperatura también afecta a la actividad biológica de las algas, como se comprueba en la Figura 47.

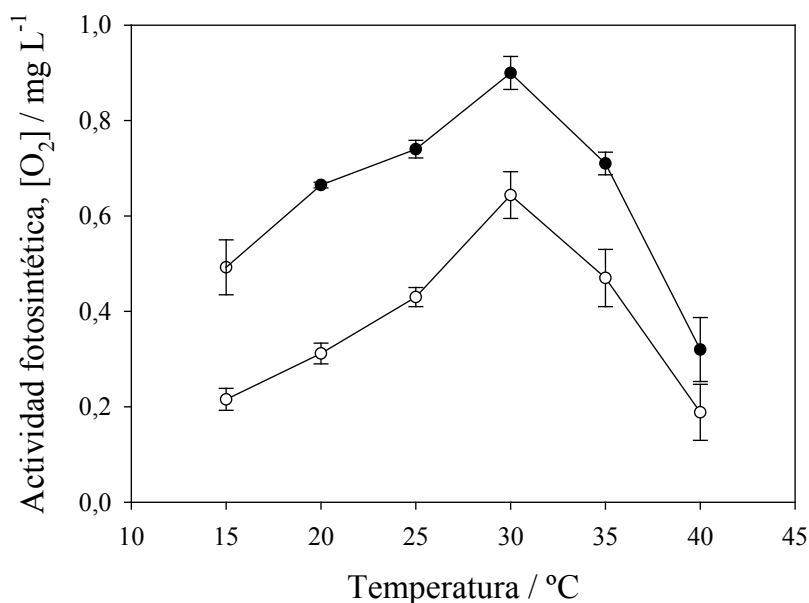


Figura 47. Relación entre la actividad fotosintética y la temperatura de una membrana de CSS (círculos negros) y otra de CRS (círculos blancos). Ambas membranas, CSS y CRS, contienen cargas de biomasa similares (12000 cuentas). Fuente de emisión LED de 470 nm, 145 μ W, 3/17 min. Caudal de 1 mL min⁻¹.

Los datos representados en la Figura 47 muestran la actividad fotosintética de una membrana de CSS (círculos blancos) y de una membrana de CRS (círculos negros), en ausencia de simazina o cualquier otro contaminante, por lo que las variaciones en la actividad fotosintética se deben únicamente al efecto de la temperatura. Como ya se comentó con anterioridad, las mutaciones naturales que generan resistencia a la simazina afectan también a la actividad fotosintética de las mismas; por ello, las membranas de CRS producen menos oxígeno que las de CSS, en ausencia de simazina.

La unidad opto-electrónica (Optosen[®]) interroga al transductor en contacto con las membranas microalgares y, por medio de una sonda de temperatura integrada en la cámara de medida, corrige los valores de desfase (ϕ) y los transforma en valores de OD. Tras la realización del calibrado (Figura 48), toda la operación es realizada automáticamente por medio del *software* del Optosen[®].

3.7.5. CONCENTRACIÓN DE MICROALGAS EN LA BIOMEMBRANA

Como hemos mencionado con anterioridad, la mayoría de los parámetros del biosensor están relacionados entre sí, siendo la concentración de algas el parámetro más crítico de todos puesto que de él depende, tanto la generación de la señal analítica (y con ella la selección de la intensidad y duración del pulso de luz actínica), como la sensibilidad del biosensor.

Durante la inmovilización de las microalgas se utilizan cultivos de concentración conocida, típicamente 2×10^6 células mL⁻¹, que colonizan la membrana porosa (ImmobaSilTM), pero resulta difícil conocer la concentración de células que realmente

quedan retenidas en el interior de la membrana. Algunos trabajos encontrados en la bibliografía determinan la concentración de algas inmovilizadas en función de los equivalentes de fluorescencia de emisión en μg de *clorofila a* por cm^{-2} [25,90], mientras que otros trabajos lo determinan en función de la densidad óptica por cm^{-2} [20,30]. Nuestro biosensor calcula la concentración relativa de microalgas inmovilizadas en función de la intensidad de emisión de sus moléculas de clorofila, utilizando la misma fuente de excitación que la que se emplea para activar la fotosíntesis. La emisión fluorescente de las moléculas de clorofila se recolecta por medio de la fibra óptica trifurcada y se mide gracias a la cámara CCD, después de pasar por una red de difracción de $600 \mu\text{m}$ y un filtro de corte a 515 nm .

En la Tabla 13 se observa cómo las tres biomembranas, colonizadas con distintas concentraciones de CSS, responden de forma diferente, tanto en ausencia de simazina como en presencia de concentraciones crecientes de simazina.

Lógicamente, para una misma intensidad y duración del pulso de luz actínica, la concentración de oxígeno O_2 -fotogenerado es mayor cuanto mayor es concentración de algas inmovilizadas (Tabla 13).

Tabla 13. Relación entre la concentración microalgar de CSS, O_2 -fotogenerado e inhibición de la actividad fotosintética para concentraciones crecientes de simazina. Fuente de emisión LED de 470 nm , $145 \mu\text{W}$, $3/17 \text{ min}$. Tiempo de incubación con la simazina: 40 min . Caudal de 1 mL min^{-1} . Las medidas se realizaron por triplicado.

Biomembrana	Fluorescencia (cuentas)	O_2 -fotogenerado en ausencia de simazina (mg L^{-1})	Inhibición de la actividad fotosintética en presencia de simazina (%)		
			100 ppb	400 ppb	600 ppb
A	5000	0,20	42 ± 5	--*	--*
B	12000	0,6	21 ± 2	$58,2 \pm 0,4$	71 ± 2
C	23000	2,0	5 ± 1	$8,8 \pm 0,9$	11 ± 2

*Para la concentración de 200 ppb la inhibición es ya del 89%; por ello, no se realizaron medidas con 400 ni 600 ppb.

La simazina actúa como un inhibidor reversible (puesto que podemos recuperar la señal como observaremos en la Figura 49) y competitivo, puesto que la molécula de simazina ocupa (compite con) con el sitio de unión de la plastoquinona (PQ) con la proteína D1.³⁹ Una alta población microalgar equivale a altas concentraciones de FS-II, por lo que una misma concentración de inhibidor tendría un mayor número de fotosistemas que inhibir. Ésta podría ser una explicación de por qué la sensibilidad de las membranas colonizadas con CSS decrece al aumentar la población de microalgas, como ocurre para la membrana C (Tabla 13). La membrana C incluso podría tener una mayor concentración celular de lo que indica la cámara CCD (cuentas); esto se debe a que, para altas concentraciones microalgares, se producen fenómenos de auto-sombreado, lo que reduce la intensidad de luz que llega a las células, alterando la relación entre la intensidad de emisión de fluorescencia y la concentración de algas.^[20,25,30,90] Esto podría explicar el por qué de la baja sensibilidad de la membrana C.

La selección de la concentración de algas dependerá del intervalo dinámico donde queremos que trabaje nuestro biosensor.

3.7.6. TIEMPO DE INCUBACIÓN

La incubación se realiza en línea por medio de un flujo continuo, de forma que la muestra en contacto con la membrana de algas está siempre fresca y la concentración del analito diana no disminuya. Cuanto mayor es el tiempo en que las células microalgares están en contacto con la muestra, mayor es el efecto del inhibidor. Este es el principio de los bioensayos realizados con algas, que fijan tiempos concretos, de 48 o 95 horas normalmente, para realizar sus estudios de toxicidad.

En la Figura 48 se observa la relación entre el tiempo de incubación de una misma membrana de CSS con concentraciones de simazina crecientes y la inhibición de la actividad fotosintética, debido a esta incubación.

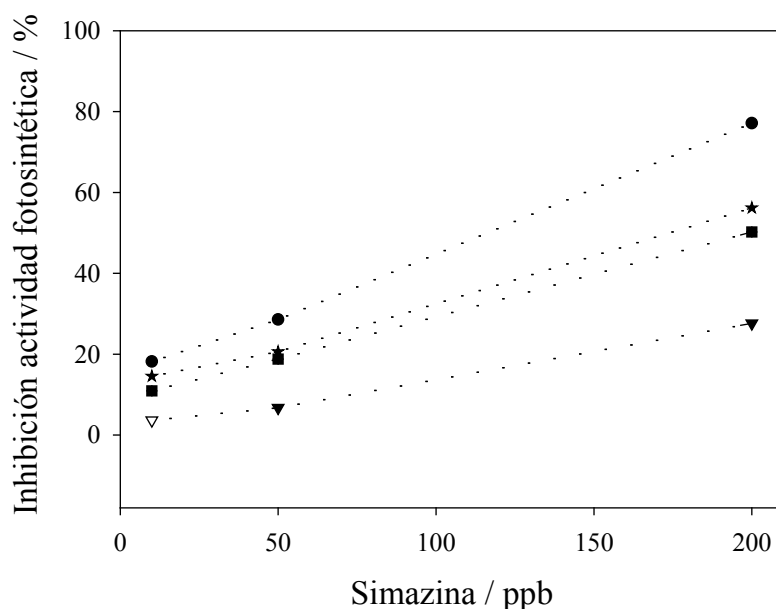


Figura 48. Relación entre la inhibición de la actividad fotosintética, para concentraciones crecientes de simazina (10, 50, 200 ppb)², y el tiempo de incubación (20, 40, 60 y 80) min. Fuente de emisión de 470 nm, 145 μ W, 3/17 min. Caudal de 1 mL min⁻¹. Membrana de CSS (5000 cuentas).

La selección del tiempo de incubación depende de las necesidades prácticas del usuario y, probablemente, de la concentración del agente contaminante. Al tratarse de un biosensor experimental, no hay un requisito concreto para realizar las medidas. Aun así, se decidió tomar **40 min** como tiempo de incubación estándar. Puesto que los ciclos luz/oscuridad seleccionados fueron de 20 min (3/17 min, respectivamente) tenemos así la opción de registrar dos medidas de la actividad fotosintética durante el tiempo de

² A pesar de que las normas de la UIPAC indican que se deben utilizar unidades de “ μ g L⁻¹”, hemos preferido utilizar “ppb” por ser, estas unidades, más frecuentes en el área de la contaminación ambiental.

incubación de la muestra. Esto nos permite asegurar que el comportamiento del biosensor sigue una tendencia, producida por la composición de la muestra, y no se trata de un caso puntual (Figura 49).

3.7.7. COMPORTAMIENTO DEL BIOSENSOR EN EL LABORATORIO

Con los parámetros seleccionados durante los estudios anteriores se realizaron una serie de experimentos que nos permitieron mejorar nuestro conocimiento sobre el comportamiento del biosensor.

La Figura 49 muestra un experimento en el que aumentamos la concentración de simazina gradualmente, introduciendo un tiempo de recuperación de la señal analítica (BG-11 libre de simazina) entre cada dosis de herbicida. Para este experimento, empleamos una membrana de CSS (*D. chlorelloides*) con una concentración microalgar equivalente a una emisión de fluorescencia en torno a 12000 cuentas. La potencia radiante de las unidades LED se mantuvo fija en 145 μW , con ciclos luz/oscuridad de 3 y 17 min, respectivamente. El tiempo de exposición a la muestra fue de 40 min, durante el cuál se registraron dos valores de actividad fotosintética (producción de O_2). El caudal de muestra se mantuvo en 1 mL min^{-1} .

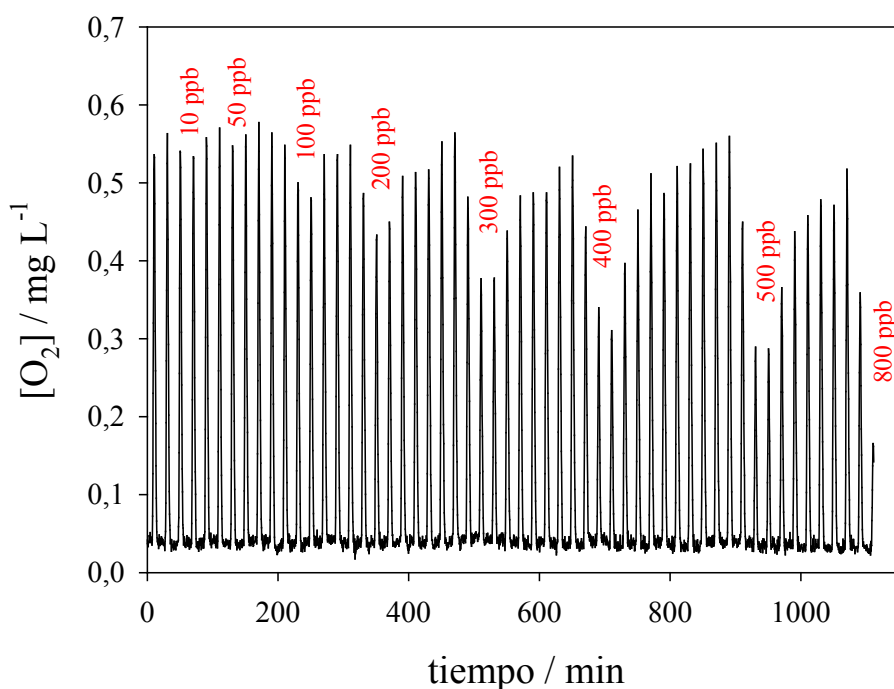


Figura 49. Respuesta de una membrana colonizada por microalgas sensibles en presencia de muestra de simazina con concentraciones de 100, 300, 400, 500 y 800 ppb.

En la Figura 49 se observa que, cuanto mayor es la concentración de simazina incubada con la membrana de CSS, menor es la concentración de OD registrada por el transductor de O_2 durante los pulsos de luz actínica. Además, el biosensor tiene una respuesta reversible, recuperando las microalgas su actividad fotosintética tras un

periodo de contacto con una corriente de medio BG-11 (libre de simazina). Lógicamente, cuanto mayor es la dosis de simazina recibida, mayor es el tiempo que las células necesitan para recuperar su actividad fotosintética previa.

También se realizaron calibrados utilizando una membrana de CSS (*D. chlorelloides*) (Figura 50) para conocer la sensibilidad del biosensor. Se emplearon las mismas condiciones que en experimento anterior (Figura 49) que nos permiten tener un rango dinámico bastante amplio. Los ciclos de luz/oscuridad de 3/17 min, respectivamente, nos permiten obtener dos datos de OD, uno a los 20 min de incubación y otro a los 40 min de incubación. Los valores empleados en el calibrado de la Figura 50 corresponden a los valores de OD registrados a los 40 min de incubación de la membrana CSS con las diferentes muestras de simazina.

En el calibrado de la Figura 50 se representa el grado de inhibición de la actividad fotosintética (%) frente a la concentración de simazina (ppb) responsable de dicha inhibición. El grado de inhibición (%) se calcula por medio de la Ec. 10, descrita previamente (página 76).

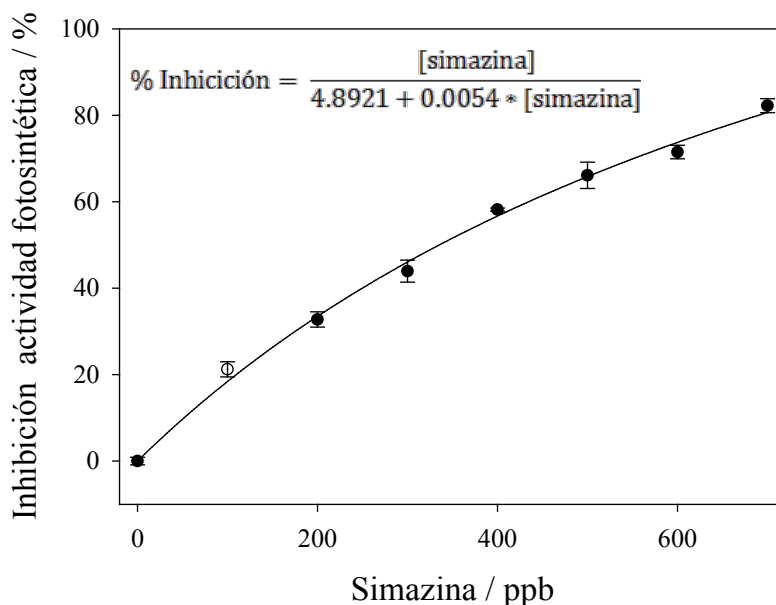


Figura 50. Calibrado típico de una membrana microalgar de CSS (10000 cuentas), en presencia de concentraciones de simazina de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 ppb. Fuente de emisión LED de 470 nm, 145 μW , 3/17 min. Caudal de 1 mL min^{-1} . Las medidas se realizaron por triplicado.

En la Figura 50 se observa el comportamiento de una membrana microalgar de CSS frente a concentraciones crecientes de simazina. El efecto inhibitorio de la simazina se ajusta una hipérbola modificada de segundo orden ($r > 0,99$).

La inhibición se considera significativa cuando es mayor que el 10%, lo que corresponde a 52 ppb para la membrana de CSS de 10000 cuentas (CCD). Como comparación, para una membrana de CSS con 5000 cuentas (CCD) tenemos valores de inhibición del 42% para 100 ppb (Tabla 13).

El límite de detección del biosensor microalgar se calcula, siguiendo las normas de la IUPAC, como tres veces la desviación estándar de diez medidas de blancos (BG-11 libre de simazina). Como la sensibilidad del biosensor depende la concentración de biomasa inmovilizada, tendremos diferentes límites de detección en función de la concentración de la membrana de CSS. El límite de detección para la membrana de CCS utilizada en la Figura 50 es de 12,22 ppb; el límite de cuantificación, calculado como diez veces la desviación estándar, es de 40,75 ppb.

Las membranas microalgares colonizadas con cepas sensibles a simazina (CSS) son las responsables de proporcionar la **sensibilidad** del biosensor. La sensibilidad de los biosensores es una característica fundamental para probar su utilidad, todos los biosensores microalgares están dotados de una mayor o menor sensibilidad. Algunos de los biosensores microalgares descritos en la bibliografía presentan mejores datos de sensibilidad, especialmente los basados en medidas de fluorescencia (Tabla 14).

Tabla 14. Límite de detección de *simazina* para biosensores microalgares presentes en la literatura.

Principio biológico	Principio de medida óptico	Alga	Límite de detección (ppb)	Ref.
Fotosíntesis	Fluorescencia	<i>C. vulgaris</i>	0.5	[19]
Fotosíntesis	Fluorescencia	<i>D. chlorelloides</i>	3.6	[22]

El factor realmente novedoso del biosensor desarrollado es la **especificidad** del mismo debida a la **cepa resistente a simazina (CRS)**. Ésta debe tener un comportamiento lo más diferenciado posible de las cepas sensibles a simazina (CSS). Otro de los factores clave en el desarrollo de nuestro biosensor es que las cepas resistentes a simazina han sido obtenidas por métodos que eluden la tecnología de recombinación genética, *no siendo en modo alguno organismos modificados genéticamente*.

Para comprobar la especificidad del biosensor microalgar desarrollado decidimos estudiar el comportamiento de las membranas **CRS** frente a concentraciones crecientes de **simazina** y frente a concentraciones crecientes de **isoproturón**, otro herbicida inhibidor del FS-II (Figura 51) no perteneciente a la familia de las triazinas.

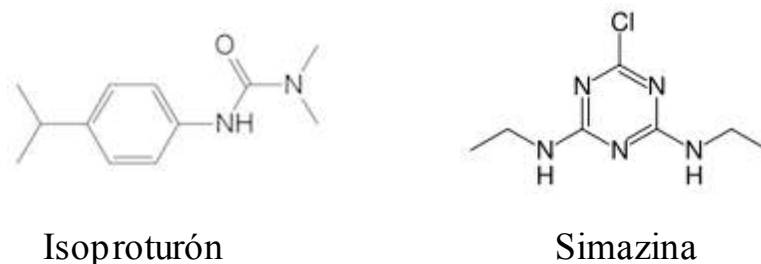


Figura 52. Molécula de isoproturón (izq.). Molécula de simazina (dcha.)

El isoproturón es un herbicida de la familia de las ureas que actúa, al igual que la simazina, desplazando a la plastoquinona (PQ) de su sitio de unión a la proteína D1, componente del FS-II.³⁹

En la Figura 53 se observa el diferente comportamiento de una biomembrana de CRS frente a concentraciones crecientes de **simazina** y de **isoproturón**. Adicionalmente, esta figura incluye un calibrado realizado con membranas de CSS frente a concentraciones crecientes de simazina. Este calibrado adicional ayuda a observar mejor el diferente comportamiento de las dos poblaciones microalgares (CRS y CSS) frente al analito seleccionado (simazina). Este diferente comportamiento es el responsable de la especificidad del método de medida.

Los experimentos presentados en la Figura 53, para la membrana de CRS, se realizaron con la misma unidad biosensora (misma membrana microalgar). Puesto que la concentración celular influye en la sensibilidad de las membranas (Tabla 13), se utilizaron membranas de CRS y CSS cargadas con concentraciones celulares similares (10000 cuentas, CCD).

Las medidas que describe la Figura 53 se realizaron fijando la potencia radiante de las unidades LED en 145 μW , con ciclos luz/oscuridad de 3 y 17 min, respectivamente. El tiempo de exposición a las distintas muestras acuosas de herbicida fue de 40 min y el caudal de las muestras se mantuvo en 1 mL min^{-1} .

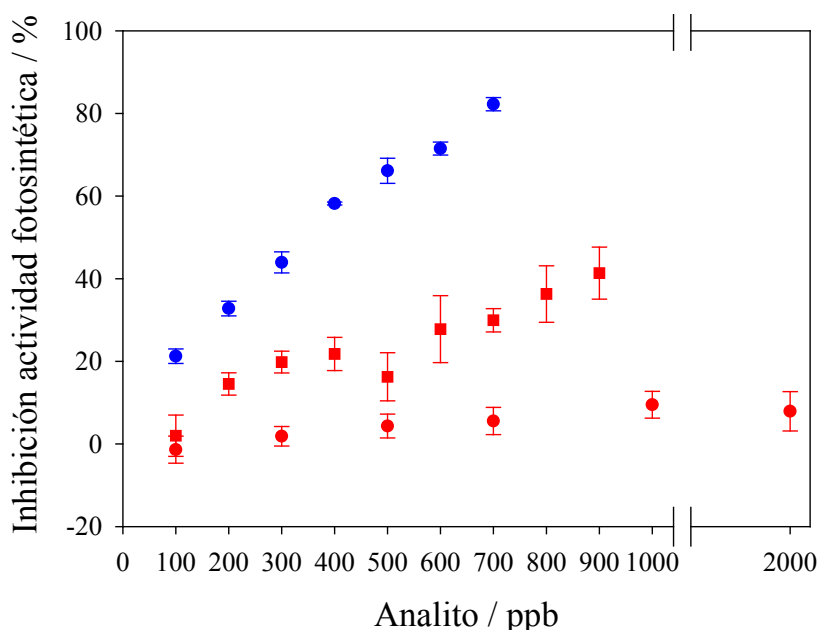


Figura 53. (●) Membrana de CSS (10000 cuentas) en presencia de concentraciones crecientes de simazina. (●) Membrana de CRS (10000 cuentas), en presencia de concentraciones crecientes de simazina. (■) Membrana de CRS (10000 cuentas), en presencia de concentraciones crecientes de isoproturón. Fuente de emisión de 470 nm, 145 μW , 3/17 min. Caudal de 1 mL min^{-1} . Las medidas se realizaron por triplicado.

En la Figura 53 se observa que la membrana de CRS presenta una gran resistencia a la presencia de simazina: incluso a concentraciones muy elevadas (2000 ppb), la

actividad fotosintética prácticamente no se ve alterada. Por otra parte, la membrana de CSS demuestra ser mucho más sensible a las mismas concentraciones de simazina.

A su vez, la cepa resistente a simazina exhibe una mayor resistencia a la simazina que frente al isoproturón (Figura 53). Queda pendiente comprobar el comportamiento de la cepa sensible (CSS) frente al isoproturón, para ver si las mutaciones que aportan resistencia a la simazina en la CRS afectan también a interacción con el isoproturón.

3.7.8. COMPORTAMIENTO DEL BIOSENSOR MICROALGAR CON MUESTRAS REALES E *IN SITU*

Mientras que las pruebas y validaciones de un biosensor pueden hacerse perfectamente en el laboratorio, no hay sustituto posible para las medidas *in situ*. Con esta consideración nos propusimos estudiar el comportamiento del biosensor microalgar en medidas de campo. En este sentido, las facilidades administrativas y técnicas que ofrece la estación biológica del Parque Nacional de Doñana (Huelva) se presentaron como un “laboratorio natural” ideal para investigar aquellos efectos no reproducibles en el laboratorio (Figura 54), más aún si tenemos en cuenta que se han reportado episodios de contaminación de sus valiosas aguas por simazina tras los periodos de altas precipitaciones.

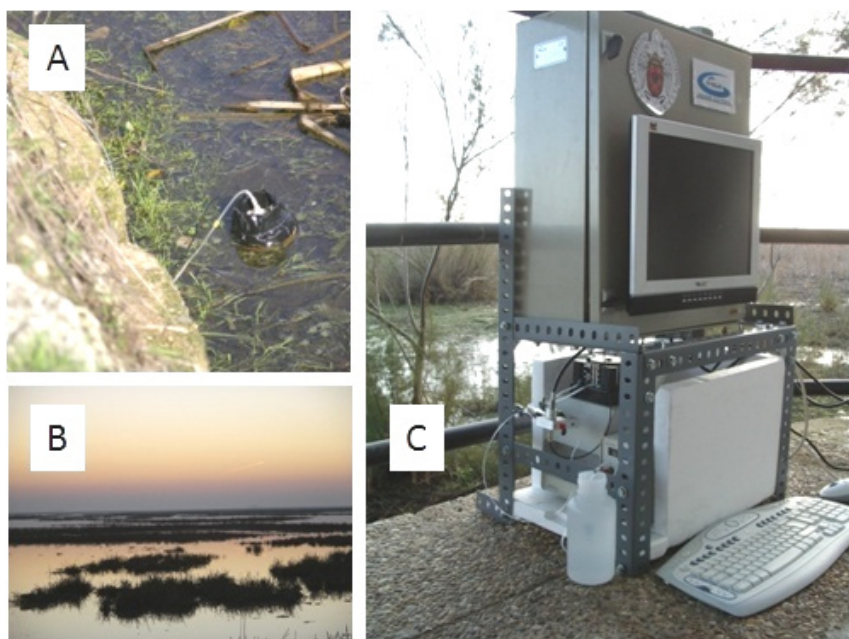


Figura 54. Fotografías tomadas en la Reserva Biológica de Doñana (Huelva). (A) Fotografía del punto de aspiración de la muestra en las inmediaciones del observatorio de El Bolín. (B) Fotografía de la zona pantanosa de Los Mimbrales. (C) Fotografía del prototipo biosensor OPTOSEN[®] instalado en El Bolín.

Gracias a la obtención de una subvención para el desplazamiento y estancia en la Reserva Biológica de Doñana, durante más de una semana del mes de Diciembre de 2008 se analizó el agua y se tomaron muestras en diferentes puntos de la misma (El

Bolín, La Escupidera, Los Mimbrales, la FAO, el Rocío y la Laguna de Arena). Además del análisis in situ con nuestro biosensor, se preservaron para ser analizadas posteriormente con un método de análisis de aguas establecido (HPLC-DAD) en nuestras instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM.

No se detectó simazina en ninguna de las muestras tomadas en el Parque Nacional de Doñana, ni por medio del biosensor microalga desarrollado ni por medio de las medidas realizadas en nuestras instalaciones en la UCM (HPLC-DAD). A pesar de ello, las medidas realizadas en Doñana representaron una excelente oportunidad para adquirir experiencia frente a problemas reales y potenciales de las medidas in situ, tales como muestrear en aguas turbias, efectos de temperatura (se detectaron variaciones de temperatura de 4 °C a 17 °C), influencia de potenciales interferencias, estabilidad de la biomasa inmovilizada, etc.

Los problemas con muestras turbias llevaron a realizar modificaciones en la celda de medida, que minimizan el efecto de la turbidez sobre la cantidad de luz actínica que llega a las células.

Para controlar el efecto de la variación de temperatura, que afectan tanto al transductor de O₂ (Figura 46) como a la actividad metabólica de las algas (Figura 47), se instaló una célula Peltier que, por medio de un software instalado en el Optosen[®], permite fijar la temperatura de la celda de medida. La temperatura seleccionada para mejorar el rendimiento del biosensor fue de 25 °C.

