

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Máster

**MEJORA DE UN FOTOBIORREACTOR DE
BAJO COSTE**
(Improvement of a low-cost photobioreactor)

Para acceder al Título de

***Máster Universitario en Ciencia e
Ingeniería de la Luz***

Autor: Borja García García

Julio - 2024

MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA LUZ

CALIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Realizado por: Borja García García

Director del TFM: Luis Rodríguez Cobo y Adolfo Cobo García

Título: “Mejora de un fotobiorreactor de bajo coste”

Title: “Improvement of a low-cost photobioreactor”

Presentado a examen el día: 31 de julio de 2024

para acceder al Título de

MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA LUZ

Composición del Tribunal:

Presidente (Apellidos, Nombre): Félix Fanjul Vélez

Secretario (Apellidos, Nombre): Yael Gutierrez Vela

Vocal (Apellidos, Nombre): Pablo Albella Echave

Este Tribunal ha resuelto otorgar la calificación de:

Fdo: El Presidente

Fdo: El Secretario

Fdo: El Vocal

Fdo: El Director del TFM

VºBº del Coordinador

Trabajo Fin de Máster Nº
(a asignar por la Secretaría)

Trabajo realizado con los medios aportados por los proyectos INIVAL23/10, financiado por IDIVAL; TED2021-130378B-C21 y PID2022-137269OB-C22, financiados por MICIU/AEI/10.13039/501100011033. También agradecer a Ecohydros S.L. y al Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Mejora de un fotobiorreactor de bajo coste

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de la Luz

ETS de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación

Grupo de Ingeniería Fotónica (GIF)

por *Borja García García*

Resumen

La dinámica del fitoplancton juega un papel crucial en los ecosistemas acuáticos ya que son un importante indicador del estado trófico y la salud de los ecosistemas. Cambios en la composición de la comunidad de fitoplancton y la biomasa pueden ser indicativos de eutrofización que pueden resultar en floraciones de algas nocivas (FAN). Debido a la contaminación y al cambio climático las FAN están aumentando tanto en frecuencia como en intensidad suponiendo un gran problema en los ecosistemas. Las FAN se producen con poca antelación, por lo que es de gran importancia el desarrollo de herramientas de detección y predicción tempranas así como una monitorización continua.

En este contexto, el objetivo principal del trabajo radica en la construcción de un fotobiorreactor de bajo coste a través de la mejora del Pioreactor, realizando un rediseño e implementando nuevos módulos que pueden ser de interés para el estudio del fitoplancton. Los cambios realizados consisten en la mejora de la iluminación para el fotoperiodo, la implementación de un módulo para medir fluorescencia con excitaciones a diferentes longitudes de onda y la posibilidad de realizar medidas de espectroscopía Raman. La mejora y combinación de técnicas podrían ser de utilidad para la monitorización continua de especies de fitoplancton.

Palabras clave – Fotobiorreactor, Fitoplancton, Cianobacteria, Monitoreo continuo, Fluorescencia, Espectroscopía Raman, Biorreactor, Pioreactor, Raspberry Pi, Arduino.

UNIVERSITY OF CANTABRIA

Improvement of a low-cost photobioreactor

Master's Degree in Light Science and Engineering

Superior Technical School of Industrial and Telecommunication Engineers

Photonics Engineering Group

by *Borja García García*

Abstract

Phytoplankton dynamics play a crucial role in aquatic ecosystems, serving as vital indicators of trophic status and ecosystem health. Changes in phytoplankton community structure and biomass can indicate eutrophication, which may result in harmful algal blooms ((!HAB)s). Due to pollution and climate change, the frequency and intensity of HABs are increasing, posing a significant challenge to ecosystem stability. The occurrence of HABs with minimal warning underscores the necessity of developing rapid detection and prediction tools coupled with continuous monitoring.

In this context, the main objective of this work is to construct a low-cost photobioreactor. This will be achieved by improving the Pioreactor, redesigning it, and implementing new modules that may be of interest for the study of phytoplankton. The modifications include enhancements to the illumination for the photoperiod, the incorporation of a module to measure fluorescence with excitation at varying wavelengths, and the potential for Raman spectroscopy measurements. The advancement and integration of these techniques could be beneficial for continuously monitoring phytoplankton species.

Key words – Photobioreactor, Phytoplankton, Cyanobacteria, Continuous monitoring, Fluorescence, Raman spectroscopy, Bioreactor, Pioreactor, Raspberry Pi, Arduino.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado y ayudado. En especial, a Luis y Adolfo, por creer en mí y porque sin ellos nada hubiese sido posible.

También a mis compañeros, especialmente a Mariela por ayudarme siempre tanto y por los buenos momentos que pasamos. De igual forma, a Celia por recibirme con los brazos abiertos desde el primer momento.

A todo el grupo del GIF por hacer que sienta de este lugar una segunda casa.

A Carlos por hacer que mis días sean mejores.

Por último, de todo corazón, debo agradecer a mi familia quienes siempre han estado ahí, dándome todo su apoyo incondicional.

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	III
Acrónimos	VI
1 Introducción	1
1.1 El problema: Floraciones de Algas Nocivas	2
1.2 Objetivos	5
1.3 Estructura del documento	5
2 Fundamentos teóricos	7
2.1 Biorreactores	8
2.2 Fitoplacton: Cianobacterias	9
2.2.1 Anatomía interna de las Cianobacterias	10
2.2.2 Anatomía externa de las Cianobacterias	11
2.2.3 Crecimiento de las Cianobacterias	13
2.2.4 Especies de Cianobacterias empleadas	13
2.3 Interacción Luz-fitoplancton	14
2.3.1 Densidad Óptica	14
2.3.2 Fluorescencia	16
2.3.3 Espectroscopía Raman	18
3 Mejora del Fotobiorreactor	21
3.1 Pioreactor	21
3.1.1 Características y funcionamiento	23
3.1.2 Posibles mejoras	24
3.2 Mejora de iluminación para fotoperiodo	25
3.3 Implementación de Fluorescencia	27
3.3.1 Fluorescencia de las cianobacterias en equipo confocal	27
3.3.2 Módulo de multi-excitación de fluorescencia	29
3.3.3 Sensor de fluorescencia con fotodiodo	32
3.4 Monitorización con Espectroscopía Raman	34
3.5 Rediseño del Fotobiorreactor	37

4	Análisis de funcionamiento	40
4.1	Cultivos de cianobacterias	40
4.2	Fluorescencia	44
5	Conclusiones y Líneas Futuras	46
5.1	Conclusiones	46
5.2	Líneas futuras	47
	Bibliografía	49

Índice de figuras

1 Introducción

1.1	El fitoplancton es extremadamente diverso [2]. Las ilustraciones no están a escala.	2
1.2	Causas de la formación de floraciones de algas nocivas.	3
1.3	a) y b) Embalse de Valdecaballeros (Badajoz) [10], c) Embalse de Villar del Rey (Badajoz) [10], d) y g) embalse de Alcántara (Cáceres) [11], e) y f) Embalse de Jaime Ozores (Badajoz) [10].	4
1.4	ODS vinculados a la calidad del agua y vida submarina.	5
1.5	Estructura que sigue el documento.	6

2 Fundamentos teóricos

2.1	Estructura general de un tipo de biorreactor de tanque agitado continuo. Adaptada de [16]	8
2.2	Diferentes tipos de fotobiorreactores. Fotobiorreactores industriales con distintos sistemas de captura de luz: a) fotobiorreactor abierto, b) canales finos de panel plano, d) y f) fotobiorreactores tubulares. c) y g) fotobiorreactores de laboratorio con sistema de iluminación artificial. [19], [20], [21], [22], [23]	9
2.3	Fitoplancton y zooplancton [24].	9
2.4	Ilustración de una típica célula de cianobacteria indicando las diferentes partes de esta. Adaptada de [25].	10
2.5	Imagen de microscopía realizada donde se ve una especie de cianobacteria (<i>Dolichospermum crasum</i> . UAM 502) que contiene heterocistos, acinetos y células vegetativas.	12
2.6	Imágenes al microscopio de las tres especies de cianobacterias con las que se ha trabajado: a) <i>Dolichospermum crasum</i> (UAM 502). b) <i>Microcystis aeruginosa</i> (UAM 253). c) <i>Aphanizomenon sp.</i> (UAM 588).	13
2.7	<i>Izquierda:</i> Absorción de la luz. <i>Derecha:</i> Dispersión de la luz por partículas en suspensión.	14
2.8	Diagrama de Jablonski. <i>Línea morada:</i> el electrón pasa del estado fundamental a un estado excitado. <i>Línea roja:</i> conversión interna. <i>Línea azul:</i> relajación vibracional. <i>Línea verde:</i> emisión de fluorescencia al pasar de un estado electrónico de mayor energía al fundamental.	16
2.9	Espectros de absorción y emisión de la clorofila-a y de la ficocianina [28].	17

2.10 Clasificación de diferentes grupos espectrales de fitoplancton por fluorescencia. Se puede observar que cada uno de estos grupos tiene una curva espectral diferente con la que se podría de terminar a que grupo pertenece el fitoplancton midiendo la fluorescencia [29]. Las cianobacterias pertenecería al grupo *Blue*. 18

2.11 Principio básico de la espectroscopía Raman. Los diagramas Jablonski muestran las diferentes transiciones de energía. 19

3 Mejora del Fotobiorreactor

3.1 HAT del Pioreactor. 22

3.2 Pioreactor con un cultivo de cianobacterias en el vial. 22

3.3 El Pioreactor tiene tres sistemas principales: un agitador magnético, un termostato y un sistema óptico. 23

3.4 Led blanco de alta potencia L2-PGC2-S de Bivar Inc. empleados para la mejora de la iluminación del fotoperiodo [34]. 25

3.5 Esquemático del circuito diseñado para la mejora de iluminación de fotoperiodos. R_3 y R_4 son las resistencias de polarización del los led, se emplean resistencias de 24Ω 25

3.6 Mejora de iluminación para foto-periodo realizada. *Izquierda:* fotobiorreactor con los leds de 5 mm sin modificar. *Derecha:* fotobiorreactor en el que se han implementado los led de alta potencia. 26

3.7 Microscopio confocal de fluorescencia NIKON A1R. 27

3.8 Imágenes de fluorescencia de las diferentes especies de cianobacterias. Cada imagen muestra conjuntamente la emisión de fluorescencia por la excitación de las líneas 405 nm, 488 nm y 561 nm. 28

3.9 Barridos espectrales. Por columnas se muestran dos de las especies y por filas la línea láser de excitación empleada. 28

3.10 Espectros de intensidad obtenidos a partir de las imágenes del barrido espectral realizado. 29

3.11 Espectros de los leds normalizados. 30

3.12 Esquemático del circuito diseñado para el modulo de excitación de fluorescencia. R_3 y R_4 son las resistencias de polarización del led correspondiente. 30

3.13 Pieza diseñada para el acoplamiento de la luz de los leds a la fibra. . . . 31

3.14 Módulo para la excitación de fluorescencia basado en leds de alta potencia con diferentes longitudes de onda. 31

3.15 Fotodiodo FDS100 empleado [35]. 32

3.16 Responsividad del Fotodiodo FDS100 [35]. 32

3.17 Espectro de transmisión del filtro FGL695 de Thorlabs [36]. 33

3.18 Esquemático del circuito diseñado para el sensor de fluorescencia. 34

3.19 Equipo Raman confocal XperRAM C de Nanobase Inc. 35

3.20	Portamuestras con canal de microfluídica conectado a las bombas peristálticas del bioreactor e integrado en el equipo de espectroscopía Raman.	36
3.21	Espectros Raman promedio y desviaciones estándar de las tres especies de cianobacterias estudiadas, <i>Izquierda</i> : UAM 502, <i>Medio</i> : UAM 588 y <i>Derecha</i> : UAM 253.	36
3.22	<i>Izquierda</i> : Espectro Raman promedio de las tres especies de cianobacterias estudiadas junto con sus desviaciones estándar. <i>Derecha</i> : Espectro promedio de todos los espectros de cianobacterias medidos junto con su desviación estándar y la posición de los picos Raman más significativos. .	36
3.23	Parte principal del fotobiorreactor rediseñada.	38
3.24	Tapas y soportes diseñados para el fotobiorreactor.	38
3.25	Fotobiorreactor ensamblado tras la implementación de las mejoras.	38
4	Análisis de funcionamiento	
4.1	Vial antes y después de dos días en el fotobiorreactor. <i>Izquierda</i> : Vial recién inoculado con UAM 253, se aprecia la ligera suspensión verde de las cianobacterias. <i>Derecha</i> : Mismo vial tras dos días en el fotobiorreactor. Como se aprecia, está contaminado por otros organismos.	41
4.2	Lectura de densidad óptica del fotobiorreactor. Se representan de manera aproximada las fases de latencia, exponencial y estacionaria.	42
4.3	Densidad óptica normalizada del fotobiorreactor. Se representan de manera aproximada las fases de latencia, exponencial y estacionaria.	42
4.4	Tasa de crecimiento obtenida a partir de las lecturas de densidad óptica. Se representan de manera aproximada las fases de latencia, exponencial y estacionaria.	43
4.5	Lectura de la temperatura del fotobiorreactor.	43
4.6	Lectura de la fluorescencia de cianobacterias medida por el fotodiodo. . .	44
4.7	Espectros de fluorescencia medidos con el espectrómetro.	45
5	Conclusiones y Líneas Futuras	

Acrónimos

ADC	Analog to Digital Converter	MOSFET	Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor
AR5	Fifth Assessment Report	ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
AR6	Sixth Assessment Report	PMT	Photo Multiplier Tube
CSV	Comma-Separated Values	PWM	Pulse Width Modulation
DO	Densidad Óptica	RPM	Revolución Por Minuto
FAN	Floración de algas nocivas	SCL	Serial Clock Line
HAB	Harmful algal bloom	SDA	Serial Data Line
HAT	Hardware Attached on Top	SQL	Structured Query Language
I2C	Inter-Integrated Circuit	SROCC	Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change		
IR	Infrarrojo		



1

Introducción

1.1 El problema: Floraciones de Algas Nocivas	2
1.2 Objetivos	5
1.3 Estructura del documento	5

El cambio climático es uno de los desafíos ambientales más críticos de nuestro tiempo. Las predicciones mostradas en los informes del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) presentan un preocupante panorama sobre las consecuencias de este. En respuesta a la creciente evidencia científica, en las últimas décadas parece haber aumentado considerablemente la conciencia social sobre el cambio climático y sus efectos. Sin embargo, el Informe de Evaluación **AR6** subraya la urgencia de tomar medidas drásticas y rápidas para mitigar el cambio climático y adaptarse a sus efectos inevitables, resaltando la necesidad de cooperación internacional y políticas ambiciosas para evitar los peores escenarios [1].

Entre los graves efectos que ya se van haciendo evidentes se encuentra el impacto sobre los ecosistemas. El calentamiento global, el aumento de la estratificación, la acidificación del agua y las alteraciones en los ciclos de nutrientes son algunos de los impactos del cambio climático que afectan directamente sobre nuestros los protagonistas en esta historia: el fitoplancton.

El fitoplancton, tanto marino como de agua dulce, juega un papel crucial en la salud y el funcionamiento de estos ecosistemas. No obstante, las alteraciones en su dinámica pueden afectar con impactos negativos en la pesca, la acuicultura, la salud humana y las economías costeras.

1.1. El problema: Floraciones de Algas Nocivas

El fitoplancton es un conjunto de organismos microscópicos que habitan flotando en aguas dulces y saladas del planeta. De forma equivalente a las plantas que conocemos, son organismos fotoautótrofos gracias al proceso de la fotosíntesis; pues usando la luz solar como fuente principal de energía, son capaces de producir sus propias reservas energéticas. Así, estos microorganismos proliferan en las regiones superficiales de los cuerpos de agua, donde tienen acceso a la luz solar y a los nutrientes que necesitan.

El fitoplancton presenta una gran biodiversidad. Podemos encontrar desde bacterias, pasando por protistas, hasta plantas unicelulares. Entre los tipos más comunes se encuentran las cianobacterias, las diatomeas con su envoltura de sílice, los dinoflagelados, las algas verdes y los cocolitóforos que están recubiertos de carbonato de calcio (Figura 1.1).



Figura 1.1. El fitoplancton es extremadamente diverso [2]. Las ilustraciones no están a escala.

Producto de las actividades de la agricultura y la ganadería o el crecimiento de ciudades y pueblos, se vierten diferentes elementos a los ecosistemas como fósforo (P) y nitrógeno (N), causando una contaminación por nutrientes inorgánicos. A esta contaminación se le llama **eutrofización** y es una de las principales causas del deterioro de la calidad del agua. Los síntomas más agudos de la eutrofización son la hipoxia¹ y las floraciones de algas nocivas (**FAN**), *harmful algal bloom* (**HAB**) en inglés.

En una situación de exceso de nutrientes y de temperatura favorable, estos organismos fitoplanctónicos pueden multiplicarse rápidamente formando lo que se suele llamar florecimiento o *bloom*. Cuando esta proliferación de algas causa impactos negativos en otros organismos mediante la producción de toxinas o por cualquier otro medio, es cuando toma el nombre de **FAN**.

¹Referido a condiciones de bajo oxígeno. En medios acuáticos, cuando el oxígeno disuelto ve reducida su concentración hasta un punto en que resulta perjudicial para los organismos acuáticos que viven en el sistema. A la ausencia total de oxígeno se le denomina anoxia.

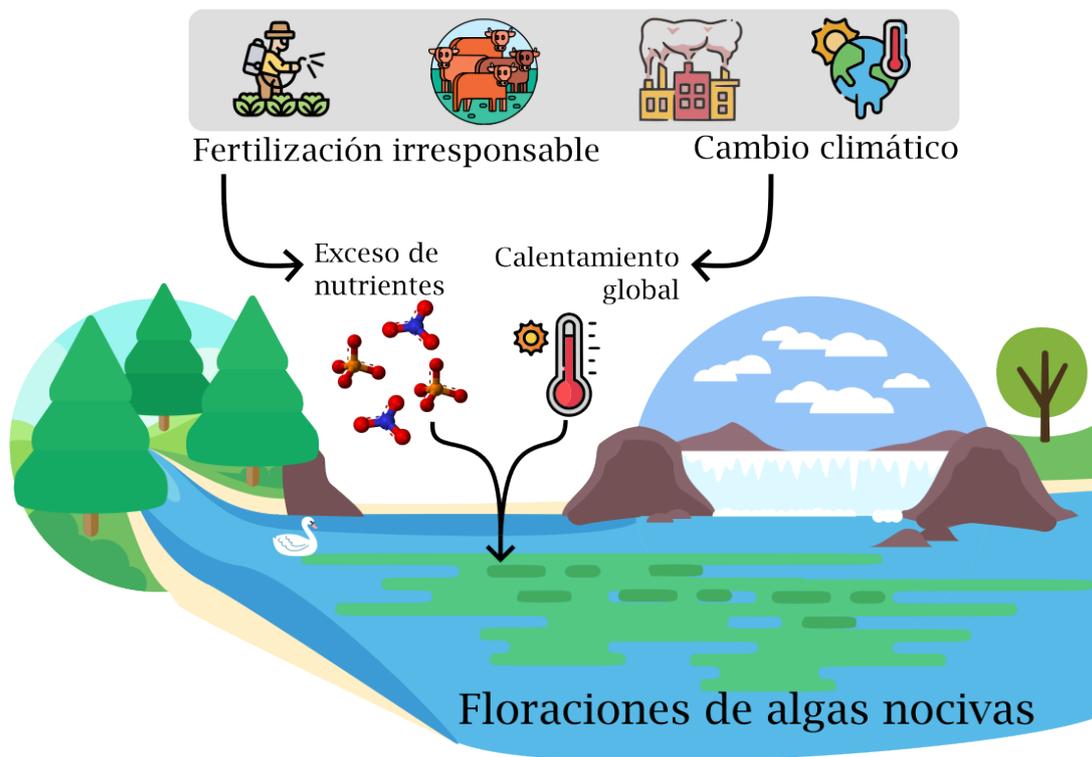


Figura 1.2. Causas de la formación de floraciones de algas nocivas.

Estos fenómenos parecen verse reforzados por el calentamiento global. El Quinto Informe de Evaluación del IPCC (AR5) [3] ya concluyó que las FAN habían aumentado en frecuencia e intensidad, causados en parte por el calentamiento, las fluctuaciones de nutrientes en áreas de surgencia y la eutrofización costera. Además, el Informe Especial sobre los Océanos y la Criósfera en un Clima Cambiante (SROCC) [4] habla de evidencias adicionales que atribuyen características de las FAN al cambio climático, demostrando que los cambios en la biogeografía, el aumento de la abundancia y la mayor toxicidad de las FAN en los últimos años han sido causados en parte o en su totalidad por el calentamiento y por otros factores humanos más directos. En general, se proyecta que la frecuencia de las FAN, su toxicidad y el riesgo para los sistemas naturales y humanos continúen aumentando en el siglo XXI con el calentamiento y el aumento de CO₂ [5], [6] (Figura 1.2).

Generalmente, las FAN en lagos y ríos de agua dulce, o en estuarios, son causadas por **cianobacterias**. Las cianobacterias producen una gran variedad de compuestos, considerados metabolitos secundarios, por no realizar funciones principales en la cianobacteria que los produce. Entre estos se encuentran las cianotoxinas, que causan diferentes efectos sobre la salud de los organismos que se ven expuestos a ellos. Estas toxinas pueden ser de muy diversa naturaleza química, por lo que normalmente se clasifican por los efectos que producen: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes. Así, las cianotoxinas se consideran los compuestos más tóxicos y más preocupantes en las masas de agua, tanto por su toxicidad como por su amplia distribución. Éstas pueden tener claros efectos nocivos en la salud de las personas expuestas, considerándose como uno de los mayores riesgos para la salud derivados del consumo del agua. [7]

A nivel ecológico, el efecto más importante es la disminución de la biodiversidad, y la anoxia, aunque en realidad estas son consecuencias directas de la presencia del afloramiento masivo, independientemente de si este es tóxico o no.

En España, las cianobacterias están presentes en muchos ríos y embalses en los que, con frecuencia, se desarrollan floraciones (Figura 1.3). Las cianobacterias potencialmente tóxicas son abundantes o dominantes en alrededor de la mitad de los embalses que se investigan y los datos indican que alrededor del 65% de las muestras en que las cianobacterias eran abundantes presentaban cianotoxinas. Así, se tiene la hipótesis de que alrededor del 25% de los embalses españoles puedan presentar en algún momento cianotoxinas en concentraciones variables. [8], [9], [10]



Figura 1.3. a) y b) Embalse de Valdecaballeros (Badajoz) [10], c) Embalse de Villar del Rey (Badajoz) [10], d) y g) embalse de Alcántara (Cáceres) [11], e) y f) Embalse de Jaime Ozores (Badajoz) [10].

