(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 924 373**

(51) Int. CI.:

G01N 1/28 (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
C12M 1/24 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2018 E 19208984 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022 EP 3628999**

(54) Título: **Dispositivo de muestreo y monitorización multiplexado desplegable en campo y procedimiento de medición de la contaminación bacteriana**

(30) Prioridad:

01.03.2017 US 201762465232 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2022

(73) Titular/es:

FLUIDION (100.0%)
231 rue Saint Honoré
75001 Paris, FR

(72) Inventor/es:

ANGELESCU, DAN y
HAUSOT, ANDREAS

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

Dispositivo de muestreo y monitorización multiplexado desplegable en campo y procedimiento de medición de la contaminación bacteriana

Campo técnico

La presente invención se refiere a un dispositivo de muestreo y monitorización multiplexado desplegable en campo, el cual se puede utilizar para tomar muestras y monitorizar un cuerpo de fluido de manera autónoma, sin contaminación cruzada y en diferentes profundidades. Además, se proporciona un módulo y una metodología de preparación y análisis de muestras que permite mezclar una muestra con un reactivo e incubarla durante un período de tiempo, a la vez que en paralelo se realizan mediciones ópticas de longitudes de onda específicas en la muestra.

Técnica antecedente

En muchos campos, se requiere un muestreo manual seguido de diferentes tipos de análisis de laboratorio para realizar la monitorización de los parámetros de calidad del agua. Tal es el caso de muchas aplicaciones, que incluyen agua potable, aguas residuales, medioambientales, recreacionales, aguas costeras y monitorización de aguas de procedimientos industriales. Tales operaciones de muestreo y análisis requieren tanto equipos como mano de obra, lo que requiere recursos significativos y personal capacitado, lo cual es costoso y requiere mucho tiempo. Además, los resultados pueden no ser totalmente representativos del entorno en el que se recogieron las muestras debido a una cadena de custodia de muestreo inadecuada, lo cual puede dar lugar a la contaminación de la muestra durante la adquisición de muestras, o a cambios de temperatura y procedimientos de degradación de la muestra durante el transporte al laboratorio. El equilibrio químico puede estar afectado, la materia viva de la muestra (por ejemplo, bacterias, algas) puede evolucionar (multiplicarse, o morir) y consumir nutrientes a partir de la muestra, y las interacciones de la muestra con los materiales del tubo y del contenedor pueden conducir la adsorción de determinadas especies en, o liberarse a partir de, las paredes del contenedor o de la tubería. Con el fin de evitar esta degradación de la muestra, es necesario tomar medidas adicionales, tales como la refrigeración de la muestra, o la adición de diferentes tipos de productos químicos, tales como los agentes de fijación. Este requisito aumenta aún más la complejidad y la logística de la recolección y el transporte de las muestras.

A menudo, los eventos que requieren monitorización pueden ocurrir en tiempos imprevisibles (tal como es el caso con las contaminaciones accidentales y las tormentas), o pueden requerir una serie temporal de muestras para proporcionar información con respecto a la composición en diferentes tiempos a lo largo de la duración de un evento (permitiendo el registro de los polutogramas). Esto puede requerir que el personal sea enviado rápidamente y durante largos periodos de tiempo, con altos costes asociados y difíciles requisitos logísticos. De manera alternativa, es posible utilizar equipos de muestreo automático (muestreadores automáticos) que pueden ser activados de manera remota por un comando externo, por un sensor (tal como un sensor de precipitación o una sonda de turbiedad) o que pueden funcionar según un calendario preprogramado. Dependiendo de la aplicación, puede ser necesario adquirir muestras puntuales (las cuales son representativas del medio muestreado en una ubicación y un momento en el tiempo), muestras de composite (múltiples muestras adquiridas a intervalos regulares durante un período de tiempo), o muestras de composite proporcionales al flujo (la muestra se recolecta de manera semicontinua durante un período de tiempo, a una tasa de entrada promedio que es proporcional al caudal de agua medido en el punto de muestreo). El muestreo adaptativo es requerido en determinadas aplicaciones (el inicio de la operación de muestreo es activado por la lectura de un sensor).

