

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 146**

51 Int. Cl.:

G01N 21/33 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2020 PCT/IL2020/050645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2020 WO20250226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2020 E 20822620 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3963308**

54 Título: **Sistema y procedimiento para determinar la concentración de nitrato acuoso en solución que contiene carbono orgánico disuelto**

30 Prioridad:

12.06.2019 US 201962860273 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.04.2025

73 Titular/es:

**B.G. NEGEV TECHNOLOGIES & APPLICATIONS LTD., AT BEN-GURION UNIVERSITY (100.00%)
P.O.B 653
8410501 Beer-Sheva, IL**

72 Inventor/es:

**ARNON, SHLOMI;
DAHAN, OFER y
YESHNO, ELAD**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 3 015 146 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema y procedimiento para determinar la concentración de nitrato acuoso en solución que contiene carbono orgánico disuelto

5

Sector de la invención

La presente invención se refiere en general a sistemas y procedimientos para optimizar el rendimiento de los cultivos agrícolas y reducir la contaminación del agua debido a la aplicación excesiva de fertilizantes. Más específicamente, la presente invención se refiere a un sistema y procedimiento para determinar un nivel de nitrato en una muestra de agua, para determinar de este modo la cantidad precisa de fertilización necesaria.

10

Estado de la técnica anterior

La contaminación de ríos, lagos, agua dulce, agua potable, aguas subterráneas y aguas intersticiales del suelo por nitratos es un problema mundial. El término "nitrato" se denomina brevemente en el presente documento también como "N". Es universalmente reconocido que la contaminación del agua potable por nitratos es una amenaza para la salud humana. También se informa de que la salud humana sufre efectos adversos, incluso cáncer, debido a la exposición continua a los nitratos por encima de un determinado nivel. Una tasa significativa de contaminación del agua es resultado de un exceso de fertilización por parte de los agricultores, debido a la falta de información precisa y en tiempo real con respecto a la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Por lo tanto, un exceso de fertilización da como resultado no solo un desperdicio de recursos, sino también una contaminación de las aguas subterráneas, en particular por nitratos.

15

20

25

30

35

40

45

Durante la segunda mitad del siglo XX, se han observado tendencias claras de aumento de la concentración de nitratos en las aguas subterráneas de los acuíferos de todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que los niveles de nitratos en el agua potable no deben superar los 50 ppm. Cuando se supera este nivel de concentración, el nitrato es perjudicial para los bebés, ya que puede causar el "síndrome del bebé azul" (metahemoglobinemia) y provocar enfermedades graves e incluso la muerte. Desafortunadamente, la contaminación por nitratos es el factor más importante responsable de la grave degradación de los recursos hídricos subterráneos y superficiales. A escala mundial, la eutrofización y la hipoxia de arroyos, ríos y lagos se atribuyen principalmente al flujo de retorno subterráneo de aguas subterráneas contaminadas con nitratos, que se filtran de los acuíferos freáticos subyacentes a los campos agrícolas. Además, el impacto de las aguas subterráneas contaminadas con nitratos no se limita a los recursos hídricos terrestres, sino que también tiene un gran impacto en los ecosistemas marinos. Se han detectado casos de eutrofización e hipoxia a gran escala en el Golfo de México y el Mar Negro, así como graves efectos en la Gran Barrera de Coral de Australia. En general, la contaminación por nitratos ha provocado más descalificaciones de aguas subterráneas y cierres de pozos de agua que cualquier otro contaminante en todo el mundo. Si bien se considera que el nitrato es el contaminante de origen no puntual más común en las aguas subterráneas, numerosos estudios han vinculado el aumento de la concentración de nitratos en las aguas subterráneas con la utilización excesiva de fertilizantes en la agricultura. Como resultado, las autoridades de protección ambiental y del agua están adoptando una normativa mundial para reducir la aplicación excesiva de fertilizantes agrícolas. Por ejemplo, la Unión Europea ha establecido la Directiva sobre nitratos, y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) considera la contaminación por nitratos en las aguas subterráneas como un evento que requiere una acción inmediata.

50

En la actualidad, la aplicación de fertilizantes en la agricultura se basa principalmente en la experiencia de los agricultores, las recomendaciones de los expertos y los análisis esporádicos del suelo. Ninguna de estas técnicas proporciona información que esté en línea con la escala temporal de la movilización de fertilizantes nitrogenados (tasas de movimiento de la solución de nitrato a través de los sedimentos del suelo), el consumo y la dinámica de transformación en el suelo.

55

60

65

En la actualidad, la supervisión de los parámetros químicos de los suelos se realiza en muestras de agua, que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante una ventosa que se coloca en el suelo, o extrayendo muestras de suelo. Las muestras de agua recogidas mediante este mecanismo se transfieren normalmente a un laboratorio para su posterior análisis químico, o se analizan in situ mediante un kit analítico. Sin embargo, el nitrato del suelo es muy soluble, móvil y, obviamente, es consumido por los cultivos. Además, la concentración de nitrato en el suelo puede fluctuar en escalas de tiempo de horas a días, como respuesta a diferentes esquemas de riego, precipitación, fertilización, absorción por las raíces y diferentes fases de crecimiento de las plantas. Por tanto, la supervisión de la concentración de nitrato mediante herramientas convencionales no cumple con la resolución temporal necesaria para optimizar los esquemas de fertilización, al tiempo que se evita la contaminación de las aguas subterráneas debido a la aplicación excesiva de fertilizantes. Además, las técnicas actuales normalmente requieren que el manejo de los esquemas de muestreo esté a cargo de un equipo de investigación dedicado, no de los agricultores.

La espectroscopia de absorción ultravioleta (UV) es uno de los procedimientos más comunes para el análisis

de nitrato en solución acuosa. El nitrato en solución acuosa absorbe luz en dos regiones de longitud de onda principales: (a) una banda de alta absorbancia entre 200 y 240 nm; y (b) una banda de baja absorbancia entre 280 y 320 nm. Si bien se sabe que la absorbancia en ambas bandas tiene una correlación directa con la concentración de nitrato, la absorbancia a 220 nm es dos órdenes de magnitud mayor en comparación con la absorbancia a 300 nm.

Tuly et al., (2009), "In Situ Monitoring of Soil Solution Nitrate: Proof of Concept", <https://www.researchgate.net/publication/231523625>, sugiere una técnica para la supervisión continua de concentraciones de nitrato en solución de suelo. Se aplica una espectroscopia de absorbancia en una muestra dentro de una copa porosa de acero inoxidable, que se instala en el suelo. La copa porosa se llena con agua desionizada, que se coloca en un depósito de solución de nitrato de potasio. Una vez que la solución dentro de la copa alcanza el equilibrio químico por difusión entre la copa porosa y el medio circundante, el espectro de absorción de la solución se mide por medio de una sonda de inmersión UV. La configuración propuesta de Tuly et al, (2009) utiliza una fuente de luz UV y una sonda de inmersión que están conectadas al espectrofotómetro a través de fibras ópticas, para determinar continuamente la concentración de nitrato dentro de la copa. Sin embargo, esta técnica tiene una aplicabilidad limitada, por dos razones principales: (a) la obtención del equilibrio químico entre la copa porosa y el medio circundante, especialmente en sedimentos no saturados con un almacenamiento de agua limitado, es bastante lenta, lo que da como resultado un desfase temporal entre la variación real de la concentración de nitrato en el suelo respecto a su medición real. Por lo tanto, es posible que no se registren variaciones rápidas de concentración, como las esperadas después de eventos intensivos de riego o fertilización; y (b) la presencia de carbono orgánico disuelto (DOC, *Dissolved Organic Carbon*) natural en el suelo limita la precisión de la absorción de UV mediante análisis espectroscópico, ya que tanto el nitrato como el DOC del suelo absorben la luz UV en intervalos de longitudes de onda superpuestos.

La Patente WO 2018/104939 A1, Yeshno et al., 2019 sugiere una técnica de supervisión de nitrato que se basa en un análisis espectral continuo del agua intersticial del suelo en una celda de flujo óptico. La celda de flujo óptico está conectada a una interfaz porosa que obtiene un flujo continuo de agua intersticial del suelo. El espectro de absorción del agua intersticial del suelo se registra y analiza continuamente para determinar en tiempo real la concentración de nitrato. El análisis implica un escaneo del espectro de absorción del agua intersticial del suelo para identificar una longitud de onda óptima donde la interferencia del DOC en la medición de nitrato sea mínima. El sistema para llevar a cabo esta técnica requiere para su funcionamiento un espectrofotómetro UV de banda ancha y, en consecuencia, una lámpara UV de deuterio de amplio rango. Sin embargo, a pesar de la capacidad del sistema para medir continuamente la concentración de nitrato *in situ*, las grandes dimensiones del sistema, junto con su elevado consumo energético, lo hacen demasiado voluminoso y caro para aplicaciones prácticas y comerciales.

En resumen, el sistema óptico de la técnica anterior de la Patente WO 2018/104939 A1 para determinar el nivel de nitrato en un suelo cultivado requiere básicamente los siguientes componentes:

- a. Una o más celdas de muestreo, cada una de las cuales permite la extracción de una muestra de agua intersticial de una región específica del suelo;
- b. Cada celda de muestreo está conectada a una celda de flujo óptico para el análisis espectral continuo o frecuente del agua intersticial del suelo;
- c. Una fuente de luz UV para aplicar un haz de luz en longitudes de onda entre 200 y 240 nm a través de la muestra de agua en la celda de flujo;
- d. Un fotodetector o un espectrofotómetro para acumular la luz del haz de luz, después de su paso a través de la muestra de agua;
- e. Una unidad de procesamiento para determinar el nivel de absorción de luz (basándose en la ecuación de Beer-Lambert), y
- f. Una unidad de procesamiento para estimar las concentraciones de nitratos basándose en una ecuación de calibración empírica previamente preparada. La ecuación de calibración se obtiene mediante un algoritmo que localiza una longitud de onda óptima, donde se encuentra una interferencia mínima del DOC;
- a. La Patente WO 2018/104939 A1 también muestra cómo el sistema puede realizar análisis en una pluralidad de regiones, mientras que cada vez se selecciona una sola región para los análisis. Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un sistema para determinar en tiempo real e *in situ* un nivel de nitrato en el suelo, que es más simple en estructura, compacto en tamaño y de menor costo en comparación con sistemas similares de la técnica anterior.