Las FAN se producen con poca antelación, por lo que es muy difícil de pronosticar cuándo se podría presentar una. Es por eso que los programas de monitoreo sostenido a escala local y los sistemas de alerta temprana pueden alertar a los gestores de recursos y a las partes interesadas sobre las posibles floraciones para que puedan tomar medidas y reducir los impactos, como alertar de mariscos tóxicos o reubicar actividades. Por consiguiente, los riesgos serán mayores en áreas poco monitoreadas. Siendo así las personas de estas áreas más vulnerables a estos peligros biológicos. [5]

Vista la importancia de una motorización proactiva y continua, parece imprescindible el desarrollo de herramientas de detección y predicción tempranas. Los métodos tradicionales incluyen la enumeración de especies utilizando microscopía óptica o medidas de clorofila-a por extracción de pigmentos mediante solvente, que tienden a ser costoso y laborioso [12]. También, cada día se están desarrollando más tecnologías basadas en espectroscopía hiperespectral por satélite [13], que para monitorización de grandes masas de agua en mares y océanos puede ser de suma utilidad, pero puede no ser tan accesible

para la monitorización de muchos embalses y ríos.

Queda claro que el análisis de calidad de aguas y fitoplancton son temas de investigación actual, que nos acompañarán tendidamente a lo largo de muchos años. Asimismo, dos de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la Agenda 2030 tienen relación con la calidad del agua y la biodiversidad acuática (Figura 1.4). En estos ya se advierte del estado de emergencia de las aguas, remarcando la necesidad de aumentar los conocimientos científicos, desarrollar capacidades de investigación y transferir tecnología, a fin de mejorar la salud de las aguas. [14]

Con esta motivación, este trabajo trata de sumergirse en la problemática, investigando sobre el tema e intentando incentivar el desarrollo de nuevos dispositivos para la monitorización del fitoplancton. Todo ello a través de la mejora de un fotobiorreactor de bajo coste.

Los fotobiorreactores son dispositivos capaces de simular condiciones controladas para el cultivo, control y mantenimiento de organismos vivos. Lo que puede ser de gran utilidad para investigaciones relacionadas con el fitoplancton y las FAN. Con la mejora de un fotobiorreactor de bajo coste se pretende acercar estos dispositivos de una manera asequible a la comunidad para la investigación y monitorización de fitoplancton. El trabajo no tiene la intención de facilitar un dispositivo óptimo para estos fines, sino transmitir ideas abriendo un abanico de posibilidades que fomenten el desarrollo de instrumentos que se ajusten a los propósitos de la investigación particular.

1.2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo radica en la construcción de un fotobiorreactor de bajo coste, basado en el *Pioreactor*¹, realizando un rediseño e implementando nuevos módulos que puedan ser de interés para el estudio del fitoplancton. Asimismo, se determinan varios subobjetivos:

- Estudio de las características biológicas y cultivos de fitoplancton, así como la interacción de la luz con estos.
- Diseño e implementación de nuevos módulos para la mejora del fotobiorreactor.
- Análisis y valoración del fotobiorreactor.

1.3. Estructura del documento

Se detalla a continuación la estructura general que sigue el presente documento. Además, en la Figura 1.5 se ilustra de forma simple el desarrollo, destacando los puntos

¹Biorreactor de fuente abierta y bajo coste desarrollado por la empresa Pioreactor en Waterloo (Canadá). Más detalles en la Sección 3.1.



Figura 1.4. ODS vinculados a la calidad del agua y vida submarina.

relevantes del trabajo.

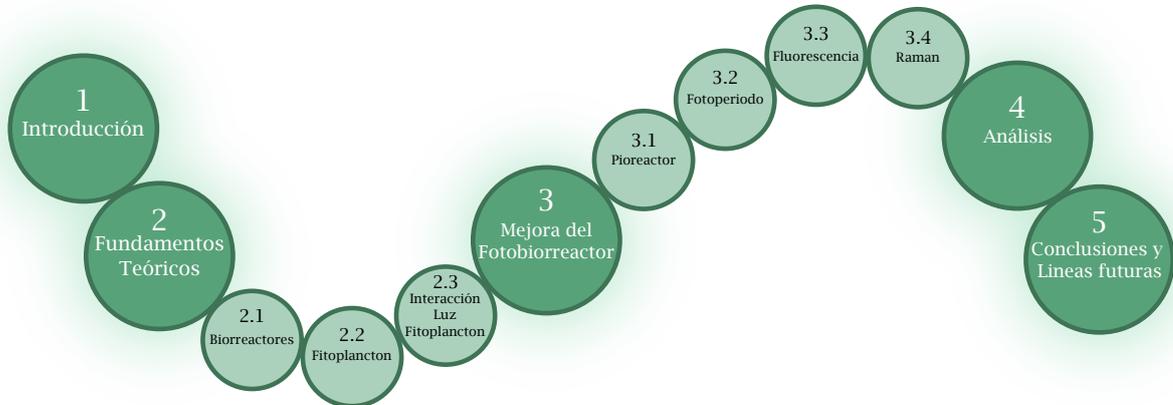


Figura 1.5. Estructura que sigue el documento.

- **Capítulo 1. Introducción**

Como hemos visto, este capítulo pretende introducir el tema principal de una forma superficial para hacernos con la perspectiva general en la que se enmarca el trabajo. Conocer el contexto general, la motivación y los objetivos facilitará la comprensión del mismo.

- **Capítulo 2. Fundamentos Teóricos**

Comprender los principios básicos a partir de los cuales se desarrolla el trabajo es fundamental. Por eso, en este capítulo se recopilan en tres grandes bloques los conocimientos necesarios para su comprensión: los fotobiorreactores, el fitoplancton y la interacción luz-fitoplancton. A partir de este estudio se derivan algunas de las consideraciones prácticas para el desarrollo posterior.

- **Capítulo 3. Mejora del Fotobiorreactor**

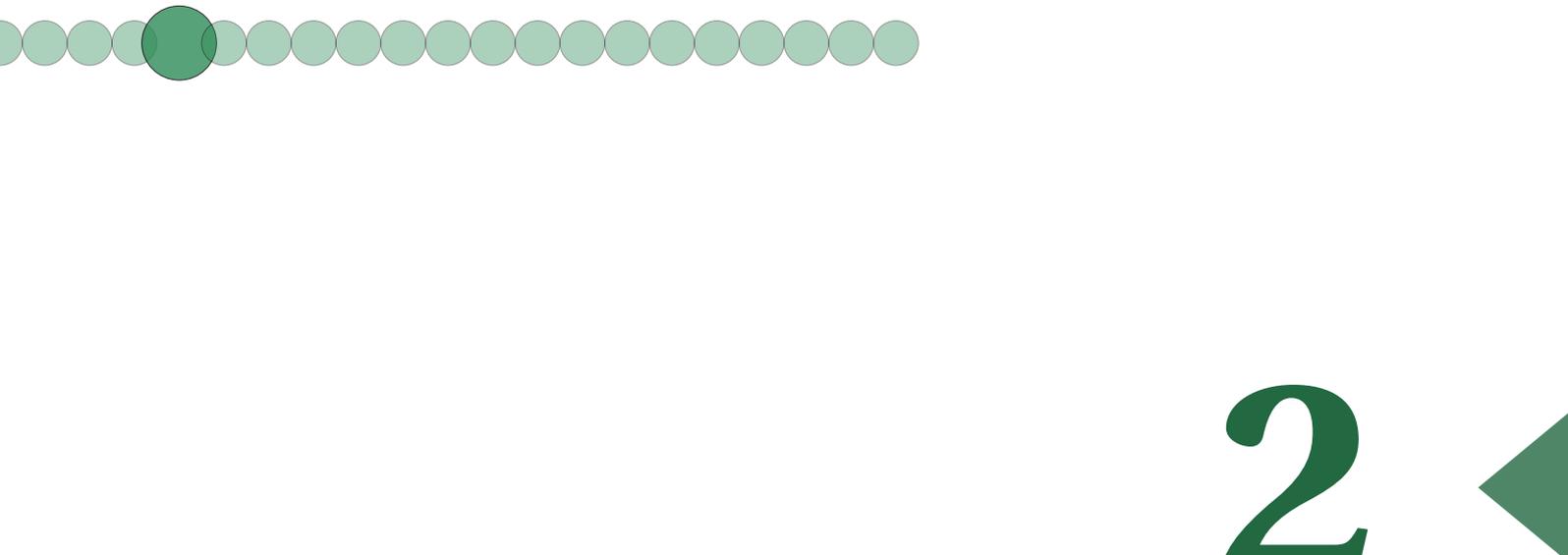
En primer lugar, se presenta el *Pioreactor*, un biorreactor de fuente abierta y bajo coste que será nuestro punto de partida. Así, antes de implementar nuestras mejoras es necesario analizarlo y comprender su funcionamiento. Tras reflexionar sobre las mejoras que queremos añadir al fotobiorreactor, llega el rediseño. En este capítulo se describe todo el proceso de diseño y las implementaciones realizadas en el fotobiorreactor.

- **Capítulo 4. Análisis del funcionamiento**

Una vez mejorado, es necesario testear el nuevo diseño y evaluar el funcionamiento del mismo. Se presentan algunos resultados preliminares que podemos obtener del dispositivo desarrollado.

- **Capítulo 5. Conclusiones y líneas futuras**

Para finalizar, se reúnen las conclusiones obtenidas del trabajo realizado y se mencionan algunas de las líneas abiertas que han quedado, así como líneas futuras por las que se podría continuar.



2

Fundamentos teóricos

2.1	Biorreactores	8
2.2	Fitoplacton: Cianobacterias	9
2.2.1	Anatomía interna de las Cianobacterias	10
2.2.2	Anatomía externa de las Cianobacterias	11
2.2.3	Crecimiento de las Cianobacterias	13
2.2.4	Especies de Cianobacterias empleadas	13
2.3	Interacción Luz-fitoplancton	14
2.3.1	Densidad Óptica	14
2.3.2	Fluorescencia	16
2.3.3	Espectroscopía Raman	18

Para abordar adecuadamente el tema, es fundamental comprender los principios básicos que sustentan este trabajo, especialmente debido a su naturaleza biológica. En este capítulo, comenzaremos definiendo qué es un biorreactor y explicando su funcionamiento más sencillo. Además, es crucial entender las características y necesidades de los microorganismos que se van a cultivar, ya que debemos proporcionarles las condiciones óptimas para su crecimiento. Finalmente, se analizará la interacción entre la luz y el fitoplancton, dado que, como veremos a lo largo del trabajo, la luz será esencial para los distintos sensores que monitorizarán el cultivo. Todo esto nos proporcionará una base sólida para entender adecuadamente el trabajo realizado.

2.1. Biorreactores

Un biorreactor es un dispositivo o sistema diseñado para proporcionar un entorno controlado en el cual se llevan a cabo reacciones biológicas, manteniendo así, un ambiente biológicamente activo. Estos dispositivos son utilizados para cultivar microorganismos, células vegetales o animales, o tejidos en condiciones optimizadas para su crecimiento y producción.

Los biorreactores pueden ser de diversos tamaños y configuraciones, desde pequeños frascos hasta grandes tanques industriales. En general, podemos describirlos como recipientes que están equipados con sistemas para controlar parámetros clave como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno, la agitación, la luz o cualquier otra variable importante para el cultivo (Figura 2.1). Estas condiciones ambientales del biorreactor afectan crucialmente en el crecimiento y la productividad de los organismos en su interior. Así, bajo las condiciones óptimas, los microorganismos o células podrán realizar su función con una producción mínima de impurezas. Las demandas específicas del cultivo a menudo son conflictivas, y lograr un rendimiento óptimo requiere alcanzar el equilibrio adecuado entre los diferentes requisitos. Es por esto que el diseño de un biorreactor es una tarea de ingeniería relativamente compleja. El éxito depende críticamente del buen diseño y operación del biorreactor. [15]

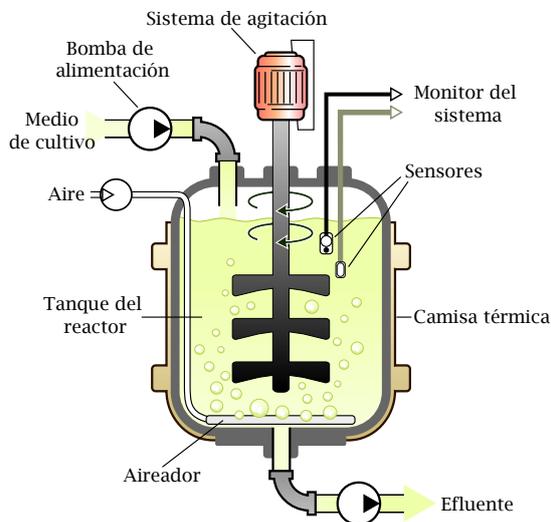


Figura 2.1. Estructura general de un tipo de biorreactor de tanque agitado continuo. Adaptada de [16]

y cianobacterias, utilizando la luz como fuente de energía. Los fotobiorreactores se diseñan para maximizar la captación de luz, ya sea natural o artificial. Suelen incluir sistemas de iluminación y control de la intensidad lumínica, además de los sistemas habituales de control. Los microorganismos, normalmente algas o cianobacterias en este caso, se cultivan en un medio de cultivo que proporciona los nutrientes necesarios y favorece el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos.

La variedad de bioprocesos es enorme y se han desarrollado muchos diseños diferentes de biorreactores para satisfacer las distintas necesidades. En todos los casos, el biorreactor debe proporcionar las condiciones ambientales necesarias para el cultivo. La configuración y diseño dependen tanto del tipo de organismos que se deseen cultivar, como del propósito específico del cultivo. Las aplicaciones de estos sistemas son diversas. Estas van desde la producción de productos farmacéuticos y bioquímicos, la generación de biocombustibles, hasta la investigación en biología y biotecnología. [17]

Uno de los tipos de biorreactores especializados es el **fotobiorreactor**. Este se distingue por su capacidad para cultivar organismos fotosintéticos, como algas

De nuevo, el diseño de un fotobiorreactor depende del microorganismo específico y del producto final deseado. Es por eso que existen muchos tipos diferentes de fotobiorreactores, cada uno con sus propias características concretas de diseño [18]. En la Figura 2.2 podemos ver algunos de los tipos más comunes de fotobiorreactores.

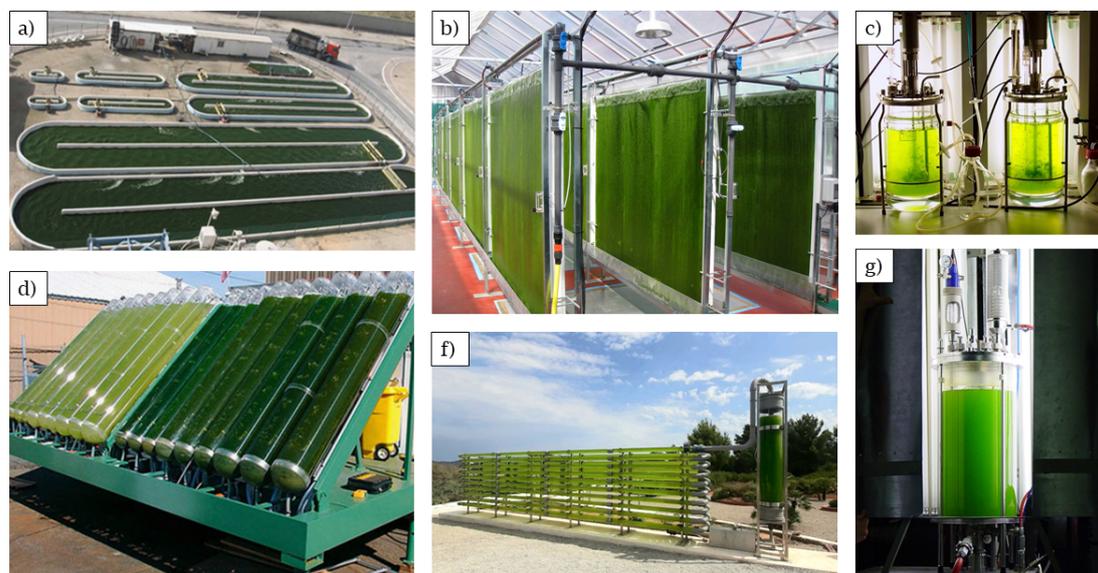


Figura 2.2. Diferentes tipos de fotobiorreactores. Fotobiorreactores industriales con distintos sistemas de captura de luz: a) fotobiorreactor abierto, b) canales finos de panel plano, d) y f) fotobiorreactores tubulares. c) y g) fotobiorreactores de laboratorio con sistema de iluminación artificial. [19], [20], [21], [22], [23]

2.2. Fitoplancton: Cianobacterias

El mundo planctónico es realmente diverso y enorme. Se denomina plancton al conjunto de organismos, principalmente microscópicos, que viven suspendidos en aguas saladas o dulces y que no tienen capacidad para hacer frente a las mareas, las corrientes y otras fuerzas que determinan su destino, sino que es arrastrado. Es por esto que toma el nombre del griego, que significa “errante” o “lo que va errante”.

Tradicionalmente, se ha subdividido el plancton en dos grandes grupos: fitoplancton y zooplancton (Figura 2.3). Fitoplancton refiriéndose al plancton vegetal y zooplancton al plancton animal. Ambos grupos están constituidos por un grupo de organismos extremadamente diverso.

El fitoplancton está compuesto por todos los organismos acuáticos autótrofos planctónicos con capacidad fotosintética. A través de la fotosíntesis que captura CO_2



Figura 2.3. Fitoplancton y zooplancton [24].

y liberan oxígeno, producen material orgánico rico en energía. Se calcula que aproximadamente un 50% del oxígeno atmosférico ha sido producido por el fitoplancton de los océanos. Además, el fitoplancton constituye la base de la cadena alimentaria de los ecosistemas acuáticos.

Como hemos visto brevemente en la introducción, el fitoplancton abarca en su conjunto muchísimos tipos de diferente forma y estructura. Sin embargo, en este trabajo nos hemos centrado principalmente en el cultivo de cianobacterias, sobre todo, por su capacidad de formar FAN y los problemas que acarrearán.

2.2.1. Anatomía interna de las Cianobacterias

Aunque tradicionalmente también son conocidas como “algas verde-azuladas”, las cianobacterias son en realidad bacterias procariotas, a diferencia de las algas, que son eucariotas. Esto es debido a que no tienen núcleo o ninguna otra estructura interna con membranas lipídicas que las recubran. Aunque las cianobacterias no tienen orgánulos rodeados por membranas, hay estructuras observables dentro de la célula (Figura 2.4).

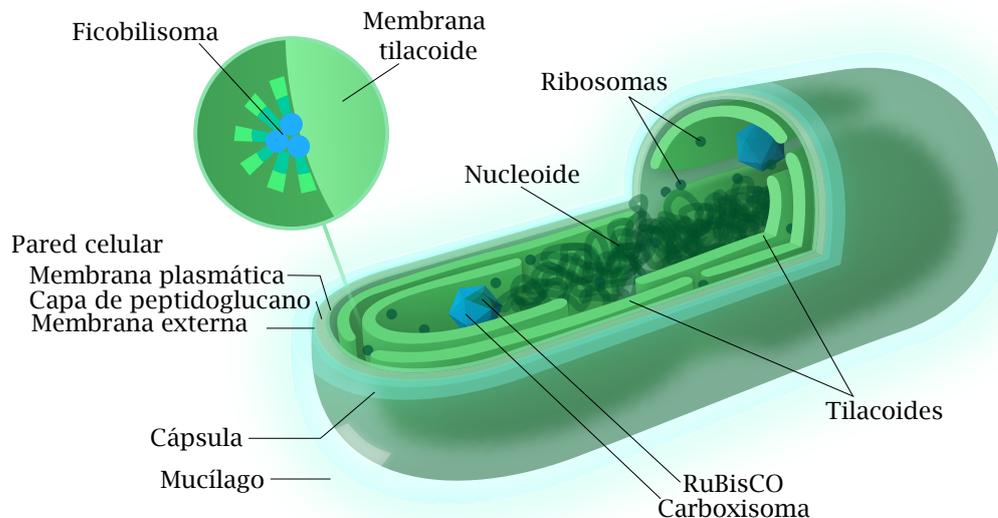


Figura 2.4. Ilustración de una típica célula de cianobacteria indicando las diferentes partes de esta. Adaptada de [25].

Algunas estructuras internas de las cianobacterias tienen funciones directas en la fotosíntesis. Una es un tipo de microcompartimiento bacteriano con pared de proteína, llamado **carboxisoma**. Esta estructura actúa para aumentar la eficiencia de la fotosíntesis en las cianobacterias al aumentar la concentración de dióxido de carbono (CO_2) alrededor de una enzima crucial, la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, abreviada **RuBisCO**. Esta enzima está involucrada en el primer paso importante de la fotosíntesis: el proceso mediante el cual el CO_2 atmosférico se incorpora en la serie de reacciones químicas que eventualmente almacenarán energía en forma de carbohidratos. [26]

Dentro de la célula de cianobacteria también hay extensiones de la membrana externa que se pliegan sobre sí mismas, aumentando la superficie. Es en estas superficies, llamadas **tilacoides**, es donde se exhiben los complejos de pigmentos fotosintéticos para capturar energía solar. Los pigmentos en estos complejos son ficocianina (azul verdoso), aloficocianina (azul), clorofila-a (verde) y ficoeritrina (rojo). Las **ficocianinas** están acopladas con proteínas para formar estructuras llamadas **ficobilisomas** y son las estructuras primarias de recolección de luz para la fotosíntesis en las cianobacterias. Estas estructuras son las que le dan su color azul-verde característico.

La superficie externa de una célula de cianobacteria consiste en peptidoglicano y una membrana externa compuesta de lipopolisacárido, esto es muy similar a la de las bacterias gramnegativas comunes. Esta es importante por que estas moléculas contribuyen a la integridad estructural de la bacteria y la protegen de algunos químicos.