CONCLUSIONES

TRANSDUCTOR LUMINISCENTE DE O₂ DISUELTO

- La incorporación de partículas silíceas a la película sensora, permite el control preciso, tanto de la **cinética de emisión** del complejo luminiscente, como de la **sensibilidad** del transductor al O₂. Hemos demostrado que este control se debe a que, ajustando la carga de partículas de sílice incorporadas a la película de silicona, podemos variar la *concentración* de la molécula indicadora y la *solubilidad* del O₂ en la misma. Además, las partículas de sílice aumentan la probabilidad de desactivación de las moléculas indicadoras excitadas por el analito (*quencher*), incrementando de esta manera la *sensibilidad* de la película indicadora a medida que se incrementa la carga inorgánica.
- Gracias a la microscopía de imagen de fluorescencia por tiempo de vida (**FLIM**), por primera vez se ha conseguido visualizar y analizar fotoquímicamente, tanto mediante intensidad de luminiscencia como a través de los tiempos de vida de emisión, los **microdominios** que generan la ancha distribución de diferentes cinéticas de luminiscencia en las películas de silicona dopadas con complejos de Ru(II), y que son responsables de la **pérdida de linealidad** en la respuesta de estos sensores. Dichos microdominios se producen como consecuencia de la segregación del indicador en ausencia de partículas de sílice como relleno de la silicona.
- El microscopio confocal FLIM aplicado al estudio de materiales luminiscentes quimiosensores ha demostrado ser capaz de establecer valiosas *conexiones* entre el mundo *microscópico* y el *macroscópico*, que se aplicarán al desarrollo de futuras películas optosensoras indicadoras de otros analitos de interés (pH, humedad, hidrocarburos, etc.).

BIOSENSOR MICROALGAR DE SIMAZINA

- El desarrollo y optimización, desde sus componentes básicos, de un robusto y selectivo *biosensor microalgar* **prototipo** para la monitorización in situ de contaminantes del agua, debería permitir que la tecnología de biosensores ópticos dé por fin el salto desde el laboratorio al mundo real. Sin necesidad de producir microorganismos modificados genéticamente, pero utilizando microalgas exquisitamente seleccionadas y cultivadas para exhibir una *sensibilidad* o *resistencia* superior frente a aquellos compuestos químicos que afectan a su maquinaria fotosintética, es posible ahora detectar *específicamente, in situ y en tiempo real* la presencia de éstos en el agua.

- Los ensayos del nuevo biosensor microalgar de doble cabezal para la detección de **simazina** en aguas, han puesto de manifiesto los *parámetros clave* para el éxito de estos dispositivos: cuidadosa selección de las cepas de microalgas, robusta inmovilización del material biológico, óptima disposición de la capa biosensora y del transductor opto-químico en el extremo distal, control de temperatura en la cámara de medida, combinación de las modernas tecnologías de iluminación con LEDs, fibra óptica y monitorización del tiempo de vida de luminiscencia del indicador.
- Los límites que impone la biología pueden comprometer el análisis, mediante el biosensor microalgar, de los contaminantes de las aguas en las concentraciones máximas que impone la legislación vigente. En tales casos, el *acoplamiento* del biosensor a un sistema de *preconcentración* optimizado, debe permitir superar tal limitación.
- Aunque la sensibilidad del biosensor microalgar depende de la concentración de biomasa inmovilizada, en ningún caso se alcanzó una sensibilidad capaz de trabajar en torno a los 0,1 ppb que la Unión Europea estipulan como límite de concentración máxima en agua potable para la simazina.³⁸ Para mejorar la sensibilidad del biosensor, sin utilizar OMG, se planteó recurrir a un sistema de pre-concentración en estado sólido. Esta solución serviría para alcanzar los niveles de detección requeridos por la normativa y evitaría los problemas relacionados con la turbidez de las muestras, pero también introduce un problema considerable, puesto que se haría necesario la introducción de un disolvente orgánico que actuara como eluyente. Las microalgas seleccionadas (tanto *sensibles* como *resistentes* a simazina) deberán ser compatibles con el eluyente seleccionado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El proyecto FUTURSEN terminó durante el año 2010, pero el desarrollo y aplicación del biosensor microalgar ha experimentado un importante impulso en el año 2012 gracias al apoyo de la Unión Europea (Programa LIFE+, proyecto “AQUATIK”) y a la confianza en el dispositivo y en nuestro trabajo, de varias empresas del grupo AGBAR (CETaqua, LabAqua y AQUALOGY Aqua Ambiente Servicios Integrales). En estrecha colaboración, como hasta ahora, con el Grupo ALBIOTOX (*Biotecnología de microalgas: Producción y toxicidad*) de la Facultad de Veterinaria (UCM), contribuiremos dentro del proyecto AQUATIK al desarrollo y validación de sistemas avanzados de monitorización para el control de contaminantes orgánicos prioritarios en efluentes de aguas residuales tratadas (www.life-aquatik.eu).

Asimismo, el grupo ALBIOTOX está cultivando actualmente nuevas cepas microalgares, sensibles y resistentes a otros contaminantes del agua de gran relevancia como son los metales pesados (cobre y cromo), otros pesticidas (atrazina, isoproturón, etc.), hepatotoxinas (microcistina LR) o antibióticos (penicilinas, fluoroquinolonas, etc.), que abren el abanico de aplicaciones e incrementan el interés del desarrollo de futuros biosensores basados en microalgas “domesticadas”.

**DESARROLLO DE
OPTOSENSORES DE
PARÁMETROS CLAVE EN
REACTORES
MICROALGARES PARA
PRODUCCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES**



INTRODUCCIÓN

1. BIORREACTORES MICROALGARES

El rápido crecimiento que ha experimentado la temperatura del planeta durante los últimos 30 años ha centrado el interés y la preocupación de científicos, administraciones públicas y ciudadanos. Este aumento de la temperatura se considera como un efecto directo de la actividad antropogénica por la inmensa mayor parte de la comunidad científica y, en concreto, como la consecuencia directa de la emisión a la atmósfera de gases de efecto invernadero (GEI). Entre estos gases destaca, por su actividad y concentración, el **dióxido de carbono** (CO₂), que representa el 76,7% de los GEI en términos de equivalentes de CO₂.⁹¹ La Figura 55 muestra la relación entre el aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera y el aumento de la temperatura durante los últimos 130 años.

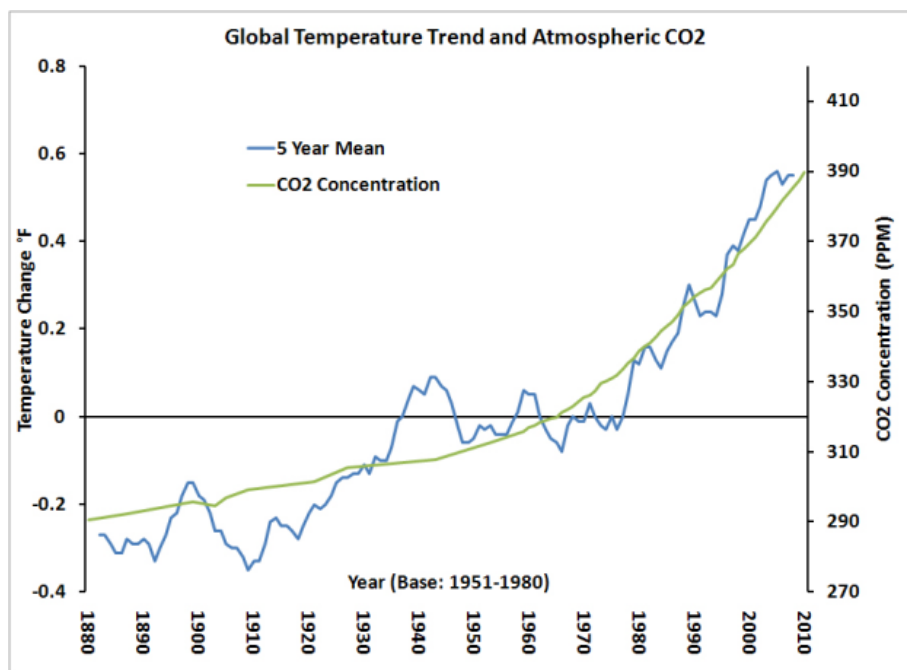


Figura 55. Concentración de CO₂ en la atmósfera (ppm, eje derecho) e incremento de la temperatura media (°F eje izquierdo) (Fuente: NASA-GISS, CDIAC, NOAA ESRL).

Ya en 1896, el Premio Nobel de Química Svante August Arrhenius (1859–1927) publicó un trabajo donde indicaba una posible relación entre el incremento de la concentración de CO₂ y el calentamiento de la temperatura mundial.⁹² A pesar de la precocidad de este trabajo, el tema permaneció alejado del interés general durante décadas. Incluso en los años 60 se llegó a pensar que el planeta se encaminaba hacia una nueva glaciación hasta que, en la década de los 80, la curva de la temperatura media del planeta comenzara a crecer de forma extremadamente rápida, atrayendo la atención de la comunidad científica, la prensa, los ciudadanos y las organizaciones no

gubernamentales (ONGs). La preocupación por las consecuencias, presentes y futuras, del calentamiento global es una realidad reflejada en numerosas cumbres internacionales, como la última conferencia de Copenhague celebrada en el año 2010, donde se acordó reducir las emisiones globales en al menos un 50% para el año 2050.⁹³

A la creciente preocupación por el futuro climático mundial se suma el carácter caduco de las fuentes de energía convencionales, lo que ha potenciado el desarrollo e investigación de nuevas fuentes de energía de naturaleza renovable y que, a ser posible, eviten la emisión de GEI. A pesar de ello, hasta el presente, la principal fuente de energía está constituida por los combustibles fósiles que son, a su vez, el principal foco de emisión de CO₂.⁹⁴ Mientras la búsqueda de una fuente de energía renovable, limpia y barata continúa, todo parece indicar que durante las próximas décadas el mundo seguirá dependiendo de los combustibles fósiles para satisfacer buena parte de sus necesidades energéticas.⁹⁵ Esta realidad ha impulsado una nueva aproximación al problema: *el desarrollo de tecnologías que capturen y almacenen el CO₂ para evitar que éste llegue a la atmósfera*; a estas tecnologías se les conocen como “CCS” por sus siglas en inglés (Carbon Capture and Storage). Algunas de estas técnicas tan solo buscan almacenar el CO₂ para mantenerlo alejado de la atmósfera, mientras que otras pretenden utilizar esas enormes cantidades de CO₂ como materia prima de la que poder sacar rendimiento económico, lo que rentabilizaría todo el proceso de captura y almacenamiento.⁹⁶

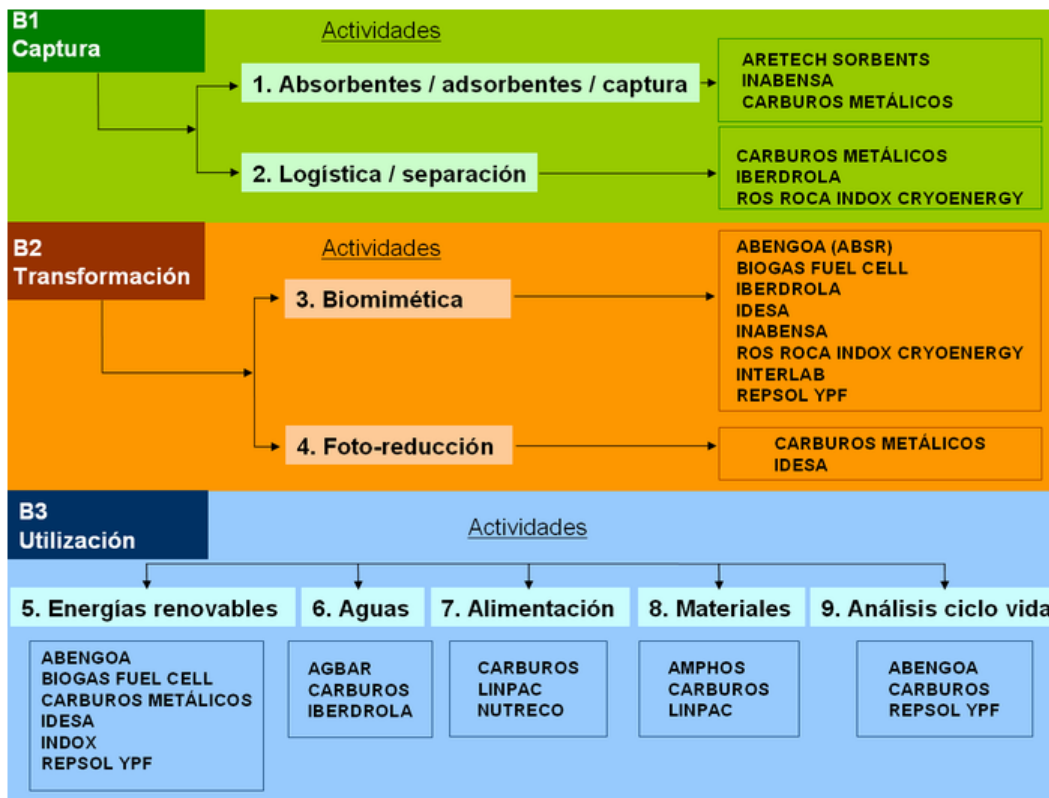


Figura 56. Esquema de los tres bloques principales en que está dividido el proyecto CENIT SOST-CO₂ y sus 9 actividades científicas. Fuente: www.cenit-sostco2.es.

Con la intención de situar a España en una posición adelantada en el desarrollo de fuentes de energía sostenible y reducir las emisiones de GEI, el Gobierno de España decidió en 2008 financiar el **proyecto CENIT “SOST-CO₂”** (“Nuevas utilizaciones industriales sostenibles del CO₂”), que tiene como propósito integrar los principales componentes de las tecnologías CCS. El proyecto fue dividido en tres bloques principales: **(B1) captura de las moléculas de CO₂**, **(B2) transformación** y **(B3) utilización** del CO₂ (Figura 56).⁹⁷

Las nueve actividades científicas recogidas en la Figura 56 tienen como objetivo evitar la emisión de CO₂ a la atmósfera y, sobre todo, proporcionar valor añadido al mismo.

Entre las aplicaciones del CO₂ nos encontramos con algunas ya asentadas y otras en vías de desarrollo. La industria actual consume unas 130 millones de toneladas métricas de CO₂ al año, lo que está muy por debajo de las 25 GT emitidas a la atmósfera cada año. El CO₂ puede utilizarse con fines industriales de forma directa e indirecta.⁹⁸

- **Directamente:** en extintores anti-incendios, para preservar comida en envasados de atmósfera modificada, para sustituir a disolventes orgánicos, etc. La extracción de cafeína, en la elaboración de café descafeinado, sería uno de los ejemplos más exitosos, donde la inocuidad de la molécula de CO₂ le ha llevado a sustituir a disolventes orgánicos como el cloruro de metileno o el acetato de etilo en la extracción de la cafeína. Para ello, se utiliza el CO₂ supercrítico como un disolvente que penetra en los granos de café y arrastra las moléculas de cafeína.
- **Indirectamente,** a través de la generación de biomasa que, a su vez, puede utilizarse para obtener productos de alto valor añadido o para generar energía de una forma indirecta. También se utiliza en la síntesis de otras especies químicas.

Otro factor a tener en cuenta en el ámbito de las tecnologías CCS es el denominado **comercio de derechos de emisión**, que administra el control de emisiones de GEI a través de los conocidos como “*bonos de carbón*” (también llamados *créditos* o *derechos de carbón*). Estos bonos tratan de reducir las emisiones de GEI gravando las emisiones de GEI con un valor económico, de forma que las industrias que emiten menores cantidades de CO₂ se ven beneficiadas por este sistema, al poder vender sus bonos de carbón a otras industrias más contaminantes. Esta medida fue uno de los mecanismos propuestos en el Protocolo de Kioto del año 1997.⁹⁹ Las tecnologías CCS se rentabilizarían, parcialmente, gracias a este “**mercado del CO₂**”.

Los cultivos de microalgas a gran escala se presentan como una de las aplicaciones industriales más prometedoras dentro de las tecnologías CCS. Su interés radica tanto en las buenas propiedades de estos microorganismos como fijadores de CO₂, como en la gran cantidad de productos de alto valor añadido que se pueden extraer de sus células.^[100 101,102]

El cultivo de microalgas con fines comerciales ha crecido notoriamente desde que en los años 60 empezara su industrialización a gran escala en Japón.¹⁰³ Esta prometedora industria nació para enriquecer los complementos alimenticios de animales

y seres humanos y, desde entonces, su número de aplicaciones no ha dejado de aumentar hacia ámbitos como la industria cosmética, la farmacéutica o la generación de biodiesel.¹⁰⁴

La posibilidad de producir biocombustible a partir de los cultivos microalgas está ligada a la biogeneración y bioacumulación de grandes cantidades de ácidos grasos (AG) en el interior de sus células. La concentración de AG en el interior de las células microalgas se encuentra comprendida entre el 1% y el 70% del peso seco del microorganismo, dependiendo de la especie cultivada y de las condiciones de cultivo.^[105,106,107]

Tabla 15. Comparación de algunas propiedades relevantes de tres especies diferentes de microalgas con otras fuentes vegetales utilizadas tradicionalmente en la producción de biodiesel. En la tabla se diferencia entre las especies microalgas que producen una baja, media y alta bioacumulación de ácidos grasos (B, M y A, respectivamente).¹⁰²

Origen	% AG por peso seco de biomasa	Rendimiento AG (Litro aceite/ha año)	Tierra utilizada (m ² año/Kg biodiesel)	Productividad biodiesel (kg biodiesel/ha año)
Maíz	44	172	66	152
Cáñamo	33	363	31	321
Soja	18	636	18	562
<i>Jatropha</i>	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Colza	41	974	12	862
Girasol	40	1070	11	946
Ricino	48	1307	9	1156
Aceite de palma	36	5366	2	4747
Microalga (B)	30	58700	0,2	51927
Microalga (M)	50	97800	0,1	86515
Microalga (A)	70	136900	0,1	121104

La Tabla 15 muestra que los cultivos de microalgas no sólo son capaces de generar mejores rendimientos que los cultivos vegetales más utilizados en la generación de biodiesel (litros de aceite al año), sino que requieren de menores extensiones de terreno. Además, los cultivos microalgas no necesitan utilizar terrenos fértiles, pueden emplear agua salada, muestran mejores rendimientos fotosintéticos que las plantas terrestres (3–8%, frente al 0,5%) y poseen tasas de crecimiento muy altas (en 24 h pueden duplicar su biomasa).¹⁰⁸

Las **microalgas** son organismos autótrofos que utilizan el CO₂ atmosférico como fuente de carbono. La asimilación del carbono se realiza por medio del denominado **ciclo de Calvin** (Figura 7), que consiste en una serie de procesos bioquímicos que tienen lugar en los cloroplastos. El ciclo de Calvin utiliza la energía almacenada durante la fase luminosa en la forma de compuestos químicos, ATP o NADPH, para transformar las moléculas de CO₂ en moléculas orgánicas sencillas. Aunque la fotosíntesis es un

proceso que involucra muchas reacciones, estas pueden resumirse en la reacción descrita por el botánico alemán Ferdinand Gustav Julius von Sachs (Ec. 1).

El proceso fotosintético requiere una fuente de luz, CO₂ y un conjunto de nutrientes fundamentales. Los cultivos antropogénicos de microalgas se realizan en **biorreactores** donde los cultivos se mantienen en condiciones de crecimiento, preferentemente en fase exponencial (Figura 19). Según la definición de la IUPAC, “*un biorreactor puede referirse a cualquier dispositivo o sistema que mantenga un ambiente biológicamente activo*”.¹⁰⁹ Para mantener los cultivos microalgares en crecimiento exponencial, los biorreactores deben estar equipados con una fuente de energía lumínica, natural o artificial y de un sistema logístico que permita suministrar y distribuir de una forma homogénea tanto los nutrientes fundamentales como la corriente de CO₂. La fuente de CO₂ puede ser la atmósfera o provenir de una fuente directa (chimenea).

Los biorreactores pueden ser sistemas **abiertos** o **cerrados**, con ventajas e inconvenientes para ambos sistemas.

Los **sistemas abiertos** son más baratos de construir y mantener que los cerrados; estas características hace que tengan una gran productividad y sean los más utilizados en la industria microalgar actual, puesto que resultan sencillos de escalar. Entre sus mayores desventajas se encuentran la falta de control sobre algunos parámetros como la temperatura o el pH, la exposición de los cultivos a las condiciones medioambientales y la facilidad de contaminación. Tampoco resulta sencilla la mezcla de nutrientes y, por lo general, su rendimiento de biomasa por volumen de cultivo es bajo. Este tipo de biorreactor no resulta apropiado como secuestrador de CO₂, ya que no podemos controlar la concentración de CO₂ por estar abiertos a la atmósfera.

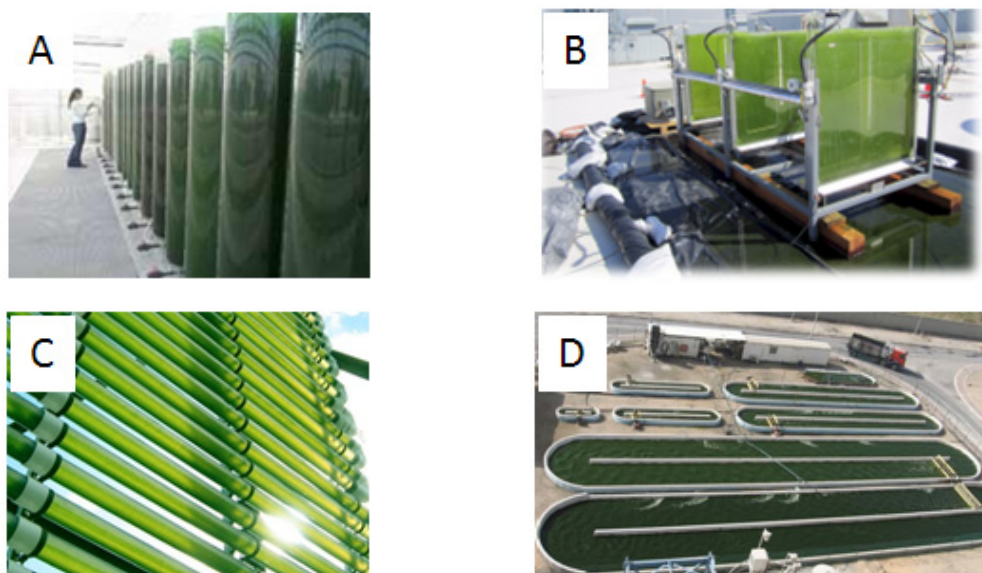


Figura 57. **A**, Biorreactor cerrado tubular-vertical (Fuente: Algenol Biofuels); **B**, Biorreactor cerrado de paneles (Fuente: Corporación Intel, Ocotillo Campus); **C**, Biorreactor cerrado tubular-horizontal (Fuente: Ternion Bio Industries); **D**, Biorreactor abierto (Fuente: www.greendiary.com).

Los **sistemas cerrados** presentan mejores rendimientos biomasa/volumen, debido a que resulta más sencillo controlar las condiciones de cultivo (pH, temperatura, etc.), pudiendo optimizarlas para la especie microalga que queramos cultivar. Además, los nutrientes se mezclan más fácilmente y es posible trabajar con atmósferas ricas en CO₂, por lo que no tenemos limitaciones de carbono. Esta última característica los convierte en sistemas ideales para las tecnologías CCS. Entre los inconvenientes que podemos encontrar están el precio, tanto de construcción como de mantenimiento, y los problemas para la eliminación de oxígeno, cuya alta concentración puede producir problemas celulares de foto-oxidación.

En la Figura 57 podemos observar algunos prototipos de biorreactores. Los distintos diseños tratan de mejorar problemas como la accesibilidad de la luz, la mezcla de nutrientes, la eliminación de los excesos de oxígeno o los problemas generados por la acumulación de algas sobre las paredes del biorreactor (*biofouling*).¹⁰⁸

Los materiales investigados en el desarrollo de biorreactores microalgares tratan de abaratar costes para hacer posible su aplicación a gran escala; solucionar problemas de *biofouling*, seleccionando materiales antiadherentes; o evitar el daño celular, filtrando las radiaciones UV.

El éxito económico de la industria microalga depende tanto de las especies microalgares seleccionadas como de las mejoras en el diseño del biorreactor. Entre las mejoras más significativas en el diseño de los biorreactores están aquellas que afectan a los sistemas de iluminación, mezcla, agitación o aireación, así como a la eliminación del exceso de O₂; el suministro de nutrientes y el control del pH, de la temperatura o de la concentración de CO₂ que suministramos al cultivo.¹¹⁰

Los biorreactores en general, microalgares o no, pueden estar dotados de **sensores** que permitan monitorizar y controlar los parámetros que ejercen mayor influencia sobre la reacción biológica de interés. De esta manera, se mejora el rendimiento de la biorreacción y se reducen los costes de producción. Entre los parámetros más comúnmente monitorizados encontramos el pH, la temperatura o la concentración de O₂ (según el biorreactor).

La futura industria microalga, integrada en las tecnologías CCS, utilizaría como fuente de CO₂ los caudales emitidos por las chimeneas de grandes instalaciones como centrales térmicas o cementeras; el agua y los nutrientes podrían proceder de fuentes de aguas residuales, lo que ayudaría a minimizar gastos y, a la vez, serviría como sistema de tratamiento de aguas (Figura 58).

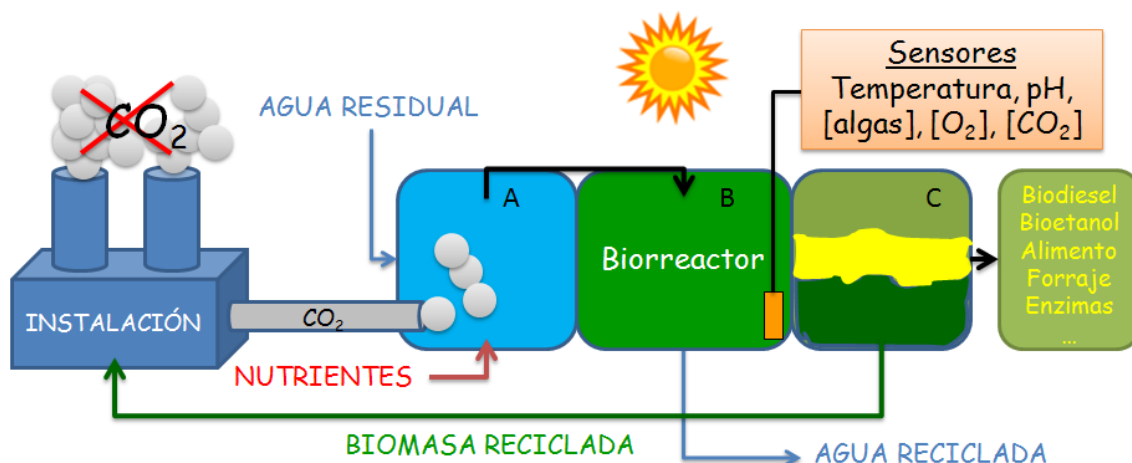


Figura 58. Esquema de un posible sistema CCS de cultivo microalgar. La corriente de CO₂ se mezcla con agua y otros nutrientes (A) y es incorporada en el biorreactor (B), transcurrido un tiempo la biomasa será tratada para obtener los componentes deseados (C).

Esta segunda parte de la Tesis Doctoral está integrada en una de de las actividades del **proyecto CENIT SOST-CO₂** (B2, **Figura 56**). Se trata de una de las actividades de transformación biomimética de las moléculas de CO₂, conocida bajo el título “*producción y desarrollo de cultivos de algas para la captación de anhídrido carbónico y la producción de biocombustibles*”. El grupo de investigación IBVF (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla), dirigido por el Prof. Miguel García Guerrero, fue el responsable de la selección de especies microalgares dotadas de una alta eficiencia en la fijación de CO₂ y que generan productos de alto valor añadido.

El objetivo principal de nuestro trabajo ha sido diseñar y desarrollar optosensores para la monitorización integral de la actividad biológica en los biorreactores microalgares para la producción de biocombustibles, utilizando como soporte experimental biorreactores y cultivos microalgares proporcionados por el grupo IBVF de Sevilla. Concretamente, hemos ideado sensores ópticos para tres de los parámetros más importantes en el funcionamiento de un biorreactor microalgar como son: la **concentración de oxígeno disuelto**, la **concentración de biomasa** y la **concentración de dióxido de carbono**.

Los tres optosensores están basados en complejos luminiscentes de rutenio(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos quelatantes; además, emplean el mismo dispositivo optoelectrónico multicanal, de forma que con un solo dispositivo podemos monitorizar los tres parámetros simultáneamente; y pretenden servir de herramientas analíticas que permitan mejorar la productividad del biorreactor y disminuir los costes de producción.

2. SENSORES DE OXÍGENO MOLECULAR

2.1. INTRODUCCIÓN

Los sensores de oxígeno juegan un papel muy importante en ámbitos tan diferentes como el medio ambiente, la salud o la industrial. Así, por ejemplo, el nivel de oxígeno disuelto es un parámetro crítico para determinar la salud de un río o para asegurar el buen funcionamiento de las balsas de tratamiento biológico de estaciones depuradoras de aguas residuales. Además, muchos procesos industriales requieren también de un conocimiento y control riguroso de la concentración de oxígeno disuelto o en fase gaseosa; entre éstos se encuentran, por ejemplo, la producción de acero, de cemento, de compuestos químicos (incluidos polímeros), de alimentos envasados en atmósfera protectora (atmósfera modificada para el empaquetado), en el funcionamiento de motores, etc.¹¹¹

La concentración de oxígeno en los biorreactores actúa como indicador de numerosos procesos biológicos tales como fermentaciones o producción de fármacos, así como en la fotosíntesis. Este último resulta fundamental para el desarrollo de la reacción biológica de interés. Por este motivo los sensores de oxígeno son herramientas habituales en los biorreactores industriales.