Un objetivo particular de la presente invención es eliminar los efectos del DOC existente en una muestra de agua intersticial sobre el espectro de absorción, para permitir de este modo la utilización de la técnica de espectroscopia de absorción para estimar la concentración de nitrato acuoso en presencia de DOC en la solución.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a medida que avance la

descripción.

La Patente CN-A-109655110 sugiere una fuente de luz LED empaquetada compuesta y un dispositivo de supervisión de calidad de agua multiparamétrico basado en la fuente de luz, de modo que los índices de nitrato, turbidez y cromaticidad se puedan medir simultáneamente.

La Patente WO-A1-2017/156258 sugiere un sensor óptico de nitrato para determinar la calidad del agua, incluido la supervisión de la calidad del agua mediante múltiples parámetros.

B.D. SHAW ET AL, en "Analysis of Ion and Dissolved Organic Carbon Interference on Soil Solution Nitrate Concentration Measurements Using Ultraviolet Absorption Spectroscopy", VADOSE ZONE JOURNAL, vol. 13, n.º 12, 19 de diciembre de 2014, páginas 1-9, DOI: 10.2136/vzj2014.06.0071 sugiere una sonda de supervisión de nitrato in situ y examina su rendimiento en presencia de especies iónicas potencialmente interferentes y carbono orgánico disuelto (DOC).

ANTHONY C. EDWARDS ET AL, en "Determination of Nitrate in Water Containing Dissolved Organic Carbon by Ultraviolet Spectroscopy", International Journal of Environmental Analytical Chemistry, vol. 80, n.º 1, 2001, páginas 49-59, GB, ISSN: 0306-7319, DOI: 10.1080/03067310108044385 sugiere un enfoque de dos longitudes de onda para la corrección de la absorbancia que la materia orgánica, tal como el nitrato, podría haber aportado.

Características de la invención

La presente invención se refiere a un sistema para determinar un nivel de nitrato en una muestra de agua según se define en la reivindicación 1. El sistema comprende:

(a) una celda de flujo óptico que es al menos parcialmente transparente y que está configurada para contener una muestra de agua; (b) un primer iluminador para iluminar la muestra dentro de la celda mediante luz en una primera longitud de onda, y un primer fotodetector para recoger la iluminación de la primera longitud de onda, después del paso de la luz a través de la muestra; (c) un segundo iluminador para iluminar la muestra dentro de la celda mediante luz en una segunda longitud de onda de excitación de fluorescencia, y un segundo fotodetector para recoger la iluminación en una tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia desde la muestra; y (d) una unidad de análisis para: (d.1) determinar un efecto global de nitrato+DOC (en adelante, los términos "nitrato+DOC" y "nitrato y DOC" se utilizan indistintamente, y su esencia es la misma) dentro de la muestra sobre la absorbancia de la muestra, siendo dicho efecto de nitrato+DOC proporcional a una tasa de absorbancia de luz debido a dicha iluminación por dicho primer iluminador, determinándose dicha absorbancia a partir de una diferencia entre un nivel de iluminación por dicho primer iluminador y un nivel de iluminación recogida por dicho primer fotodetector; (d.2) determinar una concentración de DOC dentro de la muestra, siendo dicha concentración de DOC proporcional a una intensidad de dicha emisión de fluorescencia desde la muestra debido a dicha iluminación por dicho segundo iluminador, y tal como es recogida por dicho segundo fotodetector; y (d.3) restar dicho efecto de DOC de dicho efecto de nitrato+DOC sobre la absorbancia, para determinar de este modo la concentración de nitrato dentro de la muestra.

En una realización de la presente invención, el sistema comprende además una primera tabla de consulta, para convertir la diferencia medida en la etapa (d.1) en un nivel de concentración de nitrato y DOC.

En una realización de la presente invención, el sistema comprende además una segunda tabla de búsqueda para convertir dicha emisión de fluorescencia medida en la etapa (d.2) en un nivel de concentración de DOC.

En una realización de la presente invención, el sistema comprende además una tercera tabla de búsqueda, para calibrar el resultado de la resta basándose en un tipo específico de DOC que se sabe que está en la muestra analizada específica, en el que dicho tipo de DOC refleja una composición química específica de DOC.

En una realización de la presente invención, se utiliza una ecuación matemática para convertir las mediciones de absorbancia y/o fluorescencia en niveles de concentración.

En una realización de la presente invención, el sistema comprende además uno o más iluminadores adicionales y uno o más fotodetectores adicionales, para medir la absorbancia y/o la emisión de fluorescencia en longitudes de onda adicionales, para determinar de este modo un tipo específico de DOC dentro de la muestra.

En una realización de la presente invención, la unidad de análisis comprende un modelo matemático para extraer el valor de nitrato basándose en las mediciones de absorción y fluorescencia, comprendiendo el modelo matemático:

$$C_{NO_3^{-1}} = \frac{C_{DOC} \left(\frac{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{DOC}(\lambda_2) - \varepsilon_{DOC}(\lambda_1)}{\varepsilon_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) - \left(\frac{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{NO_3^{-1}}(\lambda_2)} \quad (3)$$

Donde A es la absorbancia medida a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(nm)$), $\varepsilon_{NO_3^{-1},DOC}(\lambda_{1,2}(nm))$ es un coeficiente de atenuación molar para el nitrato o el DOC ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(nm)$), C_{DOC} es la concentración de DOC (mol L^{-1}) tal como se obtiene de dicho segundo fotodetector, C_{NO_3} es una concentración de nitrato (mol L^{-1}), y l es una longitud de trayectoria óptica (cm).

En una realización de la presente invención, la unidad de análisis aplica una técnica de aprendizaje automático que comprende: (a) generar una pluralidad de mediciones de absorción y fluorescencia para diferentes valores de concentración de nitrato y diversos tipos de DOC y concentraciones respectivas; (b) seleccionar y adaptar una o más redes de aprendizaje profundo; (c) entrenar al menos una de las redes de aprendizaje profundo seleccionadas; y (d) utilizar la red entrenada para calcular la concentración de nitrato basándose en mediciones de absorción y fluorescencia.

En una realización de la presente invención, la primera longitud de onda se selecciona entre las bandas de 200-250 nm y 280-320 nm.

En una realización de la presente invención, la segunda longitud de onda de excitación está dentro de una banda de 225 nm-600 nm.

En una realización de la presente invención, la tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia está dentro de una banda de 250 nm-700 nm.

En una realización de la presente invención, el sistema comprende además un primer filtro para asegurar que solo la radiación en la primera longitud de onda llegue al primer fotodetector.

En una realización de la presente invención, el sistema comprende además un segundo filtro para asegurar que solo la radiación en la tercera longitud de onda llegue al segundo fotodetector.

En una realización de la presente invención, la muestra de agua se toma de un suelo o de un depósito de agua.

En una realización de la presente invención, la muestra de agua se recoge de un suelo cultivado mediante una interfaz porosa y se proporciona en un caudal bajo a través de la celda de flujo óptico.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para determinar una tasa de concentración de nitrato en una muestra de agua según se define en la reivindicación 10. El procedimiento comprende:

(a) proporcionar la muestra; (b) iluminar la muestra en una primera longitud de onda y determinar el efecto combinado de nitrato+DOC dentro de la muestra sobre la absorbancia, siendo dicha concentración de nitrato+DOC proporcional a una tasa de absorbancia de luz debido a dicha iluminación en dicha primera longitud de onda, determinándose dicha absorbancia a partir de una diferencia entre un nivel de iluminación en dicha primera longitud de onda antes de pasar por la muestra y un nivel de iluminación recogida en dicha primera longitud de onda después del paso a través de la muestra de agua; (c) iluminar la muestra de agua en una segunda longitud de onda de excitación y determinar un efecto de DOC dentro de la muestra, siendo dicho efecto de DOC proporcional a una intensidad de emisión de fluorescencia desde la muestra en una tercera longitud de onda debido a dicha iluminación de la muestra en dicha segunda longitud de onda; y (d) deducir el efecto de DOC del efecto global de nitrato+DOC sobre la absorbancia, según se determina, para obtener de este modo la concentración de nitrato en la muestra.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la utilización de una primera tabla de búsqueda para convertir la absorbancia en un nivel de concentración de nitrato+DOC.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la utilización de una segunda tabla de búsqueda para convertir dicha emisión de fluorescencia en un nivel de concentración de DOC.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la utilización de una tercera tabla de búsqueda, para calibrar el resultado de la deducción basándose en un tipo específico de DOC que se sabe que está en la muestra analizada específica, en el que dicho tipo de DOC refleja una composición química específica de DOC.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la utilización de una ecuación matemática para convertir las mediciones de absorbancia y/o fluorescencia en niveles de concentración.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además medir la absorbancia y/o la emisión de fluorescencia en longitudes de onda adicionales, para determinar de este modo un tipo específico de DOC dentro de la muestra.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende un modelo matemático para extraer el valor de nitrato basándose en las mediciones de absorción y fluorescencia, comprendiendo el modelo matemático:

$$C_{NO_3^-} = \frac{C_{DOC} \left(\frac{A_{NO_3^-}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^-}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{DOC}(\lambda_2) - \varepsilon_{DOC}(\lambda_1)}{\varepsilon_{NO_3^-}(\lambda_1) - \left(\frac{A_{NO_3^-}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^-}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{NO_3^-}(\lambda_2)} \quad (3)$$

Dónde A es la absorbancia medida a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(\text{nm})$), $\varepsilon_{NO_3^-}(\lambda_{1,2}(\text{nm}))$ es un coeficiente de atenuación molar para el nitrato o el DOC ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(\text{nm})$), C_{DOC} es la concentración de DOC (mol L^{-1}) tal como se obtiene de dicho segundo fotodetector, $C_{NO_3^-}$ es una concentración de nitrato (mol L^{-1}), y l es una longitud de trayectoria óptica (cm).

En una realización de la presente invención, la primera longitud de onda se selecciona entre las bandas de 200-250 nm o 280-320 nm.

En una realización de la presente invención, la segunda longitud de onda de excitación está en el orden de 225-400 nm.

En una realización de la presente invención, la tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia está en el orden de 250 nm-500 nm.

En una realización de la presente invención, la muestra de agua se toma de un suelo o de un depósito de agua.