Tales muestreadores automáticos deben ser lo más versátiles posible. En particular, deben ser fáciles de instalar y recuperar. Deben ser capaces de tomar muestras en todas las condiciones meteorológicas, en la superficie o a varias profundidades, cerca o lejos de la costa, y sin necesidad de energía externa. Las muestras deben ser representativas del medio en el que se despliega el muestreador. El mecanismo de muestreo no debe introducir la contaminación cruzada entre muestras consecutivas, especialmente si es importante monitorizar los contaminantes a niveles de traza.

El muestreo en aguas abiertas puede requerir el acceso a embarcaciones adecuadamente equipadas, lo cual puede introducir importantes costes adicionales. La complejidad de las operaciones de muestreo y análisis puede crear una pesadilla logística, con un fuerte potencial para los errores humanos. Los riesgos para el personal inherentes a tales operaciones también son significativos, especialmente si el muestreo se realiza en la noche, en aguas abiertas a partir de plataformas flotantes, tales como embarcaciones o barcazas, o durante eventos de tormentas. Determinados tipos de contaminación también pueden suponer riesgos específicos, tales como explosiones, incendios, peligros químicos, radiactivos o biológicos.

Algunos tipos específicos de contaminación, tales como las fugas de petróleo en alta mar, pueden requerir la monitorización de una gran área, en condiciones de aguas abiertas, antes a, durante, y después de determinados eventos o después de aplicar tratamientos de contaminación. Por ejemplo, se pueden requerir múltiples muestras

sincronizadas en diferentes ubicaciones y profundidades alrededor de una plataforma de petróleo en alta mar antes del inicio de las operaciones de exploración y perforación (con el fin de establecer una línea de base), durante la fase de perforación (cuando los riesgos de fugas son más altos, involucran tanto a los petróleos crudos como a los diferentes fluidos de perforación o productos químicos utilizados para el tratamiento), durante la fase de finalización, durante las operaciones de desmantelamiento al final de la vida útil del pozo, así como para la monitorización a largo plazo a lo largo de la fase de producción operativa del pozo.

Del mismo modo, siempre que se produce una contaminación accidental en aguas abiertas, tal como un derrame de petróleo desde un petrolero o una plataforma, es necesario desplegar rápidamente equipos de monitorización en diferentes ubicaciones alrededor del perímetro del derrame con el fin de evaluar la extensión y progresión de los daños a lo largo del tiempo, y evaluar la eficiencia de las operaciones de reparación que se están llevando a cabo (tales como los tratamientos de dispersión desde embarcaciones o aeronaves). Típicamente, tal monitorización necesita ser capaz de evaluar la presencia de hidrocarburos en la parte superior de la columna de agua, y ser capaz de recolectar muestras en diferentes ubicaciones y profundidades antes, a lo largo, y después de que se realice la operación de tratamiento. Tales sistemas deberían monitorear de manera ideal uno o varios indicadores de contaminación, tales como la presencia de fluorescencia, los cambios de pH, u otros parámetros adecuados. Siempre que se cumplan determinadas condiciones, el sistema debe ser capaz de recolectar automáticamente una o varias muestras. Cuando se producen tales eventos de contaminación, la intervención rápida es esencial, con la necesidad de sistemas de monitorización capaces de desplegarse y recuperarse de manera simple y rápida, e idealmente de comunicarse de manera inalámbrica incluso cuando las redes basadas en tierra son inalcanzables.

Otros tipos de contaminación, tales como las filtraciones naturales, pueden requerir una monitorización a largo plazo, y un muestreo cada vez que se cumplan determinadas condiciones (por ejemplo, cuando el nivel de fluorescencia registrado por un fluorímetro alcance un umbral que indique la presencia de petróleo crudo).

