

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 331 767**

② Número de solicitud: 200603300

⑤ Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12N 11/08** (2006.01)

**G01N 21/77** (2006.01)

**G01N 33/18** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.12.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **14.01.2010**

⑦ Solicitante/s: **INTERLAB, Ingeniería Electrónica y de Control, S.A.U.**  
**María Tubau, 4 - 2º**  
**28050 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Bedoya Gutiérrez, Maximino;**  
**Delgado Alonso, Jesús;**  
**García Ares, Ernesto;**  
**García Alonso, José Luis;**  
**Orellana Moraleda, Guillermo y**  
**Moreno Bondi, María Cruz**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Celda de medida, analizador, procedimiento, programa de ordenador y soporte de dicho programa para medir DBO.**

⑤ Resumen:

Celda de medida, analizador, procedimiento, programa de ordenador y soporte de dicho programa para medir DBO. Esta invención concierne a un analizador para medir, preferentemente *in-situ* y en continuo, la demanda bioquímica de oxígeno de una sustancia, que comprende un circuito (202) de flujo por el cual fluye la sustancia analizada, comprendiendo dicho circuito (202) un conjunto de al menos un tipo de bacterias que interacciona con la sustancia disminuyendo su concentración de oxígeno. Según esta invención, el analizador está caracterizado porque el circuito (202) comprende una serie de soportes poliméricos (212) colonizados por dichas bacterias, estando adaptado el circuito para que la sustancia entre en contacto de forma necesaria y consecutiva con cada soporte polimérico (212).

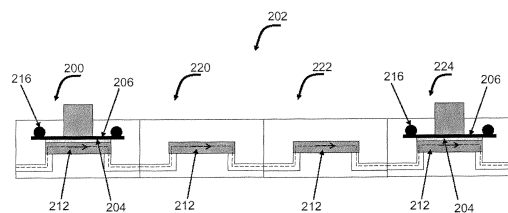


FIG.2b

ES 2 331 767 A1

## DESCRIPCIÓN

Celda de medida, analizador, procedimiento, programa de ordenador y soporte de dicho programa para medir DBO.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere principalmente a una celda de medida, a un analizador que comprende dicha celda, a un procedimiento, a un programa de ordenador y a un soporte para dicho programa, para medir, preferentemente *in-situ* y en continuo, la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en una sustancia, para por ejemplo estimar la presencia de materia orgánica en dicha sustancia, como por ejemplo agua de lagos o ríos, aguas residuales o productos de procesos industriales.

**Estado de la técnica anterior**

15 La presencia de oxígeno disuelto es fundamental para la vida de la fauna y la flora acuática aerobia, dado que su supervivencia depende de la presencia de ciertas concentraciones mínimas de esta sustancia vital en las aguas. Sin embargo, en los lagos, lagunas, ríos, etc., cercanos a zonas altamente urbanizadas o industrializadas se produce frecuentemente una disminución de la concentración de oxígeno disuelto, debido a la considerable contaminación de sus aguas. La causa principal de la desoxigenación del agua puede atribuirse a la presencia de sustancias que, en conjunto, se denominan "residuos con requerimiento de oxígeno". Se trata de compuestos que se degradan o se descomponen fácilmente debido a la actividad bacteriana aeróbica. Estas bacterias los utilizan como alimento, originando una caída de la concentración de oxígeno disuelto como consecuencia de su propia respiración.

25 El ensayo que se ha utilizado tradicionalmente para evaluar en qué medida se degrada la materia orgánica presente en las aguas es el de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en cinco días (DBO<sub>5</sub>). Dicho método resulta lento puesto que se realiza en el laboratorio y requiere 5 días para la obtención de los resultados.

30 Una alternativa desarrollada recientemente ha sido la utilización de sensores químicos sobre fibra óptica (conocidos generalmente como FOCS), que permiten realizar mediciones más rápidas de la DBO. Los FOCS conocidos se basan generalmente en mediciones de luminiscencia. En términos generales, para hacerlos funcionar, se lanza primeramente radiación de una fuente de luz por un selector de longitud de onda. La radiación es transportada por una fibra óptica a la capa reactiva. La capa reactiva está formada por un polímero dopado con un indicador químico apropiado, de forma que una propiedad óptica del indicador experimenta un cambio medible al producirse una interacción selectiva con la sustancia que se quiere detectar.

35 La capa reactiva modifica la luz incidente y la radiación modificada se envía por fibra óptica a un fotodetector. La señal obtenida es amplificada, analizada y comparada con la luz inicialmente emitida. Las diferencias entre ambas permiten deducir las concentraciones del analito que se pretende estudiar.

40 Otra alternativa, que puede verse como caso particular de los FOCS, son los biosensores. En el caso de un biosensor, la capa reactiva se cubre con una segunda capa que contiene una biomolécula o masa biológica (por ejemplo un enzima, anticuerpo, bacterias o células) capaz de reconocer específicamente la sustancia de interés. Como resultado de la interacción entre la capa biológica y la sustancia que se estudia, se produce una reacción que es detectada por un elemento sensible que contiene el indicador químico.

45 La obtención de resultados fiables depende en buena medida del diseño del biosensor y sus componentes, además del método de fabricación del mismo.

50 En Wolfbeis, O.S. *et al.*, *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 1841-1846 se describe un biosensor para la medición de DBO en aguas residuales que comprende a) una capa sensible al oxígeno la cual comprende perclorato de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) inmovilizado sobre poliéster; b) una capa biológica que comprende *Trichosporon cutaneum* inmovilizado sobre poli(alcohol vinílico); y c) una tercera capa de policarbonato para retener las células bacterianas. Los tiempos de respuesta obtenidos con dicho dispositivo sensor varían entre los 5 y los 10 minutos con un intervalo dinámico de DBO comprendido entre 0 y 110 mg/L.

55 En Orellana, G.; Moreno-Bondi, M.C. *et al.* *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 5150-5156 se describe una capa fotosensible de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) inmovilizado en silicona recubierta por una capa de un copolímero a base de metacrilato de dodecilo y un monómero acrílico que contiene fosforilcolina, la cual reduce la adhesión de bacterias marinas y trombocitos sobre la superficie de dicha capa fotosensible.

60 Como se deduce del estado de la técnica, en el desarrollo de un biosensor para la medición de la DBO hay que tener en cuenta diversas variables como, por ejemplo, la especie fotosensora, la matriz sobre la cual se va a inmovilizar y la forma de inmovilización, así como la naturaleza de la biomasa, siendo de una enorme relevancia el diseño y disposición de los diferentes elementos que componen el dispositivo de medida. Variaciones en cualquiera de dichas variables pueden conducir a una mejora o una merma en el funcionamiento del FOCS.

65 Es pues objetivo de la presente invención el proporcionar un analizador y un procedimiento de medición de la DBO mejorados, que permita su utilización *in situ* y en continuo en aplicaciones medioambientales e industriales.

## Resumen de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a una celda de medida para medir la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en una sustancia, que comprende un circuito de flujo adaptado para que fluya en él la sustancia, comprendiendo dicho circuito un conjunto de al menos un tipo de bacterias que interacciona con la sustancia disminuyendo la concentración de oxígeno de la sustancia.

Según este primer aspecto de la invención, esta celda está caracterizada porque el circuito comprende una serie de soportes poliméricos colonizados por dichas bacterias, estando adaptado el circuito para que la sustancia entre en contacto de forma necesaria y consecutiva con cada soporte polimérico. Preferentemente, la sustancia pasa a través de cada soporte polimérico colonizado. En general, la sustancia tiene que ser lo suficientemente líquida como para poder fluir a través de la celda, sabiendo que en el ámbito de esta invención, esta sustancia puede ser por ejemplo un agua cargada con restos sólidos, un fango espeso o un producto de un proceso industrial como por ejemplo la fabricación de la cerveza.

Preferentemente, las bacterias que se emplean para colonizar dicho soporte polimérico son:

- o del tipo *Pseudomonas putida* o
- o bacterias presentes en la sustancia a analizar o
- o combinaciones entre bacterias del tipo *Pseudomonas putida* y bacterias presentes en la sustancia a analizar.

Ventajosamente, una celda según la invención está dividida pues en unidades discretas de reacción (una unidad por cada soporte polimérico). Cada unidad discreta de reacción es preferentemente el espacio que ocupa cada soporte polimérico colonizado por bacterias al que se le puede añadir, dependiendo de la realización, su entorno más próximo.

La celda es, excepto la entrada y salida de la sustancia analizada es decir el principio y el final del circuito dentro de la celda, un conjunto estanco sin entrada intermedia de oxígeno o disoluciones. Una celda según la invención ofrece las siguientes ventajas frente a una celda del estado de la técnica anterior (es decir que contenga un biosensor puntual):

- se amplía el intervalo de medida de concentración de materia orgánica degradable. Esto se lleva a cabo gracias a la concatenación de cámaras sucesivas por las que pasa (y se degrada) la muestra secuencialmente, pudiéndose compartimentar la reacción en varios bloques discretos que pueden ser observados individualmente,
- se posibilita el que se pueda adaptar la sensibilidad del analizador en su conjunto a la carga orgánica de la sustancia a través de un programa de ordenador que tiene en cuenta los resultados individuales de las mediciones realizadas en cada una de las cámaras monitorizadas. Esto permite garantizar una elevada precisión tanto a baja como a alta concentración de materia orgánica y ofrece ventajas adicionales relacionadas con el tratamiento de las múltiples mediciones.

