



**BIOSENSORES MICROALGALES PARA LA DETECCIÓN DE CONTAMINANTES
AMBIENTALES: UNA REVISIÓN
MICROALGAE BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF ENVIRONMENTAL
CONTAMINANTS: A REVIEW**

García-Balboa C, Costas E y ¹López Rodas V.

Genética (Producción Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense,
Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

¹Correspondencia del autor: vlrodas@vet.ucm.es

RESUMEN

El control de la contaminación necesita, hoy en día, de sistemas de detección y análisis que permitan alcanzar altos niveles de especificidad y sensibilidad, con el fin de ser capaces de detectar la presencia de contaminantes cada vez más diversos en cuanto a sus características físico-químicas y que están presentes en concentraciones cada vez más bajas. Las microalgas son organismos fotosintéticos muy sensibles a los pequeños cambios que puedan producirse en el ambiente que los rodea, lo que los convierte en una herramienta muy útil para la rápida detección (casi instantánea) de contaminantes presentes a niveles traza. Estos organismos microscópicos, que viven en los ecosistemas acuáticos, ofrecen una solución versátil para la construcción de nuevos biosensores que demanda la actual normativa de calidad y seguridad medioambiental. Los biosensores microalgales que presentamos están basados en la actuación simultánea de dos genotipos uno sensible y otro resistente, obtenidos mediante un proceso de mejora genética por selección artificial sin ser organismos genéticamente modificados. Estos biosensores específicos para cada uno de los contaminantes, permiten discriminar la presencia de un compuesto diana en un medio complejo, incrementando también la sensibilidad, algo no conseguido hasta el momento.

Palabras clave: biosensores, microalgas, contaminantes, sensibilidad, especificidad

ABSTRACT

Nowadays, the control of pollution requires the ability to detect and analyze an increasing variety of compounds present in the environment at trace level. Micro-algae are photosynthetic microorganisms that live in marine and freshwater. They are very sensitive to changes in the environment surround them. This behaviour offer a versatile solution for the construction of the novel biosensors that the actual environmental regulatory demands. The novelty in the research here discussed is to have designed a microalgae biosensor with the property of high specificity. The functionality is based on the simultaneous action of two genotypes, sensible and resistant, obtained through a genetic selection process –without genetic manipulation-. The jointly action of the two genotypes, the resistant and the sensible, let to discriminate the presence of the target compound in a complex environment. The most important achievement of the present research -not described yet- is to have attained an increased sensibility and specificity in the detection of pollutants.

Keywords: biosensors, microalgae, pollutants, sensitivity, specificity

1. Introducción

El agua es hoy en día uno de los recursos más frágiles por razones que derivan de su irregular distribución terrestre, su disponibilidad está condicionada por factores meteorológicos y geográficos, y la calidad se ve seriamente comprometida como consecuencia de la contaminación. Se estima que en torno a 500 millones de personas no tienen acceso a fuentes de agua potable en países en vías de desarrollo; además, prevenir y/o tratar la contaminación del agua en países desarrollados supone cuantiosos gastos.

Uno de los compromisos del desarrollo sostenible es la responsabilidad adquirida en el control absoluto de la contaminación de los medios acuáticos, terrestres y aéreos. La aceptación de este compromiso implica el establecimiento de medidas de prevención y control de los contaminantes emitidos en todas las etapas de su uso: desde la fuente de descarga hasta la disposición final del recurso. De especial relevancia es detectar la presencia de compuestos tóxicos tan pronto como sea posible, con el fin de evitar la destrucción de ecosistemas y por tanto de las especies que viven en ellos.

Este compromiso también implica el establecimiento de medidas acertadas en relación a la prevención y/o eliminación de un contaminante, la mejora de los protocolos de muestreo, la optimización de los métodos de detección, y la precisión de los análisis.

La detección “*in situ*” de un determinado contaminante, y la precisión con que puedan obtenerse medidas fiables favorecerán la posibilidad de tomar decisiones rápidas de cara a implantar medidas urgentes de control. En la actualidad, hay una demanda creciente para la mejora en los sistemas de control de la contaminación del agua, de forma que sean capaces de proporcionar datos de un determinado tóxico en tiempo real, que identifiquen la naturaleza del compuesto (metal, pesticida, etc.) y que además precisen su concentración (Orellana *et al*, 2009).

Los contaminantes que más afectan a la calidad del agua pueden encuadrarse, en términos generales, en dos grandes categorías: contaminantes orgánicos (detergentes, pesticidas, compuestos volátiles) y contaminantes inorgánicos (metales pesados, residuos químicos) (Brayner *et al*, 2011).