En algunas células de cianobacterias hay una estructura hueca llamada **aerotopo**. Esta es una vacuola de gas. La pared de proteína que rodea al aerotopo permite que los gases pasen a través del aire, pero no del agua. A medida que el aerotopo acumula gas, hace que la célula en su interior sea más flotante en el agua, permitiéndole flotar a la superficie. Esto mueve la célula hacia la luz para que pueda fotosintetizar. Cuando la célula acumula carbohidratos más densos mediante la fotosíntesis, se vuelve menos flotante y se hunde. Según la célula consume carbohidratos y produce dióxido de carbono, la célula se vuelve más flotante y el ciclo continúa. Las cianobacterias son los únicos plancton fotosintéticos con aerotopos, lo que hace posible la regulación de la flotabilidad y la resultante migración vertical a través del agua. Aunque casi todos los tipos de cianobacterias pueden producir aerotopos, generalmente aquellos que forman floraciones en la superficie producen el mayor número de aerotopos. Cuando los aerotopos están presentes en gran número en una célula, refractan la luz que atraviesa la célula, lo que hace que se vean de color marrón oscuro o incluso negro bajo un microscopio. [26]

2.2.2. Anatomía externa de las Cianobacterias

Las cianobacterias también presentan diferencias externas en su apariencia. El nivel de organización de estas células varía desde células individuales simples y uniformes hasta grupos o colonias bastante complejas de múltiples células con un grado limitado de especialización.

Las colonias de cianobacterias tienen dos formas o estructuras principales: filamentosas y cocoide. En la forma de colonia filamentosas, las células están en cadenas lineales llamadas filamentos. Por otro lado, las células en las colonias de forma cocoide suelen ser redondas o ovaladas. Las células de cianobacterias varían en tamaño, forma y complejidad. La mayoría de las células son células vegetativas de paredes delgadas y son la unidad estructural primaria tanto de colonias filamentosas como cocoides. [11]

Los cambios en la complejidad de las células de cianobacterias a menudo ocurren en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, como la deficiencia de nutrientes. Los organismos y sus células pueden cambiar en respuesta a sus circunstancias. Generalmente son las células vegetativas las que se dividen y cambian a otros tipos de células. Dependiendo de las cianobacterias y sus condiciones, las células vegetativas pueden for-

mar generalmente uno de tres tipos de células especializadas: acinetos, células apicales o heterocistos.

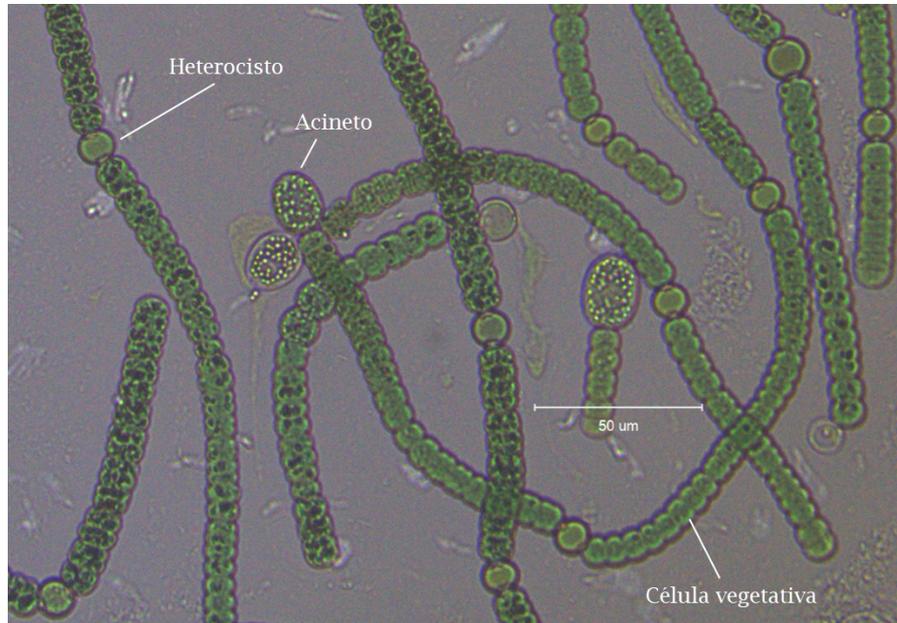


Figura 2.5. Imagen de microscopía realizada donde se ve una especie de cianobacteria (*Dolichospermum crasum*. UAM 502) que contiene heterocistos, acinetos y células vegetativas.

- Los **acinetos** son células de paredes gruesas que están especialmente adaptadas a la latencia. A menudo se producen en respuesta a la caída de las temperaturas o condiciones de secado.
- Las **células apicales** son las células terminales en un filamento de cianobacterias. A menudo se convierten en células reproductivas especializadas que se ven muy diferentes de las otras células en un filamento.
- Los **heterocistos** son generalmente más grandes que las células vegetativas y tienen paredes dobles especialmente gruesas. Los heterocistos se forman en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. Aunque el nitrógeno elemental (N_2) constituye aproximadamente el 79 % de la atmósfera de la Tierra, está en una forma química que la mayoría de los organismos no pueden usar. Los enlaces del nitrógeno molecular N_2 son demasiado fuertes para que la mayoría de los organismos los rompan. Las formas que pueden usar o reducidas de nitrógeno son compuestos como el amoníaco (NH_3). Los organismos pueden absorber y usar estas formas reducidas para producir proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes estructurales. Esta transformación química del N_2 en NH_3 se lleva a cabo, en parte, por la enzima nitrogenasa y una química muy compleja. Las cianobacterias forman nitrogenasa solo en los heterocistos porque la enzima se destruye en presencia de oxígeno (O_2). La construcción de paredes dobles y gruesas de los heterocistos es necesaria para mantener el O_2 alejado de la enzima nitrogenasa. [26]

2.2.3. Crecimiento de las Cianobacterias

Hay diferencias importantes en cómo las cianobacterias crean su próxima generación de células en comparación con las plantas y los animales. La distinción más significativa es que la replicación de las células bacterianas está completamente separada de cualquier intercambio de material genético. Nunca se ha observado el proceso de reproducción sexual en ninguna bacteria. Estas pasan por una simple división celular, también conocida como fisión binaria. El producto final de la fisión binaria son dos células hijas genéticamente idénticas. La ventaja de esto es que puede ser muy rápido. Esta rápida duplicación contribuye a la formación de floraciones.

Bajo condiciones ambientales adversas, las cianobacterias pueden producir estructuras celulares que pueden permanecer latentes por períodos prolongados y luego “germinar” en células vivas. Esto no es reproducción en el sentido más estricto, sino más bien un mecanismo de defensa para asegurar la continuación del organismo a través de circunstancias amenazantes. La forma más común de célula en reposo, como vimos antes, es un acineto. Los acinetos son células de paredes gruesas y latentes que se desarrollan a partir de células vegetativas cuando se exponen a ambientes desfavorables. La conversión de una célula vegetativa a un acineto elimina o reduce todas las funciones no esenciales y aumenta las reservas de alimentos dentro de la célula, similar a una semilla. [26]

2.2.4. Especies de Cianobacterias empleadas

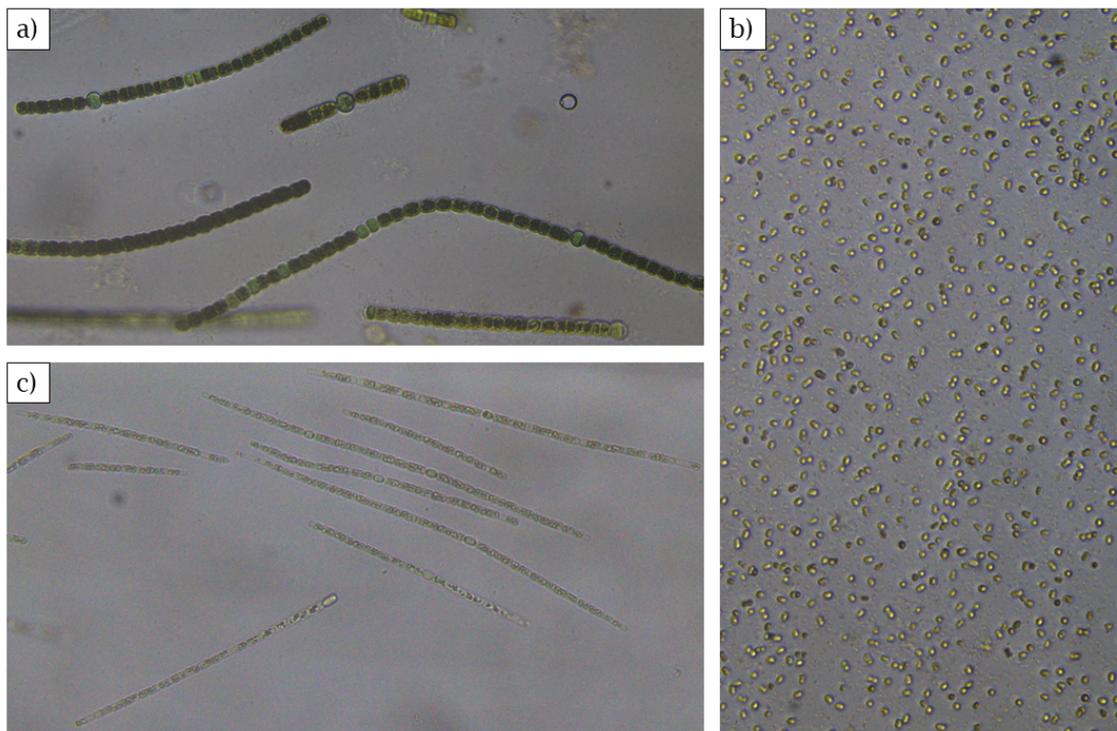


Figura 2.6. Imágenes al microscopio de las tres especies de cianobacterias con las que se ha trabajado: a) *Dolichospermum crasum* (UAM 502). b) *Microcystis aeruginosa* (UAM 253). c) *Aphanizomenon* sp. (UAM 588).

Para este trabajo se han podido disponer de cultivos puros de tres especies diferentes de cianobacterias:

- *Dolichospermum crasum*. UAM 502
- *Microcystis aeruginosa*. UAM 253
- *Aphanizomenon sp.* UAM 588

En la Figura 2.6 se muestran algunas imágenes de las especies realizadas al microscopio.

2.3. Interacción Luz-fitoplancton

Para acabar el Capítulo 2, repasaremos brevemente algunas de las interacciones y procesos de la luz, además del efecto de estos sobre el fitoplancton, para después poder emplearlas en características de mejora del fotobiorreactor. Así, veremos que la luz no solo es fundamental en el fotobiorreactor por la necesidad de proporcionar la energía necesaria para la fotosíntesis, sino que la luz también puede ser esencial para los distintos sensores que monitorizarán el cultivo. En este trabajo se emplean sobretodo tres procesos diferentes de interacción de la luz con el fitoplancton: la densidad óptica, la fluorescencia y la espectroscopía Raman.

2.3.1. Densidad Óptica

El *scattering* o dispersión puede ser utilizada para medir la densidad óptica de un medio mediante varias técnicas aprovechando cómo la luz interactúa con las partículas en el medio. La densidad óptica está relacionada con la concentración y las propiedades de las partículas en el medio, que afectan a la cantidad y el ángulo de dispersión de la luz.

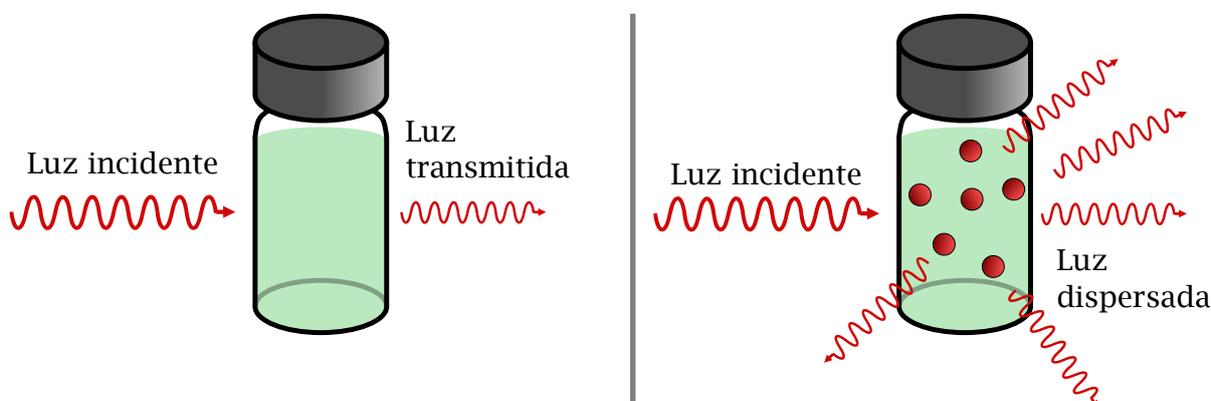


Figura 2.7. Izquierda: Absorción de la luz. Derecha: Dispersión de la luz por partículas en suspensión.

Cuando la luz atraviesa un medio que contiene partículas, estas dispersan la luz en diferentes direcciones. La cantidad de luz dispersada depende de la densidad, tamaño y composición de las partículas. De esta forma, la interacción de la luz dentro de los viales con microorganismos suspendidos será diferente a la de la luz que pasa a través de soluciones concentradas (Figura 2.7). En lugar de ser absorbida, la luz es dispersada por las células en suspensión. Esta luz dispersada la mediremos como densidad óptica (DO). A medida que aumenta la turbidez, se produce más dispersión, lo que da como resultado una lectura de DO más alta. La longitud de onda de la luz utilizada puede afectar a la medida, ya que diferentes partículas dispersan la luz de manera diferente dependiendo de su tamaño y la longitud de onda.

Hay dos técnicas que se basan en este concepto. Por un lado, está la **nefelometría**. Esta se basa en la medición de radiación dispersa con un detector que no se encuentra en el camino directo del haz luminoso. Por otro lado, la **turbidimetría** se basa en la medición la pérdida de intensidad de la luz transmitida debido al efecto de dispersión de las partículas suspendidas en ella. La elección entre uno de ambos métodos reside en la dispersión de luz, si es extensa, es apropiado aplicar la turbidimetría, en cambio, si es mínima es apropiada la nefelometría.

Como veremos en el caso de nuestro fotobiorreactor, debido a variables de fabricación, como las diferencias en la intensidad y sensibilidad del LED, las lecturas brutas de DO no son comparables entre sí. Por eso es necesaria una normalización. En este caso podemos promediar una serie de lecturas iniciales para producir un valor de referencia y normalizar las nuevas lecturas de DO:

$$\frac{\text{última DO}}{\text{DO de referencia}} = \text{DO normalizada} \quad (2.1)$$

Podemos comparar con mayor precisión el crecimiento del cultivo utilizando estas proporciones. Por la forma en la que definimos la densidad óptica normalizada, podríamos interpretarla como la cantidad multiplicativa por la que ha cambiado el cultivo. Entonces, si la DO normalizada es 2, el cultivo ha duplicado su concentración inicial, es decir, ha duplicado la población desde que el volumen es fijo.

Si bien la normalización básica tiene en cuenta las diferencias de DO iniciales, no considera la densidad óptica del medio en sí. Para un cálculo más preciso de la tasa de crecimiento, se puede medir la muestra en blanco, sin inocularla, y hacer un ajuste de referencia (Ecuación 2.2). El ajuste de referencia se recomienda para experimentos que comienzan con lecturas de DO bajas. Ajustando la referencia podremos observar la DO únicamente del microorganismo de interés.

$$\frac{\text{última DO} - \text{DO en blanco}}{\text{DO de referencia} - \text{DO en blanco}} = \text{DO normalizada y blanqueada.} \quad (2.2)$$

A partir de la densidad óptica normalizada en función del tiempo, se puede generar una gráfica de tasa de crecimiento implícita. La relación entre la tasa de crecimiento, gr , y la densidad óptica normalizada, nOD , es exponencial, y viene definida por la siguiente ecuación:

$$nOD(t) = \exp\left(\int_0^t gr(s)ds\right) \tag{2.3}$$

Podemos reescribir esta ecuación en términos de la tasa de crecimiento como:

$$gr(t) = \frac{nOD'(t)}{nOD(t)} \tag{2.4}$$

que nos dice que la tasa de crecimiento es la tasa de cambio del tamaño del cultivo, normalizada por el tamaño del cultivo. [27]

2.3.2. Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno de emisión de luz que ocurre cuando una sustancia absorbe fotones de una longitud de onda específica y luego emite fotones de una longitud de onda mayor después de un breve intervalo de tiempo. A las moléculas que presentan este tipo de fenómenos se les suele llamar fluoróforos.

Para entender mejor el proceso, podemos considerar lo que está sucediendo a escala subatómica con la fluorescencia. Si consideramos un electrón clave dentro del fluoróforo, podemos ilustrar el estado de energía del electrón mediante un diagrama de Jablonski como el que se muestra en la [Figura 2.8](#). En el diagrama, el estado de energía fundamental se denota por S_0 , así como los estados electrónicos de mayor energía por S_1 , S_2 , y así sucesivamente. Con líneas más finas y denotadas por V_n , siendo n un número entero, se representan los estados de energía vibracional dentro de los estados de energía electrónicos.

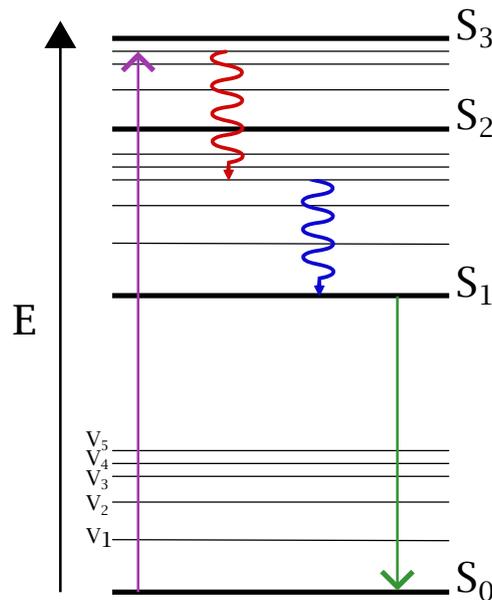


Figura 2.8. Diagrama de Jablonski. *Línea morada:* el electrón pasa del estado fundamental a un estado excitado. *Línea roja:* conversión interna. *Línea azul:* relajación vibracional. *Línea verde:* emisión de fluorescencia al pasar de un estado electrónico de mayor energía al fundamental.

Cuando incide un fotón puede transferir energía al electrón y este ascenderá a un estado de energía superior, en la [Figura 2.8](#) se representa con una flecha morada. El electrón solo absorberá fotones que tengan energías iguales a la diferencia de energía entre el estado de energía actual y uno más alto.

Una vez absorbida la energía, el electrón que está en el estado excitado volverá al estado fundamental liberando la energía de varias maneras, las más comunes son la relajación vibracional, la conversión interna y la fluorescencia. En la relajación vibracional, la energía desciende a través de estados vibratorios dentro del mismo estado electrónico, la caída de energía es pequeña. La conversión interna es lo mismo pero el electrón pasa a un estado de energía electrónica más bajo. La conversión interna ocurre en estados de energía más altos puesto que las distancias entre niveles de energías son menores.

A través de relajaciones vibratorias y conversiones internas el electrón irá bajando niveles de energía a los relativamente cercanos. Cuando el electrón pasa de estos de nuevo al estado fundamental S_0 se emite un fotón que observamos como fluorescencia. Así es como observamos que emite luz a una longitud de onda diferente a la de excitación.

Fluorescencia en fitoplancton

La fluorescencia es realmente útil para el fitoplancton, así como para las [FAN](#), puesto que estos presentan fluoróforos, siendo así autofluorescentes. Como veremos, hay varios fluoróforos importantes en el análisis del fitoplancton. Los más destacables son la clorofila-a y la ficocianina. La ficocianina es un pigmento que se encuentra en los ficobilisomas que se mencionaban en la [Subsección 2.2.1](#). En la [Figura 2.9](#) se muestran los espectros de absorción y emisión de estos compuestos. Como podemos observar, la clorofila destaca por tener un pico de absorción entorno a los 400 nm y el de emisión entorno a los 650 nm. En cambio, la ficocianina tiene el pico de absorción entorno a los 500 nm, y su emisión también se encuentra entorno a los 650 nm. Por lo tanto, la forma que tendríamos de distinguir entre ellos sería a través de la excitación a las diferentes longitudes de onda.

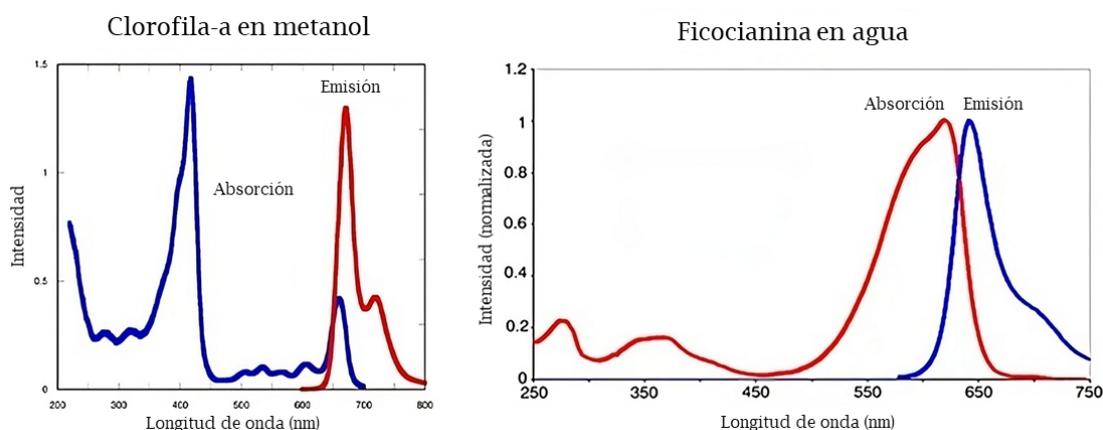


Figura 2.9. Espectros de absorción y emisión de la clorofila-a y de la ficocianina [28].

De esta forma diferentes grupos de fitoplancton contienen diferentes fluoróforos y en diferente cantidad ([Figura 2.10](#)). Esto se puede utilizar para clasificarlos en diferentes

grupos espectrales. Excitando a diferentes longitudes de onda y midiendo la fluorescencia podríamos realizar barridos espectrales de forma que caractericen los distintos grupos.