Este sistema de medidas realizadas por compartimentos ofrece una gran flexibilidad al analizador, no disponible en equipos basados en un biosensor puntual del estado de la técnica anterior, lo que permite mantener una elevada sensibilidad y garantizar un amplio intervalo de medida de concentración para un analizador que comprenda una celda según la invención.

El motivo por el cual el concepto de compartimentalización implementado mediante este diseño constituye la solución óptima es consecuencia de la propia naturaleza física del medio de reacción, es decir, del soporte polimérico colonizado por bacterias: como este soporte polimérico colonizado es sólido y estático, el conjunto de este soporte con la sustancia que lo atraviesa se aleja completamente del concepto de "mezcla (cuasi) instantánea" que se produce, por ejemplo, en un reactor biológico con agitación, en el que el sustrato y el catalizador biológico se encuentran ambos disueltos o en suspensión en un medio líquido.

Dado que la sustancia realiza un recorrido definido por el circuito de la invención atravesando secciones de soporte polimérico colonizado (también denominado membrana colonizada) por bacterias inmovilizadas, para una misma muestra, y en condiciones de flujo a caudal constante, la degradación de la muestra se produce secuencialmente y por tramos, de forma relacionada con la posición de la disolución en un momento dado a lo largo del circuito, también llamado camino de reacción. Se facilita al mismo tiempo, en el conjunto del circuito, una elevada superficie total de reacción.

De este modo cuando es preciso medir una muestra con muy baja carga orgánica, la elevada superficie de soporte polimérico (total de todos ellos) permite una medición realizada por el conjunto de la celda, proporcionando una elevada sensibilidad. Sin cambiar de configuración, cuando se introduce una muestra con elevada carga orgánica, la medida de lo sucedido en la primera cámara de reacción permite la realización de una medida analíticamente útil dentro del intervalo lineal de medida de oxígeno disuelto, y antes de que se produzca la desoxigenación completa de la muestra, debido al exceso de sustrato orgánico, que sería la consecuencia inevitable en caso de emplear un equipo basado en una única gran membrana con sensor en el camino de reacción.

## ES 2 331 767 A1

Como resulta evidente, el aunar ambas características - alta sensibilidad y capacidad de tratar muestras con bajo y alto contenido orgánico - es una ventaja de una celda conforme a la presente invención. Una celda de estas características permite construir un analizador útil para la medida automática, desatendida (por ejemplo *in-situ*) y en continuo de la DBO.

Según una realización, el circuito comprende unas cámaras, unidas entre sí por unos conductos, estando cada soporte polimérico situado en una cámara. Los conductos pueden ser preferiblemente cilíndricos y las cámaras pueden ser preferiblemente ovaladas. Los soportes poliméricos están alojados en las cámaras.

En una realización, el circuito comprende al menos dos capas sensibles al oxígeno, estando superpuestas al menos la primera de estas capas sobre el primer soporte polimérico de la serie y la segunda de estas capas sobre el último soporte polimérico de la serie. Gracias a estas capas sensibles al oxígeno, se obtiene una indicación del oxígeno presente en los soportes poliméricos que contienen las bacterias inmovilizadas, sobre los cuales están dispuestas las capas sensibles al oxígeno.

Según una realización, cada capa sensible al oxígeno comprende un indicador que tiene alguna característica óptica que varía en función de la concentración del oxígeno, preferentemente la luminiscencia del indicador. Por ejemplo, el indicador puede ser una sal de tris(4,7-difenil-1,10-fenantroлина)rutenio(II) o una sal de tris [4,7-di(4-bifenilil)-1,10-fenantroлина]rutenio(II) o una combinación entre ambas sales. La característica óptica es en estos casos la luminiscencia.

Preferentemente, cada capa sensible al oxígeno es a su vez un conjunto de subcapas, que comprende otro soporte polimérico de silicona y un indicador, en donde dicho soporte polimérico a base de silicona comprende (i) una primera subcapa de silicona que comprende sílice amorfa, y (ii) una segunda subcapa de una silicona que recubre a dicha primera subcapa.

En una realización, la celda de medida tiene al menos dos cavidades, estando sellado el fondo de cada cavidad por un elemento de estanqueidad, estando adaptadas las cavidades para poder alojar cada una de ellas por lo menos una extremidad de una fibra óptica para poder recoger a través del elemento de estanqueidad respectivo las variaciones de la característica óptica del indicador de la capa sensible al oxígeno respectiva. Preferentemente, el elemento de estanqueidad entre cada unidad discreta de reacción y la extremidad de la fibra óptica correspondiente es una capa (por ejemplo de plástico) transparente o translúcida por lo menos para las longitudes de onda de las radiaciones que van a atravesar dicha capa y que son de interés para la medición de la DBO, tapando dicha capa transparente o translúcida la cavidad.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un analizador para medir la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia que comprende un circuito de flujo adaptado para que fluya en él la sustancia, comprendiendo dicho circuito un conjunto de al menos un tipo de bacterias que interacciona con la materia orgánica presente en la sustancia disminuyendo la concentración de oxígeno en la sustancia.

Según este segundo aspecto de la invención, este analizador está caracterizado porque el circuito comprende una serie de soportes poliméricos colonizados por dichas bacterias, estando adaptado el circuito para que la sustancia entre en contacto de forma necesaria y consecutiva con cada soporte polimérico. Preferentemente, la sustancia pasa a través de cada soporte polimérico colonizado.

Se puede obtener, gracias a un analizador conforme a esta invención, un instrumento para medir de forma automática e *in-situ* la demanda bioquímica de oxígeno. Esta medida puede ser una estimación para prever lo que sería la medida de la DBO5 de la misma sustancia. La realización de estas mediciones se puede hacer en continuo con una mayor sensibilidad y vida media.

Según una realización, el analizador comprende una celda de medida según una de las realizaciones del primer aspecto de la invención. En esta realización, cuando la celda de medida tiene capas sensibles al oxígeno que comprenden un indicador que posee alguna característica óptica que varía en función de la concentración del oxígeno, el analizador puede comprender medios de detección para detectar la señal óptica proveniente de cada capa sensible al oxígeno cuando las capas sensibles al oxígeno están iluminadas por una fuente de luz. La fuente de luz puede estar comprendida en el analizador y puede estar acoplada a un selector de longitud de onda. La fuente de luz y/o los medios de detección pueden comprender fibra óptica para respectivamente llevar luz a cada elemento y/o recoger la señal óptica proveniente de cada capa sensible al oxígeno.

Según una realización, el analizador comprende medios de tratamiento de la señal para transformar la información obtenida por los medios de detección cuando estos últimos detectan la señal óptica proveniente de cada elemento, en información que pueda ser tratada por medios de procesamiento.

En una realización, el analizador comprende medios hidráulicos para gestionar el flujo de la sustancia dentro del circuito.

Según una realización, los medios hidráulicos están diseñados para gestionar el flujo de una disolución patrón dentro del circuito. Preferentemente, esta disolución patrón está formada por glucosa y ácido glutámico en agua.

## ES 2 331 767 A1

En una realización, los medios hidráulicos están diseñados para gestionar el flujo de una disolución reguladora de pH dentro del circuito.

5 Un tercer aspecto de la invención concierne un procedimiento para medir en continuo la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia.

Este procedimiento de la invención está caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 10 a) hacer fluir a través de un circuito de un analizador según alguna de las realizaciones precedentes, al menos una disolución reguladora para regular el pH, determinando la concentración de oxígeno, en la proximidad de al menos el primero y último soporte polimérico colonizado, llamados soportes poliméricos observados, concentración llamada ODR<sub>n</sub> siendo n la posición del soporte polimérico en el circuito;
- 15 b) hacer fluir a través del circuito al menos una disolución patrón de DBO, determinando la concentración de oxígeno en la proximidad de cada soporte polimérico observado, concentración llamada ODP<sub>n</sub>;
- c) hacer fluir a través del circuito al menos la disolución reguladora hasta recuperar las concentraciones ODR<sub>n</sub>;
- 20 d) hacer fluir a través del circuito al menos la sustancia, determinando la concentración de oxígeno en la proximidad de cada soporte polimérico observado, concentración llamada ODM<sub>n</sub>;
- e) hacer fluir a través del circuito al menos la disolución reguladora hasta alcanzar de nuevo las concentraciones ODR<sub>n</sub>;
- 25 f) determinar para cada soporte polimérico el consumo de oxígeno de la sustancia y de la disolución patrón, respectivamente, calculando las diferencias entre ODM<sub>n</sub> y ODR<sub>n</sub> por un lado y entre ODP<sub>n</sub> y ODR<sub>n</sub> por el otro lado;
- 30 g) determinar la demanda bioquímica de oxígeno de la sustancia realizando una media de los valores unitarios de demanda bioquímica de oxígeno calculados para cada uno de los soportes poliméricos observados obtenidos comparando, para cada soporte polimérico, los consumos de oxígeno de la sustancia y de la disolución patrón obtenidos en f) con valores de calibración previamente obtenidos.