En una realización de la presente invención, el procedimiento aplica además una técnica de aprendizaje automático, que comprende las etapas de (a) generar una pluralidad de mediciones de absorción y fluorescencia para diferentes valores de concentración de nitrato y diferentes tipos de DOC, y sus respectivas concentraciones de DOC; (b) seleccionar una o más redes de aprendizaje profundo; (c) entrenar la red y seleccionar aquella que tenga el mejor rendimiento; y (d) calcular la concentración de nitrato basándose en dichas mediciones de absorción y fluorescencia.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

- La figura 1 ilustra de manera general en forma de diagrama de flujo un procedimiento para determinar una concentración de nitrato en una muestra de agua, de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La figura 2 ilustra esquemáticamente una estructura de un sistema para determinar una concentración de nitrato en el agua intersticial del suelo, de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La figura 3 ilustra un procedimiento para determinar la concentración de nitrato en una solución de suelo (o solución acuosa), de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La figura 4 ejemplifica un patrón complejo en la relación entre la concentración de nitrato, la concentración de DOC y la absorción de UV para el agua del suelo obtenida a partir de muestras de agua de suelo de invernadero convencionales;
- La figura 5 muestra una proyección 3D de los resultados experimentales;
- La figura 6 muestra una curva de calibración para una concentración de DOC;
- La figura 7 muestra la concentración de nitrato observada (conocida) frente a la concentración de nitrato prevista mediante el nuevo concepto analítico de la presente invención, para muestras de agua del suelo de 6 sitios agrícolas.
- La figura 8 muestra las concentraciones de nitrato observadas frente a las previstas, para el extracto de agua de la mezcla de suelo de humus, cuando la ecuación de calibración se obtuvo para la absorción a 235 nm.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente invención da a conocer un sistema óptico para determinar el nivel de nitrato en un suelo cultivado, que supera los inconvenientes de sistemas similares de la técnica anterior. En resumen:

- a. El sistema puede utilizar componentes de bajo costo y bajo consumo energético, tales como fuentes de luz de tipo LED y fotodetectores de tipo semiconductor;
- b. Mientras que los sistemas de la técnica anterior se basan únicamente en la medición de la absorción, el sistema de la presente invención mide: (i) la absorción resultante de la iluminación mediante una primera fuente de luz para medir un efecto combinado tanto del nitrato como del DOC; y (ii) una emisión de fluorescencia resultante de la iluminación mediante una segunda fuente de luz para medir la concentración de DOC, y anula su efecto sobre la medición de la absorción mediante la utilización de un algoritmo de procesamiento de señales. Esta técnica de medición dual permite separar el efecto del DOC del efecto combinado del nitrato+DOC sobre la medición, por lo que la técnica permite determinar la concentración real de nitrato en la muestra de agua. Esta estructura y este análisis eliminan la necesidad de utilizar un sistema engorroso con una fuente de luz de potencia relativamente alta y de alto costo, y la necesidad de utilizar un espectrómetro para determinar una frecuencia operativa óptima en la que el efecto del DOC sobre la medición sea mínimo;
- c. El sistema aplica algoritmos para calcular la concentración de nitrato;
- d. El sistema aplica una o más bases de datos para calibrar la medición. Opcionalmente, se utilizan varias bases de datos para adaptarse a diferentes tipos de suelos (por lo tanto, diferentes composiciones de materiales y propiedades ópticas dentro del DOC);
- e. Una segunda realización del sistema de la presente invención aplica un modelo matemático de la concentración de DOC en función de la potencia de fluorescencia y de la absorción de luz en función de la concentración de nitrato+DOC y resuelve una ecuación de dos variables;
- f. Una tercera realización del sistema de la presente invención aplica múltiples mediciones para entrenar una red de aprendizaje profundo, que posteriormente se utiliza para calcular la concentración de nitrato basándose en dos mediciones de absorción y fluorescencia.

La figura 1 ilustra de manera general en forma de diagrama de flujo un procedimiento 100 para determinar una concentración de nitrato en una muestra de agua (por ejemplo, que se toma de suelo cultivado, efluente de planta de tratamiento de aguas residuales, sistemas de agricultura hidropónica/acuapónica, ríos, lagos y otras aplicaciones agrícolas y medioambientales. En adelante, por motivos de simplicidad, la descripción se referirá a una muestra que se toma del suelo) de acuerdo con una realización de la presente invención. En la etapa 112, se obtiene una muestra de agua del suelo, por ejemplo, mediante la utilización de una interfaz porosa. En una realización, la muestra fluye a un caudal bajo a través de una celda de flujo óptico. En la etapa 114, se ilumina la muestra de agua y se determina el efecto combinado del nitrato+DOC (denominado en los dibujos como "N+DOC") sobre la absorbancia. En la etapa 116, y tras la aplicación de una iluminación de excitación sobre la muestra en la celda de flujo óptico, se determina la concentración de DOC únicamente en la muestra midiendo la intensidad de la emisión de fluorescencia desde la muestra. Finalmente, en la etapa 118, se determina la concentración de nitrato en la muestra, restando el efecto del DOC (tal como se obtuvo en la etapa 116) sobre la absorbancia, de la absorbancia combinada a la concentración de N+DOC tal como se obtuvo en la etapa 114. El término "restar", que aparece a lo largo de esta solicitud, no se refiere necesariamente a una operación matemática pura, sino más bien a una operación que compensa el efecto del DOC de la combinación de N+DOC.

La figura 2 ilustra esquemáticamente una estructura del sistema 200 para determinar una concentración de nitrato en el agua intersticial del suelo, de acuerdo con una realización de la presente invención. Una interfaz porosa de pequeño volumen muerto 202 se coloca en el suelo para obtener una corriente continua de bajo flujo de solución de agua intersticial del suelo. El agua intersticial del suelo fluye a través de una celda de flujo óptico 206 mediante un tubo de diámetro pequeño (por ejemplo, diámetro interior $\leq 1,6$ mm) 204. La extracción de la muestra del suelo se realiza, por ejemplo, mediante la aplicación de baja presión (vacío) en la interfaz porosa. La muestra puede descargarse o acumularse posteriormente para un análisis adicional o calibración del sistema en la cámara de acumulación de muestras 232. La carcasa de la celda de flujo 206 es al menos parcialmente transparente, para permitir el paso de haces de luz a través de la misma. Una primera fuente de luz 212, preferentemente de tipo LED, ilumina la celda en una primera longitud de onda UV, por ejemplo cercana a los 300 nm. El haz de luz de la primera fuente de luz 212 pasa a través de la celda de flujo óptico 206 en la que fluye el agua intersticial del suelo, mientras que parte de la energía del haz de luz es absorbida por los componentes del agua (que a su vez contienen nitrato y DOC). La energía restante del haz de luz de la primera fuente de luz 212 es acumulada por el fotodetector 222, formando una señal de absorbancia 252. Una unidad de procesamiento 240 se utiliza para calcular la señal de absorbancia que refleja la diferencia entre la intensidad de iluminación de la primera fuente de luz 212 y la intensidad de luz que se acumula por el fotodetector 222 (ecuación de Beer Lambert). Una segunda fuente de luz 214, preferentemente de un tipo LED, ilumina la celda 206 en una segunda longitud de onda, por ejemplo, en una longitud de onda de excitación cercana a los 350 nm. El haz de luz procedente de la segunda fuente de

luz 214 excita el DOC dentro de la muestra de agua, provocando una emisión de fluorescencia de DOC a una longitud de onda secundaria de, por ejemplo, 451 nm. La emisión de fluorescencia resulta sustancialmente solo del DOC, es proporcional a la concentración de DOC y es independiente de la concentración de nitrato dentro de la muestra. La emisión de fluorescencia resultante del segundo haz de luz es acumulada por el segundo fotodetector 224, formando una señal de fluorescencia 254. La señal de fluorescencia 254 se transmite a la unidad de procesamiento 240 donde se utiliza una ecuación de calibración predeterminada para estimar la concentración de DOC en la muestra. Como se mencionó anteriormente, la intensidad de la emisión de fluorescencia es proporcional a la concentración de DOC en la solución. Sin embargo, la intensidad de la emisión de fluorescencia, en sí misma, también es proporcional a la intensidad de la iluminación de excitación por la segunda fuente de luz 214. Sin embargo, la intensidad de la iluminación de excitación es un parámetro que está controlado por el operador del sistema. Preferentemente, los filtros 242 y 244 están ubicados frente a los detectores ópticos 222 y 224, respectivamente, para asegurar el paso únicamente de las longitudes de onda de interés hacia los respectivos detectores. Por ejemplo, un filtro 244 que permite únicamente luz a 451 nm está ubicado frente al detector de fluorescencia 224, asegurando que la luz de 350 nm del haz de excitación no será recibida y saturará el detector 224 o enmascarará la lectura de fluorescencia. Además, un filtro para permitir únicamente el paso de, por ejemplo, 300 nm está ubicado frente al detector de absorbancia 222, para asegurar que la medición se realizará únicamente en la región donde el nitrato tiene un pico de absorbancia máximo.