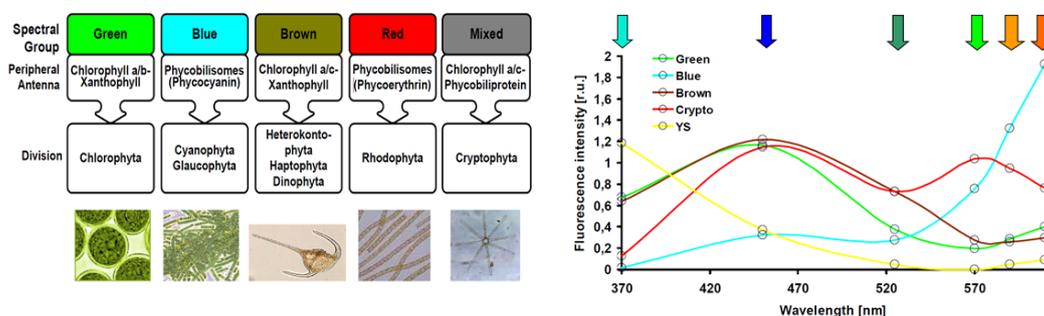


Figura 2.10. Clasificación de diferentes grupos espectrales de fitoplancton por fluorescencia. Se puede observar que cada uno de estos grupos tiene una curva espectral diferente con la que se podría determinar a qué grupo pertenece el fitoplancton midiendo la fluorescencia [29]. Las cianobacterias pertenecería al grupo *Blue*.

2.3.3. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es un método óptico no invasivo y sin necesidad de medios de contraste exógenos que se utiliza para evaluar la composición química de las muestras. La información detallada de la composición se obtiene analizando los fotones que se han dispersado inelásticamente a partir de las transiciones de nivel vibracional y rotacional en los enlaces químicos de la muestra. Además de su éxito en la química y en la física de materiales, cada vez es más común verlo en aplicaciones biomédicas.

Efecto no lineal Raman

En 1928, Chandrasekhara Venkata Raman (1888-1970) observó que cuando una luz monocromática de longitud de onda λ_{laser} incide sobre las moléculas, la luz dispersada contiene longitudes de onda diferentes a las de la fuente de excitación (Figura 2.11). El componente más fuerte tiene la misma longitud de onda que la luz incidente, pero también se observan contribuciones más débiles con longitudes de onda desplazadas. La primera contribución se denomina componente Rayleigh, mientras que las contribuciones desplazadas se conocen como componentes de dispersión o *scattering* Raman, con las frecuencias que se desplazan hacia el rojo llamadas componentes Stokes y las desplazadas hacia el azul llamadas componentes anti-Stokes. Raman se dio cuenta rápidamente de que las frecuencias de los desplazamientos correspondían a frecuencias características de las vibraciones moleculares, más comúnmente vibraciones de enlaces químicos individuales o grupos de enlaces químicos vecinos, lo que se podría utilizar para identificar y caracterizar moléculas. [30], [31]

Estas propiedades se pueden comprender mediante el uso de los diagramas de niveles de energía que se muestran en la parte derecha de la Figura 2.11. La dispersión Raman Stokes consiste en una transición del estado fundamental al estado final mediante un nivel intermedio virtual asociado a un estado excitado. En cambio, la dispersión Raman

anti-Stokes implica una transición de un estado molecular excitado al estado fundamental con un nivel virtual intermedio [31]. Las líneas anti-Stokes suelen ser mucho más débiles que las líneas Stokes. Según las estadísticas de distribución de Boltzmann, a temperatura ambiente el estado fundamental de vibración suele estar significativamente más poblado que los estados excitados de mayor vibración. Como resultado, la intensidad del espectro Stokes tiende a ser mucho mayor que la de anti-Stokes [32]. La tasa de intensidad anti-Stokes frente a la de Stokes para una vibración molecular dada se puede aproximar por:

$$\frac{I_{anti-Stokes}}{I_{Stokes}} \approx e^{-h\nu_R/k_B T} \quad (2.5)$$

donde $h\nu_R$ sería el cambio de energía correspondiente al modo vibracional, k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura.

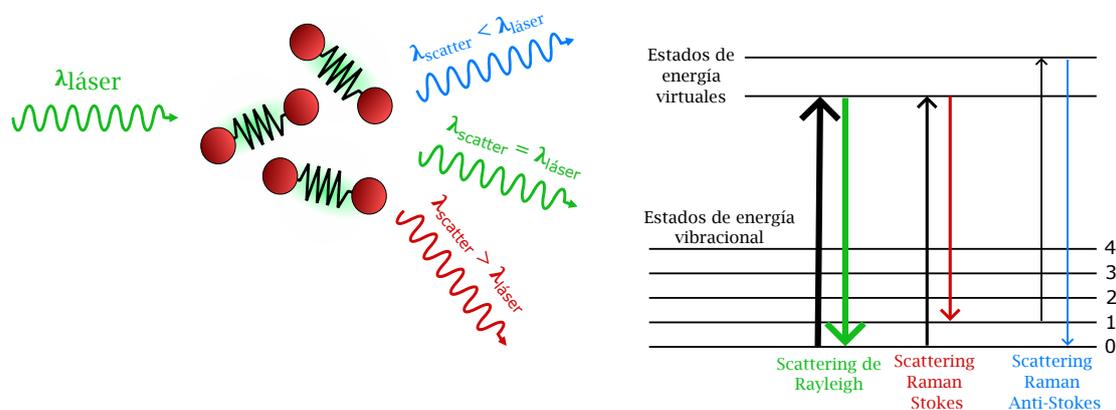


Figura 2.11. Principio básico de la espectroscopía Raman. Los diagramas Jablonski muestran las diferentes transiciones de energía.

Instrumentación general para Raman

En un sistema de espectroscopía Raman, se incide con una luz láser de excitación sobre la muestra. Esta es dispersada por ella y se recolecta para la detección. En la espectroscopía Raman solo son interesantes los fotones que sufren un *scattering* inelástico. Por lo tanto, los fotones restantes son eliminados por filtros ópticos de paso alto o paso banda que se disponen en el canal de detección. Al final, los fotones dispersos se separan según la longitud de onda con un espectrómetro y se recogen con detectores adecuados para adquirir un espectro Raman de alta resolución. [32]

Procesado espectral

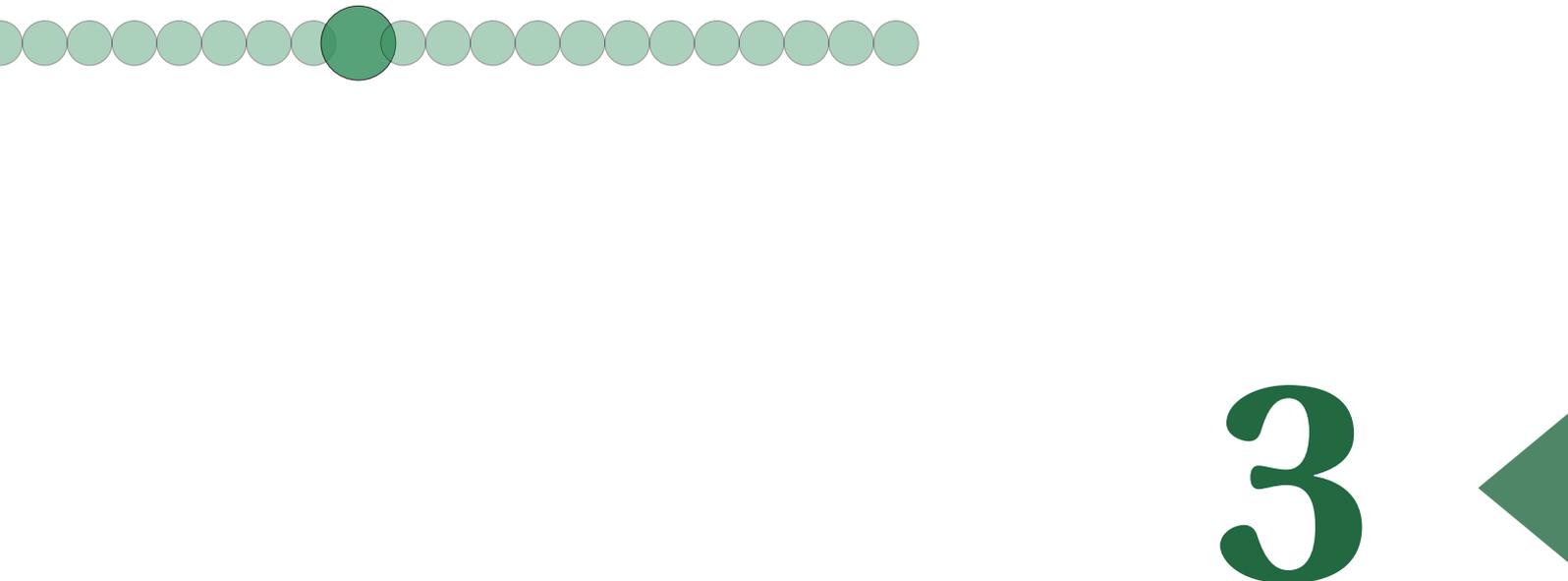
Como sabemos, la diferencia entre la frecuencia de la luz láser incidente y la de la luz con desplazamiento Raman es igual a la frecuencia del enlace vibratorio que se excitó. Las moléculas de diferentes sustancias tienen bandas o picos Raman en frecuencias específicas, que son exclusivas de los enlaces químicos de estas sustancias en particular. Por lo tanto, un espectro Raman sería como una especie de huella dactilar de biomoléculas

específicas. Tradicionalmente, los desplazamientos Raman (*Raman Shift*) se registran con unidades de cm^{-1} que se obtiene como

$$\text{Raman Shift } [\text{cm}^{-1}] = 10^7 \cdot \left(\frac{1}{\lambda_{\text{laser}}[\text{nm}]} - \frac{1}{\lambda_{\text{Raman}}[\text{nm}]} \right). \quad (2.6)$$

Una vez obtenido el espectro, como es común en técnicas espectroscópicas, suele ser necesario hacer un procesamiento espectral para la correcta extracción de datos y características que interesan. Generalmente, el procesamiento principal que debe de hacerse a los espectros Raman es la corrección de la fluorescencia con una línea base. Esta fluorescencia, que por supuesto depende de la longitud de onda de excitación empleada, aparece como una señal no deseada en los espectros y puede enmascarar las bandas de las respuestas Raman del material. Aunque tengamos fluorescencia, si esta señal no esconde totalmente la respuesta Raman del material, se puede corregir fácilmente en el procesamiento con la resta de una línea base, tal y como comentábamos. Para ello, es común recurrir al cálculo de un ajuste de mínimos cuadrados de un polinomio.

Por otro lado, en ciertos casos puede ser interesante los suavizados en los espectros Raman, como cuando se deben cuantificar relaciones de intensidades entre bandas o localizar máximos para hacer distintos cálculos. Asimismo, hay casos en los que también es necesaria una normalización para comparar medidas debido a que la intensidad de las bandas puede verse afectada por muchos factores externos.



3

Mejora del Fotobiorreactor

3.1 Pioreactor	21
3.1.1 Características y funcionamiento	23
3.1.2 Posibles mejoras	24
3.2 Mejora de iluminación para fotoperiodo	25
3.3 Implementación de Fluorescencia	27
3.3.1 Fluorescencia de las cianobacterias en equipo confocal	27
3.3.2 Módulo de multi-excitación de fluorescencia	29
3.3.3 Sensor de fluorescencia con fotodiodo	32
3.4 Monitorización con Espectroscopía Raman	34
3.5 Rediseño del Fotobiorreactor	37

Una vez aclarados algunos conceptos importantes pasamos a la parte más práctica del trabajo. Analizaremos el funcionamiento del Pioreactor, veremos las mejoras propuestas y, tras su diseño, las implementaremos en un nuevo fotobiorreactor.

3.1. Pioreactor

El pioreactor es un biorreactor de bajo coste que pertenece a un proyecto *open source* que aboga por la tendencia a democratizar la biología [33]. Pretenden hacer la biología más accesible para creadores, estudiantes y científicos. Los creadores del Pioreactor quieren que este dispositivo sea una plataforma que ofrezca oportunidades para la creatividad en la microbiología.

Un Pioreactor requiere de dos piezas principales: un microordenador Raspberry Pi y el hardware personalizado de Pioreactor como el que se muestra en la [Figura 3.1](#). Este hardware es un [HAT](#) para Raspberry Pi, hardware que se conecta en la parte

superior de esta. Los HAT no son más que un tipo de módulo complementario que amplía la funcionalidad de una Raspberry Pi para tareas específicas, en este caso para las funcionalidades del Pioreactor.

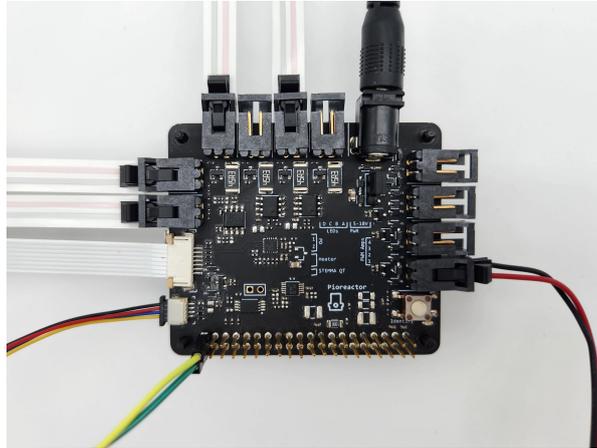


Figura 3.1. HAT del Pioreactor.

La estructura y piezas del Pioreactor se realizan con impresión 3D. Con todo esto, junto con un vial para el cultivo y unos componentes más como leds, tendríamos el Pioreactor prácticamente listo, como se ve en la Figura 3.2.

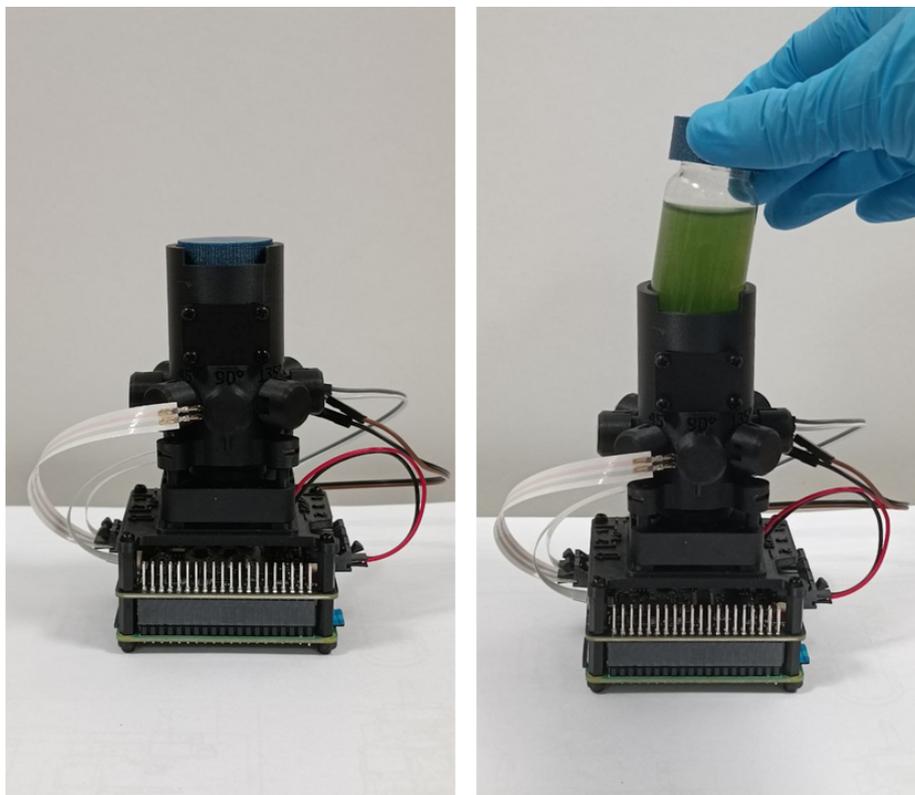


Figura 3.2. Pioreactor con un cultivo de cianobacterias en el vial.

3.1.1. Características y funcionamiento

A continuación, veremos más en detalle las características y funcionamiento del pioreactor. El Pioreactor tiene un tamaño completo de unos 9 x 6 x 12 cm. Con el vial que se introduce como recipiente, el volumen total del biorreactor es de 20 ml, y el volumen de trabajo de unos 15 ml. Como se resume en la [Figura 3.3](#), podemos decir que los Pioreactores tienen tres sistemas principales: un agitador magnético, un termostato y un sistema óptico.

El agitador magnético no es más que una barrita magnética de 15 mm que se introduce en el vial y, a través de la parte inferior del vial mediante el control de un ventilador con dos imanes, es capaz de proporcionar agitación y mezcla. Las RPM varían de 100 a 1000 RPM y se controlan mediante un lazo de retroalimentación.

Debajo del vial, en contacto con él, tenemos calefacción y sensores de temperatura integrados para estabilizar la temperatura del cultivo. Con esta podemos controlar desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 20°C más que la temperatura ambiente. La calefacción puede controlarse manual y automáticamente.

Con un sistema óptico de un led infrarrojo (IR) de unos 900 nm y dos fotodiodos, se realiza la lectura de la densidad óptica, de forma equivalente a lo que hemos visto en la [Subsección 2.3.1](#) usando dispersión o trasmisión de luz infrarroja. Los sensores pueden orientarse para registrar la dispersión a sensibilidades diferentes. Con esto se registra el estado del cultivo cada cinco segundos.

Además, está la posibilidad de añadir leds blancos de 5 mm de hasta 100 mA, convirtiendo el pioreactor en fotobiorreactor para cultivar microorganismos fotosintéticos. Como sabemos, los microorganismos como las cianobacterias necesitan ciclos de día/noche para su desarrollo. A través de estos leds podemos controlar adecuadamente este fotoperiodo.

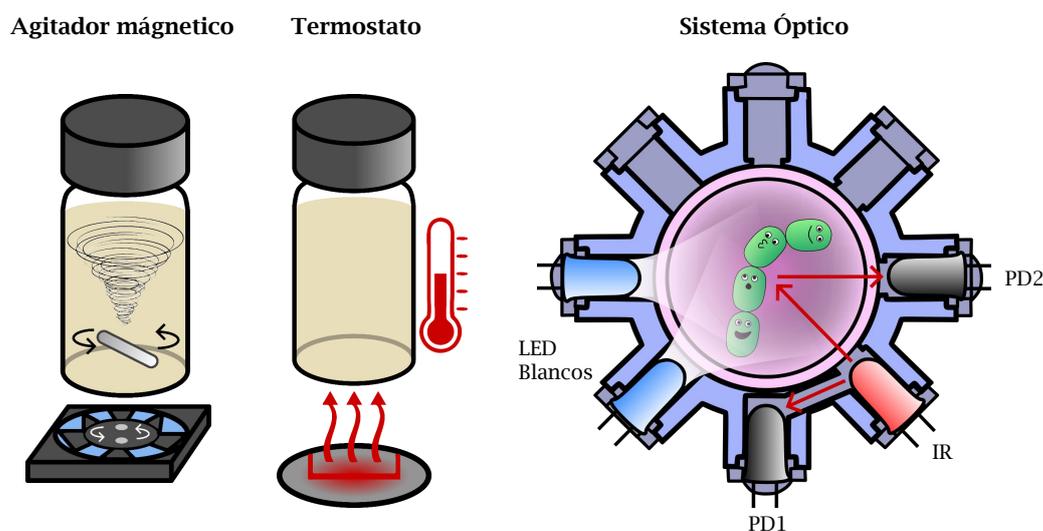


Figura 3.3. El Pioreactor tiene tres sistemas principales: un agitador magnético, un termostato y un sistema óptico.

Todo esto se integra en una interfaz web para controlar el pioreactor. Usando las métricas que hemos visto en la [Subsección 2.3.1](#), el Pioreactor calcula la tasa de crecimiento en tiempo real del cultivo después de cada medición de densidad óptica. Casi todos los datos y cambios del sistema se registran en una base de datos [SQL](#) integrada y son fácilmente exportables al formato [CSV](#) desde la interfaz.

Por último, se le puede añadir bombas peristálticas, que se controlan por [PWM](#)¹ y permiten una dosificación y extracción de medio controlada y medida. Para ello, hay tapas de viales con cuatro entradas/salidas que pueden usarse para dosificación, muestreo y flujo de aire, cada una con un conector macho tipo *luer lock*.

3.1.2. Posibles mejoras

Para realizar las mejoras debemos tener en mente que nuestro propósito es el estudio del fitoplancton a través de la monitorización del crecimiento de cultivos. Según estas necesidades se ha pensado en varias mejoras que podemos realizar.

En primer lugar, para el fitoplancton es necesario añadir los led que produzcan el fotoperiodo adecuado. Los led de 5 mm que ofrece el Pioreactor parecen ser bastantes débiles para la intensidad de la luz que recomiendan. Por ejemplo, para la especie *Microcystis aeruginosa* entre 70 y 130 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotones. Aunque es cierto que esto depende totalmente de la biomasa, por lo que en nuestro caso sería suficiente con valores bastante menores.

Por otro lado, hemos visto que la fluorescencia es un importante detector y clasificador de fitoplancton, por lo que podría ser de gran interés en la monitorización del cultivo. Aunque en este trabajo sólo se ha trabajado con cianobacterias porque no se ha podido disponer de cultivos de fitoplancton de otros grupos espectrales, se propone implementar un medidor de fluorescencia de fitoplancton a través de la excitación con leds de diferentes longitudes de onda.

Por último, por la interesante información molecular que facilita la espectroscopía Raman, puede ser de gran utilidad para la identificación o clasificación de fitoplancton en cultivos que no sean puros. Por eso, añadiremos una pequeña modificación al Pioreactor para poder realizar medidas Raman en el cultivo.

Por supuesto, las posibles mejoras que se pueden realizar son muchísimas más, pero por la extensión del trabajo nos centraremos únicamente en estas tres, dejando el resto para líneas futuras ([Sección 5.2](#)).

¹En total, el HAT tiene cuatro salidas [PWM](#) para alimentar cargas externas de entre 5 V y 18 V. La primera salida se usa para el control del motor para la agitación magnética y las demás se pueden emplear para las bombas peristálticas u otros dispositivos.

3.2. Mejora de iluminación para fotoperiodo

Con el objetivo de mejorar la iluminación para el fotoperiodo, se decide sustituir los dos led blancos de 5 mm por unos leds blancos de alta potencia. En concreto, se emplean los led de alta potencia L2-PGC2-S de Bivar Inc. de 350 mA [34], que son los que se muestran en la Figura 3.4.



Figura 3.4. Led blanco de alta potencia L2-PGC2-S de Bivar Inc. empleados para la mejora de la iluminación del fotoperiodo [34].