35 La media de la etapa f) puede ser ponderada. Preferentemente, la disolución reguladora está formada por sustancias orgánicas y/o inorgánicas que tengan capacidad de regular el pH en el intervalo de 5,5 a 9,5, preferentemente disueltas en una concentración que proporcione una fuerza iónica equivalente o inferior al 2% de cloruro sódico.

40 Preferentemente, la disolución reguladora está diluida en agua en las etapas a), c) y e), la disolución patrón está diluida en disolución reguladora en la etapa b) y la sustancia está diluida en disolución reguladora en la etapa d).

45 Por ejemplo, se puede preparar la disolución reguladora ajustando sensiblemente a pH=6.8 una disolución de fosfato sódico 0,01 M, disolución que contiene una cantidad aproximada de N-aliltiurea de 1 mg L<sup>-1</sup>, que permite controlar el crecimiento no deseado de bacterias y evitar interferencias en la medida debidas a la acción de bacterias nitrificantes.

Preferentemente, la solución patrón está formada por una o varias sustancias disueltas en un medio acuoso que proporcionan un valor de DBO conocido y estable en el tiempo bajo las diversas condiciones de trabajo.

50 Gracias a este aspecto de la invención, se obtiene un procedimiento para medir de forma automática e *in-situ*, la DBO en una sustancia o muestra que contiene, o es sospechosa de contener, materia orgánica, preferentemente en un analizador según una de las realizaciones del primer aspecto de la invención.

55 En una de las realizaciones de la invención, se repiten las etapas a) a e) alternando la introducción en el circuito de la sustancia cuya DBO se quiere medir, pudiéndose repetir varias veces en un mismo ciclo (conjunto de etapas a) a e)) las etapas c) a e). Ventajosamente, gracias a esta realización, se obtiene una medición más precisa de la DBO.

60 Según una realización de la invención, la media calculada en la etapa g) es ponderada, siendo el peso: (i) mayor para los valores calculados en los últimos soportes poliméricos observados del circuito si la sustancia tiene una DBO inferior a la DBO de la disolución patrón, y (ii) menor para los valores calculados en los últimos soportes poliméricos observados del circuito si la sustancia tiene una DBO superior a la DBO de la disolución patrón.

65 Ventajosamente, la ponderación de los valores calculados, permite ampliar enormemente el intervalo de medida del sistema, además de aportar una mayor fiabilidad a los resultados obtenidos.

Un cuarto aspecto de la invención concierne un programa de ordenador, caracterizado porque comprende medios de código de programa para efectuar un procedimiento para medir en continuo la demanda bioquímica de oxígeno

## ES 2 331 767 A1

en una sustancia según una realización del tercer aspecto de la invención, cuando dicho programa funciona en un ordenador.

En una realización, el programa de ordenador está copiado en un medio legible por un ordenador.

Un quinto aspecto de la invención concierne un soporte legible por un ordenador, caracterizado porque contiene un programa de ordenador que comprende medios de código de programa para efectuar un procedimiento para medir en continuo la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia según una realización del tercer aspecto de la invención, cuando dicho programa funciona en un ordenador.

### Breve descripción de las figuras

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo de realización preferente y práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1.- Muestra esquemáticamente tres vistas de una celda de medida de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 2a.- Muestra una representación esquemática de un detalle de una celda de medida de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 2b.- Muestra una representación esquemática de un circuito de una celda de medida de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 3.- Muestra una representación esquemática de bloques de un analizador de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las figuras 4a y 4b.- Muestran unos resultados obtenidos siguiendo un procedimiento conforme a la invención.

### Descripción detallada de la invención

Un analizador según la invención comprende en una realización una celda de medida conforme a la invención, también llamada celda de flujo, en la cual está formado un circuito adaptado para que fluya en él la sustancia cuya DBO se quiere medir.

La figura 1 muestra esquemáticamente tres vistas de una celda de medida de acuerdo con una realización de la presente invención.

La celda de medida 100 es sustancialmente, en una realización, un paralelepípedo rectangular que puede tener en un ejemplo las siguientes dimensiones: 60 mm de largo, 40 mm de ancho y 22 mm de alto.

Preferentemente, la celda está formada en un material que tenga una buena conductividad térmica (sobre todo en caso en el que la celda esté en un ambiente cuya temperatura es controlada y mantenida constante para particularmente salvaguardar la biomasa presente en dicha celda) a fin de favorecer su termostatación, que sea inoxidable y que sea mecanizable. Este material puede ser duraluminio o acero inoxidable.

Para formar el circuito por el cual fluyen las diferentes diluciones, se puede horadar unas cámaras ovaladas 102, 104, 106 y 108 en una cara ancha (la denominada superior) del paralelepípedo rectangular.

Para poner en relación estas cámaras, es posible taladrar a lo largo de la anchura del paralelepípedo rectangular unos conductos desde los lados haciendo 8 taladros roscados 110, que pueden tener como talla M15 x 1,5 mm ¼" x 28 hilos por pulgada (cada cámara teniendo un conducto de entrada y un conducto de salida, siendo los pares de conductos de entrada y salida respectivos de cada cámara paralelos). Las cámaras ovaladas están destinadas a alojar soportes poliméricos colonizados, unidos entre sí por los conductos cilíndricos de diámetro comprendido preferentemente entre 1.0 y 1.5 mm.

Para relacionar los diferentes conductos, se pueden utilizar unos tornillos rosca de ¼ de pulgada y 28 hilos por pulgada de tipo FIA (del inglés "Flow Injection Analysis") para contener tubos de teflón (politetrafluoroetileno).

Algunos de estos soportes poliméricos son denominados "observados", al poder observarse la concentración de oxígeno de la materia que los atraviese. Las cámaras que comprenden los soportes poliméricos observados son también llamadas cámaras observadas.

## ES 2 331 767 A1

Las cámaras que no son observadas son recubiertas de un tapón preferentemente macizo y opaco, por ejemplo de PVC (policloruro de vinilo) o aluminio, y roscados. Las cámaras observadas son recubiertas de un elemento de estanquidad preferentemente al menos parcialmente transparente como se puede observar en la figura 2a, que muestra esquemáticamente una cámara 200, es decir, una unidad de reacción, observada.

5

Por esa cámara 200, pueden circular flujos entrantes 208 de sustancias cuya DBO se quiere conocer, de disoluciones reguladoras o de disoluciones patrón. Estos flujos entrantes pasan por el interior de un soporte polimérico 212 para interactuar con una biomasa, que comprende bacterias, contenida en el soporte polimérico 212.

10

En una realización, estas bacterias son del tipo *Pseudomonas putida*. El cultivo de *Pseudomonas putida* se puede realizar a partir de un cultivo liofilizado de dicho microorganismo que se cultiva con agitación en un medio de cultivo líquido, en presencia del soporte a colonizar. Posteriormente se puede aumentar el nivel de colonización introduciendo dicho soporte polimérico que comprende el cultivo de *Pseudomonas putida* en una celda de flujo del equipo de medida (ver más abajo descripción del dispositivo de medida) y recirculando la disolución de nutriente a través del mismo.

15

Las referidas bacterias se puede obtener de forma comercial como liofilizado de la cepa de referencia de *Pseudomonas putida* (código CECT 324 de la Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia), o de otras colecciones como la ATCC (“American Type Culture Collection”, ATCC 12633; ATCC 23467, etc. ...).

20

Alternativamente, es posible realizar un cultivo mixto no caracterizado a partir de las bacterias existentes en las muestras que se desean medir. Por ejemplo, si se desea medir la DBO de un agua residual, es posible extraer de una muestra de dicho agua y obtener de la misma un cultivo de bacterias que posteriormente se utiliza como biomasa bacteriana para colonizar el soporte polimérico.

25

Dicho soporte polimérico de la biomasa bacteriana debe ser permeable a la disolución que se desea medir. Algunos soportes poliméricos útiles son entre otros: alcohol polivinílico (PVA), resinas autocurables, acetilcelulosa, policarbonato, gel de agarosa, alginato cálcico y el teflón. (K. Riedel, “Application of Biosensors to Environmental Samples” en *Commercial Biosensors: Applications to Clinical, Bioprocess and Environmental Samples*, G. Ramsay (ed.), Wiley, Nueva York (EE.UU.), 1998).

30

En alguna realización, dicho primer soporte, comprende un caucho de silicona, los cuales son comercialmente accesibles (por ejemplo, ImmobaSil®).

35

En alguna realización, se obtiene un soporte polimérico partiendo de una alícuota de un cultivo congelado, o de una colonia aislada en medio sólido, de *Pseudomonas putida*: se prepara un cultivo de esta bacteria, en condiciones de esterilidad, en un recipiente con 30 mL de medio líquido Y-1375 (Sigma) y con agitación, en presencia de varias unidades de soporte polimérico (por ejemplo ImmobaSil® de Ashby Scientific Ltd) durante 24 h a 28°C. Una vez alcanzado el nivel deseado, se aumenta el nivel de colonización introduciendo el soporte en una celda de flujo y circulando disolución de nutriente a través de ella.

40

Sobre el soporte polimérico 212, está dispuesta en contacto íntimo una capa sensible al oxígeno 204.