En los biorreactores microalgares se generan grandes cantidades de O₂ durante el proceso fotosintético; este hecho, puede suponer un problema puesto que elevados valores de O₂ pueden inhibir el proceso fotosintético que a su vez controla la asimilación del CO₂. Además, altas concentraciones de O₂ combinadas con altas dosis radiación solar pueden generar procesos de foto-oxidación que dañan las células. Para evitar estos problemas, los biorreactores microalgares deben evitar concentraciones de oxígeno disuelto (OD) superiores a 4 veces el valor de aire saturado.¹¹² Los biorreactores microalgares cerrados son especialmente susceptibles a la acumulación de grandes concentraciones de O₂, por lo que estos biorreactores incluyen en su sistema cámaras de desgasificación que permiten eliminar el exceso de oxígeno.

La monitorización del O₂ permite obtener información clave sobre el funcionamiento del biorreactor. Con esta intención se decidió fabricar un sensor óptico de oxígeno disuelto capaz de operar in situ en un medio particularmente difícil como es el cultivo microalgar, dada la elevada concentración de microorganismos que muestran una enorme tendencia a adherirse a todo tipo de superficies.

2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE OXÍGENO

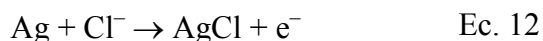
2.2.1. SENSORES ELECTROQUÍMICOS DE OXÍGENO

Los sensores electroquímicos de oxígeno aparecieron a mediados del siglo XX basados en dos principios de medida, potenciometría y *amperometría*.¹⁵ Los sensores *potenciométricos* miden un cambio de voltaje, mientras que los sensores *amperométricos* miden una variación en la corriente eléctrica; en ambos casos los cambios son producidos por la presencia de O₂ y son proporcionales a su concentración. De entre todos los sensores electroquímicos desarrollados para la medida de O₂ disuelto, el que mayor éxito ha tenido, tanto en el ámbito industrial como medioambiental, ha sido el denominado “electrodo de Clark”, un electrodo *amperométrico* desarrollado en el año 1956 y que ha venido utilizándose hasta el presente.

El *electrodo de Clark* mide los cambios de corriente producidos por la reducción catalítica del oxígeno molecular en la superficie de un cátodo de platino, según la siguiente reacción:



El cátodo está protegido del exterior por medio de una membrana de polímero permeable al O₂. La reacción de oxidación se produce en el ánodo gracias a la aplicación de un potencial externo (ca. 800 mV) a la célula electroquímica y según la siguiente reacción:



A pesar de su buena sensibilidad y rápida respuesta, los electrodos de Clark presentan una serie de inconvenientes para la medida *en continuo*, tales como:

- 1) La acumulación de AgCl en la superficie del ánodo, que puede producir una deriva en las lecturas del sensor y, finalmente, un fallo del sistema de medida.
- 2) La generación de OH⁻ (Ec. 11), que modifica el potencial del electrolito interno hacia valores negativos que pueden conducir a un desplazamiento del cero.
- 3) Los iones Cl⁻ (Ec. 12) del electrolito terminan por agotarse con el paso del tiempo.

Estos problemas se solucionan normalmente gracias a un mantenimiento periódico en que se limpia el ánodo y se reemplaza el electrolito. Según la aplicación del sensor y el volumen de muestra, también puede resultar un inconveniente el consumo de O₂ por parte del electrodo de Clark, que obliga a mantener un caudal continuo en la cámara de medida para mantener el equilibrio a ambos lados de la membrana. Además, el sulfuro de hidrógeno (H₂S) supone un importante interferente en las medidas del electrodo de Clark. Éste es un subproducto de la degradación de la materia orgánica por las bacterias anaeróbicas. El H₂S penetra también a través de la membrana del electrolito y se transforma en ión sulfuro (S²⁻) debido al pH alcalino del electrolito. El S²⁻ reacciona con

el ánodo de plata produciendo un precipitado de Ag₂S sobre la superficie del ánodo que, finalmente, impide su funcionamiento.

Las *celdas galvánicas* se presentan como alternativa (también amperométrica) a los electrodos de Clark. En ellas, las moléculas de O₂ se reducen espontáneamente en el cátodo (Pd, Cu, etc.) sin necesidad de aplicar un potencial externo, pero con el sacrificio del ánodo (Pb, Zn, etc.), que resulta oxidado irreversiblemente. Las reacciones implicadas en el proceso son las siguientes:



La reacción global produce la formación de Zn(OH)₂, que se desprende del ánodo en forma de escamas de óxido, evitando su interferencia en las lecturas de la corriente generada electroquímicamente como sucede en el electrodo de Clark con la acumulación de AgCl en el ánodo. La reacción global supone el consumo del ánodo metálico, que debe ser sustituido transcurrido un cierto tiempo (normalmente unos 5 años), lo que supone un inconveniente menor. El principal inconveniente de las celdas galvánicas para su aplicación en un biorreactor microalgar es que el CO₂ produce una gran interferencia en las medidas de O₂.

Finalmente, los *sensores potenciométricos* presentan la ventaja de no consumir el analito y de mostrar excelente sensibilidad para bajas concentraciones de oxígeno, pero su uso se ha centrado fundamentalmente en medidas del analito en fase gaseosa.

2.2.2. SENSORES ÓPTICOS DE OXÍGENO

Los sensores ópticos de oxígeno tienen su origen en los estudios realizados por H. Kaustsky en el año 1939, donde se describe por primera vez la fuerte disminución o extinción de la *luminiscencia* de determinadas moléculas orgánicas en presencia de oxígeno molecular.¹¹³

Los sensores ópticos de oxígeno se diferencian en función del tipo de compuesto *indicador* seleccionado y del *parámetro de la emisión* del mismo elegido para realizar la monitorización.

La mayoría de los sensores ópticos del mercado utilizan complejos de coordinación luminiscentes, bien basados en Ru(II) con ligandos orgánicos heterocíclicos quelatantes, o bien basados en la coordinación de Pt o Pd a porfirinas. La selección de unas u otras depende normalmente del intervalo dinámico donde vaya a trabajar el sensor de oxígeno. Por ejemplo, los complejos metalo-porfirínicos presentan mayores tiempos de vida del estado excitado, lo que les proporciona una mayor sensibilidad a bajas concentraciones de O₂ (pero un menor intervalo dinámico) que los complejos de Ru(II).⁶³

Los parámetros de la luminiscencia que se utilizan como señal analítica en los sensores ópticos son principalmente dos, intensidad y tiempo de vida de emisión, ambos

con ventajas e inconvenientes. Por lo general, las medidas de intensidad se realizan con dispositivos más baratos, pero muestran una serie de inconvenientes como la deriva de la medida producida el envejecimiento de la fuente de emisión o del receptor, el lavado de las películas indicadoras o la foto-degradación del indicador. Sin embargo, las medidas de tiempo de vida del estado excitado emisor son independientes de estos inconvenientes, pero requieren instrumentación opto-electrónica más costosa. La complejidad de los dispositivos que miden tiempo de vida de emisión es mayor para aquellos luminóforos que presentan tiempos de vida muy cortos (ns), pero disminuye si el estado excitado responsable de la luminiscencia presenta tiempos de vida entre 1 y 100 μ s. En el apartado 3.2 (página 70) de la primera parte de esta Tesis ya se han discutido algunos de los aspectos técnicos de las medidas de tiempos de vida del estado excitado.

Las virtudes de los sensores ópticos sobre los sensores electroquímicos han sido ya puestas de manifiesto ampliamente en la primera parte de esta Tesis Doctoral; entre ellas cabe recordar su insensibilidad a aquellos interferentes que sí afectan a los sensores electroquímicos (H_2S , CO_2 o NH_3); su mayor robustez; su facilidad de miniaturización; su mayor velocidad de respuesta y, sobre todo, el mucho menor mantenimiento que requieren. Esto último conduce a la drástica reducción de los costes de operación, aunque el coste inicial de adquisición sea algo mayor, lo que ha conducido a un rápido cambio de paradigma. En caso necesario, los sensores luminiscentes de O_2 se han recubierto de una película nanométrica de material polimérico que impide la adhesión de microorganismos, sin merma alguna en las características analíticas de los mismos.¹¹⁴

2.2.3. NUESTRO SENSOR DE O_2

A la vista de las consideraciones anteriores, se seleccionó un sensor óptico para medir la concentración de OD en el interior del biorreactor microalgar, basado en la utilización de un complejo de Ru(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos quelatantes.

Para la fabricación de la película sensora se utilizó la información obtenida en el trabajo previo descrito en el apartado 2.2 (página 64), de la parte primera de la Tesis Doctoral.

El complejo de Ru(II) seleccionado fue el mismo que el utilizado en el desarrollo del biosensor microalgar, esto es, el complejo de coordinación luminiscente tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) (obtenido en forma de dicloruro), que hemos abreviado como RD3. La síntesis del indicador luminiscente RD3 ha sido descrita anteriormente por nuestro grupo.⁵²

3. SENSORES DE CO₂

3.1. INTRODUCCIÓN

El CO₂ es un analito de enorme interés, tanto desde el punto de vista medioambiental como clínico.¹¹⁵ También es importante en ciertos procesos industriales de tecnología alimentaria como son la fermentación, la carbonatación de bebidas o la conservación de alimentos, entre otros.⁹⁸ En algunos bioprocesos, las fluctuaciones de los niveles de CO₂ están directamente relacionadas con el metabolismo global del ecosistema, como ocurre en los cultivos de microalgas.

En la Tabla 16 se recogen los niveles habituales de CO₂ en distintos tipos de muestras.

Tabla 16. Niveles de CO₂ típicos (a 25 °C) en distintos tipos de muestras.¹⁵

Muestra	[CO ₂]
Sangre	5% (1,6 mM)
Aliento humano	4–5%
Gases de automóviles	7–13%
Procesos de fermentación	≈ 100% (32,5 mM)
Atmósferas*	0,03–30%
Cultivo de microalgas	≈ 50 mM

* El nivel de CO₂ en la atmósfera está actualmente en continuo crecimiento debido al aumento de emisiones de CO₂; el intervalo especificado incluye la concentración en mezclas de gases para envasados en atmósferas protectoras.

Los parámetros que definen el equilibrio global del CO₂ son cuatro: pH, pCO₂, carbono inorgánico disuelto y alcalinidad total. La solubilidad del CO₂ en agua es aproximadamente 28 veces mayor que la de otros gases hidrófobos como, por ejemplo, el O₂ o el N₂.

La determinación de concentraciones de CO₂ no resulta excesivamente complicada; de hecho hay un gran número de sensores de CO₂ descritos en la bibliografía.¹¹⁶ Sin embargo, la particular naturaleza de los cultivos microalgares resulta un serio inconveniente para muchos de los sensores de CO₂ descritos en la literatura o disponibles en el mercado.

3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE CO₂

3.2.1. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA

La mayoría de los sensores de CO₂ comerciales *para medidas en fase gaseosa* utilizan detectores no dispersivos de infrarrojo (IRND). El dióxido de carbono puede determinarse por espectrometría IR gracias a que presenta una banda de tensión asimétrica y otra banda de flexión a 2350 cm⁻¹ y 650 cm⁻¹, respectivamente. Midiendo la intensidad de dichas bandas es posible determinar la cantidad de CO₂ en la muestra. Aprovechando esta característica, es posible aplicar la técnica de IR para determinar el contenido global de CO₂ liberado en muestras de agua, tras la acidificación previa de las mismas, valor que está directamente relacionado con el carbono inorgánico total presente en la muestra.

El carbono inorgánico total (también llamado carbono inorgánico disuelto) incluye todas las especies con carbono inorgánico presentes en disolución: CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ y CO₃²⁻. En medio ácido, los equilibrios ácido-base que involucran todas esas especies se dirigen hacia la producción de CO₂ (Figura 60).

Sin embargo, a pesar de ser una técnica muy sensible y rápida, en la práctica es difícil utilizar la espectrometría infrarroja para la determinación del carbono inorgánico disuelto debido a la importante interferencia que provoca la intensa absorción IR del agua en fase gaseosa. Por este motivo, en general, la determinación de CO₂ disuelto en agua se realiza mediante sensores electroquímicos u ópticos.

3.2.2. ELECTRODO DE pCO₂

Los sensores de CO₂ disuelto en agua han sido tradicionalmente, en su mayoría, los denominados “electrodos de *Severinghaus*”. Estos sensores son básicamente electrodos de pH que monitorizan la concentración de dicha especie a través de los cambios de pH en un medio acuoso situado en el extremo sensible, separado de la muestra mediante una membrana polimérica permeable al gas.¹¹⁷

El equilibrio entre la fase gaseosa y la fase acuosa viene establecido por la Ley de Henry según la cual, para una disolución diluida, la presión de vapor de un soluto en la fase gas está directamente relacionada con su fracción molar en la fase acuosa. Para aguas superficiales (a presión atmosférica), la Ley de Henry puede simplificarse a:

$$[\text{CO}_2] = K_H P_{\text{CO}_2} \quad \text{Ec. 15}$$

donde K_H es la denominada constante de Henry y P_{CO_2} es la presión parcial de CO₂ en la fase gaseosa en equilibrio con el agua. La P_{CO_2} puede determinarse con el electrodo de *Severinghaus* debido a la naturaleza ácida del CO₂ procedente del exterior, el cual provocará variaciones de pH en la disolución interna del electrodo. Ésta contiene NaHCO₃ y se encuentra confinada entre un electrodo de vidrio, que determina el pH, y una membrana hidrófoba permeable al CO₂. Dicha membrana permite el paso de

pequeñas moléculas neutras, como el CO_2 , e impide el paso de moléculas cargadas, como H^+ u otros cationes o aniones.

El electrodo de *Severinghaus* presenta importantes inconvenientes, como la interferencia debida a la presencia de gases de carácter ácido o básico, tiempos de respuesta lentos, propensión a las interferencias eléctricas, derivas de la señal causadas por las diferencias de presión osmótica, originada por la distinta concentración salina entre las disoluciones interna (electrolito) y externa (muestra) y problemas derivados de la contaminación del electrodo de referencia (un problema general de los sensores electroquímicos).¹¹⁸

Entre los sensores electroquímicos modernos para medidas de CO_2 en fase gaseosa, nos encontramos con los sensores de óxidos de metal, donde un ejemplo representativo serían los sensores “Nasicon”. Estos sensores están compuestos por un material sensible al gas que deseamos medir, unos electrodos y un calentador encargado de fijar la temperatura óptima a la cual se produce la reacción del gas de interés. En presencia del mismo, el óxido metálico produce la disociación del gas en iones cargados, lo que genera una transferencia de electrones. Los sensores de óxido de metal cuentan con la ventaja de poder miniaturizarse, tener una gran sensibilidad y selectividad. Entre sus principales inconvenientes destaca la necesidad de calentar a temperaturas comprendidas entre 300–800 °C, lo que puede ser un gran inconveniente dependiendo del medio donde queramos utilizar los sensores.¹¹⁹

3.2.3. SENSORES ÓPTICOS DE CO_2

Los sensores ópticos (*optodos*) de P_{CO_2} se presentan como una alternativa interesante a los sensores electroquímicos en determinadas aplicaciones. Estos sensores son normalmente robustos, baratos, fáciles de miniaturizar y pueden utilizar fibra óptica, por lo que podemos medir muestras situadas a largas distancias sin ningún tipo de interferencia o riesgo eléctrico.

A diferencia de los sensores electroquímicos, los sensores ópticos utilizan indicadores, colorimétricos o luminiscentes, sensibles a las variaciones de pH producidas en su disolución interna. Al igual que en los sensores electroquímicos, la acidez del electrolito interno en equilibrio está directamente relacionada con la concentración de ácido carbónico producido por la hidratación del CO_2 entrante a través de una membrana permeable al gas, el cual, a su vez, es directamente proporcional a la presión parcial de CO_2 en la muestra de agua. Basándose en este esquema de medida, se han desarrollado varios dispositivos ópticos sensibles a CO_2 , la mayoría de los cuales utilizan el indicador fluorescente HPTS (1-hidroxipireno-3,6,8-trisulfonato sódico) y miden la relación de intensidades de fluorescencia del indicador, en función del pH del agua en que se encuentra disuelto, excitando a dos longitudes de onda diferentes.¹²⁰

Mills y cols. introdujeron un nuevo esquema de medida para la construcción de sensores ópticos de $p\text{CO}_2$.¹²¹ En este caso, el indicador sensible a pH se incorpora en una membrana polimérica hidrófoba (generalmente, acetato-butirato de celulosa),

reemplazando la disolución acuosa interna de bicarbonato sódico por un hidróxido de amonio cuaternario húmedo, que es el encargado de generar posteriormente el ión bicarbonato tras ponerse en contacto con el CO₂ procedente de la disolución. A este nuevo tipo de sensores de CO₂ que no contienen electrolito acuoso en su extremo distal se les conoce como **sensores “sólidos”**, si bien la presencia de humedad en el interior de la membrana polimérica es imprescindible para el funcionamiento del sensor. Dependiendo del pK_a del indicador y de su concentración en la membrana polimérica, es posible determinar concentraciones traza de CO₂ en disolución, siendo los tiempos de respuesta más rápidos que los que muestran los **sensores de tipo “húmedo”** (i.e. aquellos que contienen el indicador óptico disuelto en una disolución acuosa de bicarbonato en su interior). Sin embargo, los sensores sólidos “tipo Mills” tienen el inconveniente de volverse opacos con el tiempo (por precipitación de las sales de amonio cuaternario hidrofóbicas tras deshidratación de la membrana, y por hidrólisis parcial de los esteres de celulosa) y de estar sujetos a una degradación progresiva de las moléculas del indicador por reacciones de tipo eliminación de Hofmann.¹²²

También se encuentran en la bibliografía (y, actualmente, en el mercado) sensores ópticos de CO₂ basados en *transferencia de energía por resonancia de Förster* (FRET), que utilizan un complejo de Ru(II) luminiscente como dador de energía y un indicador colorimétrico tradicional como especie aceptora (ambos contenidos en la misma fase sensora).¹²³ Como consecuencia de la difusión de CO₂ a través de dicha fase sensora, se produce una variación de pH que provoca un cambio de color en el indicador colorimétrico, variando de esta forma la eficiencia del proceso FRET entre ambas especies.

En 1990, Orellana y cols. descubrieron y patentaron un nuevo mecanismo de monitorización óptica de CO₂ basado en el uso de complejos de Ru(II) poliazaheterocíclicos con ligandos dotados de átomos protonables no involucrados en la coordinación al átomo metálico (e.g. pirazinas).¹²⁴ El mecanismo de respuesta de este tipo de sensores se basa en la desactivación de la luminiscencia del complejo de Ru(II) debida a la protonación de su estado excitado por un ácido de Brønsted presente en un electrolito interno situado en el extremo distal de una fibra óptica y separado de la muestra acuosa mediante una membrana polimérica permeable al gas. La entrada de CO₂ en el electrolito interno hace aumentar la concentración de ácido de Brønsted y, con ello, aumenta la contribución relativa del mecanismo de transferencia protónica a la desactivación del indicador fotoexcitado.^{124c} Como consecuencia de dicha protonación del estado excitado (típicamente irreversible^{124d}), disminuye la luminiscencia de los complejos de Ru(II), tanto en intensidad como en tiempo de vida de emisión, siendo posible utilizar ambos parámetros para cuantificar la concentración de CO₂ en el medio. Para aumentar la estabilidad mecánica del extremo sensible, normalmente el complejo de Ru(II) se encuentra inmovilizado en un hidrogel separado de la disolución problema por una fina membrana de silicona. La selección del tipo y concentración de ácido de Brønsted en el electrolito interno, del hidrogel y de la membrana permeable al gas es crucial para obtener una óptima respuesta al analito a las concentraciones de interés del mismo.¹²⁴

La principal ventaja de este tipo de principio es que permite utilizar toda la instrumentación optoelectrónica desarrollada para la medida con sensores luminiscentes de O₂ descritos más arriba. El principio de medida basado en FRET también ofrece esta posibilidad, si bien está sujeto al efecto del posible lavado o descomposición del aceptor (produce deriva de la señal), lo que no permite explotar al máximo las ventajas de la medida de tiempo de vida de emisión para la fabricación del sensor. Los sensores basados en la protonación del estado excitado del complejo de Ru(II) no están influidos por dicho efecto pero, si no se eligen indicadores de tiempo de vida suficientemente corto, están sujetos a la interferencia del O₂ que también penetra en el hidrogel que contiene el indicador.

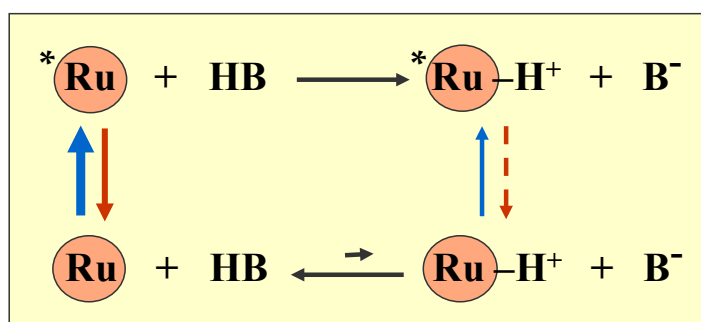


Figura 59. Principio de medida de sensores luminiscentes de CO₂ basados en la protonación del estado excitado de complejos de Ru(II) poliazaheterocíclicos. El complejo en estado fundamental (p.ej. el tris(2-(2-pirazinil)-1,3-tiazol)rutenio(II), abreviadamente “Ru” en la figura) está totalmente desprotonado ($pK_a = -1.9$); sin embargo, su basicidad aumenta más de seis órdenes de magnitud en estado excitado gracias al fuerte carácter aceptor de los ligandos pirazina. De esta forma, tiene lugar la transferencia protónica eficiente (irreversible) desde el ácido de Brønsted (HB) contenido en la fase indicadora (hidrógenofosfato, monohidrógeno ftalato, ácido acético, H_3O^+ , etc.) hasta el complejo de Ru(II) en estado excitado. El CO₂ que difunde a través de la membrana de silicona se hidroliza en la disolución reguladora interna aumentando la relación HB/B⁻, lo que producirá un incremento en la desactivación de la luminiscencia del complejo de Ru(II), con la consiguiente disminución de su intensidad y de su tiempo de vida de emisión. La intensidad de luminiscencia del complejo protonado es muy inferior a la de su base conjugada, por lo que apenas contribuye a la emisión total del sensor.

3.2.4. UN SENSOR DE CO₂ AVANZADO

Los sensores de CO₂ desarrollados por el grupo GSOLFA, dentro del **proyecto CENIT “SOST-CO₂”**, tienen como objetivo fundamental proporcionar una herramienta útil en el desarrollo de biorreactores microalgares para la producción de biomasa (fijación de CO₂) que sirva como materia prima en la obtención de biocombustibles a través de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Este objetivo está por delante del que supone el desarrollo de un sensor de CO₂ general, para múltiples aplicaciones o intervalos dinámicos de CO₂.

Así, en concreto, ha sido el objetivo fundamental de nuestro trabajo el desarrollar terminales suficientemente robustos y reproducibles, capaces de medir con precisión y exactitud en el intervalo de concentraciones de CO₂ disuelto presente en un biorreactor microalgar real (mM).

Entre los problemas e inconvenientes de los diferentes sensores de CO₂ que hemos ido mencionando, nos encontramos con el problema concreto de que, a las condiciones de pH a las que se encuentran los cultivos microalgares (pH ≈ 8–9), las moléculas de gas CO₂ disuelto se encuentran casi exclusivamente en iones bicarbonato (HCO₃⁻) (Figura 60). De hecho, muchas de las algas acuáticas se han especializado en captar y transportar el bicarbonato al interior de la célula para utilizarlo como fuente de carbono, aprovechándose así de su mayor concentración, 200 veces mayor que la del CO₂ disuelto en agua de mar.¹²⁵

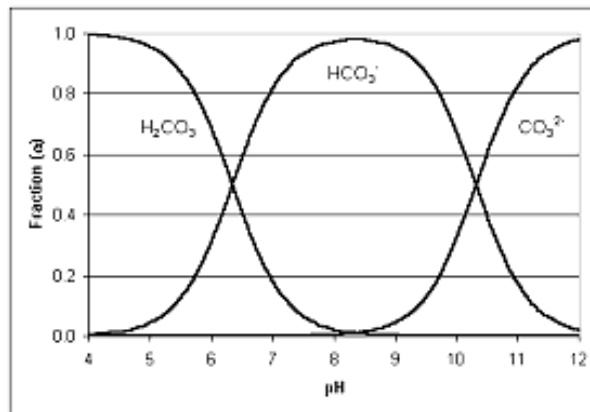


Figura 60. Diagrama de composición (en fracciones molares) del CO₂ en disolución acuosa, en función del pH.

De esta forma, cualquier sensor desarrollado para monitorizar la evolución del cultivo y rendimiento de un biorreactor microalgar ha de determinar la totalidad de las formas de CO₂ presentes en el cultivo. La solución propuesta en esta tesis doctoral pasa por realizar una acidificación en línea que desplace totalmente la mezcla de especies del CO₂ disuelto hacia la formación de H₂CO₃, molécula que rápidamente se deshidrata

para generar CO₂ gaseoso que es la especie analíticamente relevante para el sensor (v. supra).

Durante este proyecto hemos colaborado con el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, un centro mixto formado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Sevilla (USE), también perteneciente al consorcio del **proyecto CENIT SOST-CO₂** y, en particular, con la Dra. Mercedes García González. Este grupo trabaja investigando y seleccionando, tanto las mejores especies microalgares, como las condiciones de cultivo que permitan mejorar las tasas de crecimiento celular (fijación de CO₂). Para ello disponen de una batería de biorreactores de laboratorio (≈ 2 L) y de prototipos de mayor escala (≈ 350 L). Los biorreactores de laboratorio se utilizan para investigar las características de las especies seleccionadas bajo condiciones de luz (intensidad y ciclo luz/oscuridad) y temperatura controladas. Por otra parte, los prototipos de mayor volumen están dispuestos en la azotea del edificio del **Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja** (Sevilla), donde se investiga en ellos el comportamiento de los cultivos expuestos a condiciones medioambientales reales con iluminación solar. Los cultivos microalgares se airean continuamente para mantener la homogenización del sistema y evitar la sedimentación de las células. El suplemento de CO₂ se realiza en función de las necesidades del cultivo. Dichas necesidades se determinaban, hasta el inicio del proyecto y de una forma aproximada, con una medida del pH del cultivo, alterado por la naturaleza ácida del CO₂ en disolución.

Las medidas de pH se realizan por medio de un electrodo de vidrio pero, a pesar de que el electrodo de vidrio ofrece medidas rápidas, fiables y precisas, la membrana de vidrio del mismo se ensucia fácilmente, debido a la naturaleza específica y alta población de un medio de cultivo como el de un biorreactor microalgar, por lo que el dispositivo de medida requiere una continua limpieza.

El sensor de CO₂ desarrollado por nuestro equipo investigador en la UCM, en el que también ha participado la Dra. Clara Cano Raya (GSOLFA), realiza la determinación de la concentración de HCO₃⁻ presente en la muestra a través de un **dispositivo óptico** que utiliza nuevamente un **sensor luminiscente de O₂** como transductor. El principio de medida, novedoso a la par que sencillo si se consigue un diseño suficientemente robusto, se basa en monitorizar la concentración de OD (oxígeno disuelto) en una microcámara hermética de medida. La acidificación en línea de la muestra, en su camino hacia la cámara de medida, produce la generación de CO₂(g) que entra en la misma, alterando así la relación de gases por disminución de la concentración de OD presente en la cámara de medida. Esta disminución debe ser proporcional a la concentración de CO₂(g) de la muestra.

Esta estrategia indirecta de medida de CO₂ utiliza como robusto y sensible transductor de oxígeno, un complejo de Ru(II) luminiscente sensible a este analito. Los complejos de Ru(II) son interrogados por un dispositivo optoelectrónico, a través de fibra óptica. Un sistema FIA (*Flow Injection Analysis*), completamente automatizado e integrado en el dispositivo optoelectrónico, es el encargado de realizar la acidificación

en línea de la muestra. El principio óptico con el que interrogamos al transductor de oxígeno se basa en *medidas sensibles a la fase*, con lo que evitamos todas desventajas ligadas a las medidas de intensidad de luminiscencia (apartado 3.2, página 70).