Hasta el momento, se han utilizado dos tipos de metodologías para el control y monitoreo de la calidad de las aguas: análisis químicos y ensayos biológicos. Los **análisis químicos**, cada vez más sofisticados, pueden llegar a límites de detección del orden de partes por trillón (ppt). Aunque la metodología basada en estos análisis consigue datos muy exactos, altamente reproducibles y alcanzan niveles de detección muy elevados, a menudo se caracterizan por ser costosos, largos y necesitan un pretratamiento de la muestra para su traslado al laboratorio. Esto ocurre por ejemplo en los análisis por cromatografía de gases y detección en masas (Brayner *et al*, 2010). El segundo tipo de metodología empleada mucho más recientemente corresponde a los **ensayos biológicos o bioensayos**. Los bioensayos tienen la ventaja de ser extraordinariamente sensibles y permiten la detección in situ en tiempo real de la contaminación producida por una descarga súbita, lo que supone poder reaccionar en menos tiempo e impedir, si es que se trata de una fuente destinada al consumo, que se produzcan consecuencias graves de mayor orden.

Los métodos químicos adolecen además de otra limitación y es que no son capaces de discriminar la biodisponibilidad de un determinado contaminante, es decir cuánto realmente puede estar afectando a una especie en un determinado ecosistema, qué concentración es realmente necesaria para comprometer la viabilidad de las especies que habitan en él.

Uno de los métodos analíticos basado en los bioensayos que ha sido desarrollado e implementado con éxito en los últimos años es el empleo de **biosensores**. Un biosensor es un sistema analítico compuesto básicamente por dos partes (Figura 1): un *biorreceptor*: material biológico, normalmente inmovilizado (enzimas, anticuerpos, orgánulos celulares, o células completas como bacterias o algas), cuya función es la de servir como sensor biológico del elemento a analizar. Este material biológico está acoplado a un sistema *transductor*, que detecta la señal bioquímica y la transforma en una señal óptica o eléctrica (Kissinger, 2004).

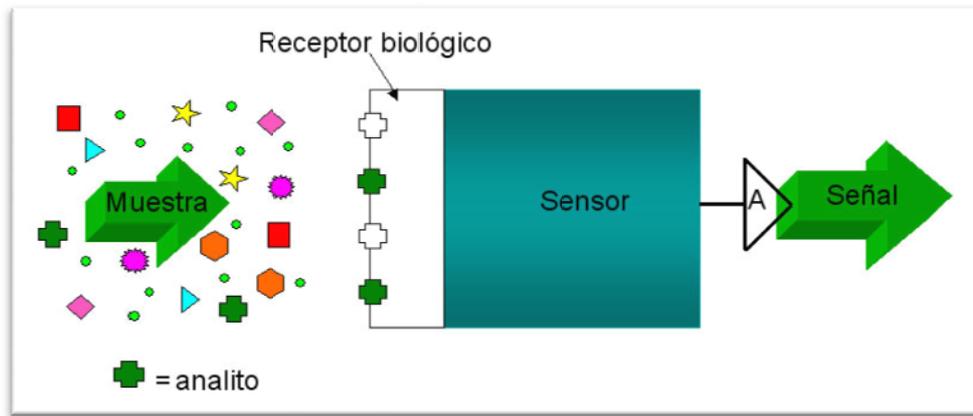


Figura 1: Esquema básico de un biosensor

Mediante este tipo de dispositivos microelectrónicos se han podido obtener datos exactos, con buena reproducibilidad y elevados niveles de sensibilidad; el método permite además obtener resultados a bajo coste, y por tanto realizar muchas medidas en tiempos cortos.

La clave para que un biosensor pueda funcionar con éxito está en que su actividad celular sea suficientemente sensible a la presencia de un determinado contaminante (o tóxico a evaluar) en la muestra a analizar, pero que no se vea afectado (insensible) por las características físico-químicas generales de dicho medio (Orellana *et al*, 2010).

La elección del componente biológico dependerá no sólo de la sustancia a analizar (analito) sino también de las características físico-químicas de la muestra; por su parte, el transductor también condicionará la naturaleza del biocomponente.

Básicamente los biosensores se clasifican en dos tipos:

- a) En función del biocomponente inmovilizado.
 1. Enzimáticos
 2. Afinidad
 3. Inmunológicos
 4. Membranas
 5. Microorganismos enteros
 6. ADN
- b) En función del transductor.
 1. Electroquímicos

2. Ópticos
3. Calorimétricos/térmicos
4. Acústicos/térmicos

2. Historia y evolución de los biosensores

Los biosensores, al igual que cualquier otro tipo de ensayo, han evolucionado a lo largo de la historia. Anecdóticamente se podría decir que los primeros biosensores fueron pájaros, ya que estas aves se utilizaban antiguamente en las minas de carbón para detectar gases tóxicos. Los pájaros más utilizados en España fueron canarios (*Serinus canarius*), éstos se mueren antes que las personas en presencia de monóxido de carbono o metano y como suelen estar cantando la mayoría del tiempo, el hecho de que no lo hicieran se convertía en una alarma sonora.