Estas capas sensibles al oxígeno comprenden un segundo soporte polimérico de silicona y un indicador, en donde:

45

a) dicho soporte polimérico a base de silicona comprende (i) una primera subcapa de silicona que comprende sílice amorfa, y (ii) una segunda subcapa de una silicona que recubre a dicha primera capa; y

b) dicho indicador es un complejo de Ru(II) que se selecciona entre las sales de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), de tris[4,7-di(4-bifenilil)-1,10-fenantrolina]rutenio(II) y combinaciones de las mismas.

50

La primera subcapa puede ser de silicona (por ejemplo Dow Corning 3140) comercial, modificada con sílice amorfa Sigma. La composición general de estas siliconas es poli(dimetilsiloxano) y sílice amorfa. La segunda subcapa de silicona también puede ser accesible comercialmente (por ejemplo, Dow Corning Gris 7091) y su función es proteger la primera capa de silicona. Para introducir el indicador, se puede emplear el método descrito por J. Delgado, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2000.

55

Las especies de coordinación del rutenio(II) y otros metales de transición son colorantes luminiscentes que pueden utilizarse como indicadores de nivel de oxígeno. Las propiedades espectroscópicas (energía de absorción y emisión, cinética de emisión) y redox de dichas especies se pueden ajustar a las necesidades concretas de cada caso mediante la modificación de sus ligandos. Para cada caso concreto, se encuentra un indicador que tenga una sensibilidad adecuada al analito estudiado. Los indicadores también deben presentar una fuerte absorción de la longitud de onda deseada, un desplazamiento de Stokes suficientemente amplio y una vida media del estado excitado que permita la obtención de medidas fiables.

60

Para obtener una capa sensible a oxígeno, se puede por ejemplo preparar el tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) siguiendo el método descrito por G. Orellana, C. Álvarez-Ibarra y M. L. Quiroga, Bull. Soc. Chim. Belg. 1988, 97, 731-741. El tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) preparado anteriormente se inmoviliza sobre una

65

## ES 2 331 767 A1

lámina de silicona comercial (Dow Corning 3140) siguiendo el procedimiento descrito por J. Delgado, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2000.

5 En alguna realización, dicho indicador comprende una sal de tris[4,7-di(4-bifenilil)-1,10-fenantrolina]rutenio(II), sintetizada por ejemplo según el método descrito por J. Delgado, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2000.

10 También es posible en alguna realización utilizar combinaciones de sales de tris(4,7- difenil-1,10-fenantrolina) rutenio(II) y de tris[4,7-di(4-bifenilil)-1,10-fenantrolina]rutenio(II).

15 La unidad de reacción o cámara de medida se sella (asegurando su estanqueidad) empleando un elemento de estanqueidad que incluye un espaciador 206, ópticamente transparente (por ejemplo fabricado en cuarzo, vidrio, plástico, poli(metacrilato de metilo) o poliéster) y una junta tórica 216. Así, el volumen muerto de la cámara de medida es nulo y las disoluciones de sustancia 208 cuya DBO se quiere medir difunden a través de la membrana 212 facilitando la interacción entre las sustancias 208 y la biomasa de la membrana 212.

20 Una extremidad 214 de una fibra óptica está montada pasante en una cavidad 215 de la parte superior de la celda 200 para llegar hasta el espaciador óptico 206 y así poder a la vez aportar la luz necesaria y observar la unidad de reacción al recoger la luminiscencia de la capa sensible al oxígeno.

25 La figura 2b muestra una realización de una celda de medida 202 para ser incluida en un analizador conforme a la invención (que puede ser también llamado sistema de monitorización de la respiración aerobia bacteriana). La celda de medida 202 comprende 4 cámaras 200, 220, 222 y 224.

30 Unos soportes poliméricos 212 de silicona biocompatible, llamados también membranas o biomembranas, que contienen los microorganismos inmovilizados, están colocados en cada una de las 4 cámaras 200, 220, 222 y 224.

35 Así, esta celda de medida comprende en su interior un conjunto de soportes poliméricos, dispuestos en línea, colonizados con una biomasa bacteriana descritos anteriormente en la descripción de la figura 1.

40 Las cámaras 200 y 224 cooperan con una extremidad de una fibra óptica y sobre sus soportes poliméricos 212, están dispuestas en contacto íntimo capas sensibles al oxígeno 204 que han sido descritas previamente.

45 El diseño de la celda de flujo es tal que el caudal íntegro de lo que fluye a través de la misma atraviesa necesariamente y de forma consecutiva cada uno de los soportes poliméricos colonizados, una vez estos se incorporan en las cámaras ovaladas de la celda. De esta forma, cuando la disolución sale de una cámara lleva una concentración de oxígeno disuelto menor o igual que la concentración que contenía a la entrada del mismo. Cada cámara forma una unidad de reacción.

50 En cada cámara, es alojado un polímero colonizado con una biomasa bacteriana (del tipo ya descrito para la figura 1), colocándose una capa sensible a oxígeno en la primera y en el última cámara de la serie (siendo estas las cámaras observadas).

55 Un dispositivo o analizador para medir la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia o muestra comprende en una realización un equipo multicanal de medida de luminiscencia con detección sensible a la fase

Este equipo multicanal comprende:

- 60 (i) una fuente de luz, acoplada a un selector de longitud de onda,
- 50 (ii) medios conectores, los cuales comprenden fibra óptica, entre el selector de longitud de onda y las capas reactivas sensibles a oxígeno.
- 55 (iii) un detector fotónico, acoplado a un selector de longitud de onda, para detectar la señal óptica procedente las capas reactivas sensibles a oxígeno y los cambios en la misma debidos a la respiración de las colonias bacterianas y
- (iv) un equipo electrónico para convertir la señal óptica en una señal eléctrica y procesarla hasta obtener una señal analíticamente útil.

60 El equipo de medida de la luminiscencia con detección sensible a la fase, para determinar la concentración de oxígeno interrogando los polímeros sensibles a O<sub>2</sub>, está compuesto preferentemente por tres bloques fundamentales. Dichos bloques son los siguientes:

- 65 - A. Sistema de generación de la señal de excitación.
- B. Sistema de recepción de la señal de emisión.
- C. Componentes ópticos.

## ES 2 331 767 A1

### A. Sistema de generación de la señal de excitación

El sistema que permite la generación de la señal que alimenta la fuente de luz que ilumina la capa sensible a oxígeno está formado por dos partes fundamentales:

- 5 - Parte digital. El componente principal es un oscilador digital que se encarga de generar la señal sinusoidal sintética que modula la intensidad de luz de la fuente de excitación. La frecuencia de esta señal es seleccionable entre 20 y 140 KHz;
- 10 - Parte analógica. Se encarga de adaptar los niveles de señal generados en la etapa digital para adecuarlos a la señal necesaria para alimentar la fuente de excitación. Como fuente de luz se emplea un diodo emisor de luz azul de alta intensidad el cuál se modula dentro de los límites de respuesta lineal del diodo.

15 Ambas partes están conectadas por un convertidor analógico digital (A/D) que permite generar la senoide analógica a partir de la función sintética que proporciona el oscilador digital.

### B. Sistema de recepción de la señal

Al igual que el sistema de generación, el bloque de recepción de la señal está compuesto por dos partes:

- 20 - Parte analógica. Los componentes incluidos en esta parte se encargan de la detección de la luminiscencia que proviene del terminal sensible a través de la fibra óptica, empleando para ello un módulo fotosensor Hamamatsu (H6780) que incorpora un tubo fotomultiplicador miniaturizado. Asimismo, se encarga de realizar un primer filtrado de esta señal para la reducción del ruido. Para ello dispone de un bloque de adaptación de la señal y un bloque de cuatro filtros electrónicos de paso-banda;
- 25 - Parte digital. Tras el sistema analógico se encuentra un convertidor analógico/digital que permite digitalizar la señal para su posterior tratamiento. A continuación existe un integrador de señal que se encarga de llevar a cabo un primer procesado de la misma, realizando  $n$  promedios entre la señal recibida y las señales acumuladas anteriormente, lo que permite disminuir enormemente el ruido. Las muestras tomadas se procesan posteriormente utilizando un acumulador diezmador que permite reducir aún más el ruido.
- 30

El objetivo de este sistema es, junto con la adquisición de la señal emitida por el indicador luminiscente, obtener el desfase de la misma con respecto a la señal modulada de excitación. El modo más sencillo de obtener este desfase es realizando una desmodulación síncrona de la señal recibida (emisión) respecto a la señal original. La señal sinusoidal generada (excitación) se convierte en una función coseno (excitación +  $90^\circ$ ), para obtener la tangente del desfase entre ésta y la señal recibida (emisión) mediante el cociente de ambas funciones. Debido a los retardos acumulativos que producen en la señal original los dispositivos contenidos en el circuito electrónico, la señal que incide sobre el compuesto luminiscente difiere, en cierto desfase, de la señal a la salida del convertidor digital/analógico que alimenta al diodo emisor. Igualmente, la senoide que llega a la parte digital del sistema de recepción de señal sufre cierto retardo o desfase con respecto a la luminiscencia detectada por el tubo fotomultiplicador. Si se toma la señal sintetizada originalmente para actuar como referencia, el desfase que se obtiene como resultado de la desmodulación de la emisión que proviene del indicador de oxígeno tendrá una contribución proveniente de los circuitos analógicos de adaptación de la señal.