Puesto que el sistema de medida incluye un tratamiento previo de la muestra (en línea) y un posterior análisis con el sensor óptico propiamente dicho, a menudo se utilizará la denominación de *analizador de CO₂*, en lugar de “sensor de CO₂”. La viabilidad del analizador de CO₂ desarrollado fue estudiada tanto con biorreactores de laboratorio como con biorreactores piloto.

4. SENSORES DE BIOMASA MICROALGAR

4.1. INTRODUCCIÓN

Se realizó un estudio preliminar para desarrollar un sensor que nos permitiera monitorizar la evolución del cultivo celular en el interior del biorreactor. Los cultivos celulares atraviesan una serie de etapas desde que son introducidos en un biorreactor hasta que se decide terminar con el proceso. La Figura 19 (página 49) muestra cómo, durante la fase de crecimiento exponencial, el cultivo celular presenta un crecimiento máximo donde el rendimiento metabólico y la asimilación de nutrientes (CO₂ entre otros) se vuelve óptima; por esta razón, no es de extrañar que los biorreactores, industriales o experimentales, traten de mantenerse constantemente en esta fase.

Cuando la concentración celular de un foto-biorreactor microalgar excede una concentración dada llegamos a la fase estacionaria, donde el crecimiento celular se reduce, o incluso se detiene. Esto es debido a que factores como la relación de nutrientes o la penetración de la luz disminuyen notablemente (Figura 19). Para evitar esta situación, se hace necesario llevar a cabo una monitorización de la concentración de microorganismos, de forma que podemos evitar alcanzar la fase estacionaria retirando parte del cultivo celular y sustituyéndolo por medio de cultivo fresco. De esta manera podemos mantener el biorreactor en la fase de crecimiento exponencial permanentemente, lo que nos permitirá mejorar la producción, ahorrar nutrientes y reducir el coste en tiempo y dinero.

En los biorreactores microalgares integrados en las tecnologías CCS, el crecimiento celular equivale a captación de CO₂, de forma que la monitorización celular se convierte en un parámetro fundamental.

4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES DE BIOMASA

Los métodos más comunes para medir la biomasa en un laboratorio son por peso seco de una muestra, su densidad óptica (absorbancia a una determinada longitud de onda), o por medio de una cámara de Neubauer (recuento celular). El grupo investigación del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC, USE), con el que hemos colaborado, emplea normalmente los dos primeros métodos para determinar la concentración de biomasa en sus biorreactores. Estos métodos son sencillos y eficaces pero ambos presentan inconvenientes:

1. Peso seco. Normalmente se filtra un volumen de 50–100 mL de las muestras celulares (filtros de microfibra de vidrio WHATMAN GF/C de 1,2 µm de poro y 70 mm de diámetro), lavando a continuación los filtros con unos 100 mL de agua destilada y secándolos a 80 °C durante 24–48 h. Una vez transcurrido ese tiempo, los filtros pasan al desecador antes de proceder al pesado de los mismos. El peso seco de las células se determina por la diferencia de peso (las muestras

se toman por triplicado). Este procedimiento, aunque fiable, resulta laborioso y lento, no permitiendo en modo alguno la determinación en línea de la biomasa microalgar existente en un momento determinado. No obstante, proporciona información práctica (gramos de CO₂ realmente fijados).

2. Densidad óptica de la suspensión. Se homogeneizan y diluyen (4X) muestras de 50 mL, para luego medir la absorbancia de la muestra a 700 nm en un espectrofotómetro (procurando que las microalgas no sedimenten). Las medidas de absorbancia se multiplican por un factor de 0,6465 para obtener directamente los gramos de biomasa. Este factor es la pendiente de una recta de calibrado (A₇₀₀ vs peso seco L⁻¹) realizada con anterioridad.

El segundo método es más rápido, pero sigue siendo laborioso, si bien es susceptible de automatización y medida en línea con un instrumento portátil dedicado (v. infra). No obstante, aunque pudiera adaptarse a la medida in situ y en continuo de la población microalgar en suspensión, nunca podría realizarse con sensores luminiscentes como los indicados anteriormente para la medida de O₂ o CO₂ disuelto en agua.

4.2.1. SENSORES ELECTROQUÍMICOS DE BIOMASA

La “espectroscopía” dieléctrica domina el sector de sensores de biomasa basados en principios electroquímicos, capaces de realizar medidas en línea y en tiempo real de la concentración celular en suspensión. Se utilizan principalmente en la industria cervecera para medir la concentración de levadura.¹²⁶ Esta técnica monitoriza las propiedades dieléctricas del cultivo, utilizando medidas de conductancia y capacitancia para medir la concentración celular.¹²⁷

4.2.2. SENSORES ÓPTICOS DE BIOMASA

En la bibliografía podemos encontrar sensores ópticos basados en medidas de *turbidimetría* para realizar medidas en línea, a través de la medida de la dispersión de la luz producida por el cultivo celular.¹²⁸ Sin embargo, la mayor parte de los sensores ópticos de biomasa están basados en medidas de *fluorescencia*.

Las medidas de fluorescencia son especialmente útiles en la monitorización de algas puesto que, de forma general, se puede relacionar la intensidad de la emisión de fluorescencia con la concentración de clorofila y ésta con la concentración (micro)algar presente en las aguas superficiales. **¡Error! Marcador no definido.** Esta información es útil para caracterizar ríos, lagos y costas, monitorizando la fluorescencia incluso desde satélites y aviones, en busca de alertas de la presencia de agentes contaminantes como fosfatos, nitratos, metales pesados o pesticidas que afectan de alguna manera al fitoplancton.¹²⁹ Esta información resulta también útil para monitorizar el afloramiento de poblaciones de algas que pueden afectar al sabor u olor del agua, que pueden resultar peligrosas para la salud o generar problemas de eutrofización de lagos.¹³⁰

Los sensores de fluorescencia también se pueden utilizar para determinar la biomasa de cultivos que carecen de moléculas de clorofila gracias a las moléculas de NAD(P)H (*nicotinamida adenina dinucleótido fosfato*). Estos sensores utilizan fuentes de excitación UV (≈ 280 nm) para excitar a las moléculas de NAD(P)H, que emiten a 350 nm,¹³¹ si bien las medidas en estas regiones espectrales son mucho más complicadas y sujetas a interferencias múltiples.

4.2.3. NUESTRO SENSOR DE BIOMASA

El cultivo de microalgas integrado en de las tecnologías CCS necesita realizar un control continuo de la población celular para un número alto de biorreactores, lo que resulta incompatible con los métodos de laboratorio, ya sea por peso seco o por medidas densidad óptica.

El sensor de biomasa ideado (pendiente de patente) utiliza también, como base de la medida, la relación que existe entre la emisión de las moléculas de clorofila y la concentración microalgar. De esta forma pretendemos desarrollar un sensor óptico que permita determinar la concentración celular de forma instantánea, evitando la extracción y el procesado de las muestras. Las medidas de fluorescencia directa son especialmente útiles para monitorizar la concentración microalgar de ríos y lagos, pero las elevadas concentraciones presentes en un biorreactor microalgar saturarían el detector por completo. Por ese motivo recurrimos a una herramienta óptica conocida por sus siglas en inglés DLR (*Dual Lifetime Referencing*), capaz de utilizar la emisión fluorescente de las moléculas de clorofila de una forma indirecta que interfiere en la determinación del tiempo de vida de emisión del sensor luminiscente. Esta técnica de medida utiliza como luminóforo de referencia un complejo de Ru(II) con ligandos heterocíclicos quelatantes.

El complejo de Ru(II) seleccionado es, una vez más, el mismo complejo de Ru(II) empleado en los transductores de O₂ (tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), abreviadamente, RD3). La ventaja de este indicador es que permite utilizar el mismo dispositivo de medida que el analizador de CO₂ y el sensor de O₂ de forma que, con un solo dispositivo, podemos medir 3 parámetros diferentes.

Los sensores de biomasa objetivo de este trabajo, tratan por tanto de superar las dificultades de medida expuestas más arriba, proporcionando dispositivos de determinación de biomasa en línea e in situ basados en el equipo optoelectrónico Optosen[®] utilizado en esta Tesis para la interrogación del biosensor de herbicidas y de los sensores de O₂ y CO₂ del cultivo microalgar. De esta manera, se avanza considerablemente hacia el objetivo final de disponer de un autómata analítico, basado en optosensores luminiscentes, para la determinación integral de parámetros clave en reactores microalgares para producción de biocombustibles.

PARTE EXPERIMENTAL

Tanto los biorreactores de laboratorio y piloto, como el dispositivo optoelectrónico (Optosen[®]) que realiza las medidas ópticas, son elementos comunes a los tres sensores desarrollados: **biomasa**, **CO₂** y **O₂ disuelto**.

La Dra. Mercedes García González del grupo de investigación en Biotecnología de Microalgas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF) del CSIC y la Universidad de Sevilla, proporcionó tres herramientas fundamentales para llevar a cabo este trabajo: el cultivo de microalgas, el biorreactor de laboratorio y el biorreactor de mayor escala (que denominaremos “piloto”).

El biorreactor de laboratorio se instaló en uno de nuestros laboratorios en la UCM. Este biorreactor se utilizó para mantener en crecimiento constante el inóculo de uno de los cultivos microalgares del grupo IBVF. El cultivo microalgar, mantenido dentro del biorreactor durante los dos años del proyecto CENIT que han solapado con esta Tesis, fue utilizado para realizar los ensayos experimentales de los tres sensores ópticos desarrollados.

Las algas son alimentadas por un medio de cultivo basado en BG-11 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE.UU., Tabla 2, página 36), al que se le añade un suplemento extra de 50 mM de NaHCO₃ (p.a., Scharlau, Barcelona, España).

El biorreactor de laboratorio utilizado para realizar las pruebas experimentales en las instalaciones de la UCM (Figura 7), es un sistema cerrado de forma tubular con un volumen aproximado de 2 L. Cuenta con un sistema de **iluminación artificial** compuesto por 6 tubos fluorescentes distribuidos en tres paneles que rodean al biorreactor proporcionando una iluminación total de 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.¹³² Un temporizador ayuda a simular las condiciones de iluminación solar, que de una forma simplificada corresponden a ciclos de 12 h de luz y 12 h en oscuridad.

La **alimentación** del reactor **con medio de cultivo** se realiza durante el ciclo de luz (12 h) y de una forma continua, por medio de una bomba peristáltica (1,5 mL min⁻¹). Un conducto situado en la parte superior del fotobiorreactor actúa como rebosadero, de forma que el volumen útil para el cultivo es de 1,8 L (Figura 61). El sistema está optimizado para mantener a las microalgas en condiciones de crecimiento exponencial, donde la captación de CO₂ es máxima (Figura 19, página 49).

El biorreactor es también alimentado por una **mezcla de gases** (98% aire, 2% CO₂ en volumen). Ésta entra por la parte inferior del biorreactor ayudando a mantener el cultivo en continua agitación, lo que facilita la interacción de todas las células con la fuente de luz y evita la sedimentación. Una bomba Millipore (XF54) inyecta aire atmosférico (1,2 L min⁻¹) con un caudal controlado por un rotámetro (Aalborg Instruments, TF Model, Monsey, N.Y., EE.UU.), mientras que el CO₂ procede de un cilindro comercial de CO₂ (99,999%, Praxair, Madrid); el caudal de este último (24 mL min⁻¹) también es controlado por un rotámetro (Key Instruments, MR3000 Series, Trevoise, P.A., EE.UU.). Ambos flujos de gases se mezclan por medio de una “T” de

plástico antes de entrar en el biorreactor. Mientras que el flujo de aire es continuo durante las 24 h del día para evitar que las algas se sedimenten, el flujo de CO₂ está ligado al ciclo de luz (12 h). Esto es debido a que la captación de CO₂ está asociada a la actividad fotosintética, que únicamente se realiza durante el ciclo de luz. De esta forma se evita derrochar materia prima (CO₂) y acidificar el cultivo en exceso durante el ciclo de oscuridad (por la hidrólisis del CO₂).

El biorreactor recibe un suministro de CO₂ (2%) mayor que el atmosférico ($\geq 0,03\%$) y tiene una producción típica de 0,5–0,6 g L⁻¹ día⁻¹ de masa celular seca.

El **dispositivo optoelectrónico** (Optosen[®]), utilizado tanto para el *analizador de CO₂* como para el *sensor de O₂* y el *sensor de biomasa*, es una versión más moderna del empleado para el biosensor microalgar (primera parte de esta Tesis Doctoral). Contiene una unidad optoelectrónica multicanal dotada de 4 fibras ópticas bifurcadas para hacer llegar la luz de excitación al indicador luminiscente correspondiente, inmovilizado en una película polimérica en el extremo distal de las fibras, y recolectar la luz de emisión. Como fuente de excitación emplea LEDs (470 nm) de alta intensidad, donde la fuente de excitación se modula según las necesidades del usuario (39 KHz en nuestro caso). El resto del dispositivo ha sido descrito previamente (apartado 3, página 45).

El Optosen[®] puede estar dotado de hasta 3 sondas de temperatura PT100 (RS-Amidata, Madrid, España) que se utilizan para registrar la temperatura en diferentes puntos y corregir la señal óptica del sensor.

Además, se empleó un controlador electrónico de flujo másico (ICP, Cantoblanco, Madrid, España) para caracterizar y calibrar los diferentes transductores utilizados en cada sensor. Los gases utilizados por el controlador electrónico de flujo másico proceden de cilindros comerciales de Carburos Metálicos (Madrid, España), el nitrógeno molecular (99,9992% puro) y de Praxair (Madrid, España), el oxígeno molecular (99,99% puro).

También se utilizó un baño termostático (Huber, Offenburg, Alemania) para caracterizar las desviaciones de la señal óptica producidas por la temperatura.

1. SENSOR DE OXÍGENO

El transductor opto-químico de oxígeno es utilizado tanto para el *sensor de O₂*, como para el propio *analizador de CO₂*. La película luminiscente indicadora es la misma que la empleada en el desarrollo del biosensor microalgar (primera parte de la Tesis). Como indicador de oxígeno molecular se utilizó el complejo de Ru(II) tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), que hemos abreviado como RD3. La síntesis del indicador luminiscente RD3 ha sido descrita anteriormente por nuestro grupo.⁵² Esta molécula luminiscente se inmoviliza en un soporte de silicona permeable al analito. La optimización detallada de la misma fue descrita en el apartado 2.1 (página 42) y ha sido ya publicada.⁵³ En esencia, consta de los siguientes componentes principales:

- Silicona RTV Dow Corning 3140 (Wiesbaden, Alemania).⁵⁴
- Sílice pirogénica (Sigma-Aldrich, 99,8%).⁵⁷
- Silicona RTV Dow Corning 3145G (Wiesbaden, Alemania).⁵⁴

La silicona 3145G se utiliza para evitar cualquier tipo de interferencia producida por la emisión de la clorofila microalgar. El desarrollo del terminal sensible requiere que la película indicadora esté adherida sobre la ventana por la que se interroga a las mismas. Con el fin de obtener películas sensoras reutilizables y robustas que soporten las duras condiciones de medida se hizo necesario un estudio sobre los diferentes componentes del terminal sensible, ventanas y método de adhesión, a partir de los siguientes componentes:

- Ventanas de vidrio (Menzel-Gläser & Co KG, Braunschweig, Alemania) o plástico (LasIRvis Optoelectronic Components Ltd, Winnards Perch, R.U.), de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor.
- Imprimación de silicona Dow Corning 1200 (Wiesbaden, Alemania).⁵⁴
- Adhesivos de silicona:
 - i) Dow Corning 3140 (Wiesbaden, Alemania).⁵⁴
 - ii) Dow Corning 1-2577 (Wiesbaden, Alemania).⁵⁴
 - iii) Dow Corning 1200 (Wiesbaden, Alemania).⁵⁴

La combinación de todos estos componentes proporcionó una gran variedad de terminales sensibles, que fueron introducidos en el biorreactor de laboratorio durante distintos periodos de tiempo, estudiando su robustez y su comportamiento analítico antes y después de ser introducidos en el biorreactor.

2. ANALIZADOR DE CO₂

2.1. TRANSDUCTOR DE O₂

La fabricación del transductor de oxígeno empleado en el *analizador de CO₂* se ha apoyado tanto en el trabajo introducido en la primera parte de esta Tesis Doctoral (apartado 2.2, página 43), como en el estudio realizado durante el desarrollo del sensor de O₂, integrado en este proyecto (SOST-CO₂).

Como indicador de oxígeno se utilizó el complejo de Ru(II), llamado tri(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) y abreviado como RD3. Esta molécula luminiscente será inmovilizada en un soporte de silicona, formada por:

- Silicona RTV Dow Corning 3140 (DC 3140, Wiesbaden, Alemania).⁵⁴
- Sílice pirogénica (Sigma 99,8%).⁵⁷
- Silicona RTV Dow Corning 3145G (DC 3145G, Wiesbaden, Alemania).⁵⁴

La silicona 3145G se utiliza para evitar cualquier tipo de interferencia producida por la clorofila microalgar.

La película indicadora de silicona se adhiere finalmente sobre una ventana de plástico resistente (LasIRvis Optoelectronic Components Ltd, Winnards Perch, R.U.).

2.2. SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

El analizador de CO₂ emplea un sistema FIA para (i) tomar automáticamente las muestras del biorreactor, (ii) realizar una acidificación en línea de las mismas, (iii) llevar las mezclas hasta la celda de medida y (iv) realizar ciclos de limpieza del sistema completo.

El sistema FIA del analizador Optosen[®], totalmente automatizado, está dotado de electroválvulas (NResearch Inc., Berna, Suiza) y bombas peristálticas (Ismatec, Glattbrugg, Suiza), además de un sistema de “Ts” y tubos de teflón (Omnifit, Diba Industries, Cambridge, R.U.) que conectan los diferentes caudales, electroválvulas y bombas peristálticas con la celda de medida. La acidificación de las muestras se realiza por medio de una solución acuosa de ácido fosfórico 0,4 M de pH \approx 1,3 preparada a partir de ácido fosfórico concentrado (p.a. Acros, 85%).

3. SENSOR DE BIOMASA MICROALGAR

Una vez más, como molécula indicadora se utilizó el mismo complejo de Ru(II) empleado en los transductores de O₂, el RD3. Diferentes cantidades de RD3 se disuelven en 100 µL de acetonitrilo (grado HPLC-gradiente, Scharlau, Barcelona, España). Una vez disuelto el indicador, se añaden 2,0 mL de adhesivo cianoacrilato (RS-Amidata S.A., Madrid, España) y se mezcla minuciosamente por medio de un agitador magnético bajo atmósfera de argón seco que evita el proceso de curación del cianoacrilato. Una vez homogeneizada la mezcla, se extraen alícuotas de 15 µL mediante una micropipeta analítica (M-100, Gilson Inc, Middleton, EE.UU.) y se depositan 15 µL de mezcla sobre cada una de las ventanas de plástico circulares de 10 x 1 mm (LasIRvis Optoelectronic Components Ltd, Winnards Perch, Inglaterra). La mezcla se deja curar durante un mínimo de 48 h antes de ser utilizada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie seleccionada para fijar el CO₂ es una *cianobacteria* conocida como *Anabaena*. Estos organismos son diazótrofos, esto es, que fijan el nitrógeno de la atmósfera como única fuente de este elemento, por lo que no requieren un suplemento externo como fuente de nitrógeno reduciendo el coste del medio de cultivo y la posibilidad de contaminación por microorganismos no diazótrofos. Su forma filamentosa facilita además el cosechado de la biomasa (Figura 61, izq.).

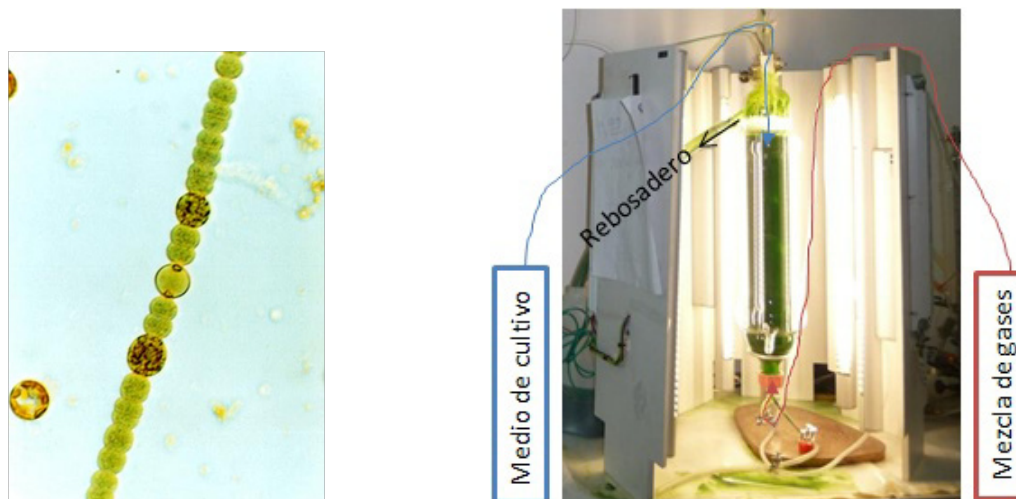


Figura 61. Fotografía de un cultivo *Anabaena solitaria* (izq.) (Fuente: www.tankonyvtar.hu/konyvek/novenytan/novenytan-1). Biorreactor de laboratorio en el que se han realizado los ensayos, cortesía del Grupo de Biotecnología de Microalgas del IBVF (dcha.).

Esta especie fue seleccionada porque exhibe, además, buenas propiedades de crecimiento celular ($\approx 0,1 \text{ h}^{-1}$, bajo condiciones de laboratorio); su intervalo de temperatura óptimo está comprendido entre 30 y 45 °C; tienen un intervalo amplio de tolerancia al pH (6,5–9,5) así como a la salinidad o la alta irradiación solar. Bajo ciertas condiciones, estos organismos liberan al medio de cultivo exo-polisacáridos con interesantes propiedades reológicas, además de acumular en su interior pigmentos que pueden aplicarse en la industria alimentaria o cosmética.¹³²

Para evaluar el funcionamiento de los sensores en condiciones ambientales reales, los diferentes dispositivos desarrollados fueron instalados en una planta piloto de cultivo microalgar enfocada hacia la captación de CO₂. La planta piloto está situada en la azotea del edificio del Centro de Investigaciones Científicas de la Isla de la Cartuja (CSIC, Sevilla).

Los biorreactores utilizados en esta planta piloto son bolsas de plástico especial (350 L) con forma de ortoedro, lo cual concede al biorreactor una apariencia similar a la de los biorreactores tipo paneles (Figura 57, B); una estructura metálica soporta y mantiene la forma de la bolsa (Figura 65, izq.).

1. SENSOR DE OXÍGENO

1.1. PRINCIPIO DE MEDIDA

El principio óptico de medida utilizado para interrogar a las películas indicadoras se basa, como ya se ha indicado, en medidas de luminiscencia con detección sensible a la fase, relacionadas directamente con el tiempo de vida del indicador luminiscente. De esta forma se evitan todos los inconvenientes relacionados con las medidas de intensidad en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes, como se expuso en el apartado 3.2 (página 70).

Se trata del mismo principio óptico que el explicado con anterioridad para el biosensor microalgar. La unidad optoelectrónica (Optosen[®]), responsable de realizar las medias analíticas mencionadas, proporciona la fuente de excitación azul LED modulada sinusoidalmente, que ilumina al complejo de rutenio(II) indicador. Las moléculas de O₂ desactivan el colorante excitado, disminuyendo el tiempo de vida en estado excitado de este último, con lo que decrece también el desfase (ϕ) entre la onda de excitación y la de emisión (Figura 31). Una relación de tipo Stern-Volmer nos permite relacionar el desfase observado con la concentración de oxígeno disuelto (Ec. 6, página 62).

1.2. CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR DE O₂

Para la caracterización del sensor de O₂, se realizó un calibrado en que se mide el valor de desfase frente a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (regulado por el controlador de flujo másico) y diferentes temperaturas (baño térmico). De esta forma podemos corregir las desviaciones en la señal de desfase producidas por la temperatura, como ya indicamos en la primera parte de la tesis.

Al tratarse de la misma película indicadora que la utilizada y caracterizada con detalle en el desarrollo del biosensor microalgar, observamos idéntico comportamiento que el mostrado en la Figura 46 (página 89).

1.3. DISPOSITIVO Y TERMINALES SENSIBLES

El equipo Optosen[®] utiliza uno de sus canales ópticos para interrogar la película indicadora de O₂ situada en el extremo distal de la fibra óptica bifurcada. Dicha película indicadora forma parte del terminal sensible de plástico que se introduce en el biorreactor microalgar gracias a la fibra óptica de longitud seleccionable a voluntad. Una de las sondas de temperatura (PT100), introducida en el biorreactor, registra valores de temperatura con la misma frecuencia que la de las medidas ópticas y envía los datos a la memoria del dispositivo optoelectrónico situada en la unidad de control de proceso (UCP) (Figura 62).

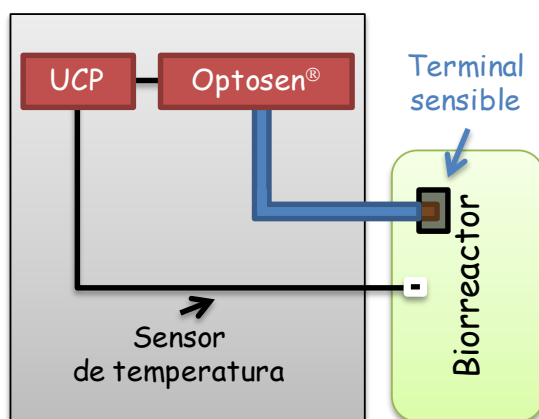


Figura 62. Representación de los componentes del sensor de O₂, dispositivo optoelectrónico, terminal sensible y sensor de temperatura.

El programa informático que recoge los datos del equipo Optosen® (S062806-03.00) corrige la desviación de la señal óptica producida por la temperatura y transforma la señal corregida en medidas reales de oxígeno disuelto, según los valores de la Figura 46 (página 89).

Las películas indicadoras, adheridas a la ventana-soporte, se introducen dentro de unos tornillos, especialmente fabricados para este proyecto, que permiten fijar la fibra óptica en contacto con la ventana soporte; a todo el conjunto se le denomina **terminal sensible** (Figura 63).



Figura 63. Terminal sensible luminiscente montado en el extremo distal de la fibra óptica bifurcada que conduce la luz desde/a el equipo Optosen®.

En este apartado se ha estudiado el comportamiento mecánico y óptico de diferentes terminales sensibles tras largos periodos de contacto con el cultivo microalga. El estudio se realizó con la intención de desarrollar terminales sensibles robustos, capaces de trabajar durante largos periodos de tiempo sin necesidad de ser sustituidos en un medio tan desfavorable como es el cultivo microalga de elevada concentración de biomasa. Para este estudio se realizó una batería de películas indicadoras utilizando diferentes soportes (ventana de plástico o de vidrio), imprimación (SI/NO) y adhesivos

de silicona; para corroborar los resultados, cada uno de los terminales sensibles fue fabricado por duplicado.

En primer lugar, se midieron los valores de desfase (ϕ) de las películas indicadoras para 0 y 21% de O_2 (a 25 °C) *antes* de tener contacto con el cultivo microalgar. A continuación, los terminales sensibles se introdujeron en el biorreactor microalgar durante diferentes periodos de tiempo (1, 3, 4, 7 y 23 semanas), transcurridos los cuales se comprobó la adhesión de la película indicadora a la ventana soporte y se volvió a medir el desfase de la luminiscencia para 0 y 21% de O_2 (a 25 °C). El propósito de las medidas de desfase fue comprobar posibles efectos del cultivo del reactor microalgar sobre el comportamiento de la película indicadora y, en especial, los posibles efectos de la adhesión de microorganismos (*biofouling*) a la película sensora.

Las condiciones extremas a las que se vieron sometidos los terminales estudiados hicieron que el proceso de selección se centrara principalmente en la estabilidad mecánica de los terminales, puesto que la mayoría se despegaban de sus respectivos soportes en mayor o menor grado, en tan solo una semana.

Finalmente, los terminales sensibles seleccionados fueron los únicos que demostraron una alta estabilidad mecánica. Estos terminales utilizan ventanas de plástico, ya que demostraron ser más resistentes que las de vidrio a los impactos mecánicos; además, la silicona parece adherirse mejor a la superficie de plástico que a la de vidrio. Se comprobó también que la aplicación de una capa de imprimación (DC 1200) mejora notablemente la actividad del adhesivo de silicona seleccionado (DC 3140).

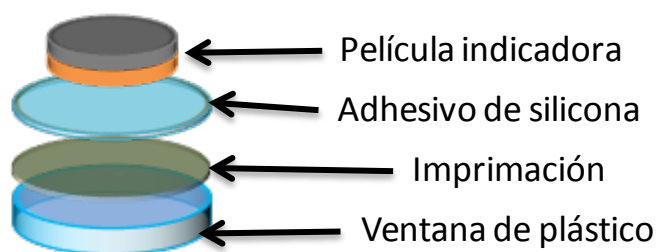


Figura 64. Composición del terminal sensible seleccionado para desarrollar el analizador de CO_2 . La figura presenta cada una de las capas por separado para clarificar la presentación. La ventana de plástico permite la interrogación de la película indicadora de O_2 .