La figura 3 ilustra un procedimiento 300 para determinar la concentración de nitrato en el suelo (o en otro medio que contenga nitrato, como se ha comentado anteriormente), según una realización de la presente invención. En la etapa 312, el agua intersticial del suelo se ilumina en una primera longitud de onda mediante un haz de iluminación, normalmente en la banda de 200-240 nm, o preferentemente en la de 280-320 nm, donde puede funcionar un iluminador de tipo LED. En la etapa 322, la absorbancia total que es el resultado de la presencia de N+DOC en la solución se calcula en referencia a una solución en blanco predeterminada, por ejemplo, agua bidestilada (DDW, *double distilled water*). En la etapa 340, la absorbancia calculada se sustituye dentro de una ecuación polinómica predeterminada. Esta ecuación se sustituye además con valores de una ecuación de una primera tabla de consulta 332 que proporciona un nivel de concentración de N/DOC específico para cada absorción combinada específica de N+DOC en la solución. La tabla de consulta 332 se obtiene principalmente mediante la utilización de experimentos, como se explicará más adelante en la sección de ejemplos. De manera sustancialmente simultánea, la muestra de agua se ilumina 314 con luz en una segunda longitud de onda, por ejemplo, 350 nm o cualquier otra longitud de onda que sea adecuada para excitar una iluminación de fluorescencia de DOC desde la muestra. En la etapa 324, un fotodetector, que está ajustado para detectar en la longitud de onda de la emisión de fluorescencia, por ejemplo 451 nm, detecta la intensidad de la emisión de fluorescencia desde la muestra. La fluorescencia de excitación/emisión a 350/451 nm resulta únicamente de la existencia de DOC en la muestra. Además, se ha descubierto que, para un tipo de suelo dado, la intensidad de la emisión de fluorescencia se puede encontrar en una correlación lineal o polinómica con la tasa de concentración de DOC en la muestra. En la etapa 344, y dada la intensidad de la emisión de fluorescencia según se determina en la etapa 324, se determina la concentración de DOC en la muestra. Esto también se hace mediante la utilización de una segunda tabla de consulta de calibración 364. La segunda tabla de consulta de calibración 364, tras la presentación de una intensidad de emisión específica, proporciona una tasa de concentración específica de DOC. La tabla de consulta de calibración 364 también se prepara de antemano, normalmente mediante la utilización de experimentos. Preferentemente, la tabla de consulta 364 se refiere selectivamente al tipo de suelo específico que se utiliza realmente. Se ha descubierto que la composición química del DOC cambia un poco de un tipo de suelo a otro. Por lo tanto, es preferente preparar una pluralidad de tablas de consulta de calibración 364, cada una para un tipo específico de suelo, y utilizar realmente la tabla de consulta (o los datos de la misma) que mejor se adapte al tipo de suelo examinado. La concentración de DOC determinada en la etapa 344 se sustituye entonces dentro de la ecuación de calibración polinómica predeterminada 340. Finalmente, la ecuación polinómica utiliza la concentración de DOC dada para deducir su atribución a la absorción combinada de N+DOC, como se indica en la etapa 322. En otras palabras, la ecuación polinómica devuelve la concentración de N como una función de la concentración de DOC (o su efecto) en la solución, y la absorbancia general causada por N + DOC.

Ejemplo

Para este estudio se recogieron y analizaron suelos de cinco campos agrícolas diferentes de la llanura costera de Israel, incluidos: invernaderos orgánicos y convencionales para cultivos de hortalizas, campo abierto que se utiliza para cultivos mixtos rotativos y un huerto de cítricos. Estos sitios se eligieron para representar un espectro de prácticas agrícolas típicas en diferentes suelos. Además, también se examinó la mezcla de suelo de humus comercial del compost comercial "Dovrat" para representar un impacto potencial de la aplicación de compost en la agricultura sobre el DOC del agua del suelo.

Las muestras de solución de suelo se obtuvieron de una mezcla de suelo y DDW. Las mezclas se dejaron reposar durante 24 horas para permitir que la solución alcanzara un equilibrio químico con el carbono orgánico disuelto natural del suelo. La fase de suelo y la fase líquida en cada muestra se separaron mediante

una centrífuga de laboratorio estándar, y los sólidos suspendidos se eliminaron mediante filtros de membrana de 0,22 µm. A continuación, las muestras se diluyeron para obtener una serie de réplicas que reflejaran diferentes concentraciones de DOC. Cada réplica de concentración de DOC se enriqueció con un volumen específico de 10.000 ppm de solución estándar de nitrato de potasio, para obtener entre 4 y 6 concentraciones diferentes de nitrato por cada nivel de DOC. Como resultado, se creó una matriz compuesta por 25 a 30 muestras de diferentes combinaciones de concentraciones de DOC y nitrato, que iban desde cero hasta aproximadamente 1.000 ppm de nitrato, y entre cero y aproximadamente 100 ppm de DOC, a partir de los extractos de suelo en cada sitio agrícola.

Los valores iniciales de DOC y Nitrógeno Total (TN, *total nitrogen*) en cada muestra se estimaron mediante un *analizador multi N / C 2100s TOC / TN de Analytic Jena*, mientras que la concentración de nitrato en cada muestra se determinó por cromatógrafo iónico *ICS 5000 de Dionex*. La absorción de cada una de las muestras a 300 nm se determinó utilizando el espectrofotómetro lector de microplacas multimodo *Spark 10 de TECAN*. La absorbancia de la luz se definió mediante la ecuación de Lambert-Beer:

(1)

$$\text{Absorbancia} = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

dónde I refleja la intensidad de la luz después de pasar a través de la solución examinada e I_0 es la intensidad de la luz de la fuente, o la intensidad de la luz de la fuente después de pasar por DDW como referencia.

Se aplicó una técnica de espectroscopia de fluorescencia para medir la concentración de DOC en la solución examinada. El hecho de que la espectroscopia de fluorescencia de DOC no se vea afectada por la presencia de nitrato en la solución hace que sea fácil separar el efecto único de la absorción por nitrato y DOC. Las mediciones de fluorescencia se realizaron mediante espectrofotómetro *Infinite M200 de TECAN* con excitación (EX)/emisión (EM) a 350/451 nm. Los resultados de los análisis químicos y espectrales se utilizaron para obtener una serie de bases de datos matriciales que contienen concentraciones de nitrato y DOC y absorbancia a 300 nm (una por sitio de muestreo). En teoría, la aplicación de una técnica de absorción UV en soluciones acuosas de nitrato debería dar como resultado una correlación lineal clara entre la tasa de absorción y la concentración de nitrato. La figura 4 ejemplifica dicho patrón complejo en la relación entre la concentración de nitrato, la concentración de DOC y la absorción UV para el agua del suelo obtenida de la estación de campo de invernadero convencional. De hecho, dado que tanto el nitrato como el DOC absorben luz en diferentes intensidades a 300 nm, su contribución a la absorbancia total a 300 nm puede describirse como su superposición de absorbancia acumulada. Como tal, un modelo 2D (como se presenta en la figura 4) no es tan adecuado para caracterizar la relación entre la concentración de N / DOC y la absorción UV. La figura 4 muestra la concentración de nitrato frente a la absorción a 300 nm de la matriz de muestras de agua obtenidas del invernadero convencional. Cada punto de datos representa una muestra de agua del suelo con una concentración conocida de DOC (indicada por anotaciones junto a cada punto (ppm)) y con una concentración conocida de nitrato. Cabe señalar que el eje X se convirtió a una escala logarítmica simplemente para mejorar la visualización. Sin embargo, al proyectar los datos en un dominio 3D, se puede ver que la relación entre las tres variables crea un plan que se puede cuantificar matemáticamente (figura 5). La aplicación de un modelo de regresión multivariable (por ejemplo, ecuación polinómica en *(MATLAB)* ha demostrado cómo la concentración de nitrato en una muestra se puede estimar en función del DOC y la absorbancia a 300 nm. La siguiente es una ecuación polinómica general para la estimación de nitrato:

(2)

$$\text{Nitrato}(\text{DOC}, \text{Abs}) = P_{00} + P_{01} \times \text{Abs} + P_{10} \times \text{DOC}$$

Dónde: Nitrato es la concentración de nitrato (ppm), *DOC* indica la concentración de DOC (ppm), *Abs* indica la absorbancia medida a 300 nm (unidades arbitrarias), y P_{00} , P_{10} y P_{01} son los coeficientes obtenidos de las regresiones.

La emisión de fluorescencia a 451 nm de muestras con concentraciones conocidas de DOC se utilizó para desarrollar una curva de calibración para cada sitio, como se muestra en la figura 6. Un análisis de la relación entre la concentración de DOC y la intensidad de fluorescencia en las diversas muestras de agua de diferentes campos, respectivamente, ha demostrado que aunque algunas curvas siguen una misma tendencia, teniendo así curvas de calibración idénticas (huerto de cítricos y campo abierto), cada grupo de muestras tiene su propia ecuación de calibración única debido a la variación en las características químicas y

ópticas del DOC entre los diversos sitios. La composición de la materia orgánica que compone el DOC se ve afectada por las características específicas del sitio, tales como: tipo de cultivo agrícola, actividad biológica en el suelo, el tipo de compost aplicado y el tipo de material utilizado para fertilizar. Por lo tanto, las curvas de calibración para las concentraciones de DOC tienen que ser específicas del sitio para poder utilizarse adecuadamente en la espectroscopia de fluorescencia. Además, dado que la variabilidad química en DOC afecta también al espectro de absorbancia, la ecuación polinómica descrita anteriormente para estimar la concentración de nitrato debería ser preferentemente específica del sitio. No obstante, se concluyó que el impacto del DOC en el espectro de absorción, como resultado de su composición química, permanece relativamente constante a lo largo del tiempo y es una característica específica del sitio. Esto demuestra que una vez que se obtiene una ecuación de calibración inicial, esta ecuación se puede utilizar para ese sitio en particular repetidamente a largo plazo, lo que hace posible una medición continua en tiempo real de la concentración de nitrato en el suelo.

Las mediciones de concentración de DOC, obtenidas a partir de la emisión de fluorescencia a 451 nm, junto con la absorbancia total a 300 nm, permitieron estimar la concentración de nitrato en una serie de soluciones obtenidas de los sitios de campo mencionados anteriormente (figura 7). El modelo conceptual estimó con éxito las concentraciones de nitrato en todos los casos, a pesar de la presencia de DOC en las muestras de agua. La alta correlación entre las mediciones de nitrato observadas y las previstas ($R^2 > 0,96$ y RMSE promedio = 66,4 ppm de nitrato) muestra que la técnica es aplicable para una medición continua y en tiempo real de la concentración de nitrato en el suelo, así como en otras fuentes de agua que contienen DOC. El procedimiento satisface las demandas prácticas de supervisión continua en tiempo real de la concentración de nitrato en el suelo, donde el intervalo de concentración de nitrato puede variar de decenas a miles de ppm durante los ciclos de fertilización e irrigación. En consecuencia, los componentes basados en LED que funcionan a 280-320 nm y los sensores correspondientes se pueden utilizar para el sistema de supervisión en línea, *in situ* de nitratos en suelos agrícolas. No obstante, la técnica de la presente invención puede alcanzar una resolución y una precisión aún mayores en el futuro, cuando se desarrollen fuentes LED de luz UV (212 nm en la figura 2) con una longitud de onda de 200-250 nm y estén disponibles en el mercado.

En la realización anterior, una calibración con respecto a la concentración de nitrato utiliza un conocimiento previo del tipo de DOC en el suelo donde se realiza realmente la determinación de la concentración específica de nitrato (es decir, cuál es el efecto adicional de la mezcla específica de DOC en esa área sobre la absorción). Basándose en este conocimiento previo, se realiza una calibración.