Para controlar estos leds con el pioreactor se utiliza el mismo canal en los que se conectaban los de 5 mm, con la gran diferencia de que a los led de alta potencia los necesitaremos alimentar con una fuente externa. Para esto se diseña el circuito electrónico que se muestra en la Figura 3.5.

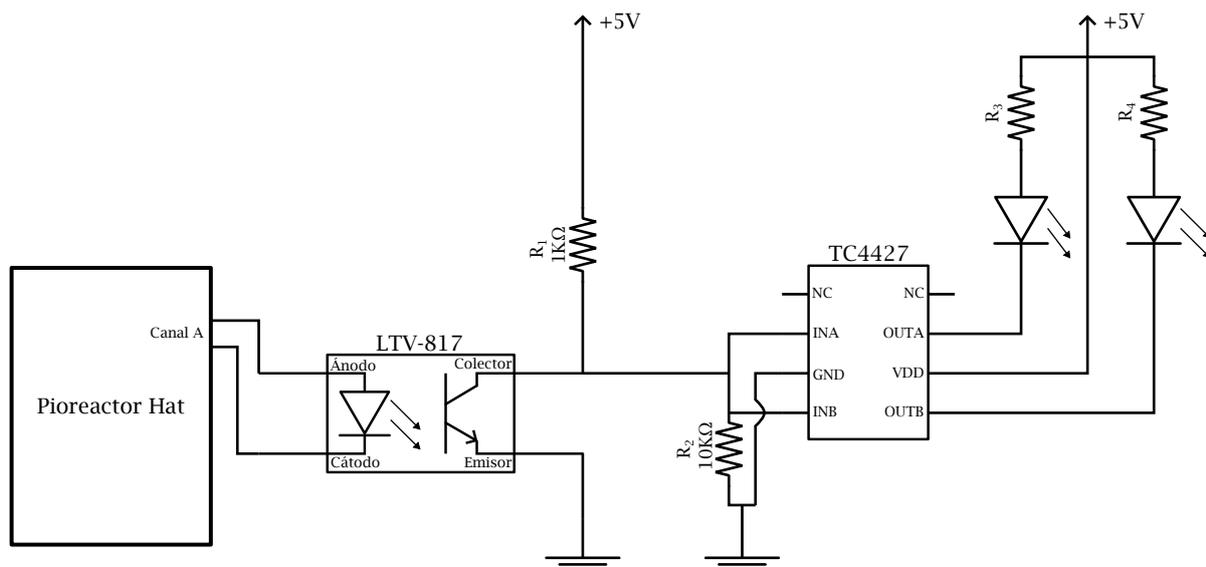


Figura 3.5. Esquemático del circuito diseñado para la mejora de iluminación de foto-periodos. R_3 y R_4 son las resistencias de polarización del los led, se emplean resistencias de 24Ω .

Los componentes principales de este circuito son el TC4427 y el LTV-817. El primero es un controlador de puerta de MOSFET. Este se utiliza para manejar cargas de alta

potencia con señales de baja potencia. Los pines INB y OUTB corresponden a la entrada y salida del canal B, mientras que los pines INA y OUTA corresponden a la entrada y salida del canal A. El pin VDD se conecta a la fuente de alimentación de +5V y GND se conecta a tierra.

Respecto al LTV-817, este es un optoacoplador. Se utiliza para aislar eléctricamente diferentes partes del circuito. Tiene el ánodo y cátodo en el lado del led, y colector y emisor en el lado del transistor. El ánodo y el cátodo se conectan al canal del pioreactor que puede controlar el fotoperiodo. El emisor se conecta a tierra y el colector se alimenta con 5 V a través de una resistencia de 1 K Ω . Así, el LTV-817 proporciona aislamiento eléctrico entre el Pioreactor y el resto del circuito, de forma que la señal del Pioreactor activa el LED del optoacoplador, que a su vez activa el transistor para permitir el paso de corriente en la otra parte del circuito.

Además de esto, se cambia la posición de iluminación de los led. Mientras que antes se introducían los led de 5 mm en ese anillo del sistema óptico, ahora se disponen en ángulo iluminando desde la parte superior del vial. Esto es tanto por el espacio que ocupan los leds como para simular las condiciones naturales de incidencia de la luz desde la superficie. En la [Figura 3.6](#) se muestra la mejora realizada.

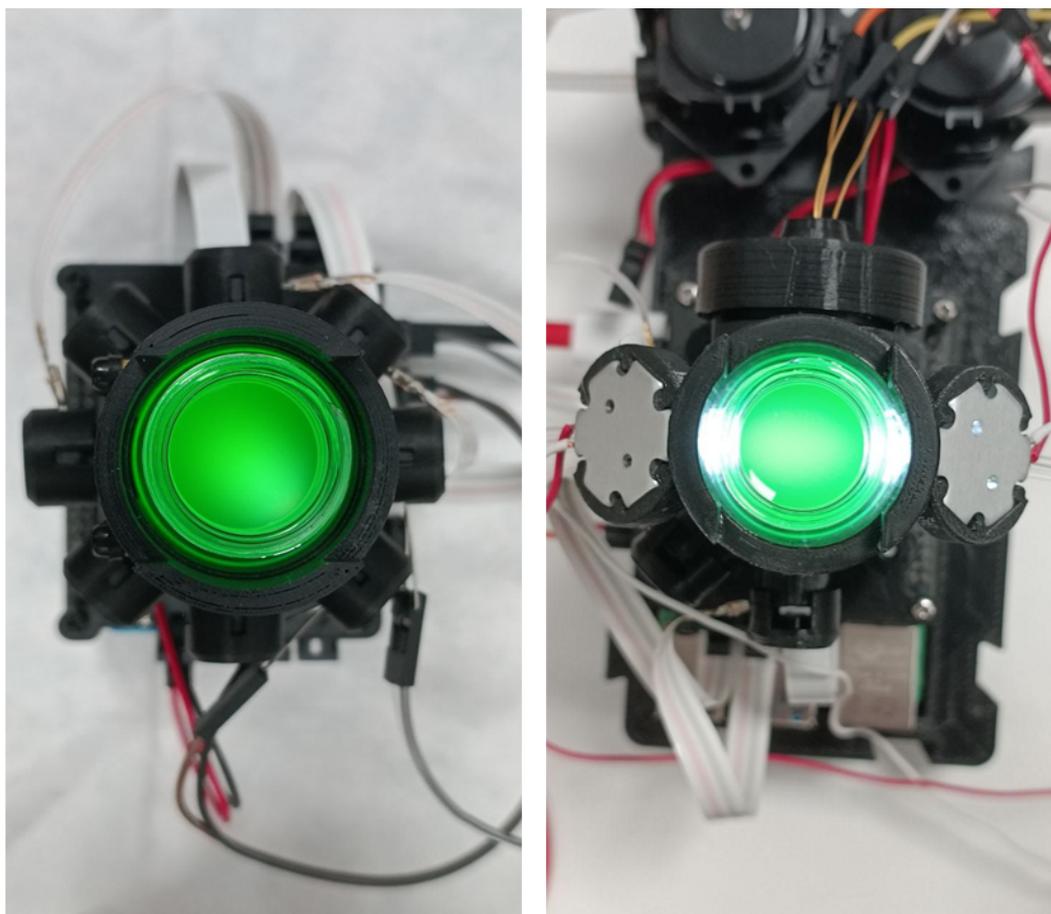


Figura 3.6. Mejora de iluminación para foto-periodo realizada. *Izquierda:* fotobiorreactor con los leds de 5 mm sin modificar. *Derecha:* fotobiorreactor en el que se han implementado los led de alta potencia.

3.3. Implementación de Fluorescencia

A continuación, se describe el proceso de diseño e implementación del módulo de fluorescencia. Este proceso se divide en varias partes. En primer lugar, se realizan medidas de fluorescencia con un equipo confocal de fluorescencia. Después, se diseña un sistema de excitación con leds de diferente longitud de onda y, por último, se diseña un sensor que mida la señal de fluorescencia con un fotodiodo.

3.3.1. Fluorescencia de las cianobacterias en equipo confocal

Para caracterizar la fluorescencia de nuestras muestras de cianobacterias se ha empleado un microscopio confocal de fluorescencia NIKON A1R (Figura 3.7). Este es un microscopio invertido que puede emplear cuatro líneas láser (405 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm) para la excitación de las muestras y recoger la señal de estas con cuatro tubos fotomultiplicadores (PMT). De las cuatro líneas láser se han podido usar tres: 405 nm, 488 nm y 561 nm.



Figura 3.7. Microscopio confocal de fluorescencia NIKON A1R.

En la Figura 3.8 se muestran algunas imágenes de fluorescencia obtenidas de las diferentes especies de cianobacterias. Se han procesado con *ImageJ* de forma que muestren los tres canales de fluorescencia juntos, cada uno de los canales en un color distinto.

El equipo, además, permite hacer barridos espectrales con los que podemos ver la emisión de fluorescencia al excitarlo con las longitudes de onda de las líneas láser del equipo. En la Figura 3.9 se muestran estos barridos espectrales para dos de las especies. Observando este tipo de imágenes, podemos ver a qué longitudes de onda se excitan, a qué longitud de onda emiten, y lo que es mejor, la procedencia de estas señales de fluorescencia.

Si representamos las intensidades promedio de las imágenes del barrido, obtenemos los espectros que se muestran en la Figura 3.10. A partir de estas, podemos intuir que al excitarlas con 405 nm fluoresce la clorofila-a puesto que la banda está centrada en torno los 670 nm. En cambio, al excitarlas con 561 nm, la emisión parece ser de la ficocianina, ya que la banda se desplaza en torno a los 650 nm. Así, es bastante ilustrativo que las cianobacterias muestran una localización espacial diferente para la clorofila y la ficocianina, asociadas a orgánulos distintos.

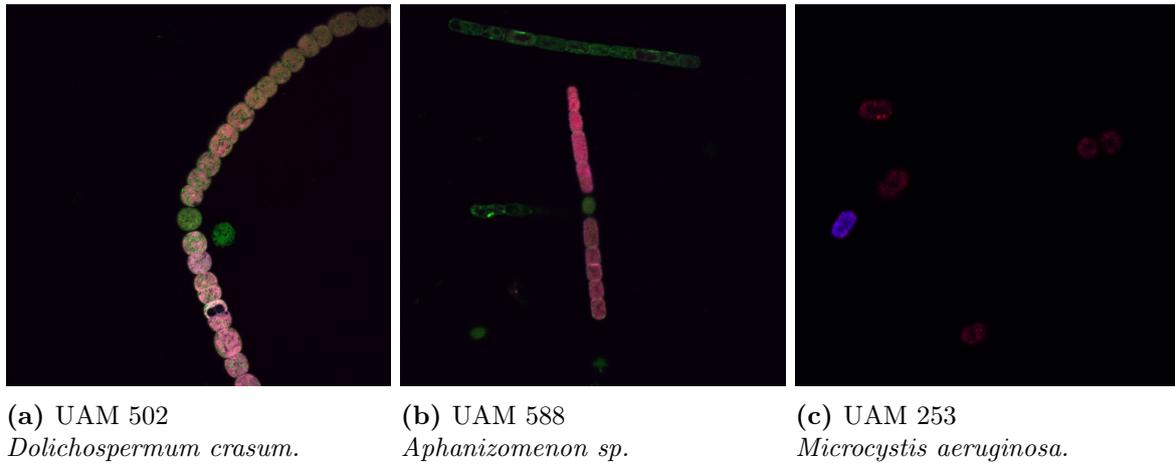


Figura 3.8. Imágenes de fluorescencia de las diferentes especies de cianobacterias. Cada imagen muestra conjuntamente la emisión de fluorescencia por la excitación de las líneas 405 nm, 488 nm y 561 nm.

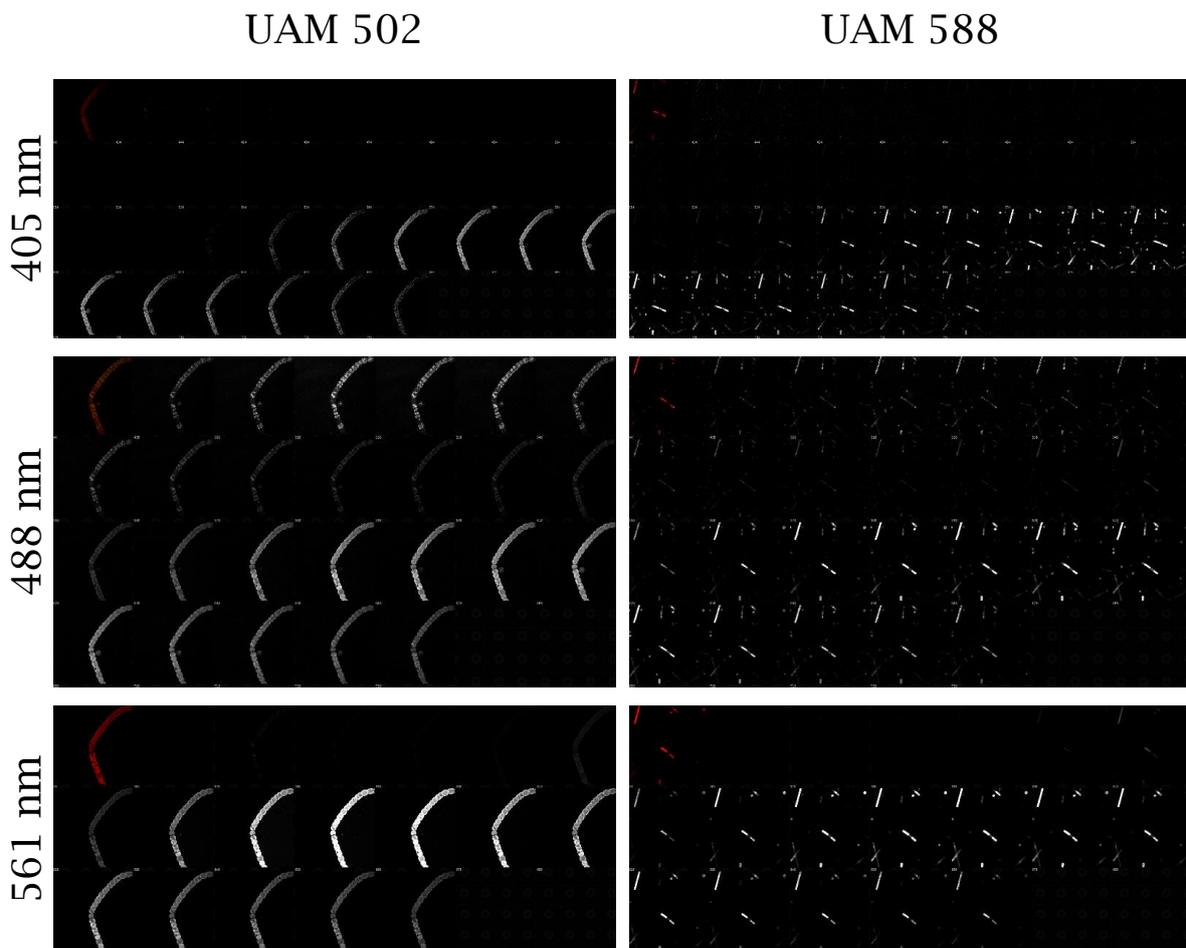


Figura 3.9. Barridos espectrales. Por columnas se muestran dos de las especies y por filas la línea láser de excitación empleada.

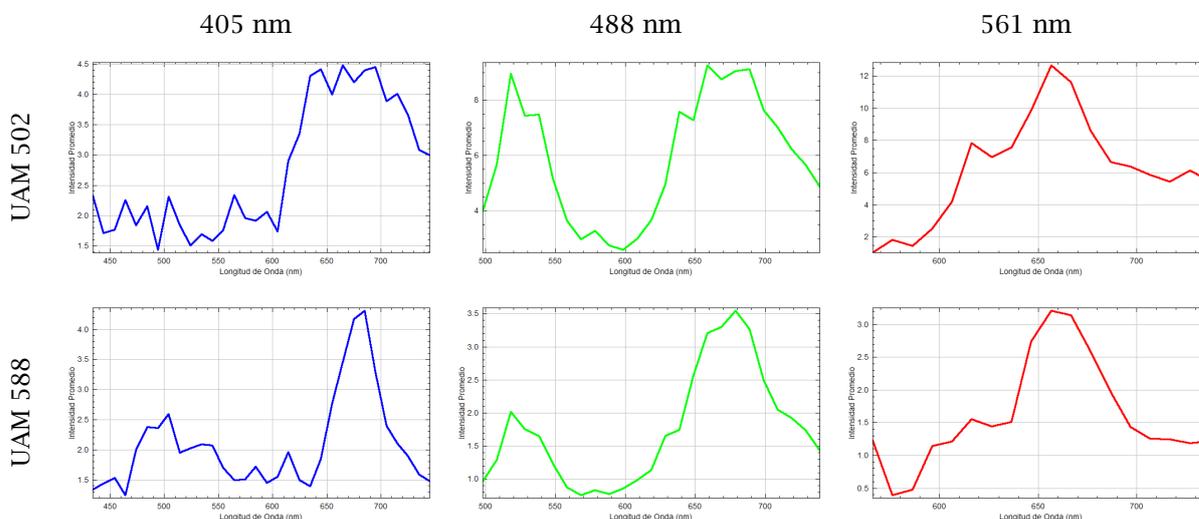


Figura 3.10. Espectros de intensidad obtenidos a partir de las imágenes del barrido espectral realizado.

3.3.2. Módulo de multi-excitación de fluorescencia

Para la implementación de la fluorescencia en el fotobiorreactor necesitaremos al menos dos sistemas importantes: una fuente de luz que excite la muestra y un sensor que recolecte la fluorescencia. En el caso del sistema de excitación se diseña un módulo que contiene un total de seis leds de alta potencia y de diferentes longitudes de onda. En concreto se montan los seis leds que se muestran en la [Tabla 3.1](#).

Longitud de onda	Led
655 nm	LST1-01F06-PRD1-00 New Energy
610-620 nm	XPERDO-L1-0000-00A01-SB01 New Energy
595 nm	XPEBPA-L1-0000-00D01-SB01 New Energy
527 nm	LST1-01G01-GRN1-00 New Energy
450 nm	LST1-01G01-RYL1-00 New Energy
405 nm	LST1-01G01-UV04-00 New Energy

Tabla 3.1. Leds utilizados.

En la figura [Figura 3.11](#) se representan los espectros medidos de estos leds. Es destacable el espectro de emisión del led 595 nm por su gran anchura. Como veremos más adelante, esto puede suponer un problema para la excitación de fluorescencia.

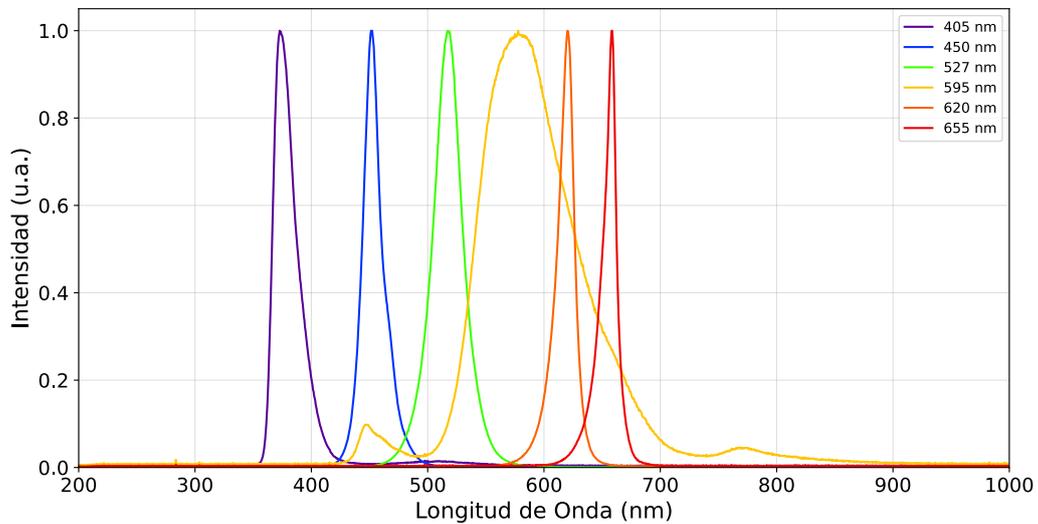


Figura 3.11. Espectros de los leds normalizados.

El módulo de leds se decide controlar con un Arduino Nano 33 BLE y se realiza el diseño del circuito que se muestra en la **Figura 3.12**. De nuevo, se emplea un TC4427 para el control de los led. Las entradas INA e INB se conectan a los pines digitales del arduino para manejarlos por *PWM*. De esta forma se podrá controlar la intensidad de los mismos.

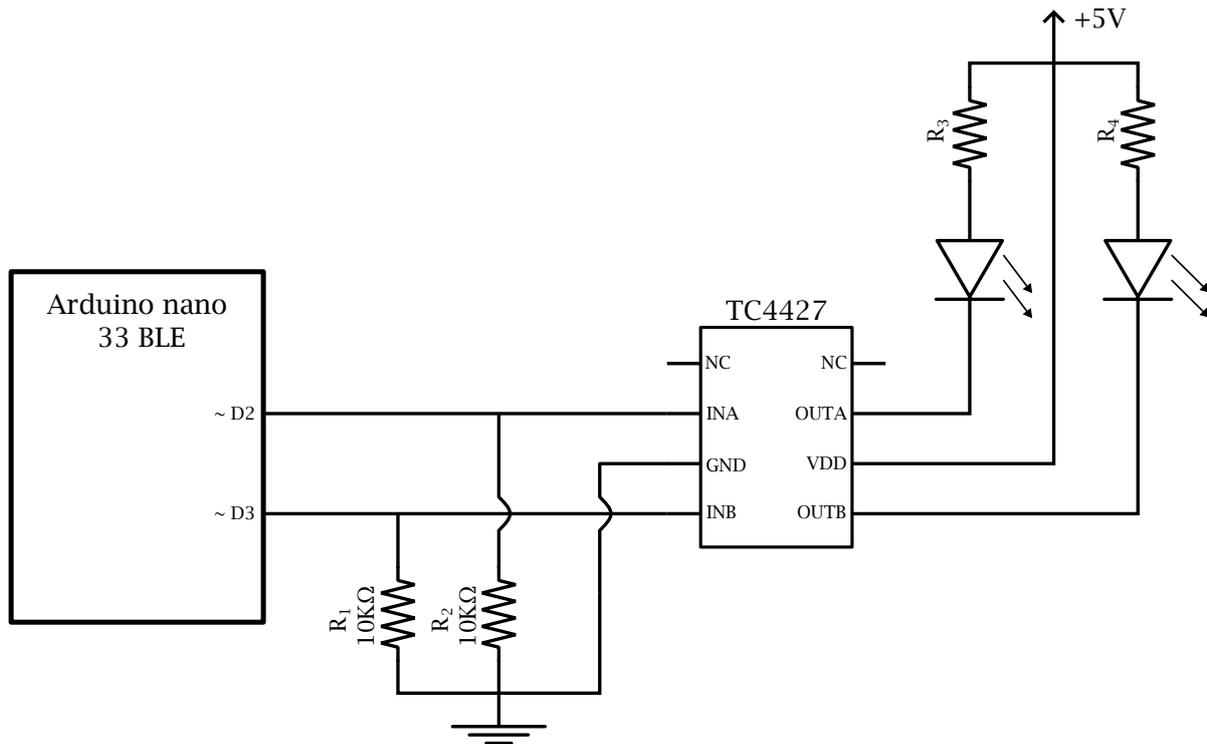


Figura 3.12. Esquemático del circuito diseñado para el módulo de excitación de fluorescencia. R_3 y R_4 son las resistencias de polarización del led correspondiente.