Al margen de este hecho anecdótico, se puede decir que el primer biosensor, tal y como hoy lo entendemos, fue un electrodo para medir oxígeno construido y desarrollado por Clark en 1956. Unos años más tarde se diseñó el primer biosensor enzimático (Clark *et al*, 1962), en el que se combinaba la actuación de una enzima inmovilizada (glucosa oxidasa) con un detector electroquímico (electrodo de oxígeno). Este biosensor permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno. Posteriormente, se desarrollaron electrodos potenciométricos inmovilizando otras enzimas como ureasas sobre electrodos selectivos de amonio y analizadores de glucosa basados en detecciones amperométricas de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Guibault & Lubrano, 1973) Éstos fueron los primeros biosensores a la venta de los muchos que se comercializarían más adelante.

En esta misma década se utilizaron por primera vez bacterias enteras vivas como biosensores para medir la cantidad de alcohol en una muestra (Divis, 1975), y se empezaron a utilizar transductores térmicos (*termal enzyme probes*) y termistores enzimáticos (*enzyme thermistors*) (Mosbach & Danielsson, 1974). Con posterioridad se han desarrollado biosensores basados en fibra óptica (Lubbers & Opitz, 1975), que han dado lugar al grupo de biosensores denominados “optode” utilizados para la determinación de CO₂ y O₂. Al mismo tiempo se construyó un biosensor de glucosa en un páncreas artificial que se comercializó con el nombre de Biostator (Clemens *et al*, 1976) y otro basado en la inmovilización de la lactato

deshidrogenasa, que ha sido muy útil tanto para mediciones clínicas como en determinaciones en pruebas deportivas

En esta misma década y al mismo tiempo, se utilizaron anticuerpos inmovilizados junto a transductores piezoeléctricos o potenciométricos, aunque fue en la década de los 80 cuando Liedberg los comercializó con éxito (Liedberg *et al*, 1983). En 1987 mediante la utilización de mediadores electroquímicos inmovilizados en electrodos enzimáticos serigrafados se consiguió construir el “bolígrafo” para el seguimiento personal de glucosa en la sangre, comercializado por MediSense. Hoy en día, las compañías Abbott, Boehringer Mannheim y Bayer dominan las ventas de éste “bolígrafo”, lo que da lugar a unos ingresos del orden de varios cientos de millones de dólares y está desbancando casi totalmente a los métodos convencionales de medición de la glucosa.

En la siguiente década, basándose en la utilización de mediadores electroquímicos para favorecer la transferencia de electrones desde el centro redox de una enzima a la superficie del electrodo, se construyeron lo que constituyó la nueva generación de biosensores electroquímicos.

En la actualidad existen multitud de biosensores en los cuales se combinan la amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con los diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos). Presentan múltiples aplicaciones tanto en sanidad (análisis clínico), alimentación (tecnología de alimentos), vigilancia del medio ambiente (contaminantes), defensa y seguridad (Ming-Hung, 2008).

3. Microalgas: organismos idóneos para el diseño de biosensores

En los últimos años se han utilizado tanto moléculas como materiales celulares para la preparación de biosensores: tejidos vegetales (Shigeoka *et al*, 1988); células animales (Ma *et al*, 2002). Además el uso de microorganismos enteros como bacterias (Oettmeier, 1999) o microalgas (Costas *et al*, 2001; López-Rodas *et al*, 2001; Altamirano *et al*, 2004; Huertas *et al*, 2010, 2011) se ha revelado como una buena alternativa. El empleo reciente de microalgas enteras para el desarrollo de biosensores las ha posicionado como un microorganismo con el

que se obtienen resultados más prometedores en relación tanto a la elevada sensibilidad como a la reproducibilidad de los datos que generan (Brayner *et al*, 2010).

Las microalgas son los principales componentes del fitoplancton y el inicio de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos (Figura 2), por tanto su disponibilidad y abundancia son muy elevadas, encontrándose en todos los medios acuáticos y en muchos medios terrestres. La mayoría de las especies de microalgas pueden crecer en casi cualquier condición medioambiental y sobrevivir con bajas concentraciones de nutrientes y en condiciones ambientales extremas de pH, temperatura, salinidad... que podrían ser letales para otros organismos (Costas *et al*, 2007). Por lo tanto, no resulta extraño que las microalgas hayan sido elegidas como candidatas idóneas para el desarrollo de biosensores capaces de responder a cambios críticos en los ecosistemas acuáticos (Merz, 1996).