En otra realización más, la identificación del tipo de DOC en el área puede obtenerse automáticamente. En una alternativa, el sistema mide la concentración de nitrato en diversos tipos de DOC mediante la utilización de un procedimiento de dos fases, como sigue:

- a. Una primera fase en la que se realizan tres mediciones ópticas de la solución. La medición óptica puede incluir dos mediciones de absorción y una medición de fluorescencia, o una medición de absorción y dos mediciones de fluorescencia. Se pueden utilizar otras combinaciones de mediciones de absorbancia y fluorescencia a muchas longitudes de onda para obtener una determinación más precisa del tipo de DOC. Cada medición óptica se realiza a una longitud de onda diferente;
- b. Una segunda fase en la que, basándose en los resultados de las mediciones de la primera fase mencionadas anteriormente y en el conocimiento previo de las tablas de consulta de bases de datos que se prepararon con antelación para diferentes DOC, el sistema identifica qué ecuación de calibración o curva de calibración específica utilizar.

En una realización de la presente invención, la unidad de análisis comprende un modelo matemático para extraer el valor de nitrato a partir de las mediciones de absorción, basándose en la ecuación de Beer Lambert:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \times C \times l$$

Donde A es la absorbancia medida a una longitud de onda dada ($\lambda(\text{nm})$), $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de atenuación molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada ($\lambda(\text{nm})$), C es la concentración de iones examinada (mol L^{-1}) y l es una longitud de trayectoria óptica (cm).

La concentración de nitrato se puede obtener mediante un conjunto de dos ecuaciones con dos incógnitas como las siguientes:

$$A1(\lambda_1) = A_{\text{NO}_3^-}(\lambda_1) + A_{\text{DOC}}(\lambda_1) = \varepsilon_{\text{NO}_3^-}(\lambda_1) \times (C_{\text{NO}_3^-}) \times l + \varepsilon_{\text{DOC}}(\lambda_1) \times (C_{\text{DOC}}) \times l \quad (1)$$

$$A2(\lambda_2) = A_{\text{NO}_3^-}(\lambda_2) + A_{\text{DOC}}(\lambda_2) = \varepsilon_{\text{NO}_3^-}(\lambda_2) \times (C_{\text{NO}_3^-}) \times l + \varepsilon_{\text{DOC}}(\lambda_2) \times (C_{\text{DOC}}) \times l \quad (2)$$

De la consolidación de la ecuación (1)+(2) podemos extraer la concentración de nitrato (ecuación (3)):

$$C_{NO_3^-} = \frac{C_{DOC} \left(\frac{A_{NO_3^-}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^-}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{DOC}(\lambda_2) - \varepsilon_{DOC}(\lambda_1)}{\varepsilon_{NO_3^-}(\lambda_1) - \left(\frac{A_{NO_3^-}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^-}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{NO_3^-}(\lambda_2)} \quad (3)$$

- 5 Donde A es la absorbancia medida a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(nm)$), $\varepsilon_{NO_3^-, DOC}(\lambda_{1,2}(nm))$ es un coeficiente de atenuación molar para el nitrato o el DOC ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(nm)$), C_{DOC} es la concentración de DOC (mol L^{-1}) tal como se obtiene de dicho segundo fotodetector, $C_{NO_3^-}$ es una concentración de nitrato (mol L^{-1}), y l es una longitud de trayectoria óptica (cm).
- 10 En otra realización más, se puede utilizar una técnica de aprendizaje automático. El aprendizaje automático puede incluir las siguientes fases:
- 15 a. Generación de múltiples mediciones de absorción y fluorescencia para diferentes valores de concentración de nitrato y diversos tipos de DOC y sus respectivas concentraciones;
 - b. Selección y adaptación de una o más redes de aprendizaje profundo a partir de resultados conocidos;
 - c. Entrenamiento de la red y selección de aquella que prometa el mejor rendimiento;
 - d. Utilización de la red entrenada para calcular la concentración de nitrato basándose en mediciones de absorción y fluorescencia de la manera descrita anteriormente.
- 20 La figura 8 muestra la concentración de nitrato observada frente a la prevista, para el extracto de agua de la mezcla de suelo de humus, obtenida mediante la técnica de la presente invención. En este experimento específico, los datos previstos se obtuvieron para mediciones de absorbancia a 235 nm.
- 25 Si bien algunas realizaciones de la presente invención se han descrito a modo de ilustración, será evidente que la presente invención puede llevarse a la práctica con muchas modificaciones, variaciones y adaptaciones, y con la utilización de numerosos equivalentes o soluciones alternativas que están dentro del alcance de los expertos en la materia, sin apartarse ni exceder el alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Sistema (200) para determinar un nivel de nitrato (118) en una muestra de agua (112), que comprende:

- a. una celda de flujo óptico (206) que es al menos parcialmente transparente y que está configurada para contener una muestra (112) de agua;
- b. un primer iluminador (212) para iluminar la muestra (112) dentro de la celda (206) mediante luz en una primera longitud de onda (312), y un primer fotodetector (222) para recoger la iluminación de la primera longitud de onda, después del paso de la luz a través de la muestra (112);

caracterizado por que comprende además:

- c. un segundo iluminador (214) para iluminar la muestra (112) dentro de la celda mediante luz en una segunda longitud de onda de excitación de fluorescencia (312), y un segundo fotodetector (224) para recoger iluminación en una tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia (324) desde la muestra;
- y
- d. una unidad de análisis para:

d.1. determinar (322) un efecto combinado de nitrato + carbono orgánico disuelto, denominado nitrato+DOC, dentro de la muestra (112) sobre la absorbancia, siendo dicho efecto combinado de nitrato+DOC proporcional a una tasa de absorbancia de luz debido a dicha iluminación por dicho primer iluminador (212), determinándose dicha absorbancia a partir de una diferencia entre un nivel de iluminación por dicho primer iluminador (212) y un nivel de iluminación recogida por dicho primer fotodetector (222);

d.2. dados (a) un nivel de intensidad por dicho segundo iluminador (212) en dicha segunda longitud de onda de excitación de fluorescencia (324), (b) una intensidad de emisión medida (254) desde la muestra en dicha tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia y (c) una calibración predeterminada (340), determinar (344) una concentración de DOC dentro de la muestra, siendo dicha concentración de DOC proporcional a la intensidad (254) de dicha emisión de fluorescencia desde la muestra; y

d.3. deducir dicho efecto del DOC, basándose en la concentración de DOC determinada, restando dicho efecto del DOC de dicho efecto del nitrato+DOC sobre la absorbancia, para determinar de este modo la concentración de nitrato dentro de la muestra.

2. Sistema, según la reivindicación 1, que comprende además una primera tabla de consulta para convertir la diferencia medida en la etapa (d. 1) en un nivel de concentración de nitrato+DOC.

3. Sistema, según la reivindicación 1, que comprende una segunda tabla de consulta para convertir dicha emisión de fluorescencia medida en la etapa (d.2) en dicho nivel de concentración de DOC.

4. Sistema, según la reivindicación 1, que comprende además una tercera tabla de búsqueda, para calibrar el resultado de la resta de la etapa (d.3) basándose en un tipo específico de DOC que se sabe que está en la muestra analizada específica, en el que dicho tipo de DOC refleja una composición química específica de DOC.

5. Sistema, según la reivindicación 1, en el que se utiliza una ecuación matemática para convertir las mediciones de absorbancia y/o fluorescencia en niveles de concentración.

6. Sistema, según la reivindicación 4, que comprende además uno o más iluminadores adicionales y uno o más fotodetectores adicionales, que miden cada uno de ellos la absorbancia y/o la emisión de fluorescencia en longitudes de onda adicionales, para determinar de este modo un tipo específico de DOC dentro de la muestra.

7. Sistema, según la reivindicación 1, en el que dicha unidad de análisis comprende un modelo matemático (240) para extraer el valor de nitrato basándose en dichas mediciones de absorción y fluorescencia, comprendiendo el modelo matemático:

$$C_{NO_3^{-1}} = \frac{C_{DOC} \left(\frac{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{DOC}(\lambda_2) - \varepsilon_{DOC}(\lambda_1)}{\varepsilon_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) - \left(\frac{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) x \varepsilon_{NO_3^{-1}}(\lambda_2)} \quad (3)$$

Dónde A es la absorbancia medida a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(nm)$), $\varepsilon_{NO_3^{-1}, DOC}(\lambda_{1,2}(nm))$ es un

coeficiente de atenuación molar para el nitrato o el DOC ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(\text{nm})$), C_{DOC} es la concentración de DOC (mol L^{-1}) tal como se obtiene de dicho segundo fotodetector, C_{NO_3} es una concentración de nitrato (mol L^{-1}).

5 8. Sistema, según la reivindicación 1, en el que dicha primera longitud de onda se selecciona entre las bandas de 200-250 nm y 280-320 nm, dicha segunda longitud de onda de excitación está dentro de una banda de 225 nm-600 nm, y dicha tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia está dentro de una banda de 250 nm-700 nm.

10 9. Sistema según la reivindicación 1, en el que la muestra de agua (112) se recoge de un suelo cultivado mediante una interfaz porosa (202), y se proporciona en un caudal bajo (204) a través de la celda de flujo óptico (206).

15 10. Procedimiento para determinar una tasa de concentración (340) de nitrato en una muestra de agua (112), que comprende:

a. proporcionar la muestra (112);
b. iluminar (212) la muestra (112) en una primera longitud de onda, y determinar (322) un efecto combinado de nitrato + Carbono Orgánico Disuelto, denominado nitrato+DOC dentro de la muestra (112) sobre la absorbancia, siendo dicha concentración de nitrato+DOC proporcional a una tasa de absorbancia de luz debido a dicha iluminación (212) en dicha primera longitud de onda, determinándose dicha absorbancia a partir de una diferencia entre un nivel de iluminación en dicha primera longitud de onda antes de pasar por la muestra (112) y un nivel de iluminación recogida (252) en dicha primera longitud de onda después del paso a través de la muestra de agua (112);

25 **caracterizado por** que comprende además:

c. iluminar (214) la muestra de agua (112) en una segunda longitud de onda de excitación, y determinar (344) la concentración de DOC dentro de la muestra (112), siendo dicha concentración de DOC proporcional a una intensidad de emisión de fluorescencia (254) desde la muestra en una tercera longitud de onda debido a dicha iluminación (214) de la muestra en dicha segunda longitud de onda, en el que dicha concentración de DOC se determina teniendo en cuenta (a) un nivel de intensidad en dicha segunda longitud de onda de excitación, (b) una intensidad de emisión de fluorescencia medida desde la muestra (112) en dicha tercera longitud de onda, y (c) una calibración predeterminada (232); y
d. deducir (118) el efecto del DOC sobre la absorbancia basándose en la concentración determinada de DOC en la muestra restando el efecto del DOC del efecto combinado (114) de nitrato+DOC sobre la absorbancia, según se determinó, para obtener de este modo la concentración (118) de nitrato en la muestra (112).