Debido al pequeño tamaño del fotobiorreactor, no hay demasiado espacio para integrar todos los leds. Por este motivo, para la implementación de este módulo en el fotobiorreactor se decide usar fibras ópticas de plástico de 1.5 mm. Para el acoplamiento de la luz del led a la fibra y para mayor comodidad, se diseñan las piezas que se muestran en la [Figura 3.13](#).

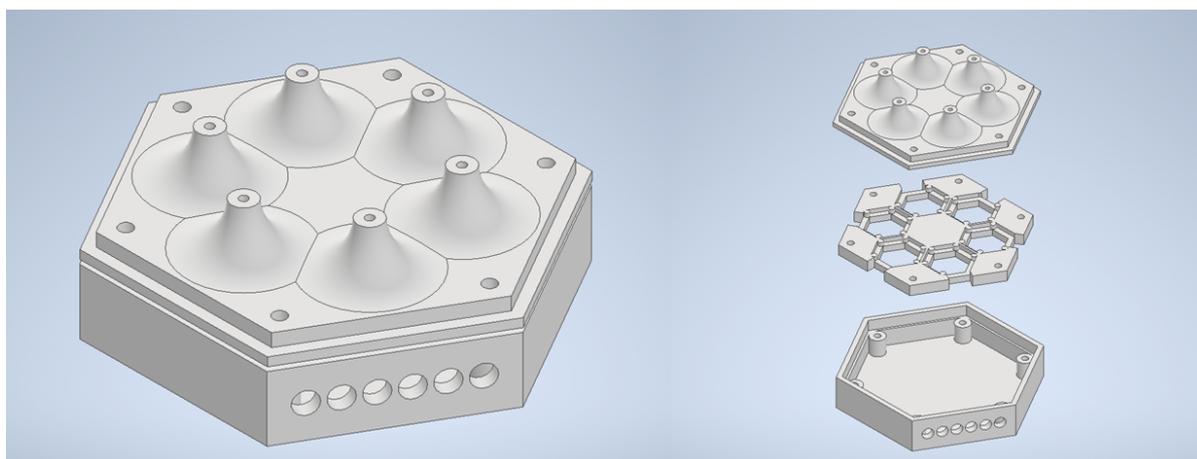


Figura 3.13. Pieza diseñada para el acoplamiento de la luz de los leds a la fibra.

Estas piezas forman una caja en la que se pueden encajar hasta un máximo de seis leds. La tapa superior tiene aberturas finas para introducir las fibras y que queden correctamente acopladas a los led. La estructura de tres piezas de la caja da la posibilidad de poner y quitar los leds deseados de forma muy sencilla. La [Figura 3.14](#) muestra la pieza impresa en 3D con los seis leds y las fibras ópticas colocadas.

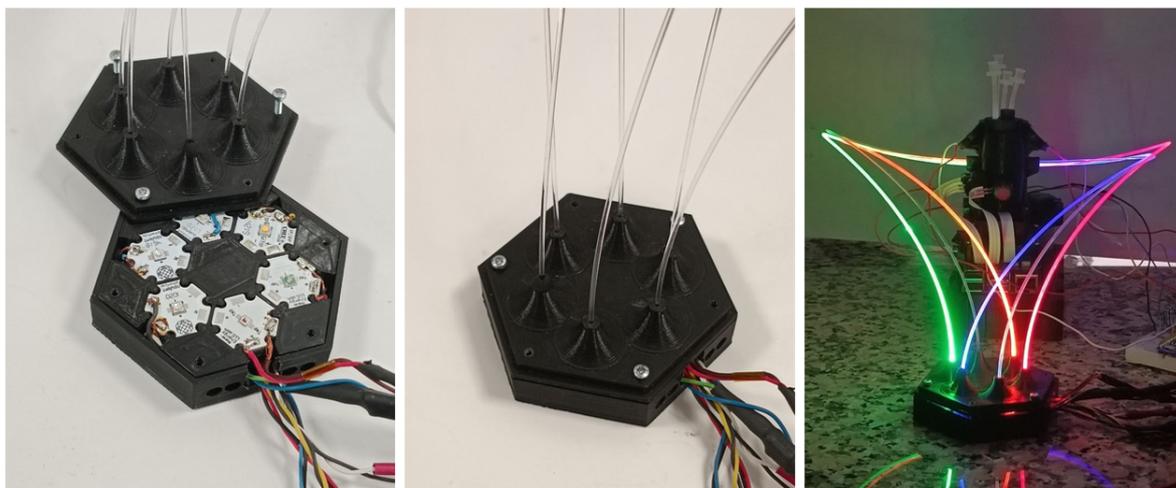


Figura 3.14. Módulo para la excitación de fluorescencia basado en leds de alta potencia con diferentes longitudes de onda.

3.3.3. Sensor de fluorescencia con fotodiodo

Como decíamos, para la implementación de la fluorescencia también necesitamos un sensor que la recolecte. Con ese fin se decide utilizar un fotodiodo. Este es un dispositivo semiconductor que es capaz de convertir la luz en una corriente eléctrica. Funciona en base al efecto fotoeléctrico, donde los fotones que inciden en el material semiconductor liberan electrones, generando así una corriente. El fotodiodo del que disponemos es el FDS100 de Thorlabs [35] que se muestra en la Figura 3.15.



Figura 3.15. Fotodiodo FDS100 empleado [35].

Un parámetro muy importante de los fotodiodos es la responsividad. La responsividad de un fotodiodo es una medida de su sensibilidad a la luz. Se define como la relación entre la corriente generada por el fotodiodo o fotocorriente, I_P , y la potencia óptica incidente sobre él, P , como se expresa en la Ecuación 3.1. Todo esto a una longitud de onda dada, pues la responsividad depende de esta. Por lo tanto, podemos ver la responsividad como una medida de la eficacia de la conversión de la energía de la luz en corriente eléctrica.

$$R_\lambda = \frac{I_P}{P} \quad (3.1)$$

En la Figura 3.16 se muestra la responsividad en función de la longitud de onda del fotodiodo FDS100. Vemos que la responsividad es cercana a 0 para longitudes de onda entorno a los 350 nm y, a medida que la longitud de onda aumenta, la responsividad alcanza un máximo en torno a los 1000 nm.

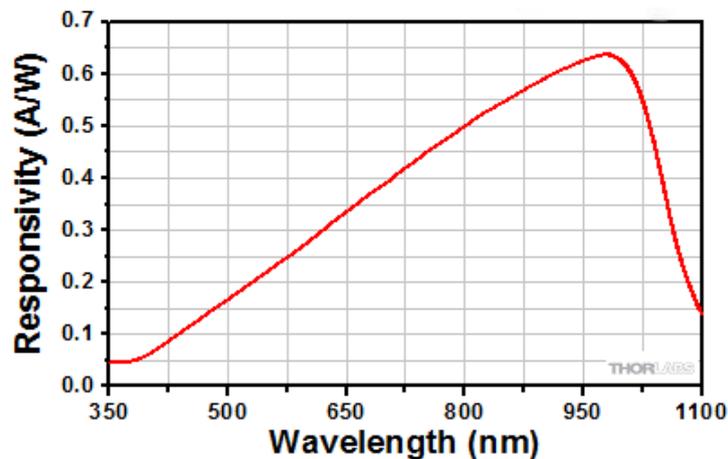


Figura 3.16. Responsividad del Fotodiodo FDS100 [35].

Para poder realizar la lectura de fluorescencia con un fotodiodo es necesario usar un filtro. Como vimos en la Subsección 2.3.2, la fluorescencia emite luz en una longitud de onda específica diferente a la luz de excitación. El filtro se utiliza para bloquear la luz de excitación y permitir que solo la luz fluorescente, la emitida por la muestra, pase al

fotodiodo. Esto asegura que el fotodiodo detecte únicamente la señal de fluorescencia y no la luz de excitación.

En el caso de las cianobacterias, el fluoróforo principal es la ficocianina de los ficobilisomas. En otras especies de fitoplancton el fluoróforo principal es la clorofila. Ya vimos en la [Figura 2.9](#) que tanto la ficocianina como la clorofila tienen el pico de emisión de fluorescencia en torno a los 650 nm. Así se suele medir la del fitoplancton, en torno a los 700nm. El filtro de emisión que se ha empleado es el FGL695 de Thorlabs [36], cuyo espectro de transmisión se muestra en la [Figura 3.17](#). Se trata de un filtro de paso largo que deja pasar las longitudes de onda superiores a los 695 nm. Por consiguiente, si nos fijamos en la caracterización de los leds mostrada previamente ([Figura 3.11](#)), el led de 595 nm tiene un espectro muy ancho por el cual una parte pasaría a través de este filtro. En este caso, con este filtro no sería posible realizar medidas de fluorescencia con el led de 595 nm.

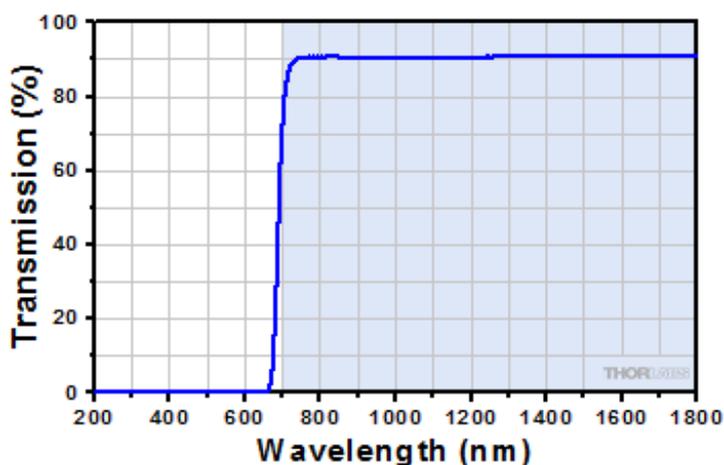


Figura 3.17. Espectro de transmisión del filtro FGL695 de Thorlabs [36].

Sabiendo esto, se diseña un circuito sencillo para la lectura de la fluorescencia que se muestra en la [Figura 3.18](#). Los componentes principales del circuito son: el fotodiodo que convierte la luz en una señal eléctrica, un amplificador operacional MCP6041 utilizado para amplificar la señal del fotodiodo, el módulo de conversión analógico-digital (ADC) de 16 bits con un ADS1115 que convierte la señal analógica amplificada en una señal digital y, por último, el microcontrolador Arduino Nano 33 BLE.

Cuando la luz incide sobre el fotodiodo, genera una corriente que es proporcional a la intensidad de la luz. El MCP6041 se configura como un amplificador de transimpedancia. Este amplificador convierte la corriente del fotodiodo en un voltaje. El voltaje de salida se calcula multiplicando la corriente de entrada, I_P , del fotodiodo con la resistencia de retroalimentación, R_f . La señal de voltaje del amplificador operacional se envía a uno de los canales de entrada del ADS1115, que convierte este voltaje analógico en una señal digital que puede ser leída por el Arduino Nano 33 BLE. Este microcontrolador recibe la señal digital del ADS1115 a través de la interfaz I2C.

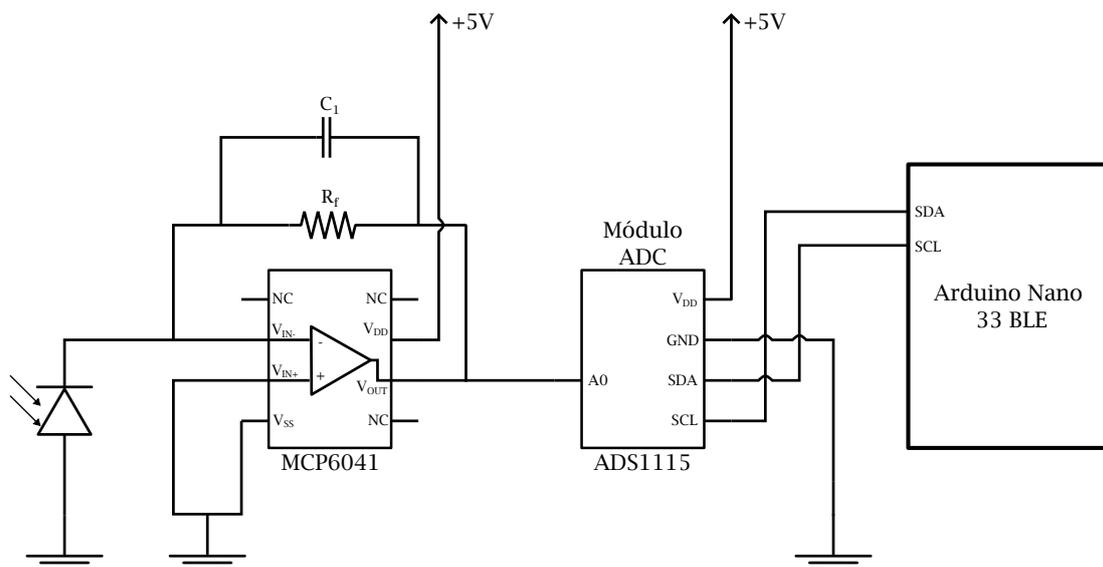


Figura 3.18. Esquemático del circuito diseñado para el sensor de fluorescencia.

También tenemos los componentes pasivos R_f y C_1 . Como decíamos, la primera es una resistencia de retroalimentación configurada en el circuito del amplificador de transimpedancia para determinar la ganancia del amplificador. El segundo es un condensador para filtrar ruidos y estabilizar la señal.

Por lo tanto, de forma sencilla podríamos decir que cuando la luz incide en el fotodiodo genera una corriente, que es amplificada y convertida en un voltaje por el MCP6041. Este voltaje es entonces digitalizado por el ADS1115 y leído por el Arduino Nano en el que podemos procesar la información, obteniendo un valor proporcional a la señal óptica detectada.

3.4. Monitorización con Espectroscopía Raman

Como se introdujo en la [Subsección 2.3.3](#), la espectroscopía Raman es una herramienta de análisis espectral que puede ser realmente útil en este contexto, puesto que es una técnica rápida con posibilidad de realizar medidas *in situ*. En el fotobiorreactor, su aplicación podría ser muy conveniente para monitorizar el estado del cultivo en tiempo real.

Se dispone de un equipo Raman confocal XperRAM C de Nanobase Inc, [37] equipado con un láser de 532 nm y objetivos de 20X y 40X ([Figura 3.19](#)). Además, este equipo es capaz de realizar mapas 2D de áreas de hasta 600 x 400 μm con el objetivo 20X y 200 x 200 μm con el objetivo 40X.

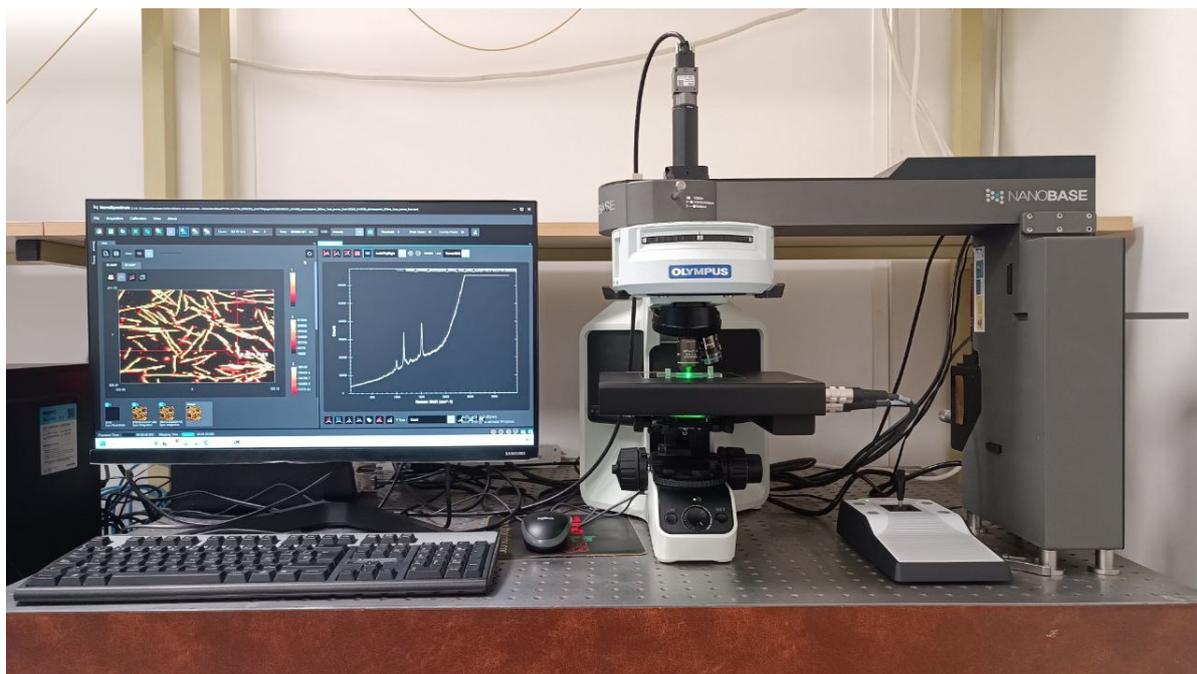


Figura 3.19. Equipo Raman confocal XperRAM C de Nanobase Inc.

Aprovechando las bombas peristálticas del Pioreactor, se acoplan mediante tubos de microfluídica a un portaobjetos con un canal. Al colocar este portaobjetos bajo el objetivo y hacer pasar el medio a través de él con la ayuda de las bombas peristálticas, podemos realizar mediciones Raman sin necesidad de abrir el vial, reduciendo así los riesgos de contaminación. Este montaje se muestra en la [Figura 3.20](#).

Para obtener los espectros Raman, se tomaron mediciones de cada uno de los cultivos puros de las tres especies, utilizando tiempos de exposición entre 300 ms y 1 s y potencias de láser cercanas a 2 mW. Se emplearon tiempos de exposición inferiores a 1 segundo debido a que el objetivo final de la implementación de la espectroscopía Raman en el fotobiorreactor es realizar medidas en flujo continuo. No obstante, las mediciones presentadas en este trabajo fueron tomadas sobre muestras estáticas, es decir, sin aplicar flujo continuo, para caracterizar adecuadamente cada una de las especies por separado. Se obtuvieron mapas Raman 2D, filtrando los espectros de cianobacterias de los del medio y los más ruidosos mediante una umbralización basada en la relación señal-ruido.

En la [Figura 3.21](#) se presentan los espectros Raman promedio y sus desviaciones estándar para cada una de las tres especies de cianobacterias estudiadas: UAM 502, UAM 588 y UAM 253. La [Figura 3.22](#) muestran los mismos espectros superpuestos y el promedio de todas las mediciones realizadas, sin distinguir por especies, junto con la localización de los picos Raman más significativos.

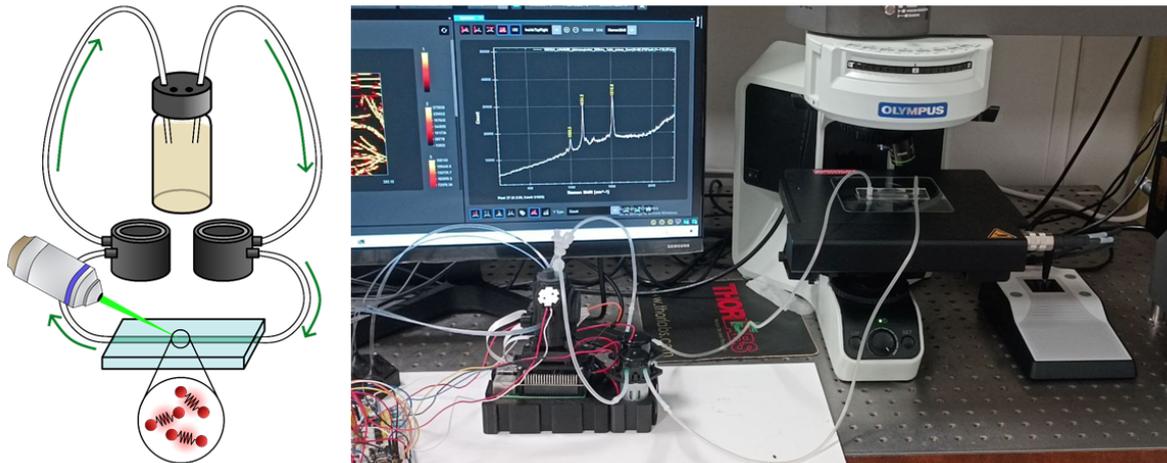


Figura 3.20. Portamuestras con canal de microfluídica conectado a las bombas peristálticas del bioreactor e integrado en el equipo de espectroscopía Raman.