El adhesivo de silicona DC 3140 actúa mejor como interfaz entre la capa de imprimación (DC 1200) y la película indicadora de oxígeno, porque esta última también utiliza como soporte idéntica silicona con lo que, al tener ambos materiales la misma composición, la interacción entre ambas se favorece.

Los terminales seleccionados, los más robustos mecánicamente, presentaron acumulaciones visibles de biomasa (*biofouling*) sobre su superficie.

La muestra como para 0% de O_2 la señal de desfase (ϕ) prácticamente se mantiene intacta (incluso durante 23 semanas), eso indica que la capa protectora (apartado 2.1,

página 129) evita las interferencias relacionadas con la fluorescencia de la masa acumulada sobre su superficie.

Tabla 17. Medidas de desfase para dos terminales (39 y 40) para concentraciones de 0 y 21% de O₂, realizadas antes y después de ser introducidas en el biorreactor microalgar durante 7 y 23 semanas.

Terminal	PRE-Algas		POST-Algas (7 semana)		POST-Algas (23 semana)	
	(0% O ₂)	(21% O ₂)	(0% O ₂)	(21% O ₂)	(0% O ₂)	(21% O ₂)
Sonda 39	49,6°	21,9°	49,3°	21,7°	49,5°	20,3°
Sonda 40	49,6°	22,0°	49,1°	21,6°	49,3°	20,2°

Al cabo de 23 semanas, si que se observan diferencias apreciables en los valores de desfase para 21% de O₂. Estas diferencias pueden ser importantes, sobre todo teniendo en cuenta la mayor sensibilidad de esta zona del sensor (Figura 41) y que el rango de trabajo del sensor de O₂ estará comprendido en la zona próxima a los 21% de O₂ disuelto.

Posiblemente esta deriva en la señal de los terminales para 21% de O₂ sea debida a la actividad metabólica de la capa de algas (*biofouling*) que consume las moléculas de O₂ próximas al transductor de O₂.

1.4. MEDIDAS IN SITU DE LA CONCENTRACIÓN DE O₂ DISUELTO

Para evaluar el funcionamiento del sensor de O₂ en condiciones mucho más cercanas a las reales en un biorreactor microalgar para producción de biocombustibles, el dispositivo desarrollado fue instalado en una planta piloto de cultivo microalgar diseñada para la captura de CO₂.

Los biorreactores utilizados en esta planta piloto son bolsas de plástico de 350 L con forma de ortoedro, lo cual concede al biorreactor una apariencia similar a la de los biorreactores de tipo panel (Figura 57B). Una estructura metálica soporta y mantiene la forma de la bolsa (Figura 65). Estas bolsas reducen el coste del sistema y facilitan las tareas de limpieza, necesarias para eliminar los problemas relacionados con la adhesión indeseable de microorganismos. Estos biorreactores son sistemas semi-cerrados, ya que la parte superior (estrecha) está en contacto con la atmósfera, favoreciendo la salida del exceso de oxígeno; no obstante, también incrementa el riesgo de contaminación del cultivo por otros microorganismos.



Figura 65. Biorreactor de bolsas introducidas en una estructura metálica con forma de ortoedro (izq.) y dispositivo sensor completo (dcha.), ambos instalados en la azotea del Centro de Investigaciones Científicas de la Isla de la Cartuja (Sevilla).

La Figura 66 muestra los datos recogidos durante uno de los experimentos (concretamente, el realizado durante el mes de Septiembre de 2011).

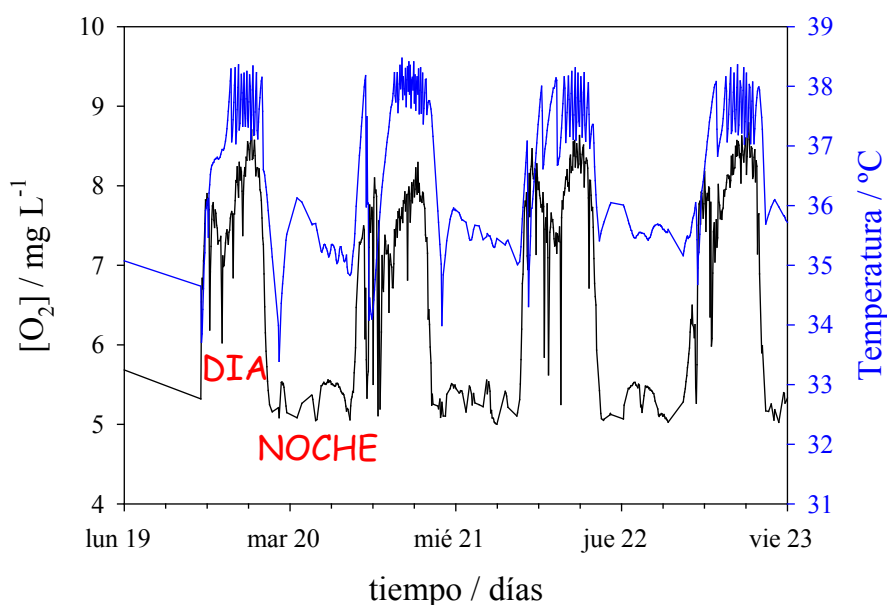


Figura 66. Medidas de O₂ disuelto (**negro**) y de temperatura del agua (**azul**) registradas por la unidad optoelectrónica (Optosen[®]) en las instalaciones de Sevilla.

La Figura 66 muestra que, durante la noche, la ausencia de fotosíntesis produce una fuerte disminución de los niveles de oxígeno disuelto, llegándose a niveles entre 5,0–5,5 mg L⁻¹. Durante las horas de luz, el proceso fotosintético eleva los valores registrados hasta concentraciones que superan los 8,2 mg L⁻¹, lo que equivale a una saturación aproximada del 125% para las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua en equilibrio con el aire a las temperaturas registradas durante el día (≈ 37 °C).

2. SENSOR DE CO₂ DISUELTO

2.1. PRINCIPIO ÓPTICO DE MEDIDA

El analizador de CO₂ también emplea como elemento transductor opto-químico la misma película indicadora de O₂ que utilizan, tanto el biosensor microalgar como el sensor de O₂ descritos anteriormente en esta Memoria. Por lo tanto, el principio de medida del sensor luminiscente se basa en las medidas de emisión sensibles a la fase.

2.2. TRANSDUCTORES DE OXÍGENO Y TERMINALES SENSIBLES

Durante el desarrollo del analizador de CO₂, se ensayaron diversos formatos de terminal sensible a partir de la información obtenida en el estudio del sensor de O₂. Finalmente se seleccionó el formato de terminal sensible que demostró mejores propiedades para el sensor de O₂, formado por la película indicadora, ya descrita con detalle en esta Memoria, unida a una ventana de plástico que se interpone entre la primera y la fibra óptica procedente del equipo Optosen, mediante una capa de imprimación y un adhesivo de silicona (Figura 64).

La Figura 67 muestra la señal detectada por el analizador de CO₂ con una película indicadora desprovista de aislante óptico y una película “protegida” de la luz mediante una capa de silicona gris.

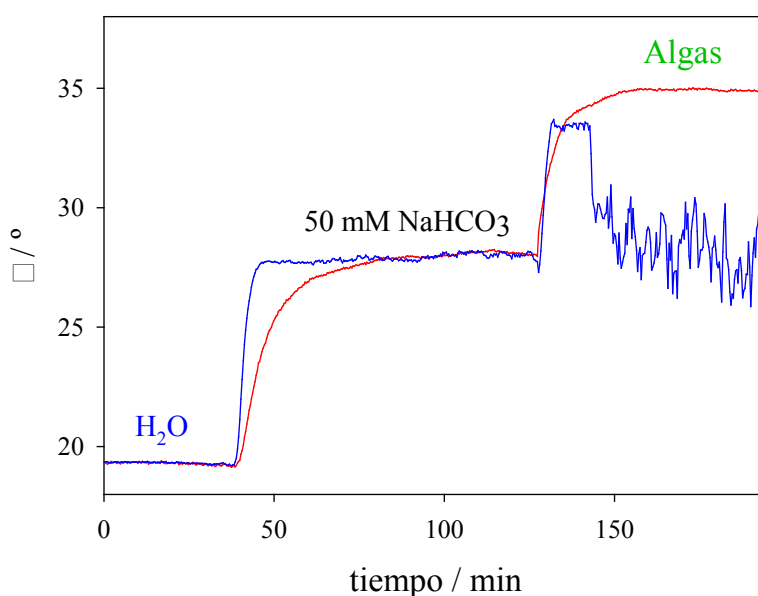


Figura 67. Respuesta del analizador de CO₂ con dos películas luminiscentes indicadoras de oxígeno diferentes (transductores). La composición de la zona sensible es idéntica en ambos casos, pero una está dotada de una capa protectora gris de aislamiento óptico (rojo) y la otra carece de ella (azul). La figura muestra la respuesta del sensor sumergido en agua, en una disolución de hidrógenocarbonato (50 mM) y en una muestra de microalgas.

Se observa perfectamente cómo la emisión de la clorofila microalgar afecta de forma importante a la señal analítica, hasta el punto de impedir totalmente llevar a cabo la medida deseada.

Al introducir la muestra de algas se desplaza una mayor cantidad de moléculas de oxígeno, el desfase crece aun más, lo que indica una mayor concentración de hidrógenocarbonato. Esto es debido a que el medio de cultivo, basado en BG-11, además de estar suplementado con 50 mM de NaHCO₃, recibe durante 12 h al día un flujo constante de CO₂(g).

La grave interferencia en la película sensora luminiscente que carece de aislante óptico se debe a que, en tal caso, la intensa emisión azul proveniente del LED de excitación no es absorbida por completo por la película sensora y es capaz de excitar la fluorescencia de la clorofila de las microalgas ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 470 \text{ nm}$). Como, además, la longitud de onda del máximo de la banda de emisión de la clorofila (645 nm) es similar a la de los complejo de Ru(II) (610 nm), el equipo optoelectrónico Optosen recoge simultáneamente ambas emisiones. Sin embargo, mientras que la emisión de largo tiempo de vida (μs) del complejo metálico produce un desfase en la emisión de unos 45° a la frecuencia de modulación del LED de excitación utilizada (39 KHz), el cortísimo estado excitado emisor de la clorofila ($\tau = 0.5 \text{ ns}$) produce, a la misma frecuencia de modulación de la excitación, un desfase de $\sim 0^\circ$ en la señal sinusoidal de emisión. El resultado final es la observación de un desfase de la emisión más corto que el que se mediría en ausencia del interferente (clorofila microalgar), tanto menor cuanto mayor sea la intensidad de la emisión de éste.

Este fenómeno de detección simultánea de emisiones del mismo color de sendos luminóforos que, sin embargo, difieren considerablemente en sus tiempos de vida de emisión, se ha utilizado en numerosas ocasiones para convertir variaciones de intensidad absoluta de fluorescencia en cambios de tiempo de vida de emisión, pudiendo así utilizar la detección sensible a la fase como parámetro analítico (técnica denominada como “*dual lifetime referencing*” o DLR).¹³³

2.3. TERMINALES SENSIBLES Y CELDA

El núcleo del analizador de CO₂ está formado por una **celda de medida**, de acero inoxidable, especialmente diseñada para satisfacer las necesidades del método de medida. Se trata de una cámara de flujo transversal doble que consta de dos sub-cámaras de muestreo paralelas e independientes entre sí; ambas cámaras son totalmente idénticas, tanto en el diseño de la cámara como en los terminales sensibles alojados en su interior. Las diferencias entre ellas vienen determinadas por la configuración de los sistemas FIA externos a la celda de medida. Denominamos **cámara de medida** a aquella cámara donde se introducen las muestras provenientes del biorreactor, que han sido acidificadas y que, por tanto, contienen CO₂(g) que ha sido expulsado de la disolución por la acidificación repentina (A). La **cámara de referencia** es idéntica a la

cámara de medida, pero las muestras que se introducen en ella no han sido acidificadas y, por tanto, carecen de $\text{CO}_2(\text{g})$ (B).

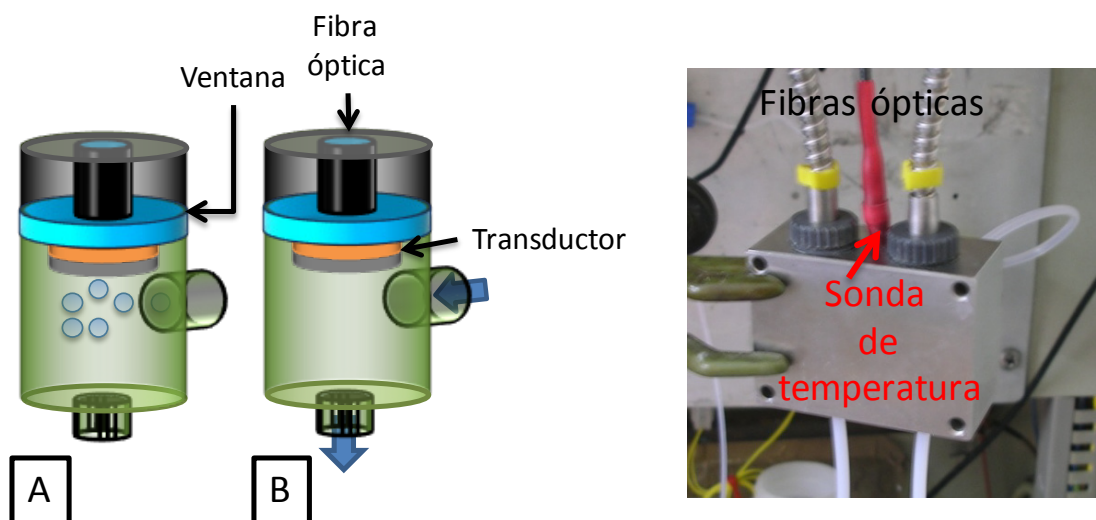


Figura 68. Esquema del interior de la celda de medida; A, cámara de medida; B, cámara de referencia y fotografía de la celda de medida real fabricada en los Talleres de Asistencia a la Investigación de la UCM.

La celda de medida dispone, además, de una cavidad donde se introduce una sonda de temperatura (Figura 68, dcha.) que nos permitirá corregir las desviaciones de la señal óptica producidas por la temperatura.

El diseño de la celda ha variado durante el proyecto, tratando de mejorar sobre todo el *proceso de limpieza* automática de la misma, dotándola de una entrada lateral y salida en el fondo de cada cámara. Cada cámara quedan sellada por el propio terminal sensible, con ayuda de una junta tórica presionada por un tornillo perforado; esta perforación permite introducir la fibra óptica que interroga a las películas indicadoras.

2.4. GENERACIÓN DEL ANALITO Y SISTEMA FIA

El cultivo de microalgas, alimentado con una fuente de CO_2 (entre otros nutrientes), presenta un pH entre 8 y 9. En estas condiciones, las moléculas de CO_2 se encuentran mayoritariamente en forma de ión hidrógenocarbonato (HCO_3^-) (Figura 60). Por tanto, si deseamos analizar el $\text{CO}_2(\text{g})$, es imprescindible acidificar la muestra ($\text{pH} \approx 4$) para desplazar cuantitativamente el equilibrio ácido-base hacia la formación del analito. El método seleccionado para realizar la acidificación de las muestras se basa en una adición en línea de una disolución acuosa concentrada de ácido fosfórico (H_3PO_4 0,4 M).

Por otra parte, las altas concentraciones celulares presentes en el biorreactor ($0,3\text{--}0,8 \text{ g L}^{-1}$ en peso seco) fuerzan a realizar ciclos de limpieza periódicos que eviten la formación de pequeños biorreactores en el interior de la propia cámara de medida, cuya

actividad biológica podrá afectar al normal funcionamiento del sensor de CO₂. Estos ciclos automáticos de limpieza se realizan alternando agua y solución ácida (H₃PO₄ 0,4 M). De esta forma, el analizador de CO₂ realiza alternativamente ciclos de medida y de limpieza por medio del sistema FIA automatizado. Las electroválvulas (**E** y **T**, Figura 69) controlan que la corriente líquida generada por la bomba peristáltica (**B**) sea de muestra, de agua o de disolución ácida concentrada de lavado, según el programa diseñado por el usuario.

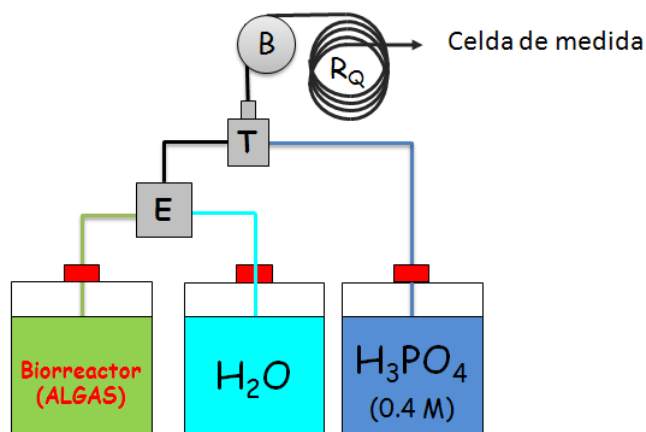


Figura 69. Esquema del dispositivo de análisis por inyección en flujo (FIA) que alimenta la celda de medida del analizador de CO₂, donde el depósito de disolución de H₃PO₄ está conectado por medio de una “T” con el biorreactor o del depósito de agua, en función de la configuración de la electroválvula (**E**). La mezcla de ambos caudales se realiza en el reactor químico (**R_Q**) y una bomba peristáltica (**B**) impulsa todo el sistema.

Se denomina reactor químico (**R_Q**, Figura 69) al circuito de tubo de poli(tetrafluoroetileno), de una longitud seleccionada (1 m), cuya misión es favorecer la mezcla total entre el ácido y la muestra/agua *antes* de llegar a la celda de medida.

2.5. DISPOSITIVO ANALÍTICO COMPLETO

El cuerpo del analizador de CO₂ (Figura 16) es un armario de acero diseñado para poder trabajar a la intemperie, tanto en condiciones de fuerte insolación, como bajo la lluvia, con elevadas o con bajas temperaturas. Consta de tres partes diferenciadas: el dispositivo optoelectrónico (Optosen[®]), el sistema FIA y la UCP, que controla todo el sistema.

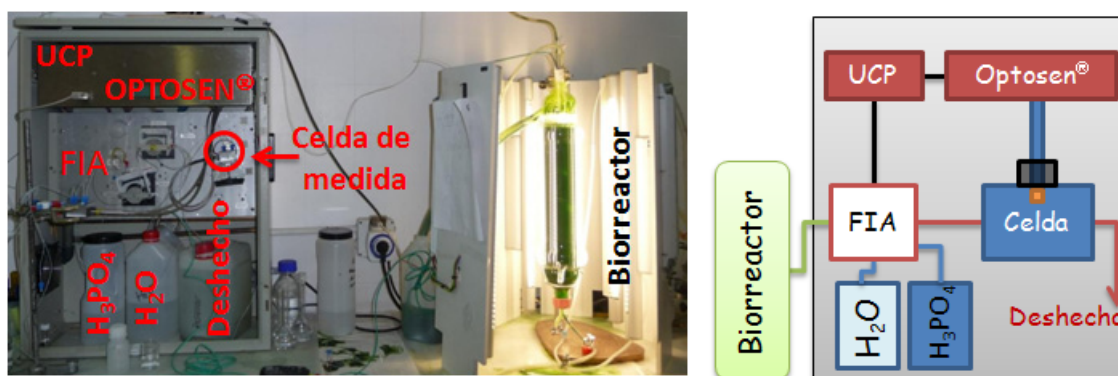


Figura 70. Fotografía y esquema del analizador de CO₂ instalado en nuestros laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM.

En el interior del armario se pueden introducir tanto la celda de medida como los distintos reactivos necesarios para el funcionamiento del analizador de CO₂ (Figura 70).

2.6. PLANTEAMIENTO DE LA MEDIDA

El principio de medida del analizador de CO₂ total en el cultivo microalgar se basa, como hemos indicado, en monitorizar la concentración de O₂ disuelto (OD) presente en el interior de la cámara de medida. El CO₂(g), generado por la acidificación de la muestra, llega a la cámara de medida desplazando a los gases presentes en ésta (O₂ y N₂ principalmente, provenientes de la disolución del aire). Al desplazar el OD de la muestra en la cámara de medida, en la que se encuentra sumergido el optosensor, se produce un incremento en la intensidad, tiempo de vida y desfase (ϕ) de la señal luminiscente, que será proporcional a la cantidad de CO₂ generada. El programa informático de control y recogida de datos del Optosen[®] nos proporciona valores de OD gracias a un calibrado previo del equipo que incluye los parámetros de desfase (ϕ), OD y temperatura (Figura 46, página 89).

El principal *inconveniente* de este principio de medida reside en que la concentración de OD de una disolución depende de varios factores: temperatura, presión atmosférica, concentración de sales, actividad biológica, etc. La acidificación previa de la muestra, inmediatamente antes de su entrada en la cámara de medida introduce un nuevo factor (“concentración de CO₂ disuelto”), pero no elimina los anteriores. Si queremos aislar este nuevo factor debemos usar necesariamente *un canal de referencia* que cancele todos los factores que influyen en la medida menos el que se desea determinar.

Para ello, necesitamos una celda de medida que incluya dos canales independientes, un canal de medida (**CM**) y un canal de referencia (**CR**):

- La muestra que atraviesa el canal de medida (**CM**) se acidifica previamente a la entrada, por lo que contiene CO₂(g). De este modo, el optosensor de OD

presente en este canal monitoriza las variaciones de OD debidas a la $[\text{CO}_2]$, temperatura, presión atmosférica, etc. (Figura 71A y C).

- La muestra que atraviesa el canal de referencia (**CR**) *no se acidifica*, por lo que este canal monitoriza las variaciones de OD debidas únicamente a la temperatura, presión atmosférica, etc., pero **no a la $[\text{CO}_2]$** (Figura 71B y D). Este canal ofrece información sobre la concentración OD inicial ($\text{OD}_{\text{inicial}}$) de la muestra, previa a la acidificación.

El sistema FIA tiene una configuración diferente para cada canal: la disposición de los depósitos de agua y ácido se permuta, de forma que la acidificación de la muestra sólo se produzca en el canal de medida (CM). Los ciclos de muestreo/limpieza se realizan por medio las dos electroválvulas mencionadas anteriormente, de medida y referencia (E_M y E_R , respectivamente), controladas por el programa informático del Optosen[®] según las condiciones seleccionadas por el usuario (Figura 71A y B).

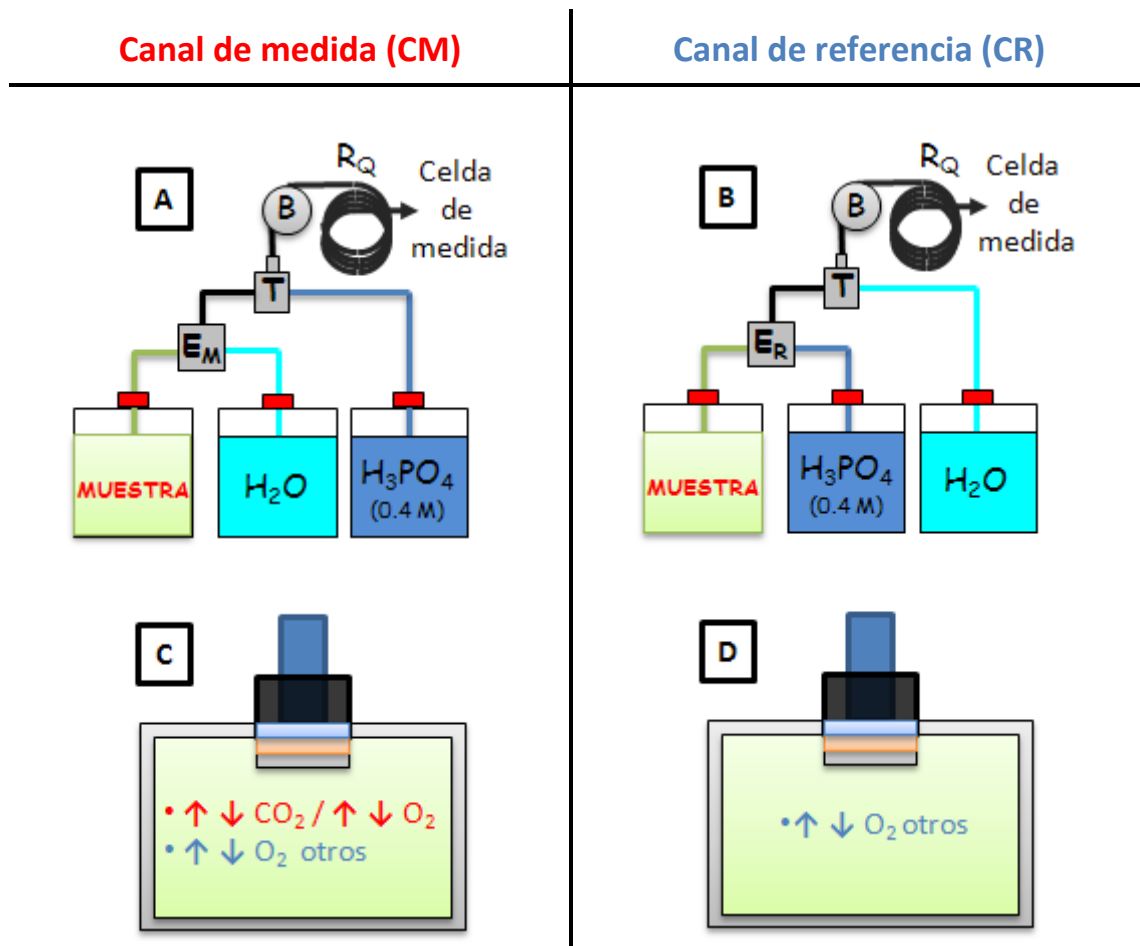


Figura 71. **A** y **B** muestran los diferentes sistemas FIA utilizados para el canal de medida y referencia, respectivamente. **C** y **D** muestran los factores que alteran la concentración de oxígeno disuelto dentro de las cámaras de medida y referencia, respectivamente.

Durante el ciclo de medida, el programa informático del Optosen[®] actúa sobre las electroválvulas para que, por medio de la bomba peristáltica (**B**, Figura 71), realicen la

toma de una corriente de muestra (NaHCO_3 o algas). A continuación, la corriente de muestra se mezcla con una corriente de ácido/ H_2O (**CM/CR**, respectivamente), gracias a la conexión en “**T**”. Finalmente, la mezcla resultante en cada caso llega a la celda de medida donde se monitoriza la concentración de OD de la mezcla. La configuración del sistema FIA del **canal de medida** produce la acidificación de la muestra y con ella el desprendimiento de CO_2 , no ocurriendo lo mismo en el **canal de referencia**.

Durante el ciclo de limpieza, las electroválvulas (**E_M** y **E_R**) cambian su configuración automáticamente, para realizar la toma de una corriente de agua y otra de ácido (**CM** y **CR**, respectivamente) que serán también mezcladas con las corrientes fijas de ácido y agua (**CM** y **CR**, respectivamente) (Figura 71). La solución ácida resultante de ambas mezclas, llega a las dos cámaras de medida para llevar a cabo la limpieza del sistema que evite los problemas de la adhesión de los microorganismos (*biofouling*).

La Figura 72 muestra los resultados de una típica medida, en la que introducimos muestras de referencia de concentración en hidrógenocarbonato creciente (30, 60 y 90 mM). En el canal de medida, la electroválvula de medida (**E_M**, Figura 71) permite el paso de la corriente de las muestras, que se mezclará con la corriente de la solución ácida (H_3PO_4 0,4 M) en la “**T**”. Durante el recorrido a través del reactor químico (**R_Q**, Figura 71) se produce la acidificación que desplaza el equilibrio hacia la formación de $\text{CO}_2(\text{g})$. La mezcla final (muestra+ácido+ CO_2) llega al **canal de medida**, donde se registra el valor de la OD, que dependerá, entre otros factores, de la concentración de hidrógenocarbonato/ CO_2 presente en la muestra.