Los muestreadores automáticos utilizados actualmente no son sumergibles, y en general utilizan una manguera que se extiende a partir de la unidad hasta el cuerpo de agua y bombas de vacío o peristálticas con el fin de extraer la muestra a partir del cuerpo de agua al muestreador. Tales muestreadores son relativamente difíciles de instalar y existen limitaciones en la altura máxima de instalación, debido al rendimiento limitado de la bomba combinado con la cavitación que puede ocurrir en los tubos. Todas las muestras circulan a través del mismo tubo de muestreo, el cual puede conducir a una grave contaminación cruzada. Por lo tanto, es necesario programar los procedimientos de limpieza en el dispositivo. Tal limpieza simple (es decir, soplar aire o bombear en sentido inverso) puede no ser eficaz para eliminar determinados tipos de contaminación, en particular: las películas de petróleo que pueden adherirse al material de las tuberías, las bacterias las cuales pueden crear colonias en los tubos, los productos químicos y las trazas de compuestos los cuales pueden adsorberse o fijarse de otro modo a las paredes de la tubería o de la bomba. Además, las partículas en suspensión pueden no viajar a la misma velocidad que el agua en los tubos, lo cual puede conducir a un muestreo no representativo. Un tal muestreador no puede tomar muestras a diferentes profundidades, por lo que es necesario utilizar múltiples unidades para ese fin. Por último, si no se dispone de líneas de alimentación y energía, un tal muestreador requerirá una batería adicional y un transmisor inalámbrico, los cuales típicamente no están integrados en la unidad de muestreador, sino que son unidades separadas de un determinado tamaño y peso, lo cual complica aún más el procedimiento de instalación. La instalación requiere tiempo y recursos, y no puede realizarse de manera rápida en situaciones de crisis. El uso de tales instrumentos en mar abierto requiere una embarcación equipada, o la disponibilidad de otro tipo de plataforma flotante apta para el mar, con un coste significativo. Estas limitaciones pueden ser exigentes para muchas de las aplicaciones descritas anteriormente.

Algunas aplicaciones (tales como: garantía de la calidad del agua potable, acuicultura, monitorización de aguas residuales, monitorización medioambiental, monitorización de aguas recreacionales, etc.) requieren un análisis microbiológico del agua para medir la presencia y concentración de patógenos, tales como Enterococos, coliformes fecales, E. Coli y otras bacterias o virus. Tales patógenos pueden introducir un riesgo significativo para la salud de los usuarios finales del agua, y las mediciones suelen ser requeridas para cumplir con la legislación local, regional o federal. Estas mediciones también pueden resultar útiles para fines operativos, por ejemplo, para mejorar los procedimientos de tratamiento del agua, o minimizar los riesgos de una mayor contaminación.

Tales análisis microbianos, requieren típicamente el transporte de la muestra a partir del sitio de recolección hasta un laboratorio, dentro de unas pocas horas siguientes a la recolección y en condiciones de refrigeración para permitir una evolución mínima de las bacterias dentro de la muestra a lo largo del tiempo. La medición de las bacterias presentes en el agua requiere entonces la realización de análisis de laboratorio. Hoy en día se utilizan varias técnicas para medir bacterias, tales como E. Coli o coliformes en general, de las cuales las más utilizadas son sumarizadas más adelante junto con la duración típica del procedimiento:

- La filtración por membrana (opcional), y siembra en medio AGAR en una placa de Petri seguida por la incubación y recuento de colonias (requiere 24-48 horas)

- La medición de la actividad enzimática mediante un cultivo bacteriano en un medio de crecimiento que contiene sustratos enzimáticos específicos que se unen a determinados cromógenos y/o fluorógenos producidos por el metabolismo bacteriano, seguido por la incubación y confirmación visual de la absorbencia y/o fluorescencia (requiere de 18 a 24 horas, y se utiliza como prueba de presencia/ausencia. La muestra puede dividirse en múltiples compartimentos o pozos para proporcionar algún análisis cuantitativo)

- El análisis basado en el ADN que involucra PCR en diferentes formas (PCR cuantitativa o PCR digital) (requiere 12 horas)