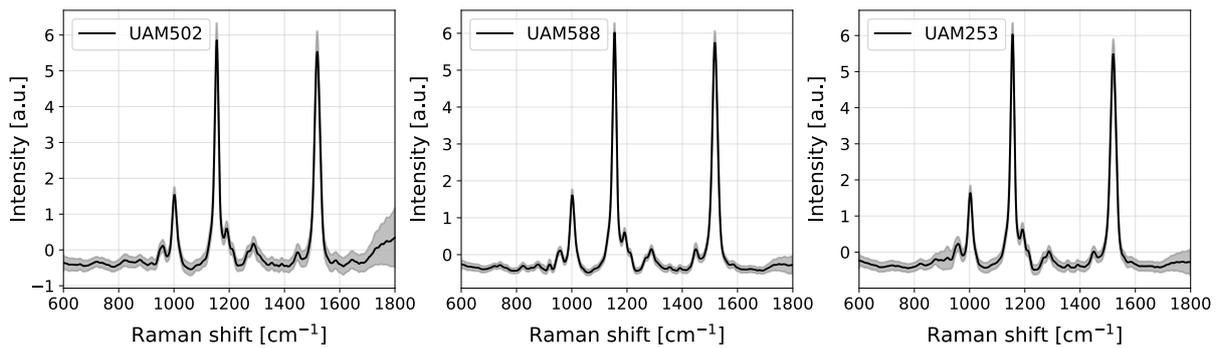


Figura 3.21. Espectros Raman promedio y desviaciones estándar de las tres especies de cianobacterias estudiadas, *Izquierda:* UAM 502, *Medio:* UAM 588 y *Derecha:* UAM 253.

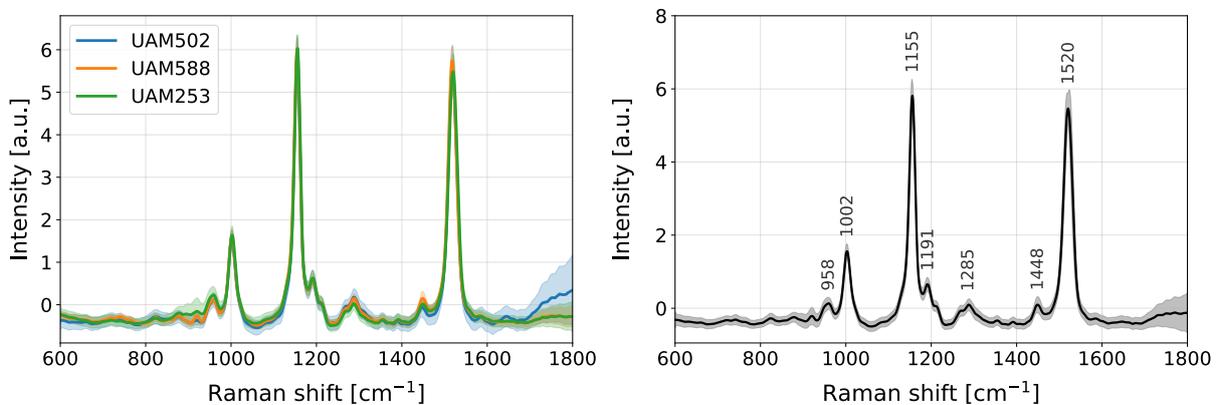


Figura 3.22. *Izquierda:* Espectro Raman promedio de las tres especies de cianobacterias estudiadas junto con sus desviaciones estándar. *Derecha:* Espectro promedio de todos los espectros de cianobacterias medidos junto con su desviación estándar y la posición de los picos Raman más significativos.

En la [Tabla 3.2](#) se recoge la asignación de los picos Raman señalados en la [Figura 3.22](#), indicando los desplazamientos Raman y sus correspondientes vibraciones moleculares según la bibliografía consultada.

<i>Raman shift</i> (cm ⁻¹)	Asignación
958	$\nu(\text{C-C})$ y $\nu(=\text{CH})$
1002	$\nu(\text{C-CH}_3)$
1155	$\nu(\text{C-C})$
1191	$\nu(\text{C-H})$
1285	$\delta(\text{CH}_2)$
1448	$\delta(\text{CH}_2)$
1520	$\nu(\text{C=C})$

Tabla 3.2. Asignación tentativa de los picos Raman observados en las muestras de cianobacterias estudiadas [38] [39]. ν : estiramiento, δ : deformación.

Como se puede observar en las [Figura 3.21](#) y [Figura 3.22](#), destacan cuatro bandas principales situadas en torno a 960, 1002, 1155 y 1520 cm⁻¹, todas ellas asociadas a pigmentos carotenoides [40]. Además, una banda Raman característica cerca de 1445 cm⁻¹ indica típicamente la presencia de proteínas y lípidos, sugiriendo la existencia de grasas saturadas e insaturadas [38]. La región central del espectro (1100 - 1450 cm⁻¹) contiene bandas anchas que probablemente incluyen una variedad de biomoléculas como lípidos, proteínas y carbohidratos. Estas bandas son difíciles de analizar debido a la superposición de picos con perfiles amplios y bajas intensidades, que pueden perderse o distorsionarse fácilmente durante el preprocesado [38].

3.5. Rediseño del Fotobiorreactor

A fin de integrar todos los sistemas, se realiza un rediseño del fotobiorreactor para imprimirlo en 3D. Los leds blancos de alta potencia para el fotoperiodo se disponen en la parte superior. La excitación para la fluorescencia de los leds se guía por fibra óptica hasta unos orificios laterales. A 90° de estas fibras se coloca el fotodiodo y en la ranura de delante de este el filtro. Respecto a lectura de densidad óptica, se han dispuesto los orificios para el led IR y los fotodiodos de forma equivalente al diseño original.

En las [Figuras 3.23](#) y [3.24](#) se muestran las piezas diseñadas. Finalmente, en la [Figura 3.25](#) se muestra el fotobiorreactor ensamblado.

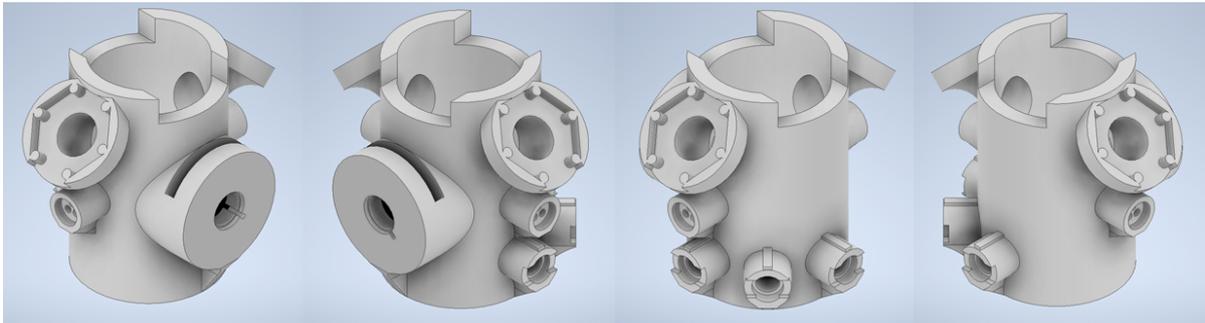


Figura 3.23. Parte principal del fotobiorreactor rediseñada.

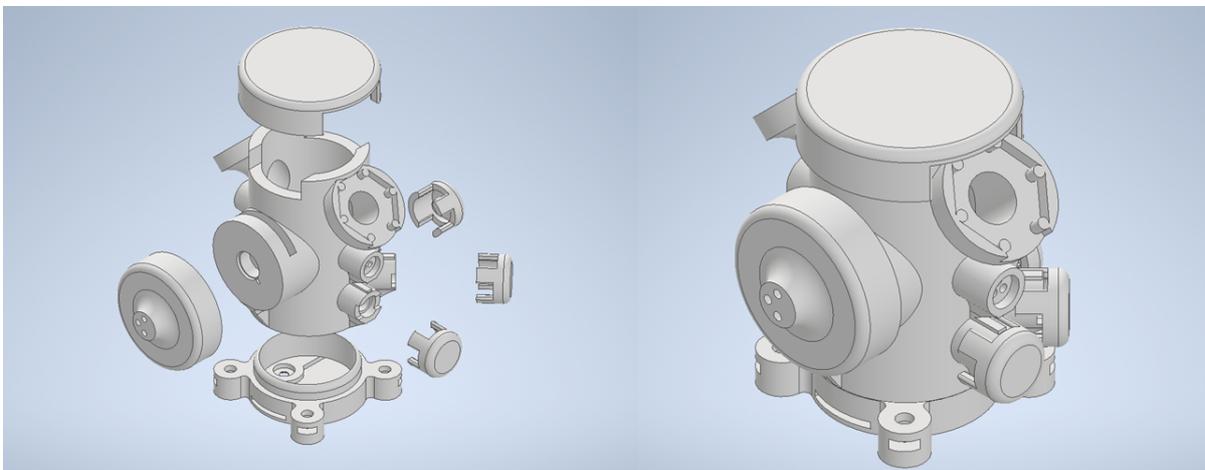


Figura 3.24. Tapas y soportes diseñados para el fotobiorreactor.

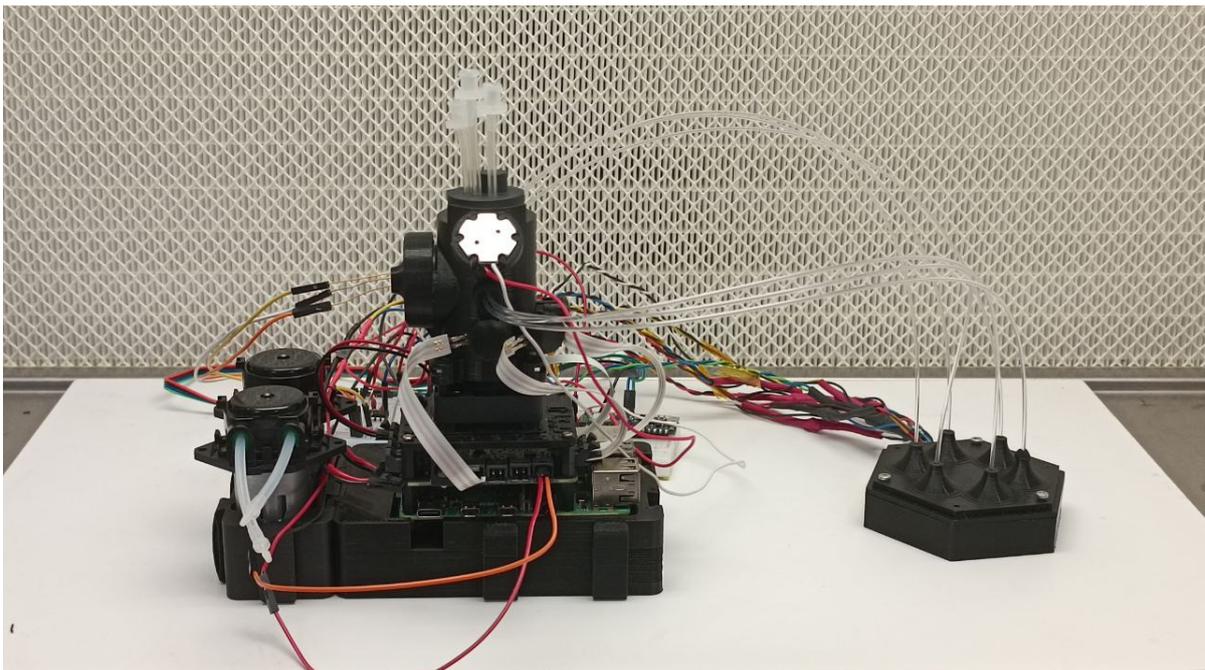


Figura 3.25. Fotobiorreactor ensamblado tras la implementación de las mejoras.

En cuanto al control de los sistemas, los leds de alta potencia para el fotoperiodo ya están integrados en el pioreactor y los controlamos a través de la interfaz. En cambio, el fluorímetro se ha realizado como primera aproximación en Arduino y no se ha integrado en el propio sistema del Pioreactor. Aun así, se ha realizado un sencillo *script* de *Python* con el que se pueden realizar las medidas de manera sencilla. Este hace que los diferentes leds para la excitación vayan encendiéndose el tiempo que se desee mientras el fotodetector mide y guarda las lecturas en un archivo de texto. La integración de esto en la interfaz de usuario del Pioreactor queda para una línea futura.



4

Análisis de funcionamiento

4.1 Cultivos de cianobacterias	40
4.2 Fluorescencia	44

En este capítulo se hace un análisis general sobre el funcionamiento del fotobiorreactor y se explican los problemas más importantes que han surgido.

4.1. Cultivos de cianobacterias

A fin de comprobar el funcionamiento del fotobiorreactor, se han realizando varios cultivos de las especies de cianobacterias que mencionábamos en la [Subsección 2.2.4](#). Para realizar estos cultivos es necesario el medio con nutrientes adecuados. Los medios de cultivo utilizados para las cianobacterias son BG-11 y BG-110. Estos medios están optimizados para el crecimiento y mantenimiento de cianobacterias. La diferencia entre ambos radica en que el BG-110 es un medio carente de nitrógeno. En el caso de las *Microcystis* es totalmente necesario emplear el medio con nitrógeno, pues estas no tienen capacidad de crear heterocistos y, por ende, no pueden fijar nitrógeno atmosférico. En cambio, las otras dos especies filamentosas sí que generar heterocistos, y por lo tanto es más adecuado utilizar el medio sin nitratos (BG-110), con el beneficio de poder disminuir el riesgo de crecimiento de otras algas.

Tras la realización de varios cultivos se detecta un gran problema que no ha permitido hacer crecer correctamente las cianobacterias. La falta de condiciones estériles ha jugado una mala pasada, contaminando los cultivos que se han realizado. Principalmente, debido a que no se dispone de equipos para la correcta esterilización de todos los materiales y a que no se ha podido trabajar en un entorno estéril. En la [Figura 4.1](#) podemos apreciar

uno de estos cultivos contaminados. Como se puede observar, el medio se ha hecho más denso debido al crecimiento de otros microorganismos y no por el crecimiento de cianobacterias, caso en el que veríamos un color más verdoso.

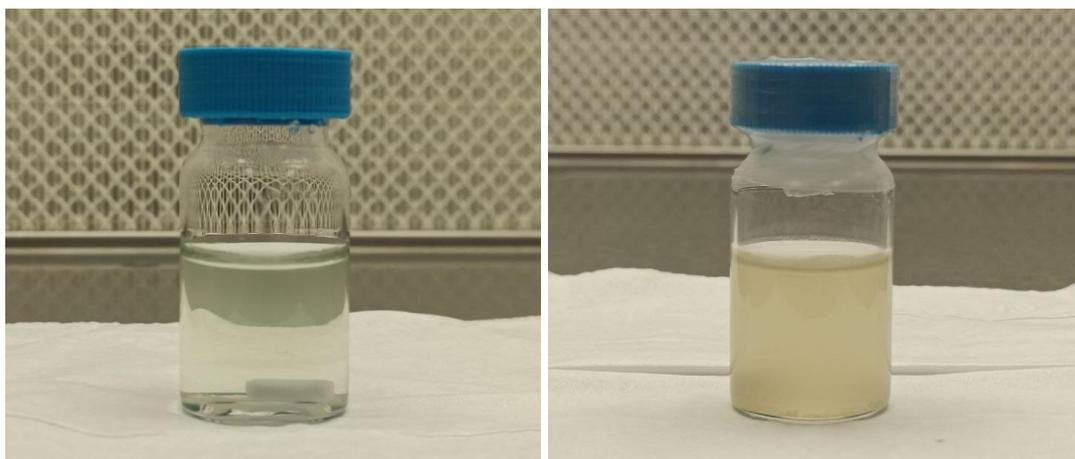


Figura 4.1. Vial antes y después de dos días en el fotobiorreactor. *Izquierda:* Vial recién inoculado con UAM 253, se aprecia la ligera suspensión verde de las cianobacterias. *Derecha:* Mismo vial tras dos días en el fotobiorreactor. Como se aprecia, está contaminado por otros organismos.

A pesar de no haber tenido resultados satisfactorios en el cultivo de las cianobacterias, podemos intentar ver cómo el fotobiorreactor se desenvuelve realizando las lecturas mientras los organismos contaminantes crecen. En la [Figura 4.2](#), [Figura 4.3](#), [Figura 4.4](#) y [Figura 4.5](#), se representan gráficamente en función del tiempo la DO, la DO normalizada, la tasa de crecimiento y la temperatura respectivamente.

En general, las gráficas relacionadas con el crecimiento se pueden interpretar en cuatro fases. Primero, tenemos la **fase de latencia** en la que no se observa crecimiento, pero sí alta actividad celular. En esta etapa, las células se encuentran en un ambiente rico en nutrientes y se preparan para crecer mediante la síntesis de proteínas y otras moléculas necesarias. Tras esta, llega la **fase de crecimiento exponencial**. Aquí las células se dividen y duplican en número después de cada generación. Finalmente, el crecimiento de las células alcanza una **fase estacionaria** a medida que los nutrientes se agotan y se acumulan los productos de desecho. Mientras se van agotando los nutrientes, el crecimiento celular se ralentiza mientras que aumenta la muerte celular, a lo que se le suele llamar la **fase de muerte celular**. [41]

En la gráficas obtenidas del fotobiorreactor se ha intentado identificar de una forma aproximada estas fases. Se puede apreciar bastante bien que la fase exponencial ocurre cuando la tasa de crecimiento es alta o creciente. Cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria, la tasa de crecimiento cae a 0 y la turbidez es constante, puesto que el cultivo ya no crece en tamaño.

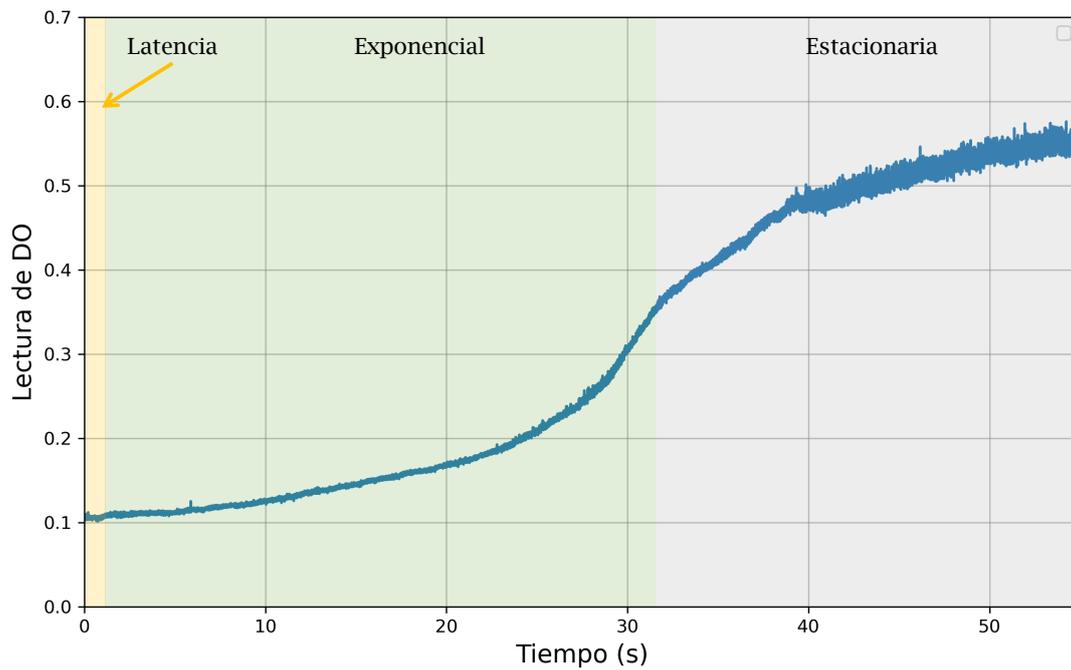


Figura 4.2. Lectura de densidad óptica del fotobiorreactor. Se representan de manera aproximada las fases de latencia, exponencial y estacionaria.

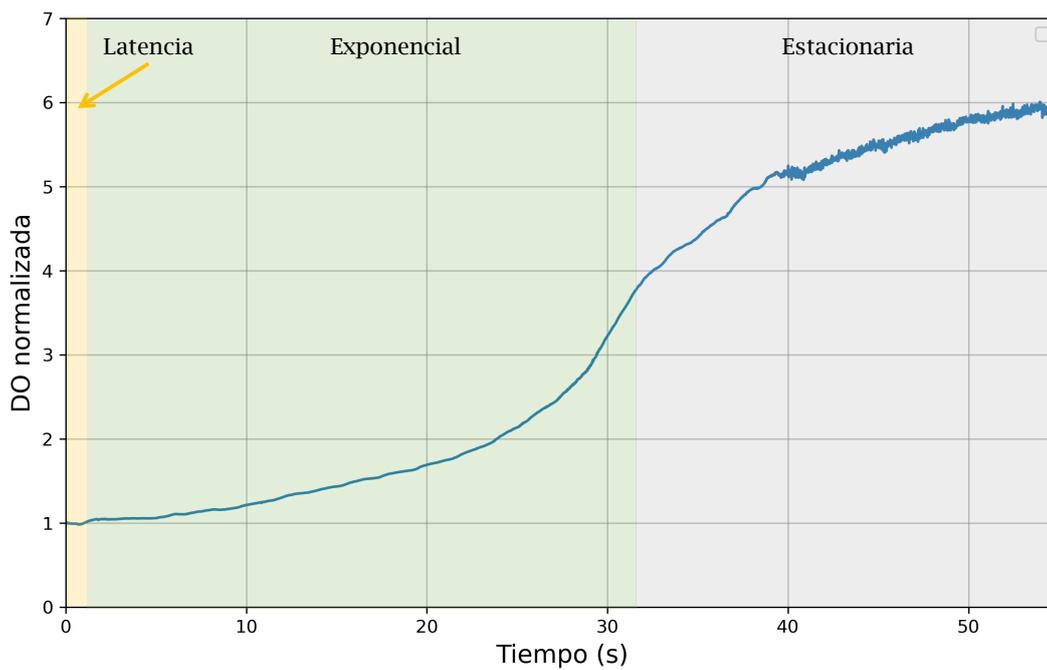


Figura 4.3. Densidad óptica normalizada del fotobiorreactor. Se representan de manera aproximada las fases de latencia, exponencial y estacionaria.