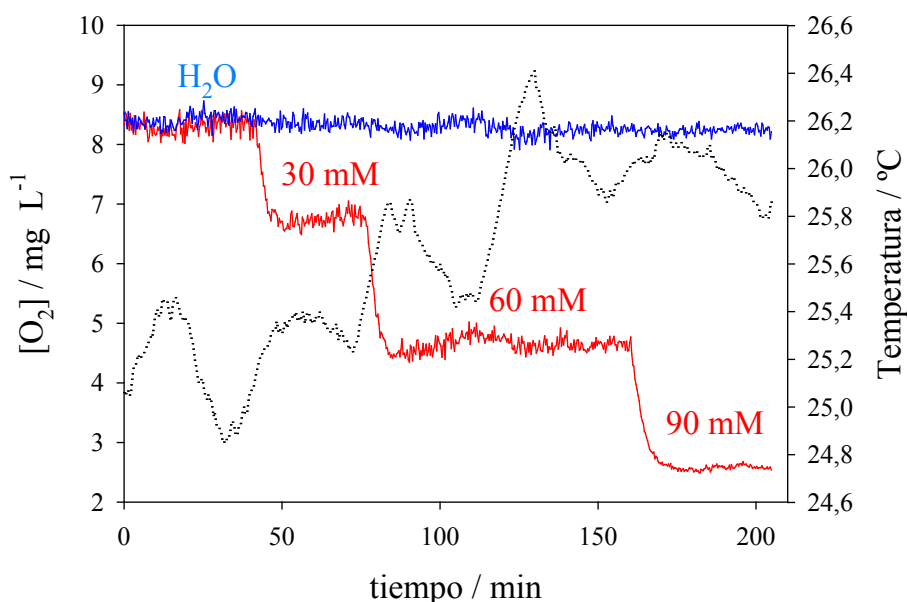


Figura 72. Experimento llevado a cabo en el laboratorio, donde se observan las diferencias en la señal de OD del canal de medida (**rojo**) y referencia (**azul**) durante un experimento con muestras acuosas de $[\text{NaHCO}_3]$ creciente (30, 60 y 90 mM). La línea de puntos indica en todo momento la temperatura en la celda de medida.

Por otra parte, la configuración FIA del **canal de referencia** (Figura 71) hace que la corriente de muestra se mezcle con una de agua sin acidificación alguna, por lo que no

hay desprendimiento de $\text{CO}_2(\text{g})$. La mezcla final (muestra+agua) llega al **canal de referencia**, donde se registran los valores de OD, que dependerán de cualquiera de los parámetros descritos menos de la concentración de hidrógenocarbonato (CO_2) presente en la muestra (Figura 72).

En el eje de ordenadas de la izquierda (Figura 72) se representa el valor de OD durante el experimento, donde se puede observar perfectamente el diferente comportamiento que presentan el **canal de medida** y el **canal de referencia**, frente a las muestras de hidrógenocarbonato. En el eje ordenadas de la derecha (Figura 72) se representan los valores de temperatura registrados durante el experimento. El **canal de referencia** es especialmente útil para ver la relación entre la temperatura y el valor de $\text{OD}_{\text{inicial}}$.

La Figura 72 sirve para ilustrar el diferente comportamiento de ambos canales (**CM** y **CR**) en presencia de las mismas muestras, pero es importante entender que *el principio de medida del analizador de CO_2 no se basa en medidas directas del OD total, sino en medidas del OD desplazado por el CO_2 generado por acidificación*. Por tal motivo, es imprescindible utilizar un **canal de referencia** que actúe de línea base de la señal.

La concentración de **OD desplazado** por el CO_2 generado en la acidificación viene dada por la diferencia entre ambas señales (Ec. 16).

$$\text{OD desplazado por } \text{CO}_2 = (\text{Señal CR}) - (\text{Señal CM}) \quad \text{Ec. 16}$$

Por medio de la Ec. 16, los datos registrados en la Figura 72 para los canales de referencia y de medida, se transforman en la función de respuesta de la Figura 73.

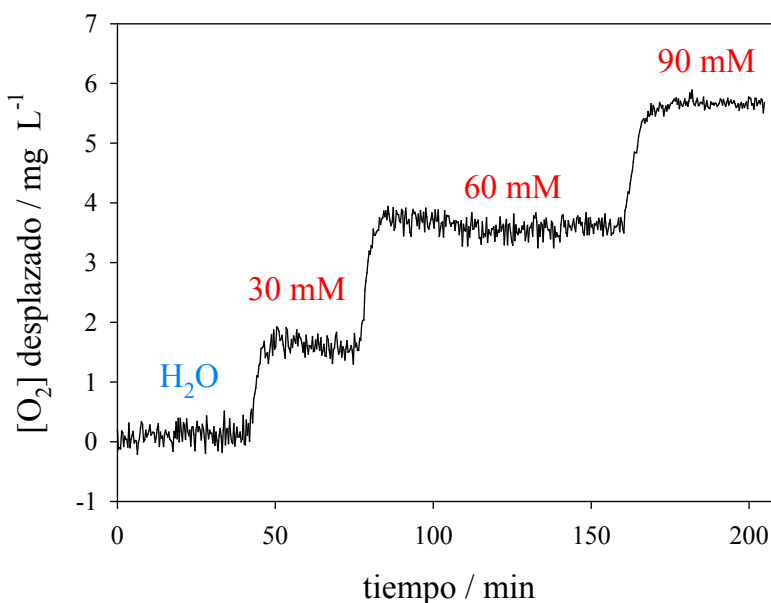


Figura 73. OD desplazado por el CO_2 durante un experimento con muestras acuosas de $[\text{NaHCO}_3]$ creciente (30, 60 y 90 mM).

Cuanto mayor es la concentración de NaHCO_3 , mayor es el desplazamiento de OD en la cámara de medida.

Llegados a este punto, la señal de *OD desplazado por CO_2* puede calibrarse para relacionar directamente la **concentración de hidrógenocarbonato** (transformado cuantitativamente en CO_2) presente en la muestra con la **concentración de OD desplazado por CO_2** de la cámara de medida. Las diferencias entre los calibrados de la Figura 74 y la Figura 75 muestran la importancia de introducir un canal de referencia que corrija la señal del canal de medida.

Ambas figuras representan los datos de cinco calibrados distintos, pero en la Figura 74 no se tiene en cuenta la información registrada por el canal de referencia, por lo que no hay, por tanto, corrección de la señal del canal de medida. En la Figura 74 no se aplica la Ec. 16, ya que no hubo un registro de los valores de $\text{OD}_{\text{inicial}}$. Por ello, los valores de *OD desplazado por CO_2* se calculan según la Ec. 17.

$$\text{OD desplazado por } \text{CO}_2 = 7,62 \text{ mg L}^{-1} - (\text{Señal CM}) \quad \text{Ec. 17}$$

El valor de $7,62 \text{ mg L}^{-1}$ es el valor experimental publicado de OD en agua para una presión atmosférica de 705 Torr y una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.¹³⁴ El valor de 705 Torr corresponde a la presión atmosférica media registrada durante los días en los que se realizaron los experimentos.

El canal de medida registra los valores de OD para distintas concentraciones de hidrógenocarbonato (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mM), que se introducen en la Ec. 17 para representar los valores de la Figura 74.

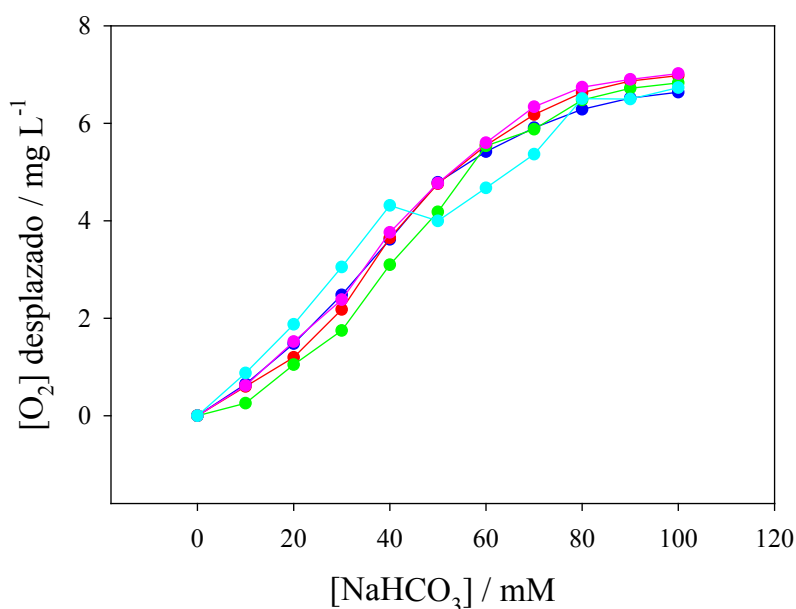


Figura 74. Cinco calibrados del sensor luminiscente de OD realizados en días diferentes *sin* utilizar los datos del canal de referencia.

Los calibrados se realizaron durante días distintos con distintas condiciones climatológicas, por lo que con toda seguridad se produjeron variaciones en la

temperatura ambiental o la presión atmosférica. La Ec. 17 no tiene en cuenta todos estos factores que afectan a la concentración de $OD_{inicial}$, utilizada como línea base o como señal de referencia, lo que afecta a la reproducibilidad de los calibrados como se puede observar en la Figura 74. Es importante tener en cuenta que las variaciones de temperatura de un laboratorio climatizado son mucho menores que las esperadas en la intemperie, donde se pretende utilizar el analizador de CO_2 .

En la Figura 75 se utilizan los mismos datos de OD, registrados por el canal de medida, que los mostrados en la Figura 74, pero ahora el valor de $OD_{inicial}$ ya no es una constante sino el valor registrado por el canal de referencia. Ambos canales (medida y referencia) interrogan simultáneamente a sus respectivos terminales sensibles, y con la misma frecuencia. En la Figura 75 sí se ha aplicado la Ec. 16.

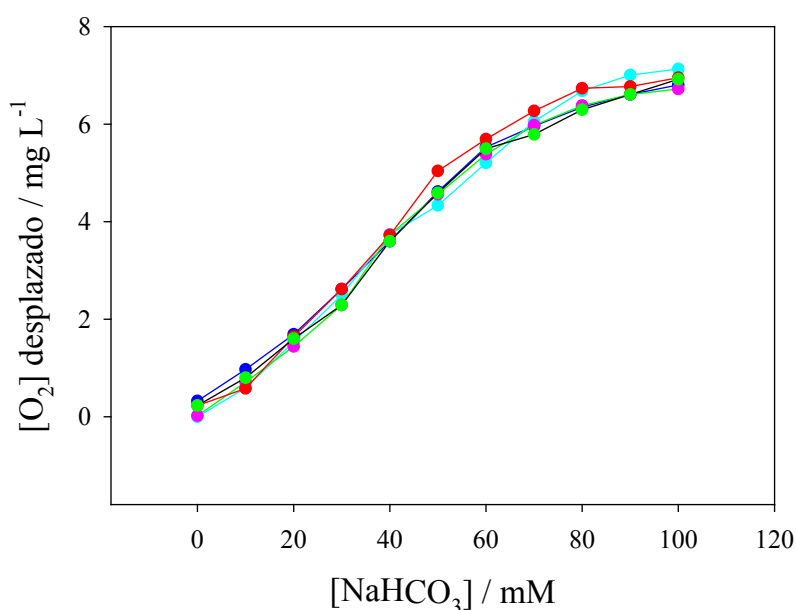


Figura 75. Cinco calibrados del sensor luminiscente de OD realizados en días diferentes corrigiendo las lecturas con los datos del canal de referencia.

El canal de referencia permite corregir los valores de OD, registrados por el canal de medida, en función del valor de $OD_{inicial}$ en tiempo real. Ello permite obtener información sobre el *OD desplazado por el CO_2* de una forma independiente a cualquier otro factor.

2.7. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ANALIZADOR DE CO_2

2.7.1. SELECCIÓN DE LA RELACIÓN DE CAUDALES

Como hemos expuesto, el principio de medida indirecta del CO_2 de la muestra, independientemente de su forma inicial, se basa en que dicho gas puede desplazar proporcionalmente al OD presente en la cámara de medida. Puesto que la muestra se

diluye con la disolución ácida, la concentración de CO₂ que llega a la cámara de medida depende tanto de la concentración de hidrógenocarbonato presente en la muestra, como de la relación de caudales entre la muestra y la disolución de ácido.

Si bien la concentración de hidrógenocarbonato presente en la muestra (cultivo microalgar) escapa a nuestro control (es de hecho el objetivo de nuestra investigación), la relación de caudales mencionada es fácilmente controlable. Cuanto menor sea el caudal de solución ácida aportado, mayor será la concentración de CO₂ presente en la mezcla y mayor será la concentración de OD desplazado de la cámara de medida.

Para investigar dicho efecto, se estudiaron dos relaciones de caudales diferentes, 1:1 (muestra/ácido) y 1:2 (muestra/ácido). Los dos caudales con los que se trabajó fueron: 0,13 y 0,26 mL min⁻¹.

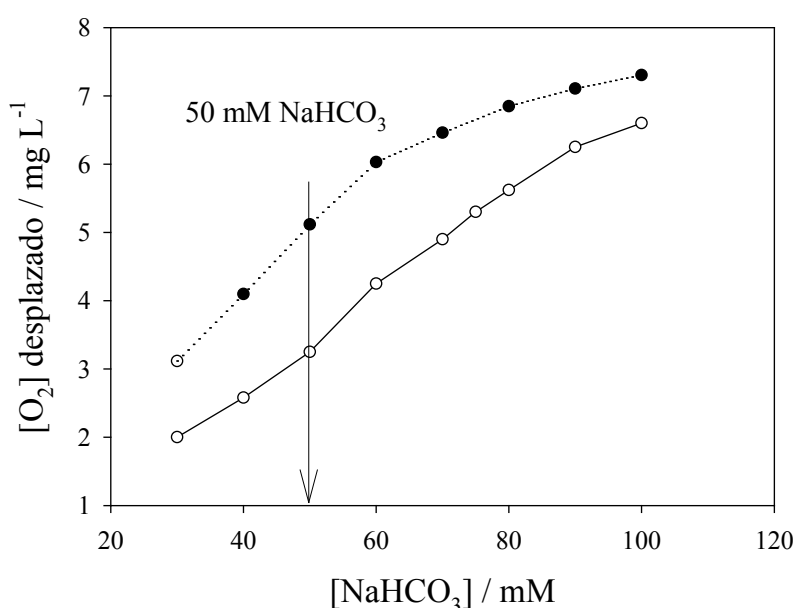


Figura 76. Curvas dosis–respuesta del sensor luminiscente obtenidas para disoluciones acuosas de hidrógenocarbonato 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 y 100 mM, acidificadas por una corriente de ácido fosfórico (0,4 M) en relaciones muestra:ácido de 1:1 (●) y 1:2 (○).

La Figura 76 muestra el desplazamiento del OD por el CO₂ generado a partir de la acidificación de muestras de hidrógenocarbonato de concentración creciente, para dos relaciones de caudales muestra/ácido diferentes. La relación 1:1 proporciona una mayor sensibilidad (pendiente) que la 1:2 en la zona comprendida entre 30 y 60 mM, mientras que la relación muestra/ácido de 1:2 proporciona una sensibilidad sostenida en todo el intervalo ensayado, siendo mayor que la 1:1 en la región comprendida entre 60 y 100 mM. Puesto que los biorreactores microalgares son alimentados continuamente con un medio de cultivo enriquecido con 50 mM de hidrógenocarbonato y una fuente de CO₂ gas, es de esperar que la muestra se encuentre normalmente en valores de hidrógenocarbonato superiores a 50 mM; por este motivo, seleccionamos la **relación de caudales muestra/ácido de 1:2** para llevar a cabo las medidas finales con el optosensor. Siendo, finalmente, en caudal de la muestra de 0,13 mL min⁻¹ y el caudal de la solución ácida de 0,26 mL min⁻¹.

2.7.2. CALIBRADO

Se realizó un calibrado del sensor utilizando disoluciones de hidrógenocarbonato de concentración creciente. Las muestras fueron acidificadas con una solución de H_3PO_4 (0,4 M) y la relación de caudales muestra/ácido fue de 1:2. Los valores de OD desplazado por CO_2 ($mg L^{-1}$) se calculan mediante la Ec. 16; la temperatura de trabajo fue controlada a $(25 \pm 1) ^\circ C$.

Como puede apreciarse en la Figura 23, el intervalo dinámico del sensor en estas condiciones contiene los valores esperados para los biorreactores microalgares típicos.

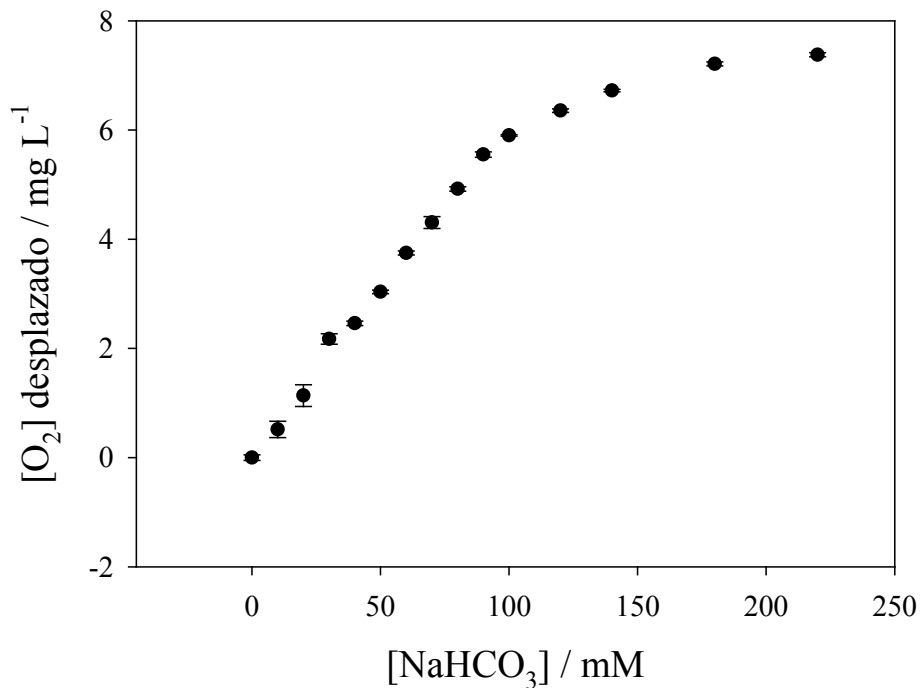


Figura 77. Calibrado del analizador de CO_2 para concentraciones de hidrógenocarbonato comprendidas entre 10 y 220 mM a $(25 \pm 1) ^\circ C$. La relación de caudales muestra/ácido fue de 1:2. Se realizaron las medidas por triplicado ($n=3$).

Para facilitar los cálculos podemos acortar la curva de la Figura 77 al intervalo de concentraciones de hidrógenocarbonato en el que normalmente opera el biorreactor (0–100 mM). En estas condiciones, podemos ajustar los datos experimentales a una línea recta ($r > 0,99$) representada en la Ec. 18.

$$\text{Ec. 18}$$

2.7.3. VALIDACIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Con la idea de validar los resultados del analizador de CO₂ desarrollado, se realizaron medidas de distintas muestras de concentración conocida y muestras del biorreactor, y se compararon con un método de referencia estándar. Como método de referencia se utilizó un método estándar volumétrico para la determinación de la alcalinidad en aguas (UNE-EN ISO 9963-2:1996). Las muestras se tomaron en días diferentes, realizándose la valoración volumétrica instantes después de la toma de la muestra.

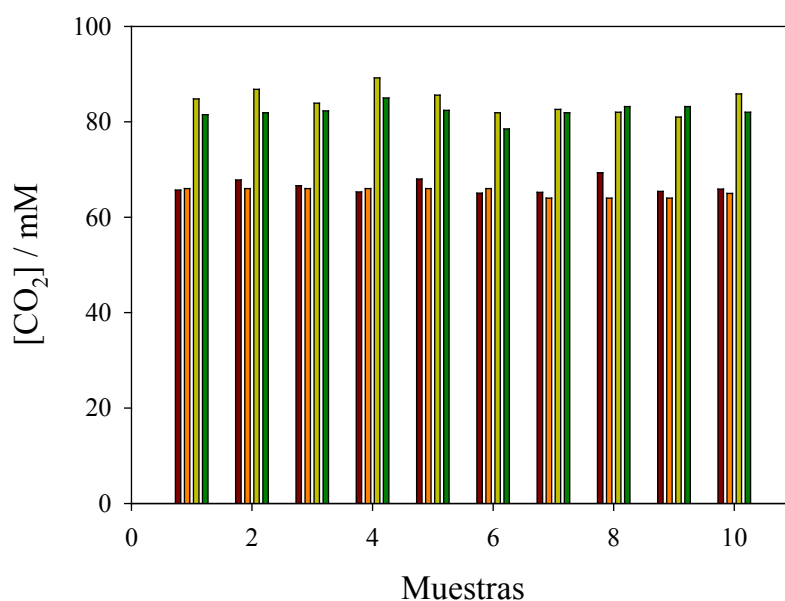


Figura 78. Determinaciones de la concentración de CO₂ en diversas muestras, utilizando el analizador optoelectrónico y un método de referencia. Solución de hidrógenocarbonato (70 mM): respuesta del analizador de CO₂ (rojo), respuesta del método estándar (naranja). Muestra del cultivo microalgar: respuesta del analizador de CO₂ (verde claro), respuesta del método estándar (verde oscuro).

La Figura 78 muestra los ensayos de validación de la respuesta del analizador de CO₂ frente a patrones de concentración conocida (70 mM) y muestras de cultivo de microalgas procedentes de un biorreactor de laboratorio.

La Tabla 18 presenta los valores más representativos de la desviación estándar de reproducibilidad (DER) para medidas intra-sensor e inter-sensor, para soluciones de hidrógenocarbonato de 40 mM y 70 mM.

Tabla 18. Valor de la desviación estándar de reproducibilidad (DER) para el mismo sensor (intra-sensor) y para sensores diferentes (inter-sensor).

Parámetro	Valore; S**
DER* (Intra-sensor)	2,3% (40 mM)
	2,7% (70 mM)
DER* (Inter-sensor)	3,4% (40 mM)
	2,9% (70 mM)

*DER para $[\text{NaHCO}_3]$, $n = 9$ (intra-sensor) and $n = 3$ (inter-sensor).

** S, desviación estándar

La Tabla 19 incluye el valor medio (para tres determinaciones) de seis muestras de cultivo microalgar, con la desviación estándar y valor P (P_{val}) del test usado en la comparación de los dos métodos utilizados para medir la concentración de hidrógenocarbonato presente en la muestra.

Tabla 19. Determinación de la concentración de CO_2 (en forma de HCO_3^- en las condiciones de pH del medio) en muestras de cultivo microalgar usando el analizador de CO_2 desarrollado y mediante el método de valoración estándar de referencia.

Muestra de microalgas	Respuesta del analizador de CO_2 (mM)	S	Valoración de referencia (mM)	S	Valor-P (%)
1	66,7	1	66	0,1	37
2	66,1	1,6	65,9	0,1	87
3	66,6	2,3	64	0,1	18,4
4	82,7	3,2	81,4	0,5	63,2
5	85,2	1,5	81,9	0,4	7,6
6	82,9	2,5	82,8	3,2	94,5

S: desviación estándar; Valor-P; se realizaron tres réplicas para cada caso.

Como demuestra la Tabla 19, los datos obtenidos por ambos métodos son estadísticamente similares ($\text{Valor-P} > 5\%$).¹³⁵

2.7.4. MUESTRAS DEL BIOREACTOR EN EL LABORATORIO

En la Figura 79 recogemos una traza típica del analizador de CO_2 con muestras extraídas automáticamente del biorreactor instalado en nuestros laboratorios. El experimento se desarrolló durante 24 h mediante una configuración del dispositivo FIA que permite alternar ciclos de medida (2 h) y de limpieza (2 h). Durante el ciclo de medida, la cámara de referencia monitoriza la concentración de oxígeno disuelto de una mezcla muestra/agua (1:2), mientras que la cámara de referencia hace lo propio con la mezcla muestra/ácido (1:2). Ambas medidas se transforman por medio de la Ec. 16 y la

Ec. 18, para proporcionar en continuo los valores de CO₂ (mM) en el reactor, que muestra la Figura 79.

Las lámparas que iluminan el biorreactor y el cilindro que proporciona CO₂ al mismo se controlan por medio de un temporizador que genera ciclos de 12 h encendido (“día”) y 12 h apagado (“noche”). Estos ciclos pretenden imitar las condiciones reales de medida en los biorreactores instalados a la intemperie, que estarán sujetos a los ciclos solares. Por otra parte, dado que en ausencia de luz no hay actividad fotosintética, el bombeo de CO₂ durante la noche originaría una disminución indeseable del pH del medio de cultivo, por lo que se evita introducir el gas en el biorreactor durante los periodos de oscuridad; por la misma razón, tampoco se introduce medio de cultivo durante la noche.

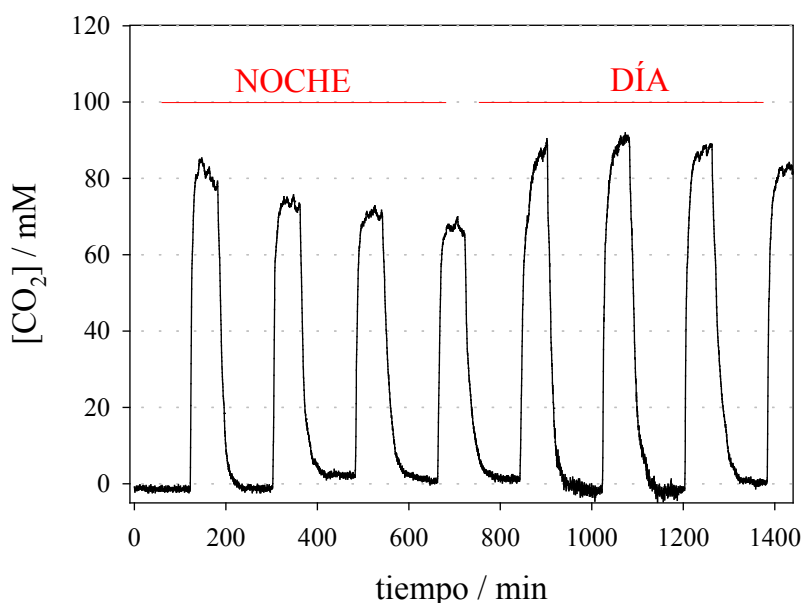


Figura 79. Determinación en continuo de la concentración de CO₂ en el biorreactor de cultivo microalgar de laboratorio mediante el analizador desarrollado en esta Tesis. Los ciclos que se observan corresponden a 2 h de toma de muestra seguidas de 2 h de limpieza de las cámaras de medida con ácido. La gráfica muestra 24 h de experimento simulando condiciones día/noche.

Durante el día, la introducción de CO₂ aumenta la concentración de hidrógenocarbonato en el medio de cultivo mientras que por la noche, interrumpido el aporte de gas carbónico, la elevada carga de microalgas del reactor provoca una disminución del nivel del analito en el biorreactor.

2.7.5. MEDIDAS EN BIORREACTOR PILOTO

Se estudió la validez del analizador de CO_2 en los biorreactores de la planta piloto de Sevilla (Figura 65). La alimentación de estos biorreactores se realiza en lote (*batch*): la totalidad del medio de cultivo (BG-11 enriquecido con 50 mM de NaHCO_3) se introduce al principio del cultivo; transcurrido un tiempo, la biorreacción se detiene y la bolsa se vacía unos 2/3 de su contenido, para rellenarla otra vez con el medio de cultivo fresco. El único nutriente que se introduce de forma relativamente continua es el CO_2 , pero sólo durante las horas de luz. Durante las horas de oscuridad, el flujo de $\text{CO}_2(\text{g})$ se detiene para evitar la acidificación del medio de cultivo, debido al carácter ácido del CO_2 por su hidrólisis. La introducción de una corriente de aire se mantiene de forma continua durante las 24 h del día para evitar la sedimentación de las células microalgas.

La Figura 80 muestra algunos datos representativos recogidos durante un experimento de 9 días, con ciclos de medida de 2 h seguidos de 10 h de limpieza, que nos permite tomar un dato diurno y otro nocturno.

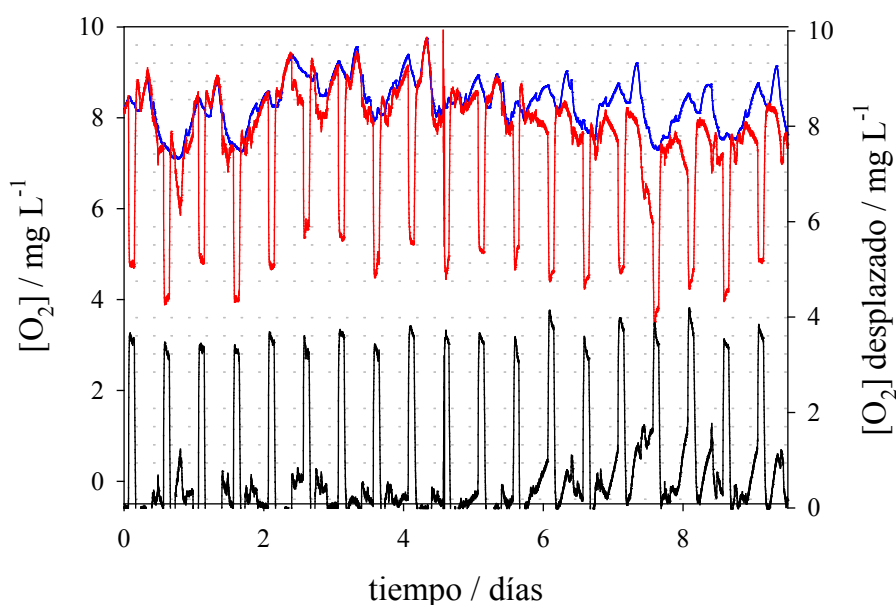


Figura 80. Datos de OD en la disolución que atraviesa el **canal de referencia** y el **canal de medida** obtenidos por el analizador de CO_2 durante un experimento realizado con muestras extraídas automáticamente de un biorreactor piloto instalado en la azotea de del Centro de Investigaciones Científicas de la Isla de la Cartuja (Sevilla). La traza **negra** muestra el OD desplazado por el CO_2 , resultante de aplicar la Ec. 16.