- Los procedimientos rápidos en base a las mediciones directas de la actividad enzimática utilizando fluorógenos, con o sin lisis celular, y sin cultivo (2-4 horas, pero no tiene la misma especificidad para E. Coli como un procedimiento basado en PCR o cultivo. No es un procedimiento aprobado)

Actualmente, muchas de estas técnicas no pueden emplearse directamente en el campo, y en el caso de los procedimientos aprobados, los resultados sólo están disponibles después de muchas horas. Combinando la recolección de muestras, el transporte, la preparación y el tiempo de medición, una estimación realista de la duración desde la muestra hasta el informe es de 24 a 36 horas. A veces, es necesario realizar pruebas de confirmación adicionales, lo cual puede aumentar aún más esta duración.

Tales largas duraciones no son adecuadas para la gestión activa de los sitios. Además, los costes de la monitorización regular pueden ser elevados: un solo análisis rutinario de laboratorio puede costar más de 50 dólares, y si se necesita un informe con urgencia, los costes pueden aumentar por un orden de magnitud. Por lo tanto, se necesitan procedimientos de detección rápida integrados en equipos de medición automatizados, los cuales puedan alcanzar la misma especificidad que los procedimientos de laboratorio, pero que produzcan resultados en sólo unas pocas horas, con un menor coste por análisis, y sin necesidad de laboratorios especialmente equipados con personal entrenado. Tales dispositivos pueden ser utilizados como dispositivos de medición precisos, o como estaciones de alerta para advertir con antelación de las contaminaciones microbiológicas.

Se han reportado varias técnicas de cuantificación rápida en línea de E. coli (véase, por ejemplo, R. López-Roldán, P. Tusell, S. Courtois y J. L. Cortina, "*On-line bacteriological detection in water*", Trends Anal. Chem., volumen 44, paginas 46-57, 2013), y algunos se han aplicado a la monitorización de la calidad del agua medioambiental o recreacional (véase, por ejemplo, R. T. Noble y S. B. Weisberg, "*A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters*", J. Water Health, paginas 381-392, 2005). Tales técnicas utilizan una variedad de procedimientos analíticos que van desde la simple dispersión de la luz o las mediciones directas de color y/o fluorescencia (véase, por ejemplo, Andy Baker, Susan A. Cumberland, Chris Bradley, Chris Buckley, John Bridgeman: "*¿To what extent can portable fluorescence spectroscopy be used in the real-time assessment of microbial water quality*?" Science of the Total Environment 532, paginas 14-19 (2015)), hasta complejas técnicas moleculares. Algunos procedimientos rápidos, tales como la PCR Cuantitativa de Transcripción Inversa (véase, por ejemplo, P. Bergeron, H. Oujati, V. Catalalan Cuenca, J. M. Huguet Mestre, S. Courtois, "*Rapid monitoring of Escherichia coli and Enterococcus spp. in bathing water using Reverse-Transcroption-quantitative PCR*", Int. J. Environ. Health, volumen 214, paginas 478-484, 2011) y la medición directa de la actividad enzimática [véase, por ejemplo: J. Baudart, P. Servais, H. de Paoli, A. Henry y P. Lebaron, "*Rapid enumeration of Escherichia coli in marine bathing waters: potential interference of nontarget bacteria*", J. Appl. Microbio, volumen 107, paginas 2054-2062, 2009 D. Wildeboer, L. Amirat, R. G. Price, y R. A. Abuknesha, "*Rapid detection of Escherichia coli in water using a hand-held fluorescence detector*", Water Research, volumen 44, número 8, paginas 2621-2628 (2010) C. Briciu-Burghina, B. Heery, F. Regan: "*Continuous fluorometric method for measuring β-glucuronidase activity: comparative analysis of three fluorogenic substrates*", Analista 140 (17) paginas 5953-5964 (2015); y B. Heery, C. Briciu-Burghina, D. Zhang, G. Duffy, D. Brabazon, N. O'Connor, y F. Regan, "*ColiSense, today's sample today: A rapid on-site detection of β-d-Glucuronidase activity in surface water as a surrogate for E. coli*," Talanta, volumen 148, paginas 75-83, (2016)] proporcionan resultados iniciales en tan solo 4 horas, pero se requiere un tratamiento previo de la muestra relativamente complejo y las técnicas no son fáciles de adaptar para una operación desatendida totalmente autónomo. Más importante aún, tales técnicas pueden sobrestimar la carga bacteriana al contar tanto las células viables como las muertas, y pueden estar sujetas a la interferencia de otras bacterias (particularmente para las mediciones enzimáticas que no implican ninguna etapa de crecimiento). También se han desarrollado procedimientos de biología molecular más específicos en base a la Hibridación Fluorescente In Situ (véase, por ejemplo, J. Baudart y P. Lebaron, "*Rapid detection of Escherichia coli in waters using fluorescent in situ hybridization, direct viable counting and solid phase Cytometry*", J. Appl. Microbio, volumen 109, número 4, paginas 1253-1264, 2010), pero su complejidad significativa los limita por el momento al uso en laboratorios académicos. La Tecnología de Sustratos Definidos (DST), que implica un medio de crecimiento selectivo específico para la bacteria de interés y que contiene sustratos enzimáticos específicos que se unen a determinados cromógenos y/o fluorógenos que son producidos por el metabolismo bacteriano, destaca como una técnica de detección fiable; existen múltiples procedimientos de cuantificación que utilizan ensayos DST y la técnica MPN (algunos miniaturizados utilizando microplacas) (véase, por ejemplo: Informe de la EPA de Estados Unidos: "*Guidelines Establishing Test*