Se estima que existen unas 90.000 especies de microalgas (sin incluir las cianobacterias) de las cuales aproximadamente la mitad han sido descritas (Brayner *et al*, 2010), **el enorme potencial de las microalgas para el desarrollo de biosensores está aún por explorar.**

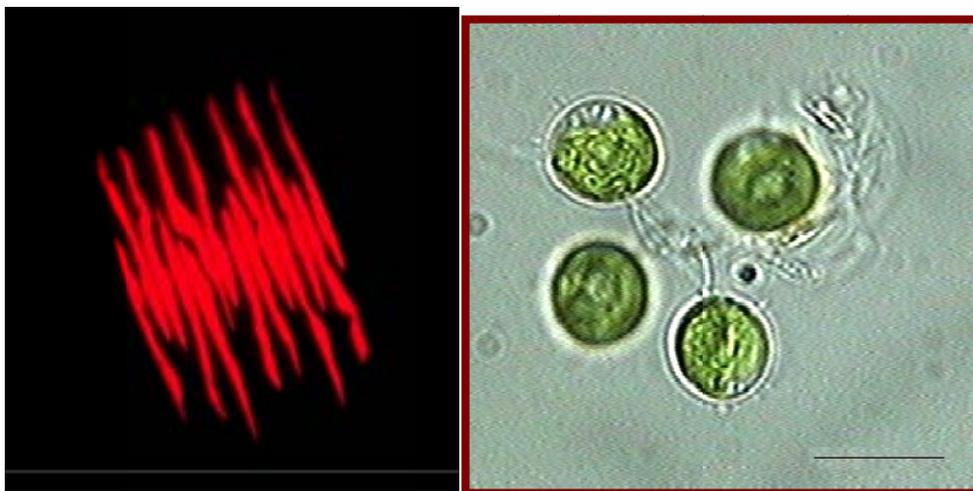


Figura 2: Distintas especies microalgales

3.1 Biosensores microalgales

El funcionamiento de los biosensores microalgales está basado en el efecto inhibitorio que algunas sustancias tóxicas ocasionan en la actividad fotosintética del organismo entero. El estado de la actividad fotosintética de las algas verdes se puede monitorear mediante tres

métodos principales: 1) la medida de la intensidad de la fluorescencia emitida por sus moléculas de clorofila; 2) la producción del oxígeno que se genera como producto de la fotosíntesis; 3) la medida de la alcalinización del medio.

Básicamente el funcionamiento de un organismo fotosintético del plancton se resume del siguiente modo (Figura 3): la luz del sol (fotosintéticamente activa) es absorbida a través de una “antena” de captación formada por proteínas asociadas a pigmentos sensibles a la luz. Una pequeña parte de la energía absorbida se disipa en forma de calor, mientras que otra parte es emitida como fluorescencia. La parte más importante de la energía absorbida se utiliza en la asimilación de CO₂ y la fotólisis del agua, para realizar la fotosíntesis, con la consiguiente síntesis de materia orgánica y la producción de O₂ ec.[1].

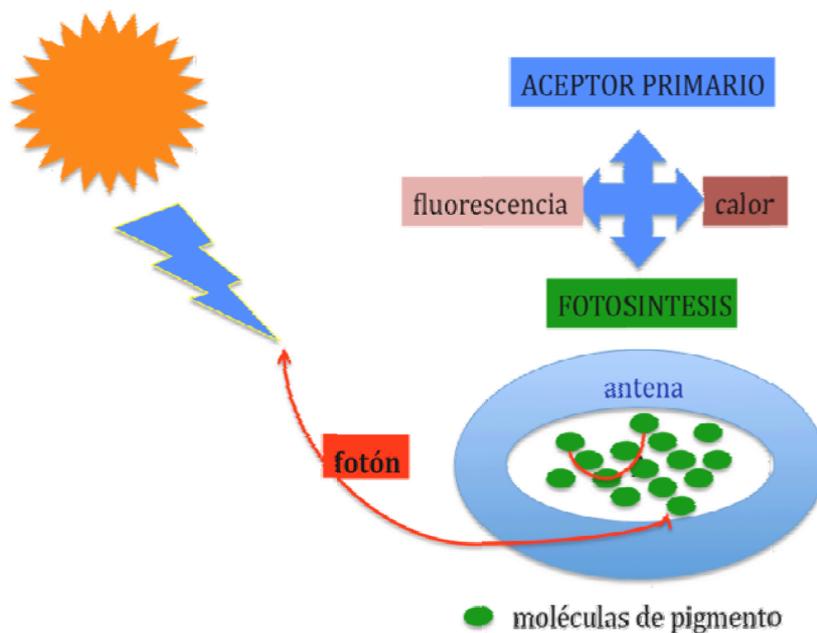
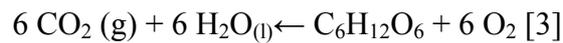


Figura 3: Esquema de la realización de la fotosíntesis en microalgas

Además, la actividad fotosintética da lugar a una alcalinización del medio de cultivo como consecuencia del consumo de CO₂ y el consiguiente desplazamiento del equilibrio de disolución del oxígeno en agua (ecuaciones [2 y 3]); dicha alcalinización resulta inhibida en presencia del agente tóxico.



En resumen, en presencia de agentes tóxicos, la actividad de las microalgas se ve afectada. La disminución de la función fotosintética puede evaluarse a través de la disminución de la emisión de fluorescencia, la disminución de la producción de oxígeno y/o la alcalinización del medio. Cualquiera de los parámetros derivados de estos métodos puede servir, en principio, para detectar la presencia de un agente tóxico.