La Figura 80 presenta, tanto los valores de OD del **canal de medida** y del **canal de referencia**, como la diferencia entre ambos (**traza negra**, eje de ordenadas derecho), por medio de la Ec. 16; de la Ec. 18 podemos obtener los valores correspondientes a la concentración de CO_2 (Figura 81).

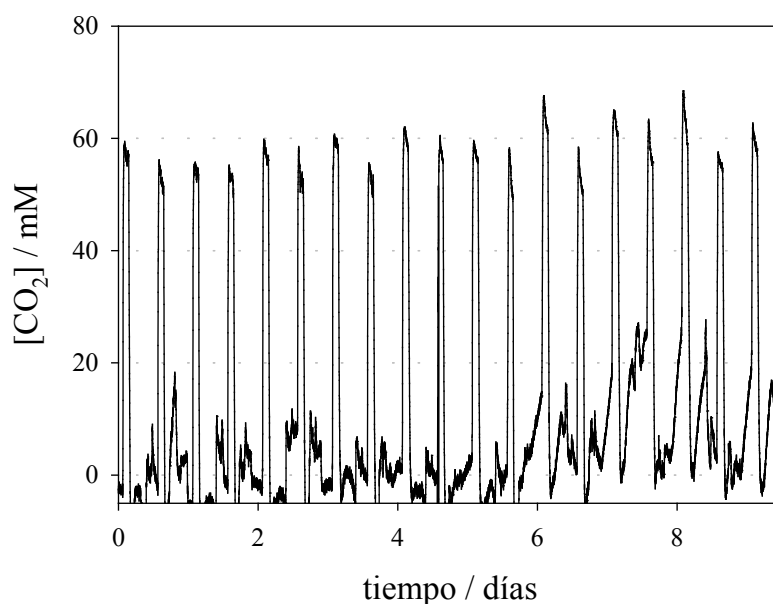


Figura 81. Valores de CO_2 medidos por el analizador de CO_2 durante un experimento realizado con muestras extraídas automáticamente de un biorreactor piloto instalado en la azotea del Centro de Investigaciones Científicas de la Isla de la Cartuja (Sevilla).

Los valores de CO_2 registrados en la Figura 81 varían en el entorno de 55 mM. Son valores menores que los obtenidos con el biorreactor de laboratorio (Figura 80) debido a las diferencias en el sistema de cultivo de ambos sistemas. Por ejemplo, mientras que la alimentación del biorreactor de laboratorio es continua (12 h), la de los biorreactores de la planta piloto es en lote (*batch*). Además, el flujo de $\text{CO}_2(\text{g})$ en nuestro biorreactor de laboratorio está sujeto a los ciclos de luz y oscuridad fijados artificialmente como 12 h y 12 h, respectivamente, mientras que en los biorreactor de la planta piloto el flujo de CO_2 , además de estar sujeto a los ciclos naturales de luz y oscuridad, está controlado por medio de un pH-metro, por lo que puede detenerse durante las horas de luz. Todo esto explicaría por qué los valores de $[\text{CO}_2]$ medidos en los biorreactores de la planta piloto son algo menores que los medidos en el biorreactor de laboratorio. Desafortunadamente carecemos de valores de referencia que nos permitan conocer la fiabilidad de los datos registrados por el analizador de CO_2 durante las semanas que estuvo trabajando en la planta piloto.

La UCP que controla los diversos componentes del analizador de CO_2 está conectada a un modem, instalado en el interior del armario, de forma que, por medio de una tarjeta telefónica de transmisión de datos (GPRS), se pudo controlar el funcionamiento del dispositivo opto-electrónico, programar el sistema FIA o recolectar datos desde los laboratorios de la UCM, sin necesidad de desplazarse continuamente a las instalaciones de Sevilla (Figura 82▲).

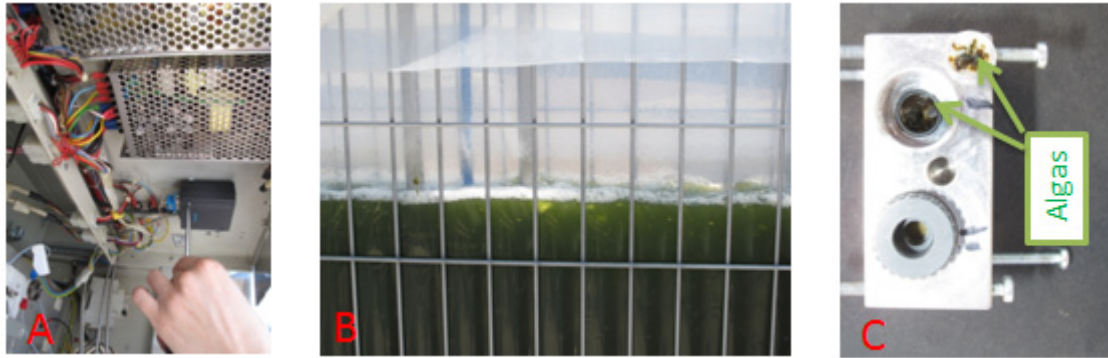


Figura 82. **A**, Modem GPRS instalado en el analizador de CO₂; **B**, bolsa de biorreactor dentro de la estructura metálica; **C**, celda de medida tras un mes funcionando ininterrumpidamente.

La Figura 82**C** muestra cómo, a pesar de los ciclos de limpieza, tanto la cámara de medida como la de referencia terminan acumulando restos de algas. El color marrón de éstas indica que la salud de las células no es buena (debido a la acidez del medio de limpieza), por lo que su actividad metabólica en el interior de la celda de medida no será importante.

Se produjeron problemas puntuales relacionados con las altas temperaturas registradas (máximos de 45 °C en la azotea y 60 °C dentro de la caja del analizador), estos problemas serían solucionables utilizando componentes adaptados a altas temperaturas.

3. SENSOR DE BIOMASA MICROALGAR

3.1. PRINCIPIO ÓPTICO DE MEDIDA Y TERMINALES SENSIBLES

El sensor de biomasa desarrollado utiliza el principio de medida óptico denominado DLR (*Dual Lifetime Referencing*) que brevemente hemos expuesto en el apartado 4.2.3 (página 125) y que permite convertir variaciones de la intensidad de emisión de un fluoróforo, en variaciones en el desfase de la señal de emisión de un luminóforo de tiempo de vida largo. La técnica DLR se basa en la utilización de dos luminóforos que presenten espectros de absorción y emisión muy similares, de forma que podamos utilizar una misma fuente de emisión y un mismo sistema de selección de longitud de onda de emisión. Además, ambos luminóforos deben presentar tiempos de vida de emisión muy diferentes: el luminóforo “**de referencia**” ha de mostrar un tiempo de vida largo (típicamente de 1-100 μ s) y ser “inmune” al analito que deseamos medir; el otro luminóforo (“**indicador**”) será proporcional a la concentración de analito (puede ser el analito mismo) y, necesariamente, debe mostrar un tiempo vida mucho más corto (típicamente de 1 a 10 ns).

El desfase de la emisión *total* (ϕ_T) registrado por el detector será función de la relación de intensidades de emisión del luminóforo de referencia y del luminóforo indicador. De esta forma, el valor del desfase total ϕ_T registrado por el detector será proporcional a la concentración de analito.¹³³ Expresado cuantitativamente, tendríamos la relación que recoge la Ec. 9:

Ec. 19

donde “*A*” es la amplitud de la señal sinusoidal proporcionada por el detector al incidir sobre él la emisión modulada, tanto del luminóforo indicador (A_{ind}) como del luminóforo de referencia (A_{ref}), ϕ_{ref} es el desfase de la señal del emisor de referencia, siendo este último constante.

El **sensor de biomasa** por medidas en DLR ideado utiliza como **luminóforo de referencia** el catión tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), abreviado como RD3. Las moléculas de RD3 están inmovilizadas en un soporte polimérico acrílico impermeable al gas, que impide la desactivación del estado excitado emisor de los complejos de Ru(II) por las moléculas de oxígeno, evitando así que este ubicuo gas se convierta en una interferencia. El **luminóforo indicador** forma parte, en este caso, del propio analito: se trata de las moléculas de clorofila situadas en los cloroplastos de las células microalgares.

Hay que destacar que la concentración de moléculas de clorofila por célula microalgar no es constante, ni siquiera dentro de la misma especie. De hecho, la proporción de clorofila por célula microalgar depende de factores como las condiciones fisiológicas de cada célula, la temperatura del medio de crecimiento, la concentración de

nutrientes, la densidad celular o la intensidad de la luz.¹³⁶ Aun así, como comentamos en el apartado 4.2.3 (página 125), las medidas de emisión de clorofila algar se utilizan habitualmente como indicador de la concentración de biomasa.¹⁵ Si las medidas de emisión de clorofila son útiles para determinar, por ejemplo, la concentración algar de un lago, donde las condiciones de crecimiento no se pueden controlar, parece lógico que las determinaciones de biomasa microalgar sean todavía más precisas en un biorreactor donde se controlan prácticamente todas las condiciones.

Se estudiaron dos disposiciones diferentes para realizar las medidas en modo DLR, en las que cada una de ellas otorga una mayor importancia a uno u otro de los luminóforos. En los Talleres de Apoyo a la Investigación de la UCM se fabricaron los dos terminales de acero inoxidable utilizados para evaluar ambas disposiciones (Figura 83).

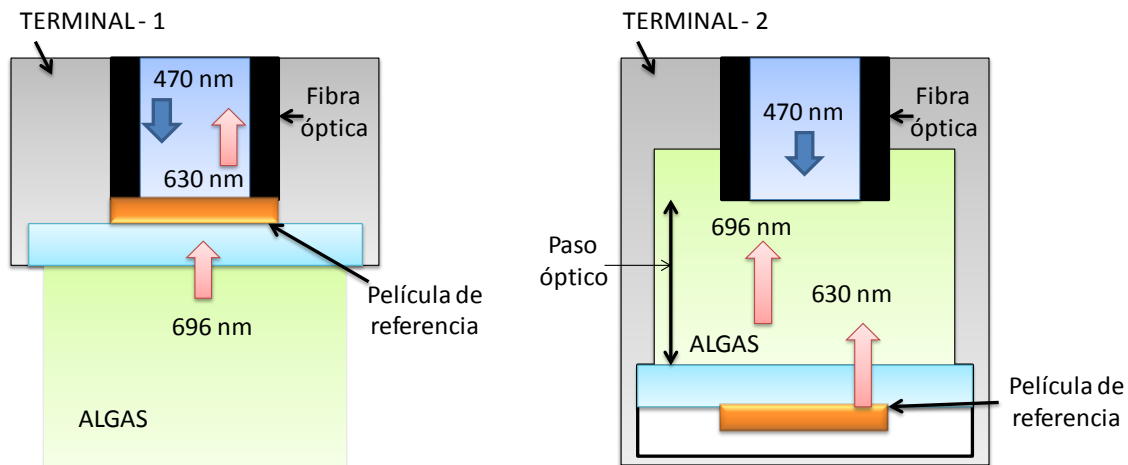


Figura 83. Esquema de los terminales de la fibra óptica utilizados para realizar el estudio de las dos configuraciones diseñadas para las medidas de desfase de la luminiscencia del extremo sensor mediante DLR.

La diferencia principal entre las dos disposiciones de la Figura 83 (Terminales 1 y 2) viene dada por la influencia que ejercen cada uno de sus componentes, tanto sobre la luz de excitación que llega a los luminóforos involucrados en la medida, como sobre la luz de emisión que llega al detector.

En el **Terminal-1**, la luz azul de excitación llega *directamente* a la película de referencia. Esta película atenúa, tanto la luz de excitación, que llega a las moléculas de clorofila, como la luz emitida por las moléculas de clorofila, que llega al detector. Con esta disposición la película de referencia tiene un mayor peso en la Ec. 19.

En el **Terminal-2** la luz de excitación que llega a la película de referencia ha de atravesar primero un *camino óptico* que contiene el analito (clorofila microalgar); asimismo, la emisión del indicador de referencia también debe atravesar idéntico medio en su camino hacia la fibra óptica que conduce al detector, lo que probablemente debería determinar que este terminal muestre una mayor sensibilidad a la presencia del analito. Con esta disposición, el indicador (clorofila) recibe el haz de luz de excitación

sin atenuación alguna y la luz emitida por el analito tampoco se atenúa. Con esta disposición, la fluorescencia de la clorofila tiene un mayor peso en la Ec. 19.

Experimentalmente, los resultados preliminares obtenidos con el Terminal-2 fueron en todo momento más satisfactorios que los obtenidos con el Terminal-1, observando en todos los casos tanto una mayor *sensibilidad*, como un más amplio *intervalo dinámico*. Estos resultados no suponen ninguna sorpresa teniendo en cuenta que la configuración del Terminal-2 concede una mayor importancia (*influencia*) a la biomasa que el Terminal-1. Otro factor a tener en cuenta es que el diseño del Terminal-2 nos permite controlar con precisión el paso óptico (PO), modificando a voluntad su efecto sobre la intensidad relativa de ambos luminóforos. Por estos motivos, se seleccionó el Terminal-2 para avanzar en el desarrollo del sensor de biomasa microalgar. En la Figura 84 podemos ver fotografías del Terminal-2 utilizado de diseño propio.

Una pieza móvil ayuda a colocar e inmovilizar la **película de referencia** (Figura 84A) en la parte inferior del Terminal-2 mientras que, por la parte superior, se introduce el extremo distal común de la fibra óptica bifurcada que proviene del equipo Optosen (Figura 84B y C). La ventaja adicional de esta configuración es que la película de referencia puede extraerse sin necesidad de desmontar el terminal sensible, manteniendo así inalterado el camino óptico optimizado en cada caso.

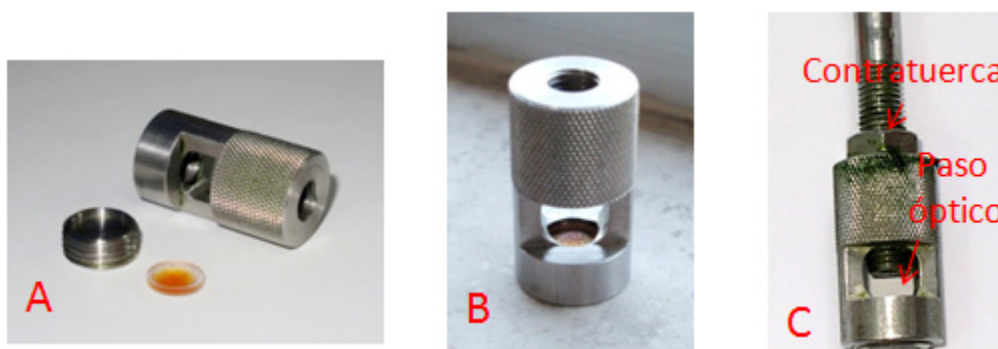


Figura 84. Fotografías del terminal sensible (“Terminal-2”) finalmente seleccionado para llevar a cabo las medidas de concentración de biomasa microalgar en biorreactores para producción de biocombustibles. **A**, Terminal-2 desmontado; **B**, Terminal-2 montado; **C**, fibra óptica introducida en el Terminal-2.

El extremo de la fibra óptica, provisto de un terminal de acero inoxidable con rosca, se introduce en el extremo del terminal, de forma que podemos seleccionar a voluntad, con gran precisión, el paso óptico entre el extremo de la fibra y la película polimérica de referencia. En el terminal diseñado y fabricado, el paso óptico puede variar entre 0 y 35 mm (correspondiente a un camino óptico total de 0 a 70 mm). Una contratuerca permite fijar el paso óptico seleccionado (Figura 84, C). Variando adecuadamente el paso óptico, podemos mejorar la sensibilidad del sensor luminiscente para el intervalo dinámico deseado.

3.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA COMPLETO

El equipo optoelectrónico que interroga el extremo sensible luminiscente es el mismo que el utilizado para el sensor de CO₂ y el sensor de O₂, esto es, el comercializado por Interlab IEC bajo el nombre de Optosen[®]. Las medidas de DLR son una forma indirecta de medir la intensidad de fluorescencia de la muestra, a través de la determinación del tiempo de vida de emisión del luminóforo de referencia mediante la detección sensible a la fase de la misma. La unidad optoelectrónica permite controlar tanto la ganancia del detector (tubo fotomultiplicador), como la intensidad de la fuente de emisión según las necesidades del usuario.

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA MEDIDA

3.3.1. CALIBRADO DE TEMPERATURA

La relación entre el tiempo de vida de emisión de los complejos de rutenio(II) y la temperatura ya ha sido mencionada en esta Memoria en varias ocasiones.⁸⁹ Esta relación obliga a monitorizar y corregir en todo momento la señal de desfase registrada por el detector, por lo que el dispositivo optoelectrónico está dotado de una sonda de temperatura (PT 100) que se introduce en el biorreactor. Asimismo, el equipo Optosen[®] dispone de un programa informático de medida que corrige la señal analítica según la temperatura registrada por la sonda, una vez introducidos los datos de un calibrado temperatura-desfase realizado previamente (Figura 85).

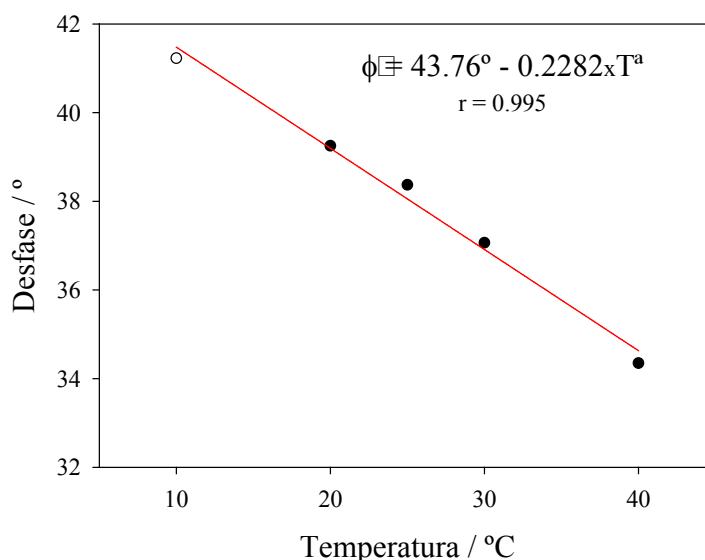


Figura 85. Típico calibrado de desfase de la luminiscencia del terminal sensible que contiene RD3 inmovilizado en una película polimérica impermeable al gas, en función de la temperatura del medio en el que se encuentra. En el intervalo 10–40 °C, el desfase disminuye 0,2282° por cada °C que disminuye la temperatura.

El importante efecto de la temperatura sobre el tiempo de vida de emisión de los complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes se debe a la presencia de un estado excitado triplete centrado en el metal (3MC), cuya energía es algo superior al estado excitado emisor de transferencia de carga metal-ligando (3MLCT). Dicho estado 3MC , no luminiscente, se encuentra lo suficientemente próximo al 3MLCT como para que sea accesible por promoción térmicamente inducida, a temperaturas cercanas a 25 °C en la mayoría de los complejos mencionados. Cálculos de la velocidad del proceso de promoción térmica al estado superior de tipo Arrhenius ($k_T = -RT\Delta G^\ddagger$) han demostrado que aproximadamente el 20–25% de los estados excitados 3MLCT de los complejos típicos de Ru(II) se desactivan por dicha vía.

3.3.2. PASO ÓPTICO Y CONCENTRACIÓN DE RD3

Una vez seleccionado el tipo de terminal, los factores que controlan la sensibilidad de las medidas en DLR son la concentración del luminóforo (RD3) en la película de referencia, que podemos controlar; y la longitud del paso óptico, que podemos regular a voluntad gracias al original diseño de nuestro terminal. Se estudiaron, por tanto, las combinaciones de ambos parámetros a fin de obtener la mayor sensibilidad posible en el intervalo dinámico de interés.

Las concentraciones de biomasa microalgar registradas en los biorreactores piloto llegan a niveles máximos comprendidos entre 0,7–0,8 g de peso seco por litro de cultivo. Cuando se alcanzan estos valores el biorreactor se vacía parcialmente y se rellena con medio de cultivo fresco hasta una concentración de unos 0,4 g L⁻¹. Estos valores se midieron por los dos métodos descritos en el apartado 4.2 (página 123).

El proyecto SOST-CO₂ finalizó antes de poder realizar medidas en las instalaciones del IBVF-CSIC-USE de Sevilla, por lo que las medidas con el sensor de biomasa desarrollado, que se describen en esta Memoria, fueron llevadas a cabo exclusivamente en el biorreactor de laboratorio. Éste llega a la fase estacionaria (Figura 19, página 49) con concentraciones de microalgas hasta 0,8 g L⁻¹, medidas por el método 1 (apartado 4.2, página 123).

Se utilizó como parámetro analítico la excursión del desfase ($\Delta\phi$) que se produce al pasar de la inmersión del sensor en agua (no fluorescente) a las muestras de algas (fluorescentes) extraídas del biorreactor de laboratorio. Se emplearon películas poliméricas de referencia con distintas concentraciones de luminóforo (RD3) y distintos valores de PO (Tabla 20). Los valores de desfase medidos se corrigen en función de la temperatura registrada por el sensor de temperatura introducido en biorreactor (Figura 85). Las medidas de peso seco de biomasa microalgar se calcularon utilizando el método 1 descrito en el apartado 4.2 (página 123)

De entre las distintas películas de referencia fabricadas, la que presentó mayor sensibilidad para el intervalo dinámico de interés, comprendido entre 0,4 y 0,8 g L⁻¹, fue la cargada con una concentración de RD3 igual a 0,4 mg mL⁻¹ (Figura 86).

Tabla 20. Relación entre el paso óptico (PO), la concentración de luminóforo de referencia (RD3) y la excursión de desfase de la emisión desde el terminal sensible ($\Delta\phi$, Terminal-2) producida por diferentes muestras extraídas del biorreactor de laboratorio. La tabla incluye también los valores de peso seco de las diferentes muestras ensayadas.

PO/mm	[RD3]/mg mL ⁻¹	Peso seco/g L ⁻¹			
		0,516	0,624	0,708	0,791
		$\Delta\phi_{(AGUA \rightarrow MUESTRA)} / ^\circ *$			
30	0,4	3,76	4,26	6,55	7,77
40		7,21	10,25	12,94	17,46
50		10,97	13,16	20,35	25,11
30	0,6	3,25	3,55	3,26	3,90
40		6,63	7,17	7,78	12,37
50		11,80	13,28	15,20	23,19
30	0,8	3,22	3,77	2,26	4,21
40		6,35	6,18	9,00	8,32
50		12,94	14,03	14,39	16,54

*Excursión del desfase observada, desde la medida con agua a la medida con muestra.
Incertidumbre de las medidas $\pm 0.05^\circ$

La Figura 86 muestra el valor de desfase registrado por el Optosen[®] y corregido con la temperatura, utilizando una película de referencia de 0,4 mg mL⁻¹ (RD3) y diferentes pasos ópticos. Las medidas de peso seco se realizaron instantes después de realizar las medidas ópticas.

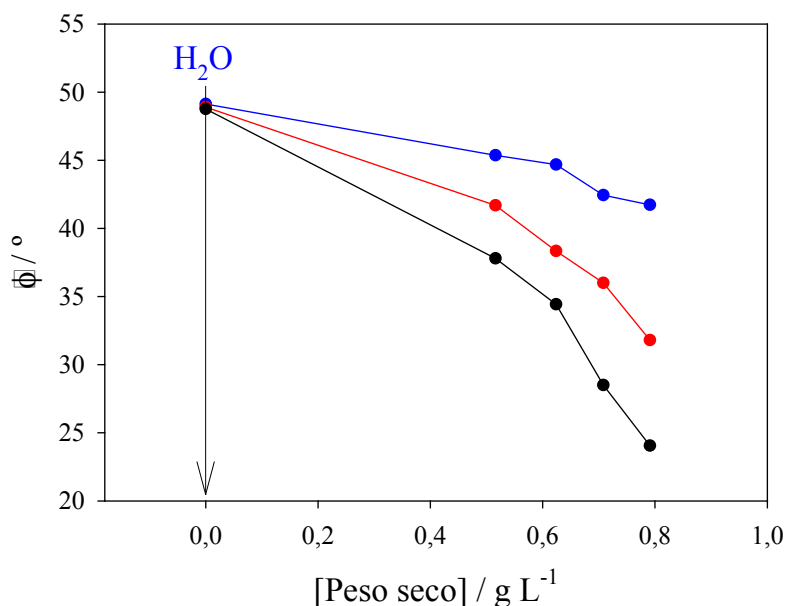


Figura 86. Relación entre el desfase medido por el procedimiento DLR y los valores de peso seco obtenidos para las mismas muestras. Se utilizó una película de referencia cargada con 0,4 mg mL⁻¹ de RD3 en un Terminal-2. Se utilizaron tres pasos ópticos diferentes para cada una de las muestras: 30 mm (●), 40 mm (●) y 50 mm (●).

Como se indicó anteriormente, el proyecto CENIT finalizó antes de poder realizar una optimización del sensor de biomasa y ensayarlo en condiciones reales. Sin

embargo, los experimentos realizados arrojaron suficiente información como para pensar que este sensor puede convertirse en una herramienta útil para la monitorización de la masa celular presente en biorreactores microalgares industriales.

CONCLUSIONES

- El **sensor luminiscente de oxígeno molecular** basado en un complejo homoléptico de Ru(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes ha demostrado ser una poderosa, robusta y fiable herramienta para la monitorización del metabolismo microalgar en biorreactores dirigidos a la producción de lípidos precursores de biocombustibles. Además, puede utilizarse como *transductor opto-químico* en otros sensores complementarios (CO₂, concentración de biomasa microalgar) de gran interés para el seguimiento de la evolución del cultivo microalgar en el biorreactor solar. La ausencia de electrolito interno en el extremo sensible y la interrogación de los sensores luminiscentes de O₂ con instrumentación “a medida” basada en el *tiempo de vida de emisión*, en vez de la intensidad absoluta de la misma, permite operar dichos sensores in situ y de forma *ininterrumpida* en el biorreactor microalgar durante más de 4 semanas *sin mantenimiento* alguno.
- El desarrollo de un original, sencillo y preciso **sensor luminiscente de CO₂/HCO₃⁻**, basado en la medida del O₂ *desplazado* de la corriente de muestra en la cámara de medida, por el CO₂ generado al *acidificar la muestra*, permite disponer de un dispositivo fiable para la medida de elevadas concentraciones de hidrógenocarbonato en agua. Esta situación es precisamente la que se encuentra en reactores microalgares para producción de biocombustible y que, hasta la fecha, sólo podía resolverse indirectamente a través de la medida del pH del medio de cultivo. Con el nuevo sensor es posible realizar el seguimiento detallado del proceso de *fijación de CO₂* en el biorreactor y optimizar el mismo, contribuyendo a minimizar los efectos medioambientales de la producción de este gas. El diseño del nuevo sensor resulta suficientemente *versátil* (e.g. intervalo dinámico “sintonizable”) para poder aplicarlo en *otros ámbitos* donde el seguimiento de los niveles de CO₂/HCO₃⁻ resulta complicado por la especial naturaleza del medio (fermentaciones, estaciones depuradoras de aguas residuales, etc.).
- Utilizando el principio conocido de la detección, sensible a la fase, de luminiscencia dual con tiempo de vida invariable, hemos inventado un nuevo **sensor** de concentración de **biomasa microalgar** para el análisis de proceso en reactores de producción de materia prima para la fabricación de biocombustibles mejorando la producción y ahorrando en nutrientes. El empleo de una película de material impermeable al gas, que contiene un complejo luminiscente de Ru(II), permite utilizar la *misma instrumentación* desarrollada para interrogar los modernos *optodos* de O₂, con el consiguiente ahorro económico en el control del proceso (equipos y personal de mantenimiento). Asimismo, el diseño y fabricación de un terminal sensible novedoso aumenta la *versatilidad* del sensor de biomasa, debido a que permite adaptarlo al *intervalo dinámico* y *sensibilidad* deseados mediante el

ajuste preciso del paso óptico y de la película luminiscente de referencia (tipo de luminóforo, concentración del mismo y espesor de la capa).