45 Para evitar o minimizar esta contribución, el sistema dispone de un fotodiodo situado directamente a la salida del LED de excitación, que recibe la luz emitida por éste y cuya respuesta se utiliza como señal de referencia. Esta señal sufrirá los mismos retardos acumulativos originados por los componentes electrónicos que la señal que incide en el terminal sensible. De este modo, quedan eliminadas en el proceso de desmodulación todas las contribuciones al desfase total producidas por los componentes electrónicos a excepción de la que provoca el tubo fotomultiplicador, que queda excluido del recorrido que realiza la señal de referencia o calibración.

### C. Componentes ópticos

55 En la salida del LED de excitación e inmediatamente antes de la fibra óptica el sistema dispone de un filtro óptico, que puede ser un filtro de banda ancha (típicamente centrado a 400 nm) o un filtro interferencial centrado a 400 ó 420 nm. Asimismo, en la entrada del fotomultiplicador se encuentra un filtro de corte que, dependiendo del filtro utilizado en la excitación, tiene una longitud de onda de corte de 570, 590 ó 630 nm.

60 El sistema dispone de una fibra óptica de haz bifurcado que conecta la radiación luminosa de excitación con la capa sensible a oxígeno y éste con el sistema de detección.

Un analizador comprende también en una realización un equipo para gestionar la alimentación de toda la instrumentación, las interfaces eléctricas de la misma y la activación de los dispositivos eléctricos del bloque hidráulico.

65 El analizador comprende también en una realización un bloque hidráulico que comprende medios de recolección y adaptación de una muestra, un sistema de autocalibración y un sistema de desinfección.

## ES 2 331 767 A1

Además, en una realización, el analizador comprende medios de procesamiento y de memorización para memorizar y poner en práctica un programa de ordenador conforme a la invención. Este programa gestiona automáticamente un analizador conforme a la invención (lo que asegura su autonomía) según un procedimiento conforme a la invención. Preferentemente, este programa puede calcular resultados, memorizarlos y visualizarlos de forma numérica o gráfica.

En términos generales, la fuente de luz emite una radiación luminosa que incluye distintas longitudes de onda. El selector de longitud de onda al que está acoplado está diseñado de forma que elige la longitud de onda adecuada para la excitación del indicador de oxígeno. Dicha luz se transporta por los medios conectores a través de la fibra óptica hasta la capa reactiva sensible a oxígeno. Dentro de la celda de medida y, como consecuencia de los cambios en la respiración de la biomasa bacteriana, los estados excitados del indicador de oxígeno se ven modificados en su cinética de emisión de luz. En consecuencia, la luz que devuelve la capa reactiva sensible al oxígeno se modifica.

Dicha luz modificada se recoge en un detector fotónico y se transforma en una señal eléctrica, la cual se procesa para obtener una señal analíticamente útil.

En una realización, la celda de flujo se sitúa dentro de un bloque hidráulico. El bloque hidráulico comprende (i) medios de recolección y adaptación de una muestra, (ii) un sistema de autocalibración y (iii) un sistema de desinfección.

Los medios de recolección y adaptación de la muestra comprenden una serie de tubos que conducen la muestra hasta un depósito e impiden que éste se vacíe una vez cortado el caudal de muestra. También incluyen medios de regulación de la temperatura que permiten adecuar la temperatura de la muestra a la temperatura de la disolución patrón y de la disolución reguladora (ver más abajo). Además, comprende un aireador que permite saturar de aire la muestra y, por último, comprende un conjunto de tubos, bombas peristálticas y electroválvulas, que permiten modificar la muestra por dilución para llevarla en las condiciones óptimas de medida hasta la celda de medida.

El sistema de autocalibración comprende una serie de tubos, bombas peristálticas y electroválvulas.

El sistema de desinfección comprende una lámpara de emisión UV que ilumina la disolución patrón y otra que ilumina el interior de la instrumentación.

El bloque hidráulico 300 está representado esquemáticamente en la figura 3 que muestra un esquema de funcionamiento de un analizador conforme a una realización de la invención. Este bloque hidráulico está dividido en tres partes: una parte 302 de toma de muestra, una parte 304 de transporte y de dilución de muestra y una parte 306 de medida de la muestra, que incluye la propia celda de medida 330, cuya temperatura está controlada por un termostato, donde se lleva a cabo la determinación de la DBO.

A continuación se detalla un procedimiento conforme a una realización de la invención, utilizando para ello una realización de analizador conforme a las figuras, 1, 2 y 3.

La determinación de la DBO de la sustancia 310 se lleva a cabo siguiendo las etapas descritas a continuación.

En la parte 302 de toma de muestra del analizador 300, llega un flujo 310 de la sustancia cuya DBO se quiere medir, llamada muestra, procedente de un sistema de bombeo. Este sistema de bombeo puede pertenecer al equipo de medida (bomba de achique o bomba peristáltica) como en la figura 3 o ser un sistema de bombeo independiente que coopere con una electroválvula.

La muestra 310 se canaliza y almacena en un recipiente 314 adecuado (como por ejemplo un recipiente de acero inoxidable, PVC o Teflón) donde se oxigena mediante una corriente de aire proveniente, por ejemplo, de un compresor 312 de aire de caudal máximo  $2,7 \text{ L min}^{-1}$ .

El bloque hidráulico 300 comprende también en esta realización una parte 304 de transporte y de dilución de muestra que sirve para, controlando el caudal global para que quede sensiblemente constante en la celda de medida 330, dirigir a dicha celda de medida 330, según una secuencia preestablecida, la muestra preferentemente diluida en disolución reguladora, la disolución reguladora que puede ser diluida en agua o la disolución patrón que puede ser diluida en disolución reguladora, tal como se describe a continuación.

Las diferentes disoluciones son transportadas mediante la bomba 316 (como por ejemplo la bomba peristáltica que vende la empresa Ismatec S.A., Glattbrugg-Zürich, Suiza) desde el recipiente 314 hasta la celda de medida 330 en la parte 306 de medida de la muestra 310.

La selección de las disoluciones patrón, reguladora y muestra para su bombeo hasta la celda de medida se lleva cabo activado/desactivando las electroválvulas 318 y 320 (como por ejemplo las electroválvulas que vende la empresa NResearch Inc., West Caldwell, New Jersey, USA).

Con las electroválvulas 318 y 320 desactivadas, se permite el paso únicamente de la disolución reguladora 326 mezclada con agua 324. Activando únicamente la electroválvula 320 se permite el paso del patrón 322, añadiendo disolución 1 reguladora 326, a la celda de medida 330 y activando únicamente la electroválvula 318 se permite el

## ES 2 331 767 A1

paso de la muestra a la celda de medida 330, añadiendo disolución reguladora 326 si es necesario. El hecho de añadir disolución reguladora a la muestra y a la disolución patrón permite en otras cosas controlar el caudal que llega a la celda de medida 330.

5 Para llevar a cabo una medida rutinaria de la DBO en una muestra de agua superficial (río, lago, etc), en una realización, se hace pasar por la celda de medida durante 45 min la disolución reguladora 310 a un caudal entre 0.20 y 0.64 mL min<sup>-1</sup> que depende del factor de dilución definido por los caudales del sistema de bombeo. Pasado ese tiempo, se activa la electroválvula 320 y durante 20 minutos el patrón 322 circula a través de la celda de medida 330 a ese mismo caudal.

10 De nuevo, se hace pasar por la celda de medida durante 45 min la disolución reguladora 310 y finalmente se hace pasar por la celda de medida durante 20 minutos la muestra 310. El cálculo de la DBO se realiza por medio de un programa informático que además gestiona automáticamente todo lo referente a la gestión de los flujos que circulan por la celda de medida 330.

15 De la celda de medida 330, pueden salir desechos 332.

20 En un ejemplo se describe la utilización de un analizador conforme a la invención para la medida en continuo de la DBO. El analizador se instaló en las inmediaciones de la arqueta de salida de la depuradora de aguas residuales urbanas donde se llevó a cabo la toma de muestra con una bomba de achique.

La determinación de la DBO de la muestra se lleva a cabo siguiendo un protocolo de las siguientes acciones, el conjunto de las cuales se repite en el tiempo:

25 - Entrada de una disolución reguladora (obtenida ajustando a pH 6.8 una disolución fosfato sódico 0.01 M que contiene una cantidad aproximada de N- alitiourea de 1 mg L<sup>-1</sup>) durante un tiempo fijo t1, previamente establecido;

30 - Entrada de disolución patrón de glucosa y ácido glutámico (llamada GGA y que se describe en la norma UNE-EN 1899: Sept. 1998 - *Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno después de n días (DBOn)*) de concentración fijada de 20 mg L<sup>-1</sup> de DBO diluida en la disolución de fosfato sódico durante un tiempo fijo t2, previamente establecido;

35 - Repetición en 4 ocasiones de:

o Entrada de la disolución reguladora durante un tiempo t1;

o Entrada de la disolución de muestra diluida en la disolución de fosfato sódico durante un tiempo t2.