40 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, que utiliza además una primera tabla de búsqueda para convertir dicha absorbancia (252) en niveles de concentración de nitrato+DOC.

12. Procedimiento, según la reivindicación 10, que utiliza una segunda tabla de búsqueda para convertir dicha emisión de fluorescencia en un nivel de concentración de DOC.

45 13. Procedimiento, según la reivindicación 10, que utiliza además una tercera tabla de búsqueda, para calibrar el resultado de la deducción basándose en un tipo específico de DOC que se sabe que está en la muestra analizada específica, en el que dicho tipo de DOC refleja una composición química específica de DOC.

50 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 10, en el que se utiliza una ecuación matemática para convertir las mediciones de absorbancia y/o fluorescencia en niveles de concentración.

15. Procedimiento, según la reivindicación 10, que mide además la absorbancia y/o la emisión de fluorescencia en longitudes de onda adicionales, para determinar de este modo un tipo específico de DOC dentro de la muestra.

60 16. Procedimiento, según la reivindicación 10, que comprende además la utilización de un modelo matemático (240) para extraer el valor de nitrato basándose en dichas mediciones de absorción y fluorescencia, comprendiendo el modelo matemático:

$$C_{NO_3^{-1}} = \frac{C_{DOC} \left(\frac{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) \times \epsilon_{DOC}(\lambda_2) - \epsilon_{DOC}(\lambda_1)}{\epsilon_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) - \left(\frac{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_1) + A_{DOC}(\lambda_1)}{A_{NO_3^{-1}}(\lambda_2) + A_{DOC}(\lambda_2)} \right) \times \epsilon_{NO_3^{-1}}(\lambda_2)} \quad (3)$$

dónde A es la absorbancia medida a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(\text{nm})$), $\epsilon_{NO_3^{-1}, DOC}(\lambda_{1,2}(\text{nm}))$ es un coeficiente de atenuación molar para el nitrato o el DOC ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada ($\lambda_{1,2}(\text{nm})$), C_{DOC} es la concentración de DOC (mol L^{-1}) tal como se obtiene de dicho segundo fotodetector, C_{NO_3} es una concentración de nitrato (mol L^{-1}).

17. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que dicha primera longitud de onda (212) se selecciona entre las bandas de 200-250 nm, o 280-320 nm, en el que dicha segunda longitud de onda de excitación (214) está en el orden de 225-400 nm, y dicha tercera longitud de onda de emisión de fluorescencia está en el orden de 250 nm-500 nm.

18. Procedimiento, según la reivindicación 10, que aplica además una técnica de aprendizaje automático, que comprende las etapas de:

- a. generar una pluralidad de mediciones de absorción y fluorescencia para diferentes valores de concentración de nitrato y diferentes tipos de DOC, y sus respectivas concentraciones de DOC;
- b. seleccionar una o más redes de aprendizaje profundo;
- c. entrenar la red y seleccionar aquella que tenga el mejor rendimiento; y
- d. calcular la concentración de nitrato basándose en dichas mediciones de absorción y fluorescencia.