- Todos los sensores desarrollados en el **proyecto CENIT “SOST-CO₂”**, tienen la *ventaja* de poder ser interrogados por un mismo dispositivo optoelectrónico multicanal (Optosen[®], Figura 33). Un equipo provisto de 4 canales ópticos independientes permite monitorizar *simultáneamente* los niveles de CO₂ (requiere dos canales), O₂ disuelto y biomasa microalgar en suspensión. La posibilidad de conectar hasta 4 sondas de temperatura a la unidad Optosen[®] proporciona un *sistema compacto, único* en el mundo, para la monitorización integral de los parámetros clave que permitan al operador del biorreactor conseguir la más eficaz producción de la materia prima imprescindible para disponer de fuentes de energía sostenibles.

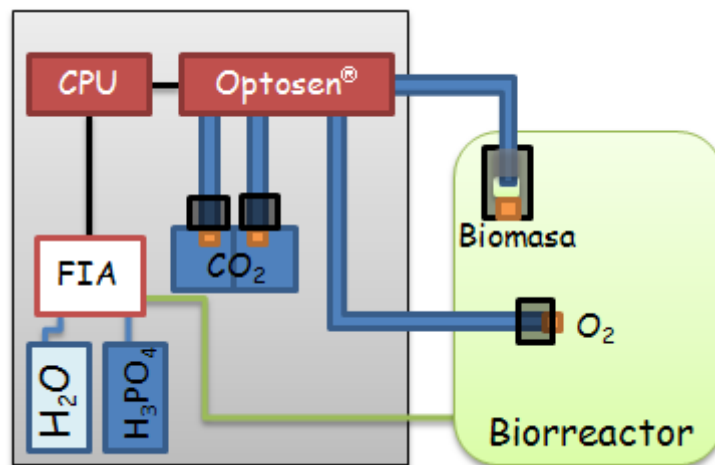


Figura 87. Esquema del dispositivo optoelectrónico multicanal Optosen[®] provisto de los diferentes sensores desarrollados para la monitorización integral de biorreactores microalgares para producción de biocombustibles.

REFERENCIAS

- 1 L. Barsanti & P. Gualtieri (2005), “*Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*”, CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU. 251–252.
- 2 L.E. Graham & L.W. Wilcox (2000), “*Algae*”, Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J., EE.UU. 64–79.
- 3 European Union countries (Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1984), “*Algae growth inhibition test. Test Guidelines*”, OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris, **201**, 14.
- 4 A.P.F. Turner, I. Karube and G.S. Wilson (1987), “Biosensors: Fundamentals and Applications”, Oxford University Press, Oxford, R.U. 770.
- 5 D.W.G. Morrison, M.R. Dokmeci, U. Demirci and A. Khademhosseini (2008), “Biomedical Nanostructures”, John Wiley & Sons, Inc. **17**, 439–454.
- 6 M.C. Moreno-Bondi, M.E. Benito-Peña, J.L. Urraca and G. Orellana (2012), “Immuno-Like Assays and Biomimetic Microchips”, *Topics Curr. Chem.* **325**, 111–164.
- 7 W. Jie, F. Zhifeng, Y. Feng and J. Huangxian (2007), “Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers”, *Trends Anal. Chem.* **26**, 679–688.
- 8 S. Hahn, S. Mergenthaler, B. Zimmermann and W. Holzgreve (2005), “Nucleic acid based biosensors: The desires of the user”, *Bioelectrochemistry*, **67**, 151–154.
- 9 A.E. Abelow, O. Schepelina, R.J. White, A. Vallée-Bélisle, K.W. Plaxco and I. Zharov (2010), “Biomimetic glass nanopores employing aptamer gates responsive to a small molecule”, *Chem. Commun.* **46**, 7984–7986.
- 10 S. Belkin (2003), “Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants”, *Curr. Opin. Microbiol.* **6** (3), 206–212.
- 11 Y. Lei, W. Chen and A. Mulchandani (2006), “Review: Microbial biosensor”, *Anal. Chim. Acta*, **568**, 200–210.
- 12 G. Orellana and D. Haigh (2008), “New Trends in Fiber-Optic Chemical and Biological Sensors”, *Curr. Anal. Chem.* **4**, 273–295.
- 13 P.T. Kissinger (2005), “Review: Biosensors, a perspective”, *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2512–2516.
- 14 L.C. Clark and C. Lyons (1962) “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29-45.
- 15 G. Orellana, C. Cano-Raya, J. López-Gejo and A.R. Santos (2011), “Online Monitoring Sensors”, en *Treatise on Water Science*, P. Wilderer (Editor), Elsevier Science, Oxford, U.K. Vol. 3, Ch. 59, pp. 221–262.

-
- 16 C. Plasencia (2010), *Farma España Industrial*, Mayo/Junio, 70–74.
- 17 M. Yuce, H. Nazır and G. Donmez (2010), “An advanced investigation on a new algal sensor determining Pb(II) ions from aqueous media”, *Biosens. Bioelectron.* **26**, 321–326.
- 18 D. Frense, A. Müller and D. Beckmann (1998), “Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells”, *Sensor. Actuat. B*, **51**, 256–260.
- 19 C. Védrine, J.C. Leclerc, C. Durrieu and C. Tran-Minh (2003), “Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides”, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 457–463.
- 20 M. Naessens, J. C. Leclerc and C. Tran-Minh (2000), “Fiber Optic Biosensor Using *Chlorella vulgaris* for Determination of Toxic Compounds”, *Ecotox. Environ. Safe.* **46**, 181–185.
- 21 M. Altamirano, L. García-Villada, M. Agrelo, L. Sánchez-Martín, L. Martín-Otero, A. Flores-Moya, M. Rico, V. López-Rodas and E. Costas (2004), “A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT”, *Biosens. Bioelectron.* **19**, 1319–1323.
- 22 E. Peña-Vázquez, E. Maneiro, C. Pérez-Condec, M. C. Moreno-Bondi and E. Costas (2009), “Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol–gel technology”, *Biosens. Bioelectron.* **24** (12), 3538–3543.
- 23 A. Tibuzzi, G. Rea, G. Pezzotti, D. Esposito, U. Johannmeier and M.T. Giardi (2007), “A new miniaturized multiarray biosensor system for fluorescence detection”, *J. Phys.: Condens. Mater.* **19** (39), 395006.
- 24 H. Nguyen-Ngoc and C. Tran-Minh (2007), “Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix”, *Anal. Chim. Acta*, **583**, 161–165.
- 25 B. Podola, E.C.M. Nowack and M. Melkonian (2004) “The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds”, *Biosens. Bioelectron.* **19**, 1253–1260.
- 26 C. Durrieu, C. Tran-Minh, J.M. Chovelon, L. Barthet, C. Chouteau and C. Védrine (2006), “Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring”, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **36**, 205–209.
- 27 P. Pandar and D.M. Rawson (1993) “An amperometric algal biosensor for herbicide detection employing a carbon cathode oxygen electrode”, *Environ. Toxic. Water*, **8**, 323–333.
- 28 L. Campanella, F. Cubadda, M.P. Sammartino and A. Saoncella (2000) “An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments”, *Water Res.* **35** (1), 69–76.

-
- 29 A.I. Zamaleeva, I.R. Sharipova, R.V. Shamagsumova, A.N. Ivanov, G.A. Evtugyn, D.G. Ishmuchametova and R.F. Fakhrullin (2011), "A whole-cell amperometric herbicide biosensor based on magnetically functionalised microalgae and screen-printed electrodes", *Anal. Meth.* **3**, 509–513.
- 30 C-W. Cho, T.P.T. Pham, Y-C. Jeon, J. Min, H.Y. Jung, D.S. Lee and Y-S. Yun (2008), "Microalgal photosynthetic activity measurement system for rapid toxicity assessment", *Ecotoxicology*, **17**, 455–463.
- 31 I. Shitanda, K. Takada, Y. Sakai and T. Tatsuma (2005), "Compact amperometric algal biosensors for the evaluation of water toxicity", *Anal. Chim. Acta*, **530**, 191–197.
- 32 M. Naessens and C. Tran-Minh (1999), "Biosensor using immobilized *Chlorella* microalgae for determination of volatile organic compounds", *Sensor. Actuat. B*, **59**, 100–102.
- 33 T. Tatsuma, Y. Yoshida, I. Shitanda and H. Notsu (2009), "Algal biosensor array on a single electrode", *Analyst*, **134**, 223–225.
- 34 H. Guedri and C. Durrieu (2008), "A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring", *Microchim. Acta*, **163**, 179–184.
- 35 K.F. Chong, K.P. Loh, K. Ang and Y.P. Ting (2008), "Whole cell environmental biosensor on diamond", *Analyst*, **133**, 739–743.
- 36 C. Durrieu and C. Tran-Minh (2002), "Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals", *Ecotox. Environ. Safe*, **51** (3), 206–209.
- 37 A.H. Dawson, M. Eddleston, L. Senarathna, F. Mohamed, I. Gawarammana, S.J. Bowe, G. Manuweera and N.A. Buckley (2010), "Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: A prospective cohort study", *PLoS Med.* **7**, 10, 1–10.
- 38 European Communities (1980), Drinking water Directive **L229**, 11.
- 39 R.J. Cremlyn (1992), "Agrochemicals: Preparation and Mode of Action", *J. Agric. Sci.* **118**, 401–406.
- 40 J. Overnell (1975), "The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga", *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**, 1, 19–26.
- 41 G. Zweig, I. Tamas and E. Greenberg (1963), "The effect of photosynthesis inhibitors on oxygen evolution and fluorescence of illuminated *Chlorella*", *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 196–205.
- 42 K. Rohacek and M. Bartak (1999), "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basics concepts, useful parameters, and some applications", *Photosynthetica*, **37**, 339–363.

-
- 43 R. Rojíčková and B. Maršálek (1999), “Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing”, *Chemosphere*, **38** (14), 3329–3338.
- 44 G.S. Saylor and S. Ripp (2000), “Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes”, *Curr. Opin. Biotech.* **11** (3), 286–289.
- 45 C.F. Olesen and N. Cedergreen (2010), “Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence”, *Pest Manag. Sci.* **66** (5), 536–542.
- 46 M. Bedoya, J. Delgado, E. García-Ares, J. L. García-Alonso, G. Orellana and M.C. Moreno-Bondi (2006), “Measuring cell, analyzer, procedure and computer program for the analysis of BOD”, *Spanish Patent Appl.*, 200603300; *PCT Patent* WO20088081060.
- 47 P.C. Wilson, T. Whitwell and S.J. Klaine (1999), “Phytotoxicity, uptake, and distribution of [¹⁴C] simazine in canna hybrida 'yellow king humber'”, *Environ. Tox. Chem.* **18**, 1462–1468.
- 48 G. Orellana, V. López, E. Costas, E. Maneiro and D. Haigh (2009), “Microalgal biosensors for detection of environmental pollutants”, *PCT Patent* WO2009013370.
- 49 J. Hernández-Allica, D. Carrera-Martínez, V. López-Rodas, A. Flores-Moya and E. Costas (2011), “Highly Specific Biosensors to Herbicides, Based on Sensitive- and Resistant-Mutants of Microalgae”, *Herbicides and Environment*, A. Kortekamp (Ed.), InTech, pp. 433–442, ISBN: 978-953-307-476-4. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/highly-specific-biosensors-to-herbicides-based-on-sensitive-and-resistant-mutants-of-microalgae>.
- 50 E. Costas, E. Carrillo, L.M. Ferrero, M. Agrelo, L. García-Villada, J. Juste and V. López-Rodas (2001), “Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea herbicide”, *Phycologia*, **40**, 391–398.
- 51 X. Reboud, N. Majerus, J. Gasquez and S. Powles (2007), “*Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research”, *Biol. J. Linn. Soc.* **91**, 257–266.
- 52 D. Garcia-Fresnadillo, Y. Georgiadou, G. Orellana, A.M. Braun and E. Oliveros (1996), “Singlet-Oxygen (¹Δ_g) production by ruthenium(II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water”, *Helv. Chim. Acta*, **79**, 1222–1238.
- 53 J. López-Gejo, D. Haigh and G. Orellana (2010), “Relationship between the Microscopic and Macroscopic World in Optical Oxygen Sensing: A Luminescence Lifetime Microscopy Study”, *Langmuir*, **26**, 2144–2150.
- 54 Datos proporcionados por el fabricante: www.dowcorning.com.

-
- 55 Datos proporcionados por el fabricante: www.merck.de.
- 56 Datos proporcionados por el fabricante: www.whatman.com.
- 57 Datos proporcionados por el fabricante: www.sigmaaldrich.com.
- 58 M.L. Johnson (1992), "Why, when, and how biochemists should use least squares", *Anal. Biochem.* **206**, 215–225.
- 59 F. Marva, V. López-Rodas, M. Rouco, M. Navarro, F.J. Toro, E. Costas and A. Flores-Moya (2010), "Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations", *Aquat. Toxicol.* **96** (2), 130–134.
- 60 I. Moreno-Garrido (2008), "Review. Microalgae immobilization: Current techniques and uses", *Bioresource Technol.* **99**, 3949–3964.
- 61 P.C.J. Roach, D.K. Ramsden, J. Hughes and P. Williams (2003), "Development of a conductimetric biosensor using immobilised *Rhodococcus ruber* whole cells for the detection and quantification of Acrylonitrile", *Biosens. Bioelectron.* **19**, 73–78.
- 62 P. Payra and P.K. Dutta (2003), "Development of a dissolved oxygen sensor using tris(bipyridyl) ruthenium (II) complexes entrapped", *Micropor. Mesopor. Mater.* **64**, 109–118.
- 63 R. Ramamoorthy, P.K. Dutta and S.A. Akbar (2003), "Oxygen sensors: Materials, methods, designs and applications", *J. Mater. Sci.* **38**, 4271–4282.
- 64 Por ejemplo, los dispositivos comerciales para monitorización de O₂ basados en fibra óptica como la sonda Hach LDO probe, el sensor YSI 6150, el sensor RDO de In-Situ Inc., la fluorosonda FL-3 de Environmental Instruments, los sensores de PreSens Fibox y Microx, y el dispositivo analítico Optosen de Ultrasens Sistemas, entre otros.
- 65 G. Orellana and D. García-Fresnadillo (2004), "Environmental and industrial optosensing with tailored luminescent Ru(II) polypyridyl complexes", en "*Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications*", R. Narayanaswamy and O.S. Wolfbeis (Editores), Springer Series in Chemical Sensors and Biosensors, Springer, Berlin-Heidelberg, Alemania, Vol. 1, Ch. 13, 309–357.
- 66 H. Riesen, L. Wallace and E. Krausz (1997), "Dynamical processes in the lowest-excited triplet metal-to-ligand charge transfer states of ruthenium and osmium diimine complexes in crystals", *Int. Rev. Phys. Chem.* **16**, 291–359.
- 67 P.C. Alford, M.J. Cook, A.P. Lewis, G.S.G. McAuliffe, V. Skarda, A.J. Thomson, J.L. Glaspera and D.J. Robbins (1985), "Luminescent Metal Complexes: Luminescence Properties of Ring-substituted 1,10-Phenanthroline Tris-complexes of Ruthenium(II)", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 705–709.
- 68 O. Stern and M. Volmer (1919), "Ueber die Abklingungszeit der Fluoreszenz", *Physik. Z.* **20**, 183–188.
- 69 M. I. Gutiérrez, C. G. Martínez, D. García-Fresnadillo, A. M. Castro, G. Orellana, A. M. Braun and E. Oliveros (2003), "Singlet Oxygen (¹Δ_g) Production by

-
- Ruthenium(II)-Complexes in Microheterogeneous Systems", *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3397–3403.
- 70 G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, D. García-Fresnadillo and M. D. Marazuela (2005), "The Interplay of Indicator, Support and Analyte in Optical Sensor Layers", en "*Frontiers in Chemical Sensors: Novel Principles and Techniques*", G. Orellana and M.C. Moreno-Bondi (Editores), Springer Series in Chemical Sensors and Biosensors, , Springer, Berlin-Heidelberg, Alemania; Vol. 3, pp 189–225.
- 71 P.M. Gewehr and D.T. Delpy (1994), "Analysis of non-linearity of optical oxygen sensors based upon phosphorescence lifetime quenching", *Med. Biol. Eng. Comput.* **32**, 659–664.
- 72 S. Draxler, M.E. Lippitsch, I. Klimant, H. Kraus and O.S. Wolfbeis (1995), "Effects of polymer matrices on the time-resolved luminescence of a ruthenium complex quenched by oxygen", *J. Phys. Chem.* **99**, 3162–3167.
- 73 W.L. Robb (1968), "Thin silicone membranes – their permeation properties and some applications", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **146**, 119–137.
- 74 L. Xin and M.A. Winnik (2001), "Luminescence Quenching in Polymer/Filler Nanocomposite Films Used in Oxygen Sensors", *Chem. Mater.* **13**, 3449–3463.
- 75 B. Valeur (2002), "Molecular Fluorescence, Principles and Applications", *Wiley-VCH*, Weinheim, Germany, pp. 110–112.
- 76 A.M. Castro, J. Delgado and G. Orellana (2005), "Hydrocarbon in water sensing with PTFE membranes doped with a luminescent Ru(II) poly(pyridyl) complex", *J. Mater. Chem.* **15**, 2952–2958.
- 77 C.A. Kelly, F. Farzad, D.W. Thompson and G.J Meyer (1999), "Excited-State Deactivation of Ruthenium(II) Polypyridyl Chromophores Bound to Nanocrystalline TiO₂ Mesoporous Thin Films", *Langmuir*, **15**, 731–737.
- 78 J.R. Lakowicz (2006), "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 3^a edición, Springer Science+Business Media, New York, EEUU, pp. 98–204.
- 79 R.J. Cremlyn (1990), "Agrochemicals; Preparation and mode of action", *Wiley*, West Sussex, U.K. pp. 241.
- 80 S. Herranz, J.Ramón-Azcón, E. Benito-Peña, M.D. Marazuela, M.P.Marco, M.C.Moreno-Bondi (2008) "Preparation of antibodies and development of a sensitive immunoassay with fluorescence detection for triazine herbicides", *Anal. Bional. Chem.* **391**, 1801–1812.
- 81 California Public Health Goal (2001), "Public Health Goal for simazine in drinking water", September 2001.
- 82 R.G. Van der Hoff and P. Van Zoonen (1999), "Trace analysis of pesticides by gas chromatography", *J. Chromatogr. A*, **843**, 301–322.

-
- 83 E. Hogendoorn and P. Van Zoonen (2000), "Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis", *J. Chromatogr. A*, **892**, 435–453.
- 84 G.E. Walsh (1972), "Effects of herbicides on photosynthesis and growth of marine unicellular algae", *Hyacinth Control J.* **10**, 45–48.
- 85 K. Verschueren (1984), "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals", *Van Nostrand Reinhold Company*, New York, EE.UU, 2nd ed.
- 86 California Department of Pesticide Regulation (DPR) (2003), "Pesticide information profile: Simazine", Aquatictox database.
- 87 S. Sánchez-Fortún, V. López-Rodas, M. Navarro, F. Marva, A. D'ors, M. Rouco, D. Haigh-Flórez and E. Costas (2009), "Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium Chlorelloides* to extreme chromium contamination", *Environ. Toxicol. Chem.*, **28** (9), 1901–1905.
- 88 D.P. Hader, M. Lebert, A. Flores-Moya, C. Jimenez, J. Mercado, S. Salles, J. Aguilera and F. L. Figueroa (1997), "Effects of solar radiation on the photosynthetic activity of the red alga *Corallina elongata Ellis et Soland*", *J. Photoch. Photobio. B.* **37**, 196–202.
- 89 J. Van Houten and R.J. Watts (1976), "Temperature dependence of the photophysical and photochemical properties of the tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ion in aqueous solution", *J. Am. Chem. Soc.* **98** (16), 4853–4858.
- 90 I. Moreno-Garrido, L.M. Lubian and A.M. Soares (1999), "Oxygen Production Rate as a Test for Determining Toxicity of Copper to *Rhodomonas salina* Hill and *Wehterbee (Cryptophyceae)*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**, 776-782.
- 91 Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007), "Climate Change 2007: the AR4 Synthesis Report", Edited by Rajendra K. Pachauri, IPCC Chairman, Andy Resinger, Head of Technical Support Unit, The Core Writing Team. Published by IPCC, Geneva, Switzerland, 2007.
- 92 S. Arrhenius (1896), "On the Influence of Carbonic Acid in the Air upon the Temperature of the Ground", *Phil. Mag.* **41** (5), 237-276.
- 93 International Energy Agency (IEA) (2010) "World Energy Outlook 2010", *I.E.A.*, Resumen Ejecutivo.
- 94 EEA, European Environmental Agency, (2004), "Greenhouse gas emission trends and projections in Europe 2004: progress by the EU and its Member States towards achieving their Kyoto Protocol targets", Report No 5, Copenhagen, Denmark.
- 95 Energy Information Administration (2007), "International Energy Outlook", US DOE.
- 96 E. J. Wilson, D. Gerard (2007), "Carbon capture and sequestration: integrating technology, monitoring and regulation", *Wiley-Blackwell*, New Jersey, EE.UU., 1 ed.
- 97 <http://www.cenit-sostco2.es/>

-
- 98 L.F. Vega (2010), "El CO₂ como recurso. De la captura a los usos industriales", Fundación Gas Natural, Barcelona, España, 1 ed.
- 99 R.N. Stavins (2003), "Experience with Market-Based Environmental Policy Instruments", *Hand book of Environmental Economics*, **1**, 355–435.
- 100 P. Spolaorea, C. Joannis-Cassana, E. Duranb and A. Isamberta (2006), "Review Commercial applications of microalgae", *J. Biosci. Bioeng.* **101** (2), 87–96.
- 101 M. Negoro, A. Hamasaki, Y. Ikuta, T. Makita, K. Hirayama and S. Suzuki (1993), "Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler", *Appl. Biochem. Biotech.* **39–40** (1), 643–653.
- 102 T.M. Mata, A.A. Martins and N. S. Caetano (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**, 217–232.
- 103 M.A. Borowitzka (1999), "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters", *J. Biotechnol.* **70**, 313–321.
- 104 P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert (2006), "Review: Commercial Applications of Microalgae", *J. Biosci. Bioeng.* **101** (2), 87–96.
- 105 Li Y, Wang B, Wu N, Lan CQ. (2008), "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*", *Appl. Microbiol. Biot.* **81** (4), 629–36.
- 106 Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C.Q. Lan, N. Dubois-Calero (2008), "Biofuels from microalgae", *Biotechnol. Progr.* **24** (4), 815–20.
- 107 Y. Chisti (2007), "Biodiesel from microalgae", *Biotechnol. Adv.* **25** (3), 294–306.
- 108 N.M. Verma, S. Mehrotra, A. Shukla and B.N. Mishra (2010), "Review Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion", *Afr. J. Biotechnol.* **9** (10), 1402-1411.
- 109 IUPAC (1997), "Compendium of Chemical Terminology", Golden Book, 2nd ed.
- 110 A.M. Kunjapur and R.B. Eldridge (2010), "Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae", *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 3516–3526.
- 111 J.W. Schwank and M. Di Battista (1999), "Oxygen sensors: materials and applications", *MRS Bull.* **24**, 44–48.
- 112 E. Molina-Grima, J. Fernández, F.G. Acién-Fernández and Y. Chisti (2001), "Tubular photobioreactor design for algal cultures", *J. Biotechnol.* **92**, 113–31.
- 113 H. Kautsky (1939), "Quenching of luminescence by oxygen", *Trans. Faraday Soc.* **35**, 216–219.
- 114 F. Navarro, C. Villoslada, G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, T. Vick, M. Driver, G. Hildebrand and K. Liefieith (2001), "Fiber-Optic Luminescent Sensors with Composite Oxygen-Sensitive Layers and Anti-Biofouling Coatings", *Anal. Chem.* **73**, 5150–5156.

-
- 115 G. Orellana, C. de Dios, M.C. Moreno-Bondi and M.D. Marazuela (1995), "Intensity- and lifetime-based luminescence optosensing of carbón dioxide", in Proc. SPIE, , A. Scheggi (Editor), *SPIE—The International Society for Optical Engineering*, Bellingham, WA, EE.UU. **2508**, 18–29.
- 116 S. Neethirajan, D.S. Jayas and S. Sadistap (2009), "Carbon Dioxide (CO₂) Sensors for the Agri-food Industry—A Review", *Food Bioprocess Technol.* **2**, 115–121.
- 117 J.W. Severinghaus and A.F. Bradley (1958), "Electrodes for blood PO₂ and PCO₂ determination", *J. Appl. Physiol.* **13**, 515–520.
- 118 G.K. McMillan (1991), "Understand Some Basic Truths of pH Measurement", *Chem. Eng. Prog.* **87**, 30–37.
- 119 G. Jasinski, P. Jasinski, B. Chachulski and A. Nowakowski (2006), "Electrocatalytic gas sensors based on Nasicon and Lisicon", *Mater. Sci-Poland*, **24** (1), 261–268.
- 120 (a) O. Oter, K. Ertekin and S. Derinkuyu (2008), "Ratiometric sensing of CO₂ in ionic liquid modified ethyl cellulose matrix", *Talanta*, **76** (3), 557–563. (b) S.M. Borisov, M.Ch. Waldhier, I. Klimant and O.S. Wolfbeis (2007), "Optical Carbon Dioxide Sensors Based on Silicone-Encapsulated Room-Temperature Ionic Liquids", *Chem. Mater.*, **19** (25), 6187–6194. (c) YSI 8500 (www.ysilifesciences.com).
- 121 A. Mills and K. Eaton (2000), "Optical sensors for carbon dioxide: an overview of sensing strategies past and present", *Quim. Anal.* **19**, 75–86.
- 122 M.J. Leiner, J. Tusa and I. Klimant (2009), US Patent 20090004751A1.
- 123 C. Bultzingslowen, A.K. McEvoy, C. McDonagh and B.D. MacCraith (2003), "Lifetime-based optical sensor for high-level pCO₂ detection employing fluorescence resonance energy transfer", *Anal. Chim. Acta*, **480**, 275–283.
- 124 (a) Orellana, G. and Moreno, M.C. "Sensor óptico", Patente Española 9002740 (29/10/1990); (b) G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, E. Segovia and M.D. Marazuela (1992), "Fiber-optic sensing of carbon dioxide based on excited-state proton transfer to a luminescent ruthenium(II) complex", *Anal. Chem.* **64**, 2210–2215. (c) M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi y G. Orellana (1998), "Luminescence lifetime quenching of a ruthenium(II) polypyridyl dye for optical sensing of carbon dioxide", *Appl. Spectrosc.* **52**, 1314–1320. (d) L. Tormo, N. Bustamante, G. Colmenarejo, G. Orellana (2010), "Can luminescent Ru(II) polypyridyl dyes measure pH?", *Anal. Chem.* **82**, 5195–5204.
- 125 N.A. Nimer, M.D. Iglesias-Rodríguez and M.J. Merrett (1997), "Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species", *J. Phycol.* **33**, 625–631.
- 126 K. Kiviharju, K. Salonen, U. Moilanen and T. Eerikäinen (2008), "Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 657–665.

-
- 127 C.M. Harris, R.W. Todd, S.J. Bungard, R.W. Lovitt, G. Morris and D.B. Kell (1987), “Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass”, *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 181–186.
- 128 A.M. Salgado, R.O.M. Folly and B. Valdman (2001), “Biomass monitoring by use of a continuous on-line optical sensor”, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **75** (1), 24–28.
- 129 American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation (1999), “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Section 10200 A”, *Amer. Public. Health. Assn. EE.UU.*, Washington, DC, 20th ed.
- 130 J. Pelley (1998), “Is Coastal Eutrophication Out of Control?”, *Environ. Sci. Technol.* **10**, 462–466.
- 131 S. Marose, C. Lindemann, R. Ulber and T. Scheper (1999), “Optical sensor systems for bioprocess monitoring”, *Trends Biotechnol.* **17**, 30–34.
- 132 J. Moreno, M.A. Vargas, H. Rodríguez, J. Rivas and M.G. Guerrero (2003), “Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047”, *Biomol. Eng.* **20**, 191–197.
- 133 I. Kilmant, C. Huber, G. Liebsch, G. Neurauder, A. Stangelmayer and O.S. Wolfbeis (2001), “Dual lifetime referencing (DLR) – a new scheme for converting fluorescence intensity into a frequency-domain or time-domain information”, en “*New trends in fluorescence spectroscopy*”, B. Valeur and J.C. Brochon (Editores), Springer Series on Fluorescence, Springer, Berlin-Heidelberg, Alemania, Ch. 13, pp. 257–274.
- 134 M.L. Hitchman (1978), “Chemical Analysis: Measurement of dissolved oxygen”, *John Wiley & Sons, Inc., EE.UU., N.J.* **49**, 198.
- 135 M.J. Schervish (1996), “P-Values: What they are and what they are not”, *Am. Stat.* **50** (3), 203–206.
- 136 M. Felip and J. Catalan (2000), “The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima”, *J. Plankton Res.* **22** (1), 91–105.