40 Las figuras 4a y 4b dan una muestra gráfica de los resultados obtenidos. La Figura 4a está compuesta por dos gráficos 402 y 404 que muestran la evolución del oxígeno disuelto en mg L<sup>-1</sup> (ordenadas en función del tiempo (hh:mm:ss dd/mm/aa)) en la primera cámara (gráfico 402) y en la última cámara (gráfico 404) del circuito interno de una celda de medida como la descrita en las figuras 1 y 2. El trazado recoge medidas de series consecutivas de 4 muestras y un patrón.

45 La figura 4b es un trazado representativo de la DBO calculada tras el proceso de medida (cálculo correspondiente a la etapa f) de un procedimiento según la invención). El trazado recoge los resultados de series consecutivas de 4 muestras y un patrón.

50 La ausencia de materia orgánica en la disolución reguladora que atraviesa la celda provoca un aumento de la concentración de oxígeno en cada una de las cámaras de la celda de medida, que es cuantificada por los sensores de oxígeno. Por el contrario, cuando hay presencia de materia orgánica en la disolución portadora, ya sea disolución patrón GGA o muestra, en la celda se produce una disminución de la concentración de oxígeno proporcional a la carga orgánica presente en la disolución.

55 Por ejemplo, en la primera cámara (gráfico 402), se observan:

- los mínimos 410 de oxígeno disuelto, correspondientes al paso de la disolución patrón

60 - los mínimos 412 de oxígeno disuelto, correspondientes al paso de la muestra y

- los máximos 414, correspondientes al paso de la disolución reguladora.

65 En la última cámara (gráfico 404), se observa una gráfica similar (mínimos correspondientes al flujo de patrón y muestra y máximos correspondientes al flujo de disolución reguladora) pero con menor oxígeno disuelto globalmente, al haber sido consumida parte de la materia orgánica que atraviesa la celda de medida en las cámaras anteriores. La concentración de oxígeno leída en la última cámara (en esta realización el cuarto) es siempre inferior a la leída en la primera cámara.

## ES 2 331 767 A1

5 Esto último es generalizable a cualquier realización de la invención, ya que al haber una serie de unidades de reacción, el valor de concentración de oxígeno en la proximidad de cada soporte polimérico (preferentemente dentro cada soporte polimérico, ya que es por su interior donde fluyen las disoluciones) es siempre inferior en la siguiente unidad de reacción que en la anterior, siendo dicha diferencia analíticamente distinguible. Esto es lo que aporta que la serie de cámaras produzca un mejor analizador que los existentes en el estado de la técnica anterior.

10 Después de obtenidos estos datos, se procede, según las etapas f) y g) de un procedimiento conforme a la invención, al cálculo de la DBO de la muestra para obtener por ejemplo una gráfica 420 que muestra la evolución en el tiempo de la DBO en  $\text{mg L}^{-1}$ .

15 En una realización, este cálculo es hecho por un programa de ordenador conforme a la invención cargado en medios de procesamiento contenidos en el analizador.

20 Este cálculo comprende las etapas de, primero, determinar para cada soporte polimérico el consumo de oxígeno de la sustancia y de la disolución patrón respectivamente calculando las diferencias entre ODMn y ODRn por un lado y entre ODPn y ODRn por el otro lado; y segundo determinar la demanda bioquímica de oxígeno en la sustancia realizando una media, que en esta realización es ponderada (ver más adelante), de los valores unitarios de demanda bioquímica de oxígeno calculados para cada uno de los soportes poliméricos observados obtenidos comparando para cada soporte polimérico los consumos de oxígeno de la sustancia y de la disolución patrón obtenidos en f) con valores de calibración previamente obtenidos.

25 El consumo de oxígeno de una muestra (o un patrón) se calcula pues en esta realización, para cada una de las cámaras, como la diferencia de la concentración de oxígeno disuelto medida por el sensor óptico en presencia de la muestra ODMn (o el patrón ODPn) y en presencia de disolución reguladora ODRn.

30 El valor de DBO resultante es una media ponderada de los valores calculados para cada una de las cámaras, siendo el peso en dicha ponderación mayor en las últimas cámaras de la celda de flujo para muestras con valores de DBO inferiores a la DBO del patrón y menor en estas últimas cámaras para muestras con valores de DBO superior a la DBO del patrón. Este sistema de empleo de una serie de soportes colonizados y sensores de oxígeno, y de ponderación de los valores calculados, permite ampliar enormemente el intervalo de medida del sistema, además de aportar una mayor fiabilidad a los resultados obtenidos.

35 En este caso el valor de la muestra oscila entre 5 y  $19 \text{ mgL}^{-1}$  de DBO. Se puede observar como, gracias a un analizador conforme a la invención, se puede realizar pues la medición, en continuo, *in-situ* y automática de la DBO.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 331 767 A1

## REIVINDICACIONES

1. Celda de medida (202, 330) para medir la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en una sustancia (310), que comprende
- un circuito de flujo adaptado para que fluya en él la sustancia (310), comprendiendo dicho circuito un conjunto de al menos un tipo de bacterias que interacciona con la sustancia (310) disminuyendo la concentración de oxígeno de la sustancia,
- una serie de soportes poliméricos (212) colonizados por dichas bacterias, estando adaptada la celda para que la sustancia (310) entre en contacto de forma necesaria y consecutiva con cada soporte polimérico (212), y
- unas cámaras (102, 200), unidas entre sí por unos conductos, estando cada soporte polimérico en una cámara (102, 200),
- caracterizada** porque la celda (202) comprende al menos dos capas (204) sensibles al oxígeno, estando superpuestas al menos la primera (204) de estas capas sobre el primer soporte polimérico (212) de la serie y la segunda (204) de estas capas sobre el último soporte polimérico (212) de la serie.
2. Celda de medida según la reivindicación 1, **caracterizada** porque cada capa (204) comprende un indicador que tiene alguna característica óptica que varía en función de la concentración del oxígeno.
3. Celda de medida según la reivindicación precedente, **caracterizada** porque tiene al menos dos cavidades (215), estando sellado el fondo de cada cavidad (215) por un elemento de estanqueidad (206, 216), estando adaptadas las cavidades (215) para poder alojar cada una de ellas por lo menos una extremidad (214) de una fibra óptica para poder recoger a través del elemento de estanqueidad (206, 216) respectivo las variaciones de la característica óptica del indicador de la capa sensible al oxígeno (204) respectiva.
4. Analizador (300) para medir la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia que comprende una celda según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Analizador según la reivindicación 4 cuando depende de la 2, **caracterizado** porque comprende medios de detección para detectar una señal óptica proveniente de cada capa sensible al oxígeno (204) cuando las capas sensibles al oxígeno (204) están iluminadas por una fuente de luz.
6. Analizador según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque comprende medios de tratamiento de la señal para transformar la información obtenida por los medios de detección cuando estos últimos detectan la señal óptica proveniente de cada capa sensible al oxígeno (204), en información que pueda ser tratada por medios de procesamiento.
7. Analizador según la reivindicación 4, 5, ó 6, **caracterizado** porque comprende medios hidráulicos para gestionar el flujo de la sustancia dentro del circuito (202).
8. Analizador según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque los medios hidráulicos están diseñados para gestionar el flujo de una disolución patrón dentro del circuito (202).
9. Analizador según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque los medios hidráulicos están diseñados para gestionar el flujo de una disolución reguladora de pH dentro del circuito (202).
10. Procedimiento para medir en continuo la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia (310), **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- hacer fluir a través de un circuito de un analizador (300) según alguna de las reivindicaciones 4 a 9, al menos una disolución reguladora (326) para regular el pH, determinando la concentración de oxígeno en la proximidad de al menos el primero y el último soporte polimérico colonizado (212), llamados soportes poliméricos observados, concentración llamada ODR<sub>n</sub>, siendo n la posición del soporte polimérico en el circuito;
  - hacer fluir a través del circuito al menos una disolución patrón (322) de DBO, determinando la concentración de oxígeno en la proximidad de cada soporte polimérico colonizado observado, concentración llamada ODP<sub>n</sub>;
  - hacer fluir a través del circuito al menos la disolución reguladora (326) hasta recuperar las concentraciones ODR<sub>n</sub>;
  - hacer fluir a través del circuito al menos la sustancia (310), determinando la concentración de oxígeno en la proximidad de cada soporte polimérico observado, concentración llamada ODM<sub>n</sub>;

## ES 2 331 767 A1

e) hacer fluir a través del circuito al menos la disolución reguladora (326) hasta alcanzar de nuevo las concentraciones ODRn;

f) determinar para cada soporte polimérico el consumo de oxígeno de la sustancia y de la disolución patrón, respectivamente, calculando las diferencias entre ODMn y ODRn por un lado y entre ODPn y ODRn por el otro lado;

g) determinar la demanda bioquímica de oxígeno de la sustancia realizando una media de los valores unitarios de demanda bioquímica de oxígeno calculados para cada uno de los soportes poliméricos observados obtenidos comparando, para cada soporte polimérico, los consumos de oxígeno de la sustancia y de la disolución patrón obtenidos en f) con valores de calibración previamente obtenidos.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizada** porque se repiten las etapas a) a e) alternando la introducción de la sustancia cuya DBO se quiere medir en el circuito (202) con la introducción de una disolución, pudiéndose repetir varias veces dentro de un mismo ciclo de etapas a) a e) las etapas c) a e).