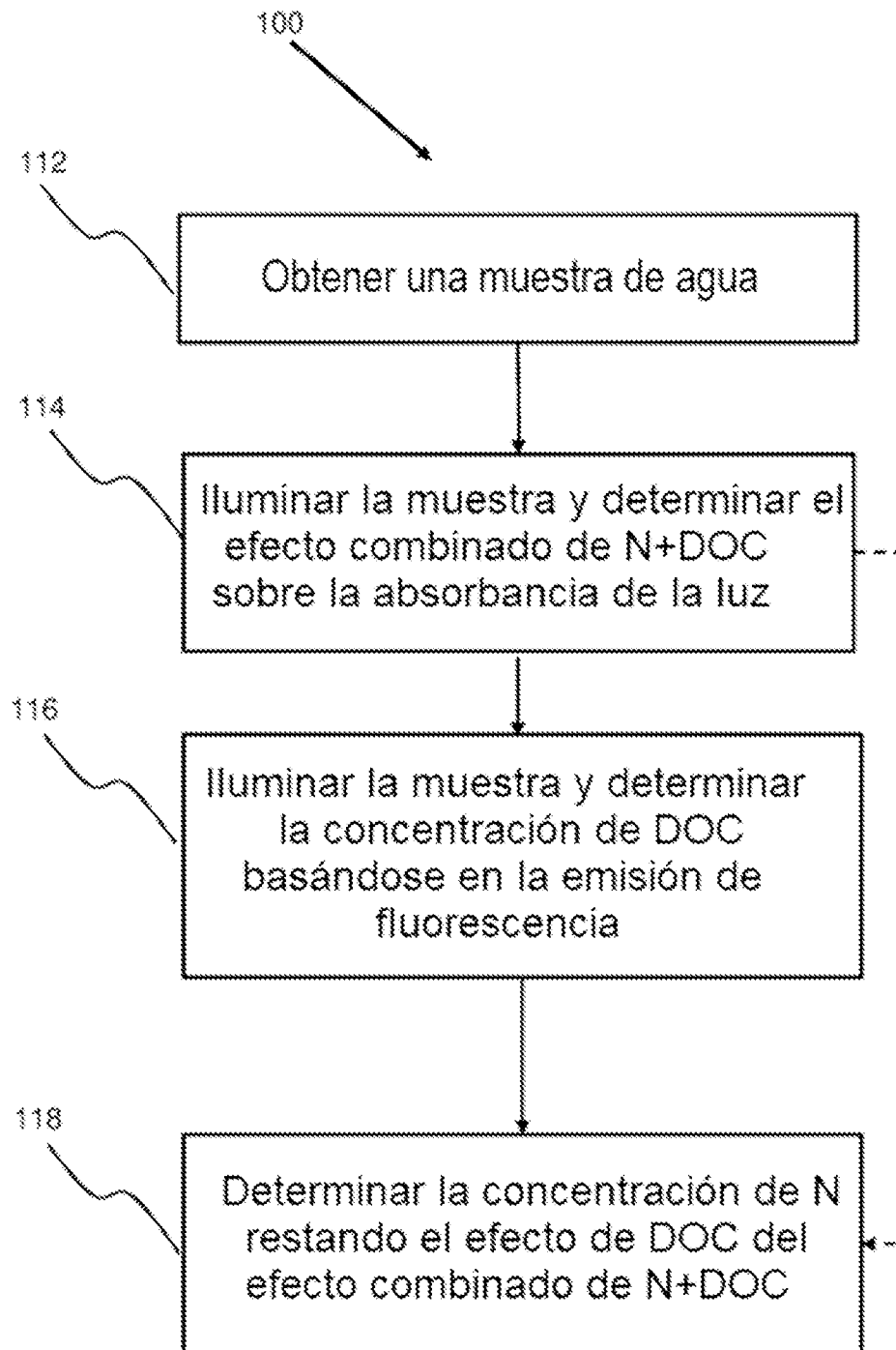


Fig. 1

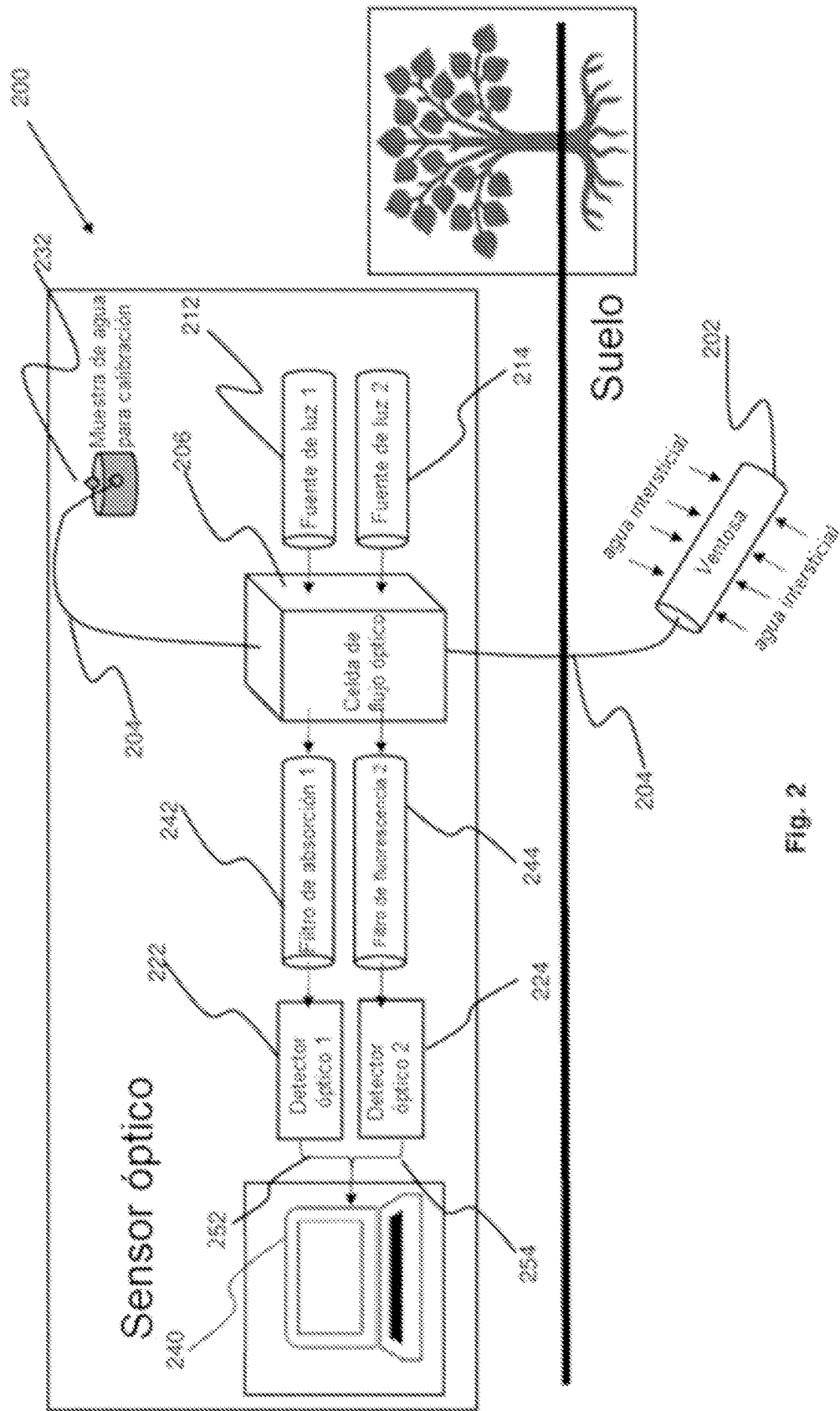


Fig. 2

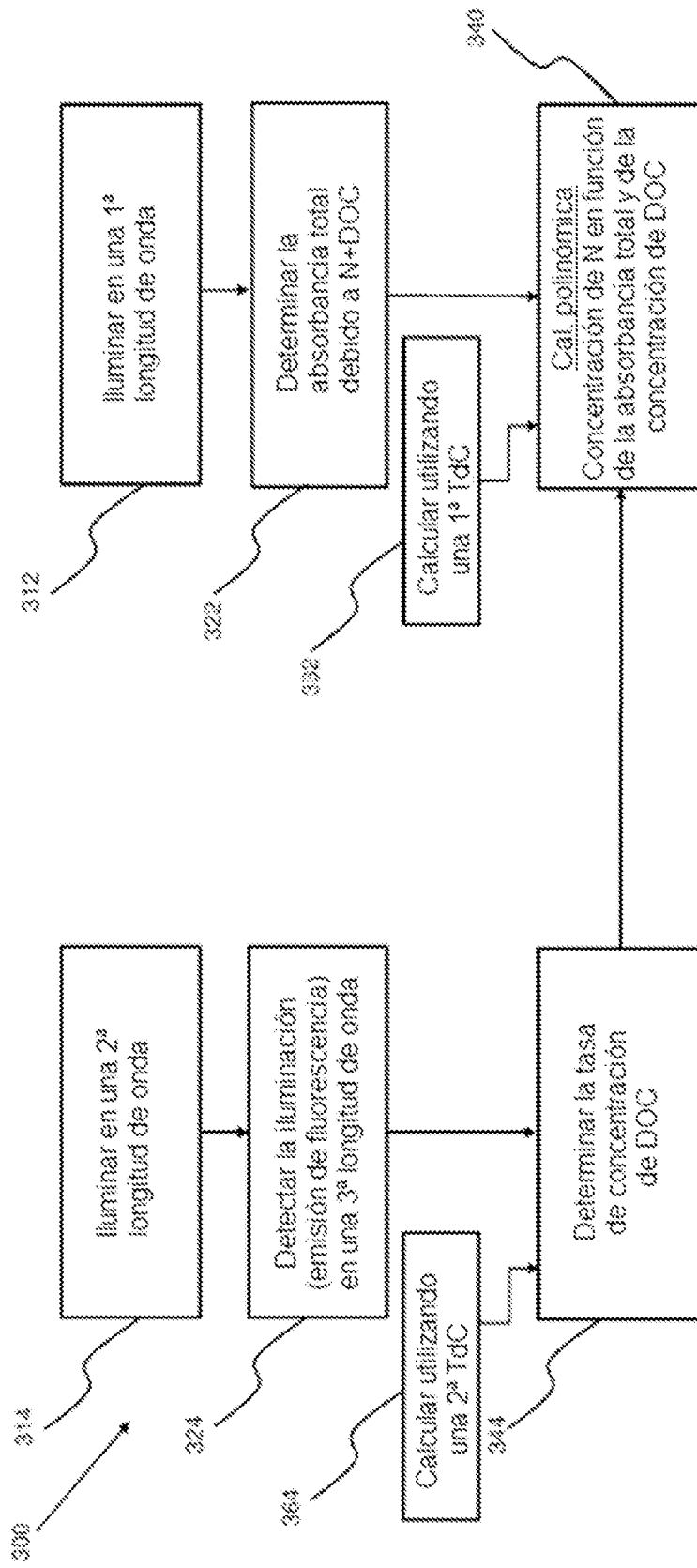


Fig. 3

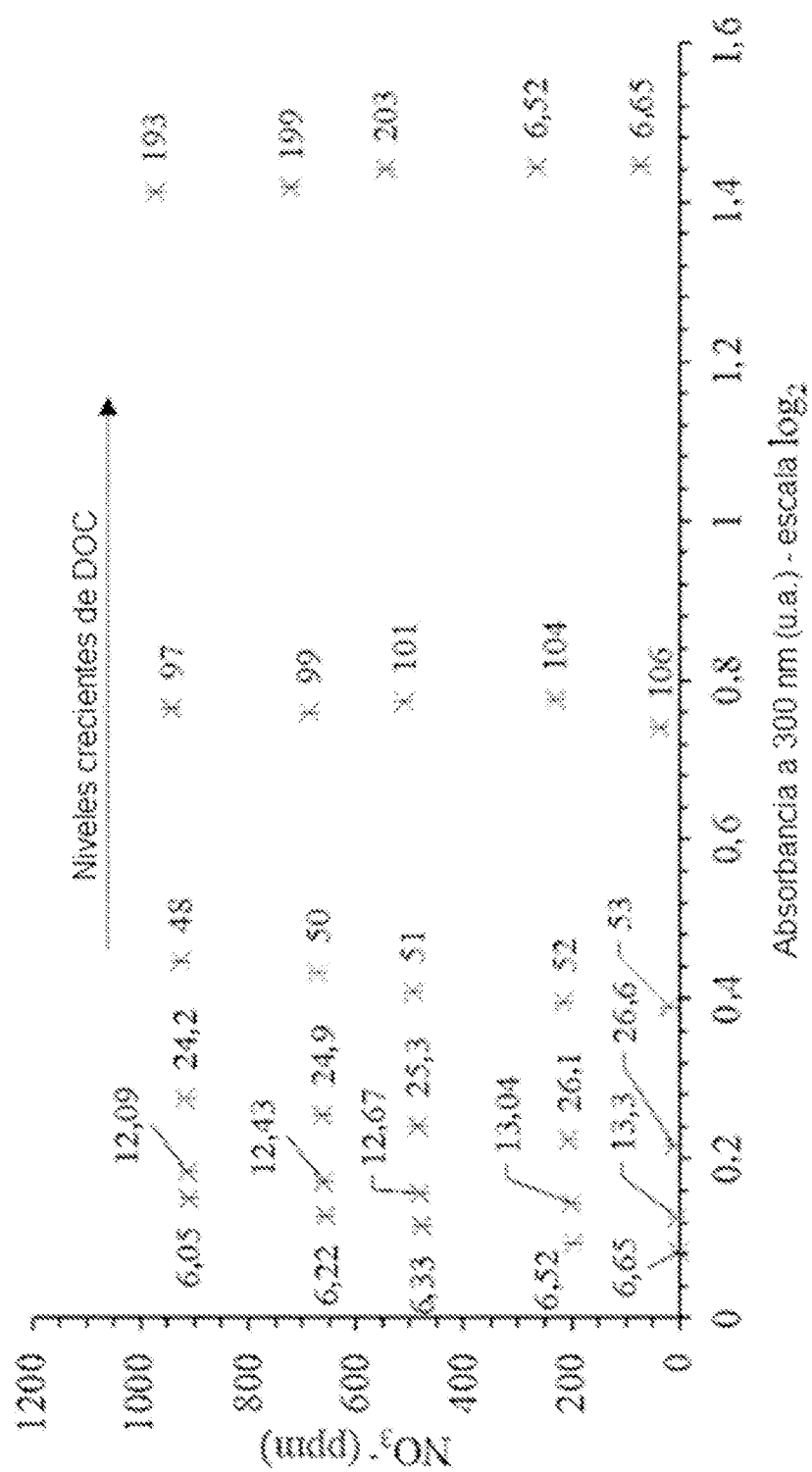


Fig. 4