El método más extensamente utilizado para detectar la inhibición fotosintética en presencia de un agente tóxico es la medida de la emisión de fluorescencia de la clorofila a en el fotosistema II (PSII).

Este tipo de biosensor se ha descrito, por ejemplo, para detectar la presencia de ciertos herbicidas que inhiben el transporte de electrones al PSII durante la fotosíntesis. Se ha estimado que el 50% de los herbicidas utilizados causan un efecto a este nivel. Son muchas las referencias bibliográficas en relación a la medida de la inhibición fotosintética (producida por un tóxico como un herbicida, un metal pesado, etc...) que se produce como consecuencia de la disminución de actividad del fotosistema II (PSII). Microalgas de la división Chlorophyta como *Chlorella vulgaris*, *Dictyosphaerium chlorelloides* se han utilizado para la detección de compuestos tóxicos tanto orgánicos como inorgánicos tanto en agua como inmovilizadas en soportes, (Orellana *et al*, 2008; Brayner *et al*, 2010) (Figura 4).

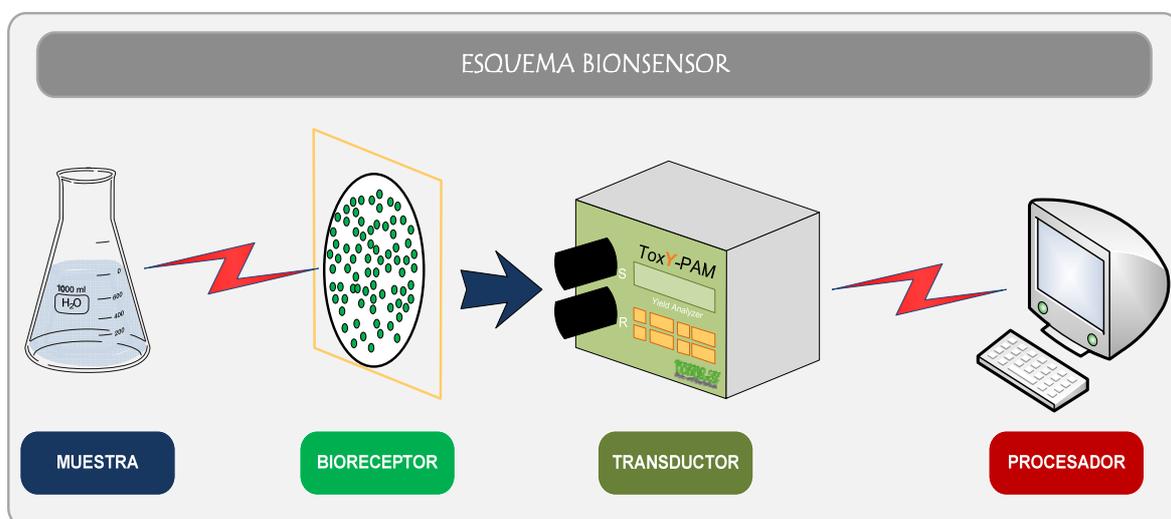


Figura 4: Esquema tipo de nuestro biosensor microalgal

3.2 Inmovilización de microalgas

Uno de los pasos limitantes en el desarrollo de los biosensores microalgales se encuentra en conseguir inmovilizar la biomasa en un material compatible, con el fin de evitar pérdidas sin que se vea alterada ni la estabilidad ni la actividad de las células. La mayoría de las técnicas de inmovilización dependen del uso de materiales orgánicos (alcoholes polivinílicos o polisulfonas) que en ocasiones pueden ser materiales tóxicos para las algas. Aunque se han probado otros soportes más biocompatibles, como por ejemplo el alginato de calcio, sufren de falta de inestabilidad con el tiempo, lo que limita su uso para diseños que tengan por objeto su empleo a largo plazo (Moreno-Garrido, 2008). Con el fin de mejorar la estabilidad de los soportes se han propuesto distintas técnicas de inmovilización: microencapsulación dentro membranas semipermeables (Kitajima *et al*, 1976); adsorción a derivados de celulosa (Shioin & Sasa, 1979); tratamiento en matrices de gel (Karube *et al*, 1981; Ochiai *et al*, 1982); reticulación en glutaraldehído (Park *et al*, 1966), co-reticulación en matrices mixtas de albúmina-glutaraldehído (Cocquempot *et al*, 1981; Tomasset *et al*, 1983; Loranger *et al*, 1994), colonización en siliconas porosas y membranas semipermeables (Costas y López-Rodas 2008). Sin embargo, de todas las opciones, la que de forma más general presenta propiedades óptimas son las matrices de sílica-gel; además de presentar una elevada estabilidad tanto mecánica como química, tienen la ventaja adicional de que se trata de un material transparente, requisito necesario para que las células puedan desarrollar adecuadamente su actividad fotosintética.