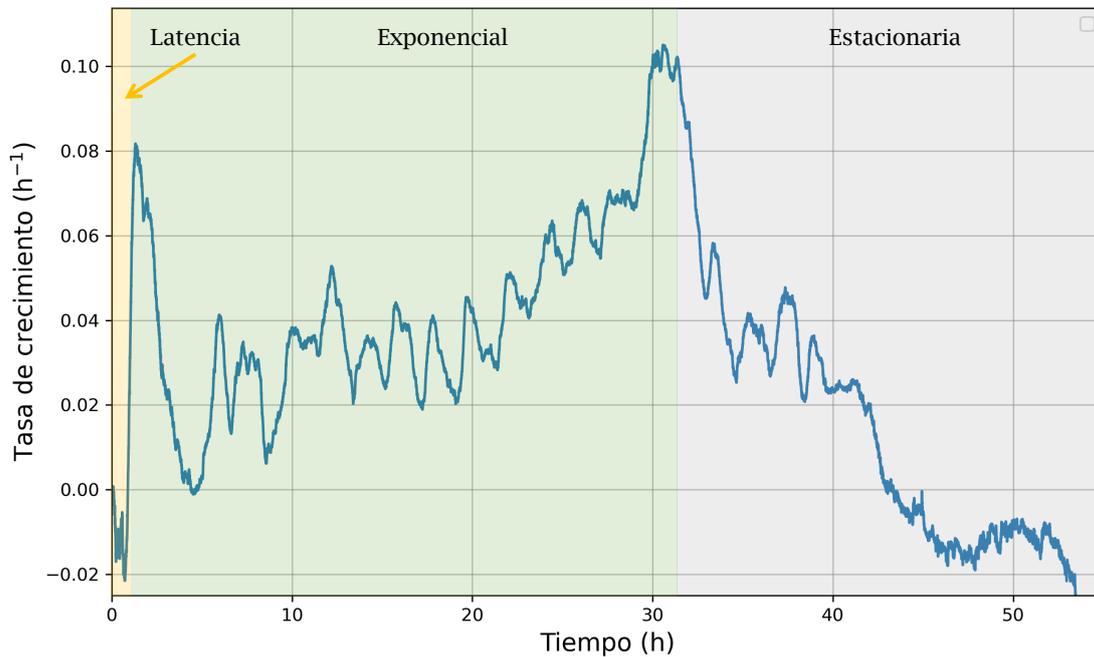


Figura 4.4. Tasa de crecimiento obtenida a partir de las lecturas de densidad óptica. Se representan de manera aproximada las fases de latencia, exponencial y estacionaria.

Respecto a la temperatura, este cultivo en concreto se puso a $25^{\circ}C$. En la [Figura 4.5](#) podemos ver cómo la placa calefactora se enciende cuando desciende la temperatura y se apaga cuando la supera, generando esos picos de máximos y mínimos. Si se realiza la media de las lecturas de temperatura, efectivamente, esta queda en torno a los $25^{\circ}C$.

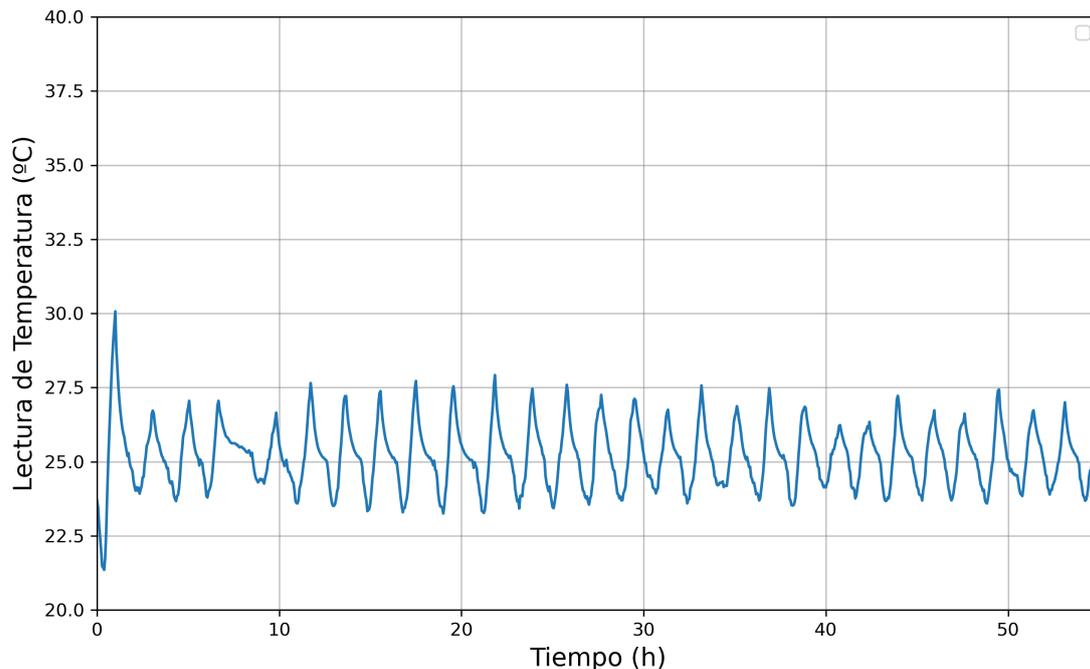


Figura 4.5. Lectura de la temperatura del fotobiorreactor.

4.2. Fluorescencia

Respecto a la lectura de la fluorescencia en fitoplancton, se introducen viales de cianobacterias para comprobar su funcionamiento. Mediante el *script* de *Phyton* se realizan las medidas con las longitudes de onda de los led de 655, 620, 527, 450 y 405 nm. La lectura del fotodiodo se representa en la [Figura 4.6](#). Podemos ver que solo se obtiene respuesta de fluorescencia al excitar con las longitudes de onda más rojas, es decir, a 620 nm y a 655 nm. Teniendo en cuenta que el fluoróforo principal de las cianobacterias es la ficocianina y que esta tiene una absorción entorno a estas longitudes de onda ([Figura 2.9](#)), el resultado es consistente.

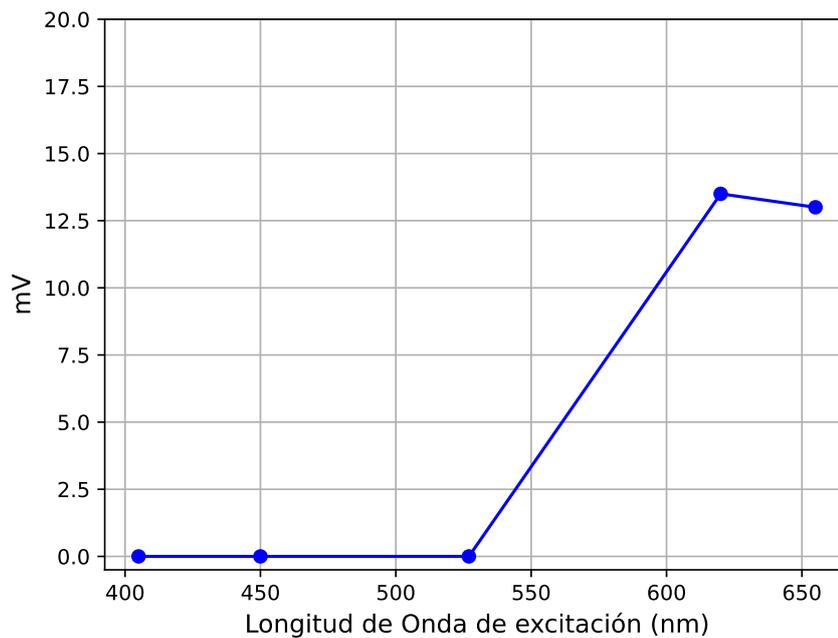


Figura 4.6. Lectura de la fluorescencia de cianobacterias medida por el fotodiodo.

Para comprobar este comportamiento se decide poner el espectrómetro Qmini AFBR-S20M2WU de Broadcom [42] a través de una fibra óptica en el lugar del fotodiodo. Se miden los espectros para las mismas longitudes de onda y, efectivamente, tal y como veíamos con el fotodiodo, la fluorescencia aparece al excitar la muestra a 655 y 620 nm ([Figura 4.7](#)). A las demás longitudes de onda de excitación no se observa nada.

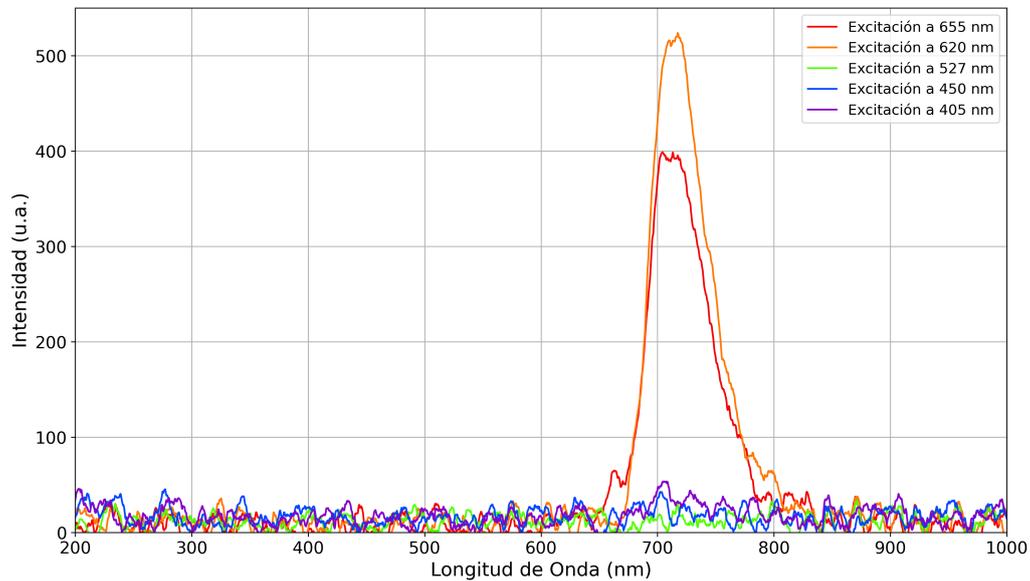


Figura 4.7. Espectros de fluorescencia medidos con el espectrómetro.

Aunque estos resultados preliminares son consistentes, también se han observado algunos problemas. La excitación a través de las fibras de plástico quizás no es lo suficientemente potente debido a pérdidas. Además, las fibras de plástico también tienen fluorescencia y podrían afectar de alguna manera a las medidas.

Estos problemas que han ido surgiendo son realmente útiles para continuar por el camino correcto. Quizás, el fotobiorreactor diseñado en su forma actual no alcance plenamente las características deseadas. Tiene ciertas limitaciones y áreas de mejora que es necesario abordar para continuar optimizando su funcionamiento. No obstante, proporciona información útil que nos ayuda a continuar mejorándolo.



5

Conclusiones y Líneas Futuras

5.1 Conclusiones	46
5.2 Líneas futuras	47

En este último capítulo se resumen de manera breve las principales ideas y conclusiones que se extraen del trabajo realizado. Además, se exponen algunas de las posibles líneas futuras que se podrían seguir para continuar con el desarrollo de las mejoras de estos fotobiorreactores de bajo coste.

5.1. Conclusiones

Debido a la contaminación ambiental y al cambio climático, las **FAN** están aumentando tanto en frecuencia como en intensidad, suponiendo un gran problema en los ecosistemas, lo que a su vez produce impactos negativos en la pesca, acuicultura, salud humana y en la economía. Las **FAN** se producen con poca antelación, por lo que es de gran importancia el desarrollo de herramientas de detección y predicción tempranas, así como una monitorización continua.

De tal manera, los fotobiorreactores pueden ser interesantes en el estudio de estas floraciones de algas nocivas, facilitando el monitoreo y análisis del crecimiento del fitoplancton. Es por eso que el objetivo principal del trabajo ha sido la mejora de un fotobiorreactor de bajo coste para la monitorización del crecimiento del fitoplancton.

Para ello, primero se han estudiado las características biológicas del fitoplancton, entendiéndose así que tienen autofluorescencia gracias a fluoróforos como la clorofila o la ficobilina. Resulta que esta fluorescencia es de gran interés tanto para la detección como para la identificación de diferentes grupos de fitoplancton.

Visto esto, se ha propuesto la implementación de tres mejoras al Piorreactor, el fotobiorreactor de bajo coste del que partimos. Los cambios realizados consisten en la mejora de la iluminación para el fotoperiodo, la implementación de un módulo para medir fluorescencia con excitaciones a diferentes longitudes de onda mediante leds y la posibilidad de realizar medidas de espectroscopía Raman.

Tras el diseño y desarrollo de de las mejoras, se han intentado realizar cultivos de cianobacterias. Desgraciadamente, los cultivos no han salido adelante debido a la contaminación. El hecho de no disponer de herramientas de esterilización y no poder trabajar en ambientes estériles ha causado la continua contaminación de los cultivos con los que no hemos podido observar correctamente el crecimiento de las cianobacterias.

Aun así, las medidas preliminares de fluorescencia realizadas sobre las cianobacterias corresponden correctamente a la excitación de la ficocianina que contienen. No obstante, los resultados obtenidos no han sido los mejores, aún queda un gran margen de mejora. En primer lugar, porque la fluorescencia emitida por el fitoplancton es bastante débil y, por lo tanto, es necesaria una sensibilidad mayor si se quiere monitorizar el cultivo a concentraciones bajas. El acoplamiento de luz para la excitación mediante la fibra óptica de plástico no ha dado los mejores resultados, además este tipo de fibras de plástico tienen fluorescencia lo que quizá no sea lo más adecuado para usarlas en medidas de fluorescencia.

Respecto, a la espectroscopía Raman los resultados arrojan espectros interesantes con bandas asociadas a pigmentos carotenoides. Así podría ser una interesante técnica para la monitorización del fitoplancton siendo una técnica rápida con posibilidad de hacer medidas *in situ*.

Finalmente, destacar que este trabajo pone en valor la multidisciplinariedad. Se pone de manifiesto la necesidad de la colaboración entre diversas áreas, como la biología y la ingeniería, demostrando que la tecnología fotónica ofrece soluciones diversas y efectivas. Este proyecto, ha sido un esfuerzo profundamente multidisciplinar que ha permitido aprender no solo sobre electrónica y fotónica, sino también sobre biología.

A través de la mejora de un fotobiorreactor de bajo coste, este trabajo a tratado de sumergirse en la problemática de las FAN, investigando sobre el tema e intentando incentivar el desarrollo de nuevos dispositivos para la monitorización del fitoplancton. El trabajo no tiene la intención de facilitar un dispositivo óptimo para estos fines, sino más bien transmitir ideas que fomenten el desarrollo de instrumentos que se ajusten a los propósitos de la investigación particular, abriendo así, un abanico de posibilidades.

5.2. Líneas futuras

A través del desarrollo realizado, se han identificado varias áreas que podrían beneficiarse de un estudio y desarrollo adicionales.

Se han encontrado limitaciones en la medida de fluorescencia por la baja emisión de los cultivos de fitoplancton, lo que sugiere la necesidad de una investigación más profunda para mejorar la excitación o colección del sistema. Además, por la fluorescencia que tienen las fibras ópticas de plástico podría ser conveniente cambiarlas por unas de sílice.

También queda pendiente la integración completa del sensor de fluorescencia desarrollado en la Raspberry Pi. Con esto, el control y monitorización del fotobiorreactor sería más cómodo y sencillo pudiendo controlar todas las características a través de la interfaz de usuario.

Por otro lado, esta vez sólo se ha podido trabajar con cianobacterias. Sin embargo, para comprobar el potencial de los equipos sería necesario hacer medias con fitoplancton de diferentes grupos espectrales, tanto en fluorescencia como en Raman. Esto nos permitiría comprobar si las técnicas son capaces de discriminar entre diferentes grupos. Además, las medidas Raman se ha realizado de forma estáticas, por lo que podría ser de utilidad pasar a medidas en flujo continuo.

Por supuesto, la clave para futuras investigaciones es encontrar unas condiciones de esterilización adecuadas, ya que como hemos visto la contaminación de cultivo es un gran problema que se debe evitar. Se podría empezar por explorar medios de esterilización de bajo costo como ollas que mediante vapor y alta presión, garanticen la eliminación de microorganismos, haciendo así la función de autoclave.

Las investigaciones futuras en este área podrían tener un impacto significativo en el desarrollo de nuevos dispositivos fotónicos para la monitorización e identificación de fitoplancton.

Bibliografía

- [1] Core Writing Team, H. Lee, and J. Romero, editors. *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland, 2023.
- [2] NASA. Studying chesapeake bay from above. <https://www.visibleearth.nasa.gov/images/89003/studying-chesapeake-bay-from-above/89003f>, 2024.
- [3] T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P.M. Midgley, editors. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013.
- [4] H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, and N.M. Weyer, editors. *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 2019.
- [5] N.L. Bindoff, W.W.L. Cheung, J.G. Kairo, J. Arístegui, V.A. Guinder, R. Hallberg, N. Hilmi, N. Jiao, M.S. Karim, L. Levin, S. O'Donoghue, S.R. Purca Cuicapusa, B. Rinkevich, T. Suga, A. Tagliabue, and P. Williamson. Changing ocean, marine ecosystems, and dependent communities. In *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*, pages 447–587. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 2019.
- [6] I. Losada, C. Izaguirre, and P. Diaz. *Cambio climático en la costa española*. Oficina Española de Cambio Climático, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, 2014.
- [7] A. Quesada, D. Carrasco, and S. Cirés. Cianobacterias en aguas de consumo y de recreo: Un problema de todos. Technical report, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, 2006.
- [8] A. Quesada. Cyanobacteria in spanish reservoirs. how frequently are they toxic? *Limnetica*, 23(1):109–118, June 2004.
- [9] R. Vieira-Lanero, S. Barca, M.C. Cobo, and F. Cobo. Occurrence of freshwater cyanobacteria and bloom records in spanish reservoirs (1981–2017). *Hydrobiology*, 1:122–136, 2022.
- [10] Confederación Hidrográfica del Guadiana. Informe sobre el análisis de muestras de agua y fitoplancton en embalses de abastecimiento en riesgo por sequía, eutrofización y/o proliferación de algas. Technical report, Confederación Hidrográfica del Guadiana, 2020.

- [11] A. Quesada and S. Cirés Gómez. *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, 2011.
- [12] M. Simonazzi et al. Improvement of in vivo fluorescence tools for fast monitoring of freshwater phytoplankton and potentially harmful cyanobacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21):14075, October 2022.
- [13] Moreno O. Mamán L. Caballero I., Fernández R. and Navarro G. New capabilities of sentinel-2a/b satellites combined with in situ data for monitoring small harmful algal blooms in complex coastal waters. *Scientific Reports*, 10, 12 2020.
- [14] United Nations. Objetivos de desarrollo sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>, 2024.
- [15] Y. Chisti and M. Moo-Young. Bioreactors. In *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, pages 247–271. Elsevier, 2003.
- [16] GYassineMrabetTalk. Image from Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8301774>, 2024. Own work, CC BY-SA 3.0.
- [17] C. Mandenius, editor. *Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications*. Wiley, 1st edition, 2016.
- [18] R. Sirohi et al. Design and applications of photobioreactors - a review. *Bioresource Technology*, 349:126858, April 2022.
- [19] J.P. Bitog, I.-B. Lee, C.-G. Lee, K.-S. Kim, H.-S. Hwang, S.-W. Hong, I.-H. Seo, K.-S. Kwon, and E. Mostafa. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 76(2):131–147, 2011.
- [20] Ibiza Botánico Biotecnológico. Fotobiorreactor tubular. <https://ibizabotanicobiotecnologico.com/fotobiorreactor-tubular/>, 2024.
- [21] A. Hohe. Image from wikimedia commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29181109>, 2024. ReskiLab, University of Freiburg.
- [22] UPM Innovatech. Microalgas: Solución sostenible para el tratamiento de aguas residuales. <https://upminnovatech.blogspot.com/2014/05/microalgas-solucion-sostenible-para.html>, 2014.
- [23] P. Benner, L. Meier, A. Pfeffer, et al. Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and scalability. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45:791–813, 2022.
- [24] Ilustra Naturaleza. Image on ilustra naturaleza. <https://www.ilustranaturaleza.com/picture/216485>, 2024.
- [25] Kelvinsong. Image from Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24126121>, 2024. Own work, CC BY-SA 3.0.

- [26] M. A. Nienaber and M. Steinitz-Kannan. *A Guide to Cyanobacteria: Identification and Impact*. The University Press of Kentucky, 2018.
- [27] Pioreactor. Od normal growth rate. <https://docs.pioreactor.com/user-guide/od-normal-growth-rate>, 2024.
- [28] YSI. Hab monitoring and phycocyanin: Dispelling three myths. <https://www.ysi.com/ysi-blog/water-blogged-blog/2021/06/hab-monitoring-and-phycocyanin-dispelling-three-myths>, 2021.
- [29] BBE Moldaenke. Seminario web. <https://www.bbe-moldaenke.de/es/saber-medios/seminario-web.html>, 2024.
- [30] R. Masters Barry and T. C. So Peter, editors. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*. Oxford Academic, New York, NY, USA, 1998.
- [31] R. W. Boyd. *Nonlinear optics*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 4 edition.
- [32] G. Keiser. *Biophotonics: Concepts to Applications*. Graduate Texts in Physics. Springer Singapore.
- [33] Pioreactor. Pioreactor homepage. <https://pioreactor.com/en-es>, 2024.
- [34] Bivar. L2-PGC2-S LED. <https://www.mouser.es/ProductDetail/Bivar/L2-PGC2-S?qs=YIMyphLn24T6VdhXKu5K9g%3D%3D>.
- [35] Thorlabs. FDS100 Si Photodiode. <https://www.thorlabs.us/thorProduct.cfm?partNumber=FDS100>.
- [36] Thorlabs. FGL695 Longpass Colored Glass Filter. <https://www.thorlabs.us/thorProduct.cfm?partNumber=FGL695>.
- [37] Nanobase. XperRAM C series. <https://www.nanobase.co.kr/xperam-c-series>.
- [38] N. I. Novikova, H. Matthews, I. Williams, M. A. Sewell, M. K. Nieuwoudt, M. C. Simpson, and N. G. R. Broderick. Detecting phytoplankton cell viability using nir raman spectroscopy and pca. *ACS Omega*, 7(7):5962–5971, 2022.
- [39] V. E. de Oliveira, M. A. C. Neves Miranda, M. C. S. Soares, H. G. M. Edwards, and L. F. C. de Oliveira. Study of carotenoids in cyanobacteria by raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150:373–380, 2015.
- [40] W. Liu, Z. Wang, Z. Zheng, L. Jiang, Y. Yang, L. Zhao, and W. Su. Density functional theoretical analysis of the molecular structural effects on raman spectra of -carotene and lycopene. *Chinese Journal of Chemistry*, 30(10):2573–2580, 2012.
- [41] C. Sorokin. Growth rate measurements on phytoplanktonic organisms. *Chesapeake Science*, 10(3/4):313, September 1969.

- [42] Broadcom. Qmini AFBR-S20M2WU spectrometer. <https://www.broadcom.com/products/optical-sensors/spectrometers/spectrometers-qmini/afbr-s20m2wu>.