12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, **caracterizado** porque la media calculada en la etapa g) es ponderada, siendo el peso: (i) mayor para los valores calculados en los últimos soportes poliméricos observados del circuito si la sustancia tiene una DBO inferior a la DBO de la disolución patrón, y (ii) menor para los valores calculados en los últimos soportes poliméricos observados del circuito, si la sustancia tiene una DBO superior a la DBO de la disolución patrón.

13. Programa de ordenador, **caracterizado** porque comprende medios de código de programa para efectuar el procedimiento para medir en continuo la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12, cuando dicho programa funciona en un ordenador.

14. Programa de ordenador según la reivindicación 13, **caracterizado** porque está copiado en un medio legible por un ordenador.

15. Soporte legible por un ordenador, **caracterizado** porque contiene un programa de ordenador que comprende medios de código de programa para efectuar un procedimiento para medir en continuo la demanda bioquímica de oxígeno en una sustancia según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12, cuando dicho programa funciona en un ordenador.

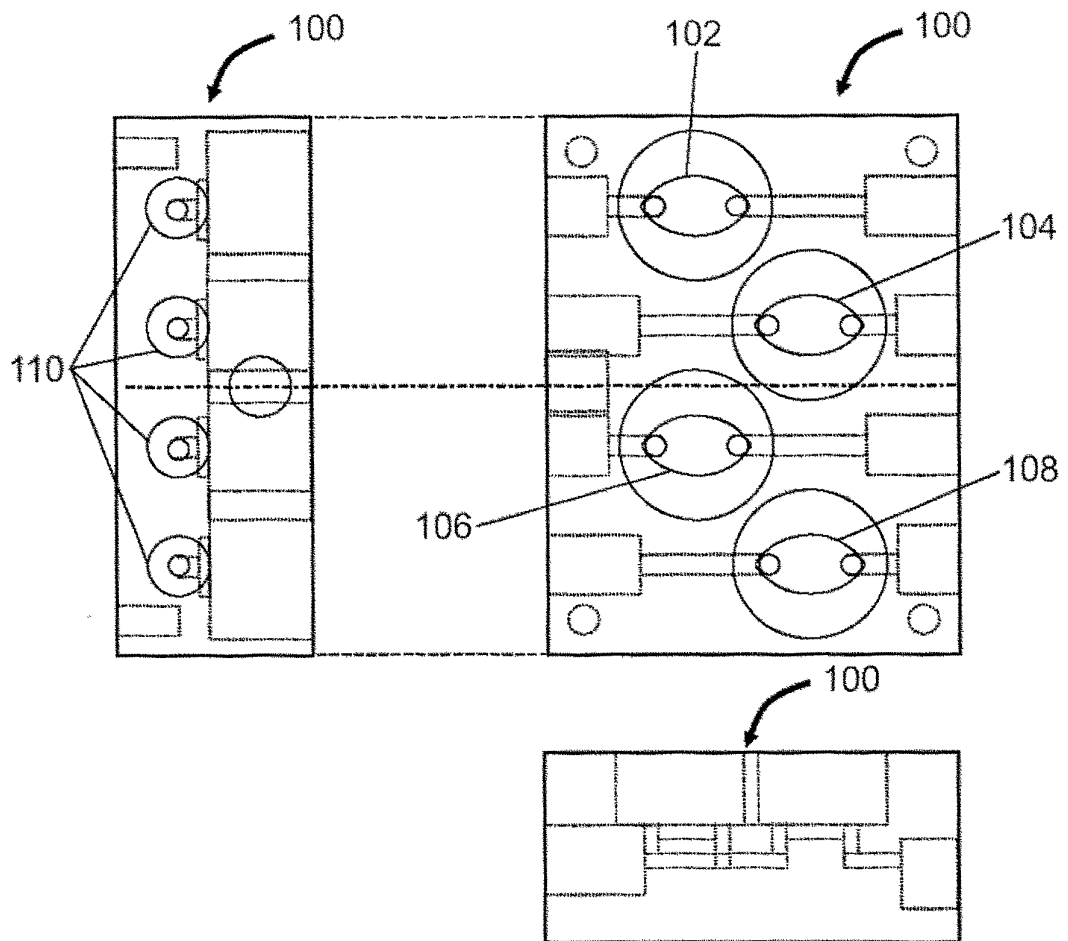


FIG.1