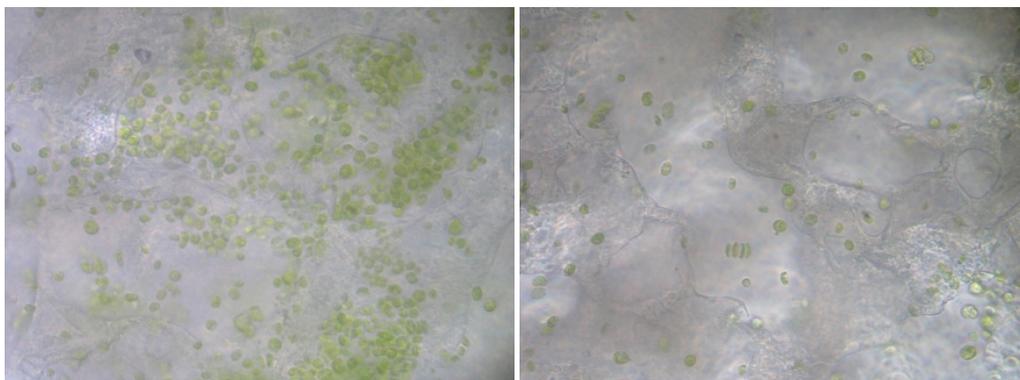


Figura 5: Colonización de dos especies de microalgales en siliconas porosas

4. Una limitación de los biosensores microalgales: el problema de la ESPECIFICIDAD

Pese a las importantes ventajas, anteriormente descritas, relativas al uso de biosensores microalgales (rapidez, repetibilidad, exactitud, análisis directo de las concentraciones sin pretratamiento de muestras o con un pretratamiento mínimo de las mismas, lo que posibilita la detección *in situ* de las concentraciones reales medioambientales), existe un aspecto que aún compromete su uso. Normalmente los biosensores presentan una limitada especificidad, debido a que se obtiene una señal global para un conjunto de sustancias que están presentes en la muestras y que eventualmente podrían estar afectando de forma sinérgica. Es decir, que la aplicación más segura es con frecuencia aquella que trata de determinar “niveles de contaminación” en general, o contaminación del agua en términos generales, sin poder especificar la medida concreta de la concentración de un tóxico determinado. Este dato puede resultar suficiente en algunos casos, pero conforme las normativas medioambientales se hacen más restrictivas y exigentes, la determinación exacta de un determinado parámetro puede resultar una exigencia insoslayable.

La especificidad en los biosensores microalgales puede conseguirse a través de un procedimiento de selección genética para la obtención de biosensores específicos. La aplicabilidad de los biosensores así obtenidos es potencialmente muy elevada, pues en principio sólo se vería restringido por los límites naturales de cada especie (Orellana *et al*, 2010).

NUESTRA APORTACION A LOS BIOSENSORES MICROALGALES: ESPECIFICIDAD A MEDIDA

El principio operacional en el que se basa el funcionamiento de los biosensores microalgales de elevada especificidad consiste en la utilización (presencia) simultánea de dos genotipos diferentes para detectar un determinado contaminante. El genotipo sensible permitiría obtener la sensibilidad necesaria frente a un determinado tóxico y el genotipo resistente sería el que pondría de manifiesto la especificidad. A modo de ejemplo, si en una muestra de agua hay presente una concentración de x mg/L de un determinado tóxico, el biosensor funcionaría de este modo: por un lado, el genotipo sensible alertaría de la presencia de un tóxico (se vería afectada su actividad fotosintética); por su parte, la presencia del

mutante resistente específico permitiría desvelar de qué tóxico se trata y en la mayoría de los casos incluso su concentración.

5. La obtención de los genotipos sensible y resistente

El desarrollo del biosensor basado en la actividad simultánea de dos genotipos, sensible y resistente, requiere, como paso preliminar, de la selección de ambos genotipos. Es importante destacar que el biosensor objeto de la presente investigación no es un organismo modificado mediante ingeniería genética, sino que se obtiene detectando y aislando un mutante resistente natural, que posteriormente se somete a un proceso de mejora genética mediante ciclos de ratchet. (Altamirano *et al*, 2004, Orellana *et al*, 2010 Patente). Éste es el primer caso descrito en la bibliografía de obtención de biosensores de elevada especificidad sin manipulación genética previa de las cepas, pues se han hecho otros intentos de incrementar dicha especificidad por medio de sofisticados y costosos procedimientos, como por ejemplo, la obtención de cepas bacterianas con genes bioluminiscentes, o la incorporación de proteínas fluorescentes a bacterias (Horsburgh *et al*, 2002).

La sensibilidad y especificidad de los biosensores microalgales frente a un determinado tóxico se puede incrementar considerablemente si las cepas que integran dicho biosensor han sido previamente seleccionadas por su resistencia y/o sensibilidad frente al agente tóxico cuya presencia quiere ser detectada (Altamirano *et al*, 2004), por tanto, el proceso de selección de ambos genotipos se hace específicamente en presencia del tóxico objeto de estudio.