Procedures for the Analysis of Pollutants; Analytical Methods for Biological Pollutants in Ambient Water; Final Rule", Registro Federal de Estados Unidos 40 CFR Parte 136 Volumen 68, número 139 (2003); y "*Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number Method*", NF EN ISO 9308-2, "*Water quality -- Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of E. coli in surface and waste water*" NF EN ISO 9308-3).

Algunos sensores comerciales automatizan el procedimiento de la tecnología de sustrato definido, y proporcionan una cuantificación bacteriana en base al tiempo de aparición de la absorbencia y/o fluorescencia, pero no son adecuados para su despliegue en el campo (véase, por ejemplo, http://adasaproducts.com/en/portfolio/aquabio/).

Existen un número de dispositivos para las mediciones bacterianas automatizadas, como se muestra más arriba. En general, son en base a la automatización de algunas de las técnicas generales mencionadas más arriba. Sin embargo, sigue habiendo un número de dificultades, las cuales están relacionadas con el despliegue en campo de tales dispositivos. Por ejemplo, a menudo tales dispositivos no están totalmente automatizados (requieren la intervención humana en diferentes etapas), o no pueden funcionar con batería (requieren algún tipo de instalación directamente en el punto de medición). No son sumergibles y, a menudo, no integran capacidades de adquisición y preparación de muestras (por ejemplo, mezcla automática con un reactivo específico), especialmente cuando se monitoriza el entorno natural. Los efectos de las propiedades de la muestra, tales como los sólidos y partículas en suspensión, o la temperatura del agua, pueden afectar negativamente a la medición o a su precisión final. La dificultad de descontaminación y limpieza puede complicar aún más la operación en campo para un tal instrumento. Tales dispositivos suelen carecer de la capacidad de enviar datos o alertas en tiempo real, lo cual limita su utilidad como estaciones de alerta microbiológica.

A menudo es importante poder monitorizar los eventos de contaminación bacteriana en una escala de tiempo más corta que el tiempo de medición típico requerido por las mediciones bacterianas automatizadas actuales. Tal es el caso con las descargas rápidas durante los eventos de desbordamiento del alcantarillado combinado, o durante las tormentas, los cuales pueden contribuir rápidamente una contaminación bacteriana significativa a las vías fluviales. Los dispositivos actuales no permiten tal monitorización dinámica.