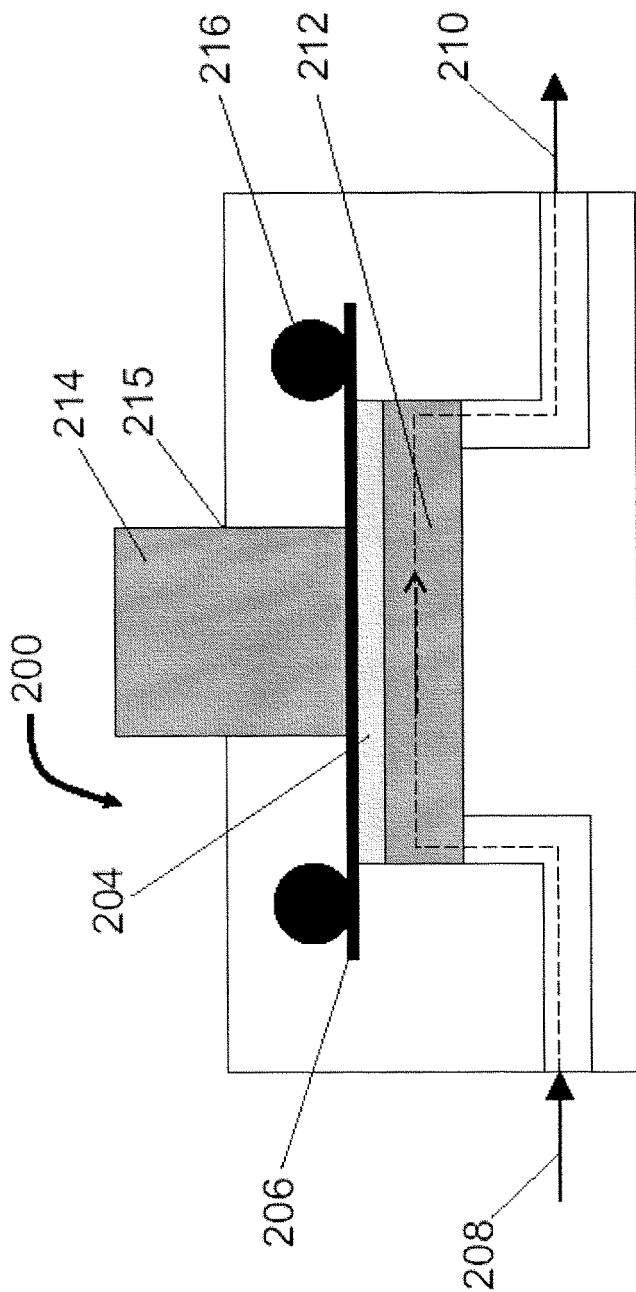


FIG.2a

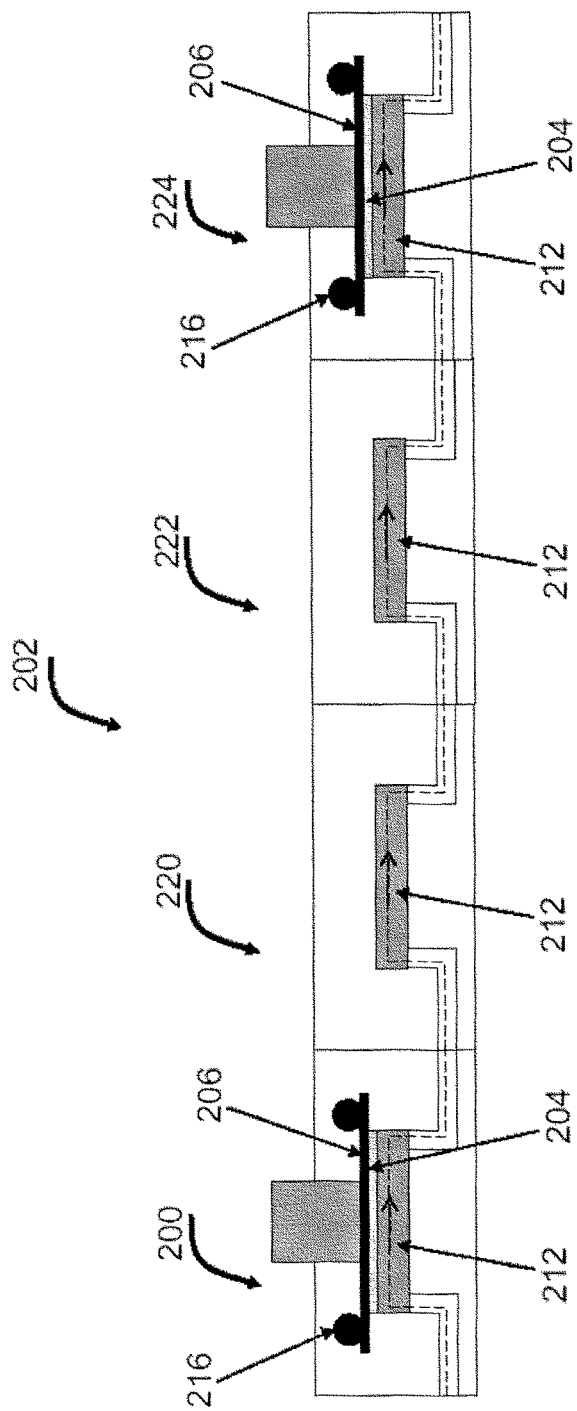


FIG.2b

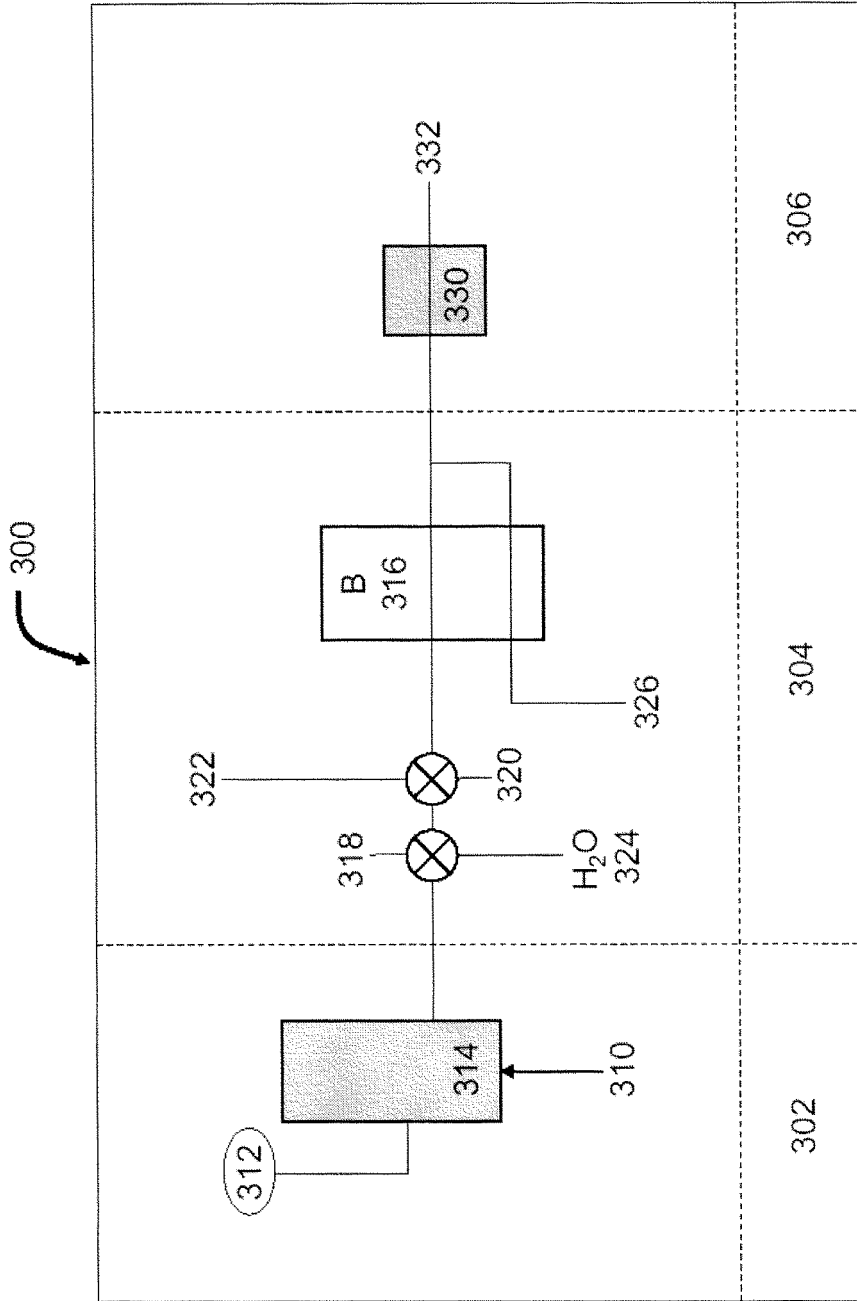


FIG.3



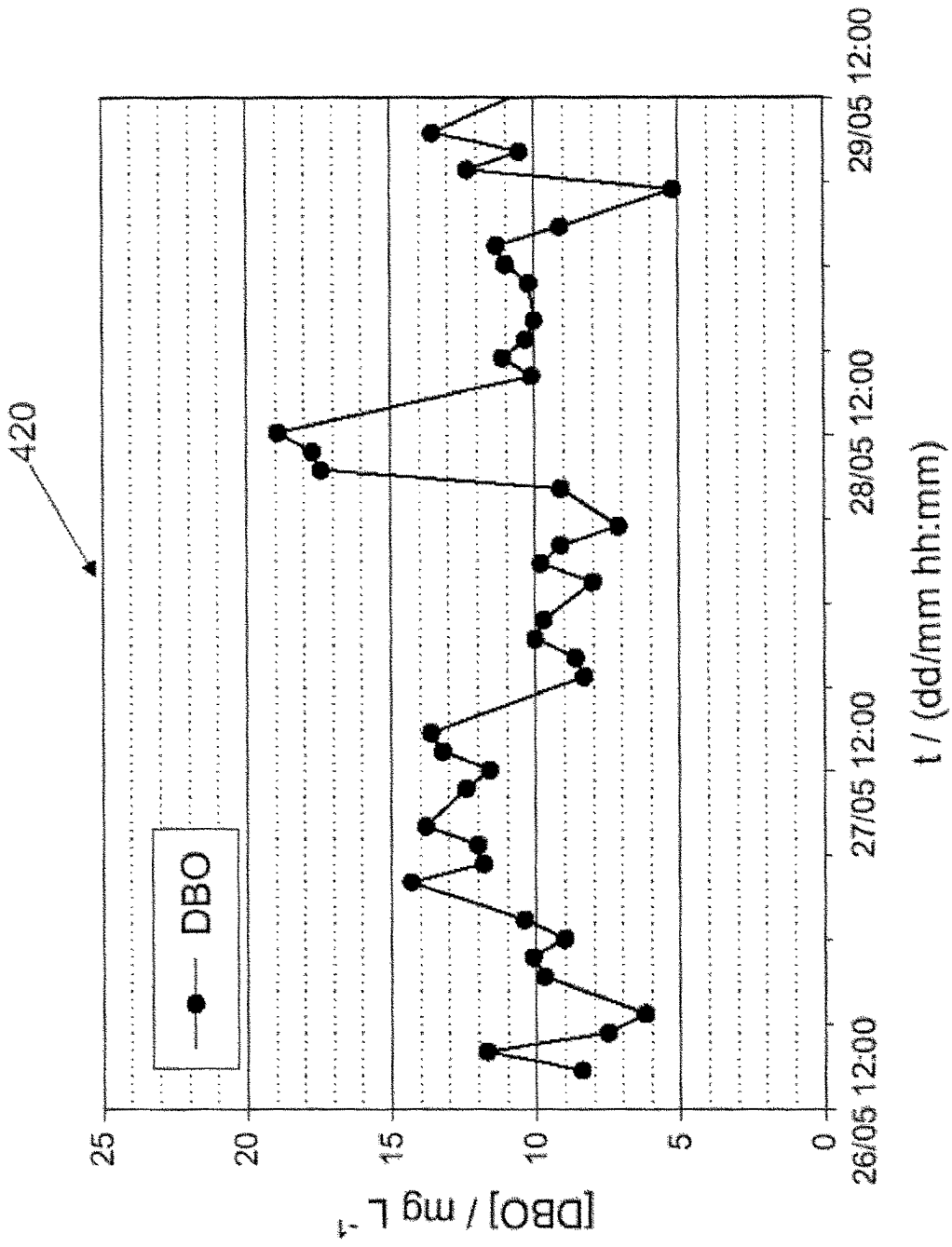


FIG.4B



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 767

② N° de solicitud: 200603300

③ Fecha de presentación de la solicitud: **28.12.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GB 2014979 A (CORNING GLASS WORKS) 05.09.1979, página 1, líneas 98-130; página 5, líneas 15-48; página 9, línea 85 - página 10, línea 92; reivindicaciones 23,27; figura única.	1,6,13
A	KWOK, N.Y. et al. An optical biosensor for multi-sample determination of biochemical oxygen demand (BOD). Sensors and Actuators B. Octubre 2005, Vol 110, N° 2, páginas 289-298, ISSN 0925-4005 <DOI:10.1016/j.snb.2005.02.007>.	1,6,13
A	LIN, L. et al. Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix. Biosensors and Bioelectronics. Marzo 2006, Vol. 21, N° 9, páginas 1703-1709, ISSN 0956-5663 <DOI:10.1016/j.bios.2005.08.007>.	1,6,13

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

28.12.2009

**Examinador**

A. Figuera González

**Página**

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12M 1/34** (2006.01)  
**C12N 11/08** (2006.01)  
**G01N 21/77** (2006.01)  
**G01N 33/18** (2006.01)