El proceso de detección y aislamiento se realiza del siguiente modo: una primera fase de selección mediante un análisis de fluctuación (Figura 5) (Luria and Delbrück, 1943; López-Rodas *et al*, 2001) y un segundo paso de mejora genética donde se termina seleccionando el genotipo resistente mediante ciclos de ratchet sucesivos (Huertas *et al*, 2010, 2011) (Figura 5). El primer paso de selección (análisis de fluctuación) permite identificar los mutantes que, o bien ya existían previamente, o que han aparecido espontáneamente durante el proceso de selección; mediante los ciclos de ratchet se seleccionan los organismos que acumulan más de una mutación, lo que les confiere mayor resistencia al tóxico. De este modo se obtienen cepas que presentan una intensa sensibilidad frente al tóxico y cepas que muestran

una resistencia incrementada al tóxico; todo ello supone un efecto sinérgico favorable a incrementar la especificidad.

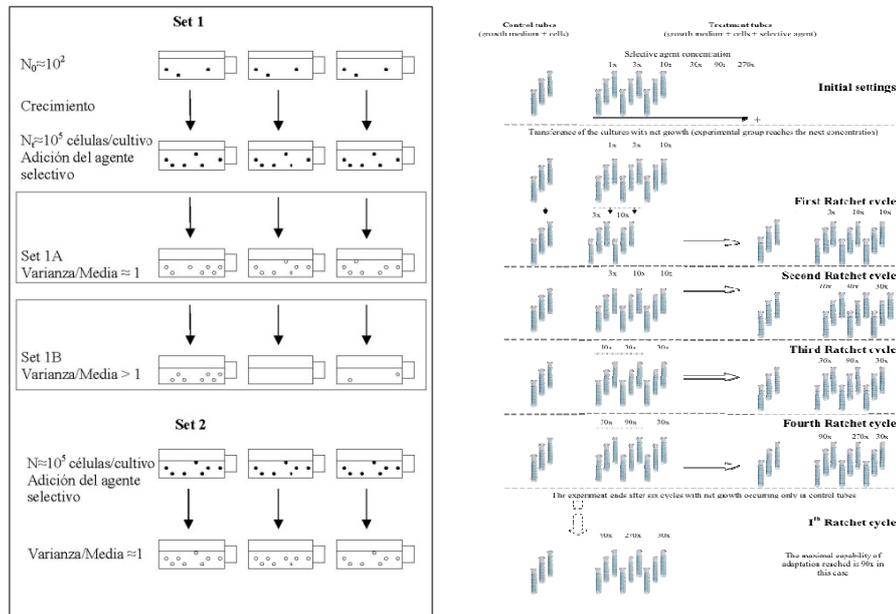


Figura 5: Esquemas del Análisis de Fluctuación y del experimento Ratchet

6. Perspectivas en Biosensores Microalgales

En principio no hay limitación alguna respecto a los posibles especies microalgales que se pueden utilizar para seleccionar los genotipos sensible y resistente. La única condición es que puedan obtenerse ambos genotipos para el compuesto de interés, de forma que produzca una inhibición suficiente sobre la fotosíntesis para que pueda ser detectado con éxito.

De esta forma, este tipo de biosensores pueden desarrollarse prácticamente “a medida” y pueden servir para detectar una gama variadísima de compuestos de distinta naturaleza y propiedades como pueden ser pesticidas, insecticidas, antibióticos, metales pesados, etc. De hecho, cada día crece el número de publicaciones que muestran los logros obtenidos utilizando este tipo de biosensores para distintos analitos y con distintos diseños experimentales. Sirvan como ejemplo, los biosensores microalgales para la detección de TNT (Altamirano *et al*, 2004), para el monitoreo de distintos herbicidas como simazina y diquat

(Marvá *et al*, 2010), glifosate (López-Rodas *et al*, 2007) para el incremento de temperatura (Huertas *et al*, 2010), para la detección de cromo (D'Ors *et al*, 2010) o cobre (García-Villada *et al*, 2004; Peña-Vázquez *et al*, 2010), etc.

En la actualidad hay un interés creciente para implementar estos biosensores y utilizarlos comercialmente con objeto de cumplir la legislación medioambiental europea. Tanto esta legislación como la regulación medioambiental existente hoy en España lleva a la necesidad de controlar una amplia gama de tóxicos, con límites de detección muy específicos. Ilustraremos dos casos de contaminación ambiental que, difiriendo en la naturaleza del tóxico problema, ambos pueden ser abordados mediante el empleo de biosensores. Uno de los contaminantes, persistente y abundante en la zona del País Vasco, cuya problemática está aún por resolver es el lindano.

Otro de los problemas ambientales importantes es el relacionado con las elevadas concentraciones de cobre y hierro que se detectan en aguas del Atlántico en la zona entre Cádiz y Huelva. Dicha contaminación procede por una parte de las aportaciones de la Faja Pirítica Ibérica, con yacimientos de Cu, Zn, Pb, Au y Ag, por donde discurren los ríos Tinto y Odiel y que se incluyen entre las áreas más contaminadas del mundo.