La monitorización bacteriana debe realizarse a menudo en ubicaciones remotas, sin energía ni infraestructura de comunicación por cable. Algunos ejemplos podrían incluir la monitorización de la calidad bacteriana del agua en un lugar agrícola (monitorización del agua de riego), en un lugar de acuicultura, en un lugar de baño remoto, en un cuerpo de agua, en una boya.

En lo que respecta a los procedimientos de medición cuantitativa bacteriana actuales, muchos se basan en el procedimiento del número más probable (NMP), en el que se llenan un número de pozos con la muestra, cada uno de los cuales actúa como una "incubadora" o "reactor" separado lo cual puede dar una respuesta de presencia o ausencia. En base al número de pozos que registran la presencia de bacterias, es posible inferir estadísticamente el número más probable de bacterias inicialmente presentes en un determinado volumen de muestra. Este procedimiento está limitado en lo respecta, al intervalo de concentración: una muestra que está demasiado concentrada registrará presencia en casi todos los pozos, lo cual limita la capacidad de cuantificación. Por lo tanto, para cubrir todo el intervalo de concentraciones posibles (típicamente cubren varios órdenes de magnitud), se puede requerir realizar múltiples diluciones de la muestra, y medir cada dilución de manera independiente. Lo mismo ocurre con los procedimientos de chapado: si se mide una muestra que está demasiado concentrada, toda la placa estará cubierta de colonias, lo que hará imposible el conteo y la cuantificación. Existen problemas similares cuando una muestra está demasiado diluida, lo cual puede requerir la concentración de las bacterias mediante la filtración de mayores volúmenes de muestra. Existe un problema adicional con tales sistemas de cuantificación: las colonias bacterianas agregadas en una partícula se cuentan como una sola bacteria. Por lo tanto, si el agua que se va a analizar contiene cargas microbianas en forma de partículas, tales procedimientos tienden a subestimar sistemáticamente la concentración microbiana. Un tercer problema está relacionado con el hecho de que los resultados precisos sólo están disponibles después de un tiempo de incubación igual al tiempo máximo de medición.

Los procedimientos basados en PCR pueden ser altamente específicos para la cepa o el tipo de bacteria de interés. Sin embargo, los complejos requisitos de preparación y tratamiento de la muestra hacen que este procedimiento sea poco práctico para la mayoría de las aplicaciones en campo. Otra desventaja es que tales técnicas también pueden detectar materia de ADN de células muertas, y, por lo tanto, no pueden diferenciar entre células activas e inactivas. Las mediciones rápidas en base a la actividad enzimática miden la actividad total de determinadas enzimas que están presentes de manera preponderante en la bacteria objetivo, pero las cuales no pueden diferenciarse de enzimas similares presentes en otros tipos de microorganismos, o incluso dentro de células muertas e inactivas. Por lo tanto, tales mediciones no tienen el requisito de especificidad para la bacteria objetivo (por ejemplo, E. Coli), lo cual puede dar lugar a falsos positivos - la medición actúa, por lo tanto, sólo como un indicador representativo de la presencia de la bacteria objetivo (E. Coli), y depende de la matriz microbiológica local del agua. Tales pruebas, típicamente requieren

la confirmación mediante otras mediciones complementarias con mayor especificidad. Por lo tanto, las mediciones rápidas de la actividad enzimática pueden ser aceptables para una estación de alerta, pero no proporcionan un sensor preciso para la cuantificación de la concentración de la bacteria viva objetivo. La medición requiere una determinación muy sensible y precisa de la actividad enzimática a lo largo del tiempo, lo cual a menudo se mide mediante la fluorescencia de un subproducto de la actividad enzimática. Se requiere un detector de fluorescencia altamente sensible, y las mediciones pueden verse afectadas por las propiedades de la muestra, tales como la turbiedad o el color, lo que requiere correcciones; la medición también requiere un tratamiento previo de la muestra, lo cual puede ser difícil de realizar de forma totalmente automatizada.