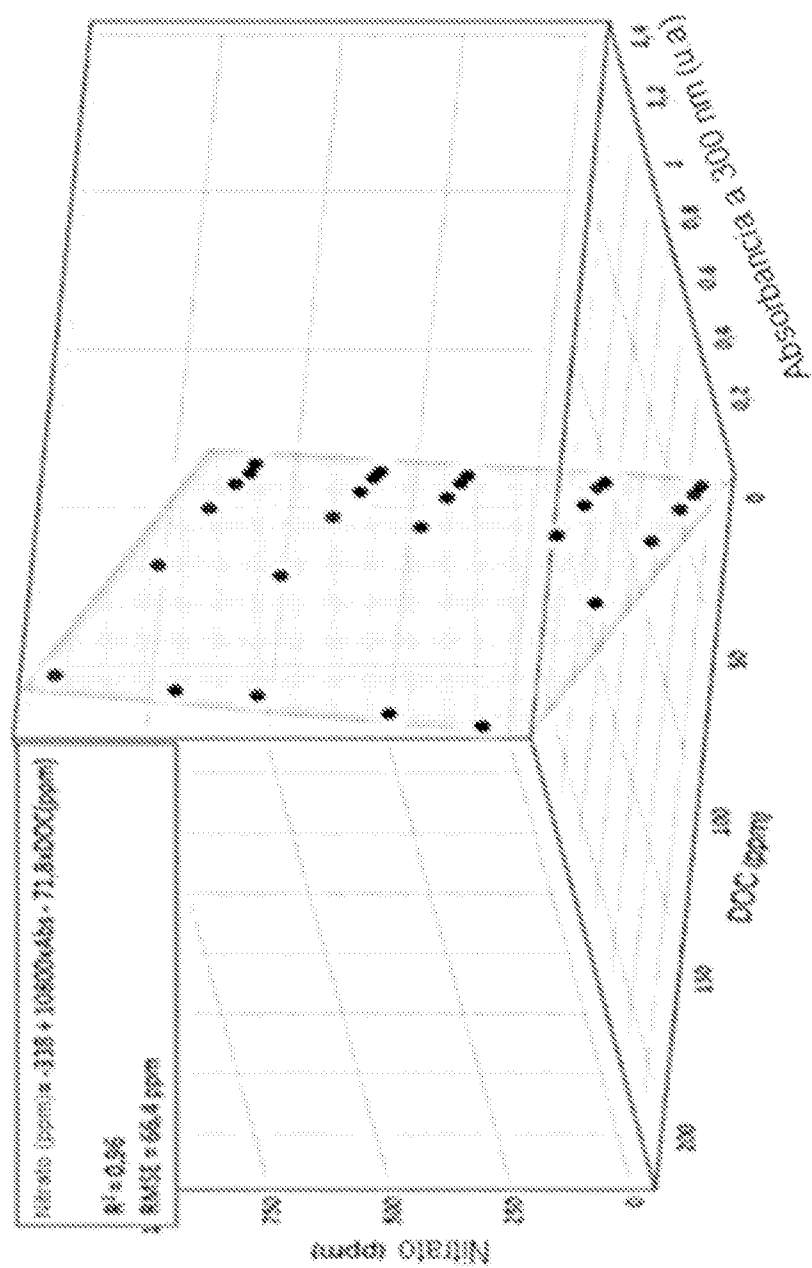


Fig. 5

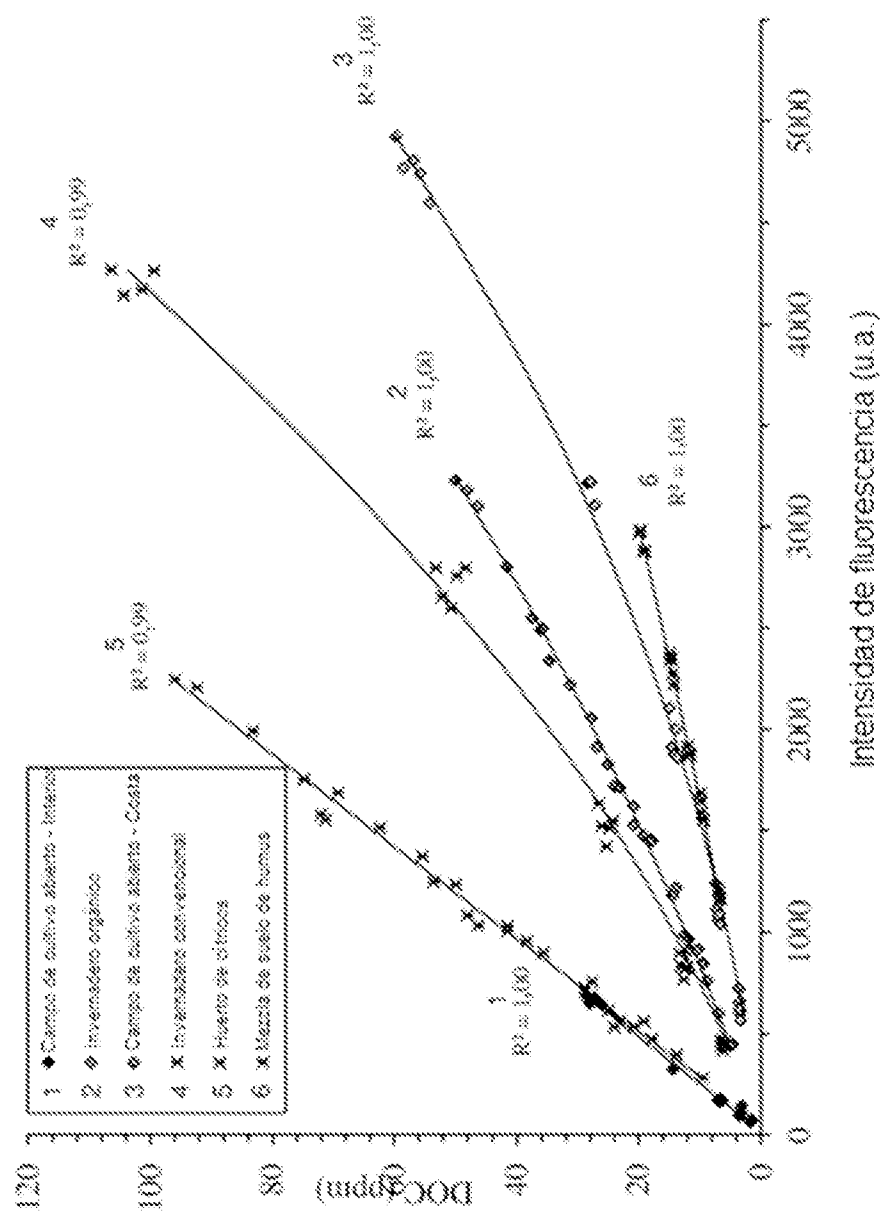


Fig. 6

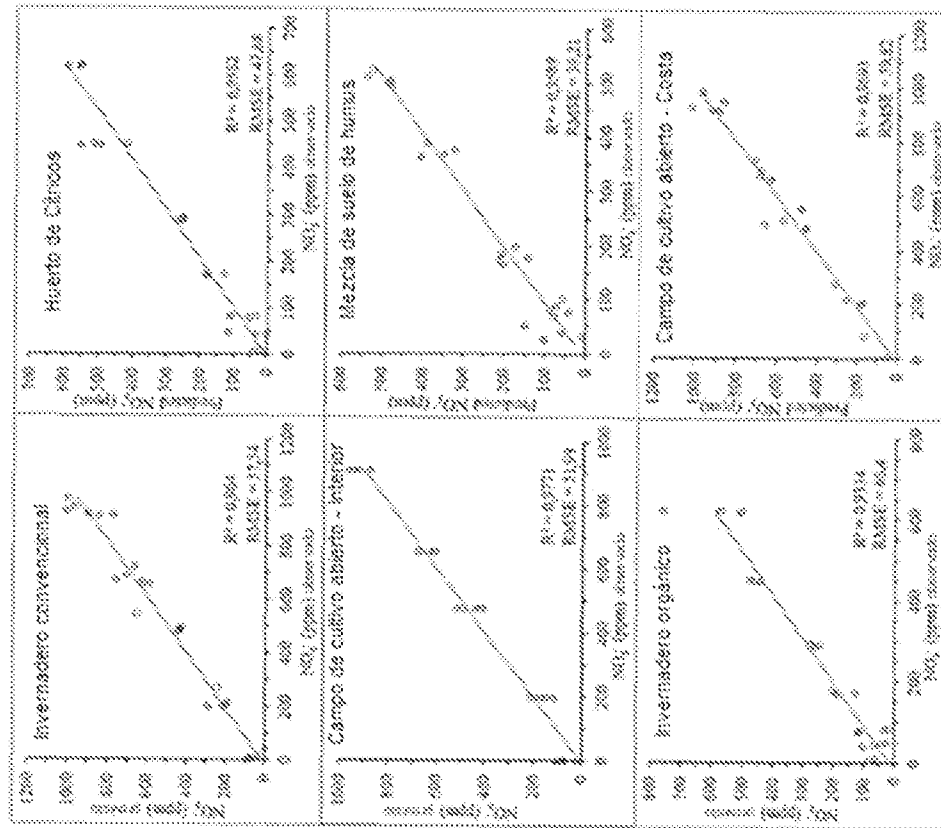


Fig. 7

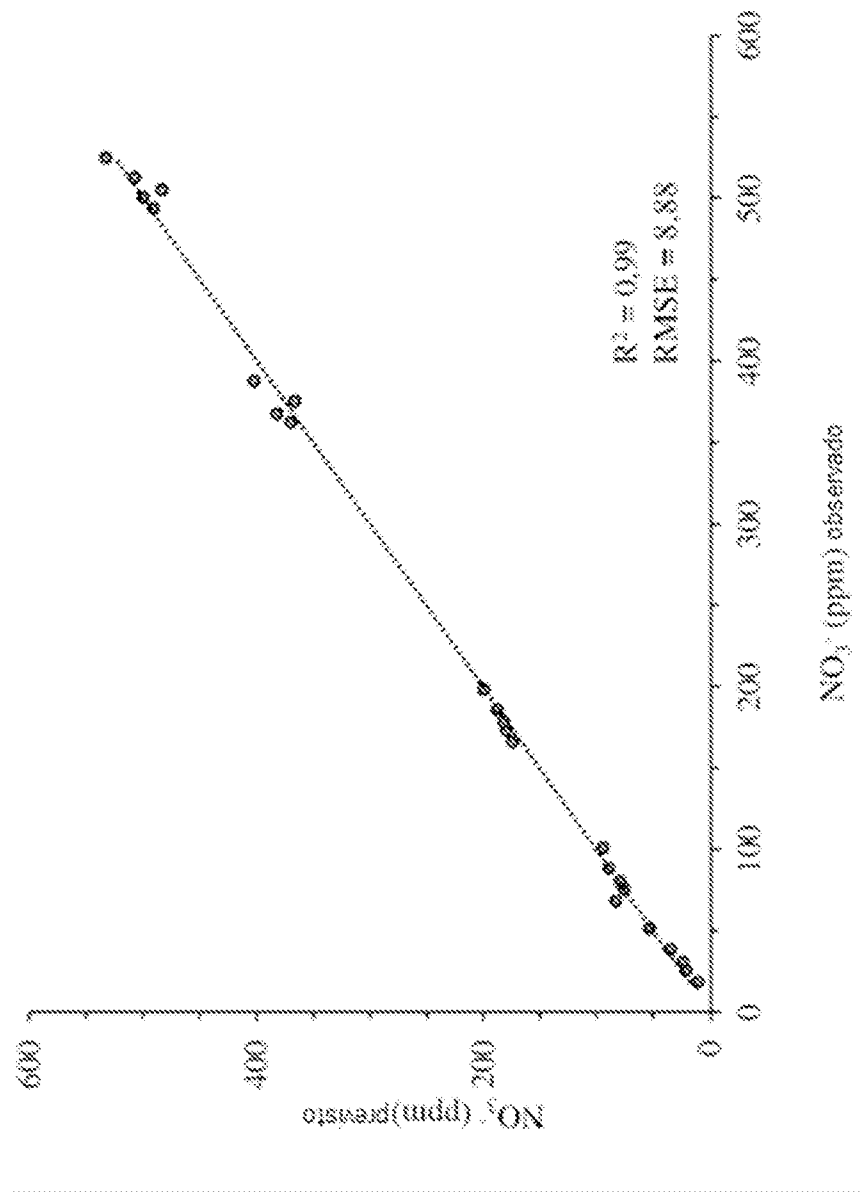


Fig. 8