El empleo de biosensores microalgales “a medida” con una alta especificidad, permitirá, sin duda, avanzar en la detección y control de la contaminación en los ecosistemas acuáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano M., García-Villada L., Agrelo M., Sánchez-Martín L., Martín-Otero L., Flores-Moya A., Rico M., López-Rodas V., Costas E., 2004. *Biosensors & Bioelectronics*. 19: 1319-1323
- Brayner *et al*, 2011. *Anal. Bioanal. Chem.* 401: 581-597
- Clark *et al*, 1962. *Ann. NY Acad. Sci.* 102: 29-45
- Clemens A.H., Chang P.H., Myers R.W., 1976. Proc. Journes Ann. De Diabetologie de l'Hôtel-Dieu, Paris (France)
- Cocquempot M.F., Thomaset B., Barbotin J.N., Gelif G., Thomas D., 1981. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 193-198

- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J., Lopez-Rodas, V., 2001. *Phycologia* 40: 391–398
- Costas, E., Flores-Moya, A., Perdigones, N., Maneiro, E., Blanco, J.L., Garcia, M.E. & Lopez-Rodas, V. 2007. *New Phytologist* 175(2): 334- 339.
- Costas, E. y Lopez-Rodas, V. 2008. Symp. Futursen. Fac. Químicas. UCM. Nov.
- Divis C., 1975. *Annals of Microbiology* 126A: 175-186
- D’Ors A., Pereira M., Bartolomé M.C., López-Rodas V., Costas E., Sánchez-Fortún S., 2010. *Chemosphere* 81: 282-287.
- Garcia-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sanchez, L., Lopez-Rodas, V. & Costas, E. 2004. *Water Research* 38: 2207- 2213.
- Guilbault G., & Lubrano G.J., 1973. *Anal. Chim. Acta* 64: 439-455
- Horsburg A.M., Mardlin D.O., Turner N.L., Henkler R., Strachan N., Glover L.A., Paton G.I., Killham K., 2002. *Biosensors & Bioelectronics*. 17, 1-7.
- Huertas, E., Rouco, M., López-Rodas, V. & Costas, E. 2010. *New Phytologist* 188: 478-487
- Huertas E., Rouco M., López-Rodas V., Costas E., 2011. *Proc. R. Soc. B*. 278: 3534-3543.
- Kitajima M., Buttler W.L., 1976. *Plant Physiol.* 57: 746-750
- Kissinger P. T., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 16: 186-189
- Liedberg B., Nylander C., Lundstrum I., 1983. *Sensors and Actuators* 4: 299-304
- Lubbers D.W., Opitz N.Z., 1975. *Bioscience*. 30C: 532-533
- Luria, S., Delbrück, M., 1943. *Genetics* 28, 491–511.
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Larrauri, A., Martin-Otero, L. & Costas, E. 2001. *Eur. J. Phycol.* 36: 179-190.
- López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marvá, F., Garcia, M.E. & Costas, E. 2007. *Evolutionary Ecology* 21: 535- 547.
- Loranger, C. & Carpentier, R. 1994. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 178.
- Karube I., Mastsunaga I., Otsuka T., Kayano H., Susuli S., 1981. *Biochim. Biophys Acta* 637: 400-405.
- Moreno-Garrido, 2008. *Bioresour. Technol.* 99: 3949: 3964
- Ming-Hung Lee T., 2008. *Sensors* 8: 5535-5559.
- Ma J., Xu L., Wang S., Zheng R., Jin S., Huang S. Huang S., 2002. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51: 128-139.
- Marvá F., López-Rodas V., Rouco M., Navarro M., Toro F.J., Costas E., Flores-Moya A., 2010. *Aquatic Toxicology* 96: 130-134
- Merz D., Geyer M., Moss D.A., Ache H.J., 1996. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354: 299-305

- Mosbach K., Danielsson B., 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 364: 140-145.
- Ochiai, K., Kamata, Y. & Shibasaki, K. 1982. *Agric. Biol. Chem.* 46: 91-96.
- Orellana G., López-Rodas V., Costas Costas E., Haig Florez D., Maneiro Pampín E. 2010.
Patente US/0248286 A1
- Oettmeier W., 1999. *Cell Mol Life Sci.* 10: 1255-1277
- Park R.B., Kelly J., Drury S., Sauer K., 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 55: 1056-1062
- Peña-Vázquez E., Maneiro E., Pérez-Conde C., Moreno-Bondi M., Costas E., 2009.
Biosensors. & Bioelectronics. 24: 3538-3543
- Shigeoka T., Sato Y., Takeda Y., Yoshida K., Yamauchi F., 1988. *Environ. Toxicol. Chem.*
847: 1234-1255.
- Shioi I., Sasa T., 1979. *FEBS* 101:311-315.
- Thomasset B., Barbotin J.N., Thomas D., Thomasset T., Vejux A., Jeanfil J., 1983. *Biotechnol.*
Bioeng. 25: 2453-2468