Cualquier estación de medición microbiológica automatizada es propensa a la contaminación procedente de muestras anteriores. Por ejemplo, pueden formarse colonias bacterianas en los componentes dentro del instrumento que haya estado en contacto con una muestra anterior. Otro problema al que se enfrentan todos estos instrumentos, especialmente para su despliegue en el entorno natural, es la generación de residuos, los cuales deben ser completamente eliminados, neutralizados, o contenidos.

El documento WO2006/116835 A1 divulga un sistema para el análisis rápido de parámetros microbiológicos. El sistema incluye un contenedor de espécimen para contener una muestra líquida, un alojamiento que tiene una cámara cerrada formada para recibir el contenedor de espécimen, un sistema de incubación montado dentro del alojamiento para incubar materiales microbiológicos dentro de la muestra líquida, y un sistema de espectrofotómetro montado dentro del alojamiento para medir la luz absorbida, emitida o dispersada por las muestras líquidas a medida que los materiales microbiológicos son incubados por el sistema de incubación a lo largo del tiempo. El contenedor de espécimen se llena con una muestra líquida que se va a analizar y se mezcla con un reactivo que proporciona un parámetro detectable, y se coloca dentro del aparato. El sistema de incubación calienta y mantiene la temperatura de la muestra líquida dentro de un intervalo preestablecido, a la vez que el sistema de espectrofotómetro propaga la luz dentro del contenedor de espécimen, y monitoriza y registra los cambios en la luz a medida que ésta se propaga a través del contenedor.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones independientes 1 y 8. Las realizaciones de la invención se establecen en las reivindicaciones dependientes.

Diversas realizaciones proporcionan dispositivos de muestreo capaces de realizar operaciones de adquisición de muestras de forma automática, directamente in situ, evitando a la vez los problemas descritos más arriba. Los dispositivos de muestreo pueden estar configurados para incluir alguna o todas las características siguientes:

- sumergible y/o flotable
- totalmente autónomo y capaz de funcionar con batería con gran autonomía de energía
- robusto, y no afectado por las condiciones meteorológicas o marítimas adversas
- capaz de ser controlado de manera remota y de responder rápidamente a una solicitud de muestreo. Este control remoto puede ser por cable o inalámbrico utilizando, por ejemplo, comunicación por radio, óptica, celular, satelital o acústica
- capacidad para ser programado previamente y adquirir muestras en un horario
- configurado para utilizar diferentes conductos de fluido y diferentes contenedores para cada muestra independiente, de modo que no introduzca contaminación cruzada entre las muestras
- no debe permitir el contacto de fluidos con los conductos de muestreo y el contenedor antes de la operación de muestreo
- configurado para el muestreo de muestras puntuales, el muestreo de composite y/o adaptativo, dependiendo de la aplicación configurada para realizar determinadas operaciones de filtración o preconcentración en cada muestra
- configurado para recolectar muestras a partir de diferentes profundidades, incluyendo cerca de la superficie y, típicamente, en los 10 metros superiores de la columna de agua
- configurado para registrar las coordenadas GPS, así como una marca de tiempo para cada muestra recolectada

- capaz de comunicar a un operador (de manera inalámbrica o siempre que se establezca una conexión por cable) el estado del sistema y de sus parámetros de funcionamiento (es decir, la tensión de la batería, la temperatura, la intensidad de la señal, etc.); las mediciones obtenidas a partir de cualquier sensor que pueda estar fijadas al sistema; la información sobre las operaciones de muestreo en curso; la lista de contenedores disponibles para el muestreo; los datos de la cadena de custodia para cada muestra, tales como el número de contenedor, la ubicación, la profundidad, la marca de tiempo, etc.

- fácil de instalar o desplegar, y fácil de recuperar con un uso mínimo de equipos externos, y debe ser capaz de transmitir información sobre la posición GPS para facilitar la recuperación; los sistemas también pueden tener luces de baliza o radiobalizas para facilitar la identificación y la recuperación

- configurado para mantener las muestras, después de la adquisición, a la temperatura del agua o en condiciones de refrigeración, de modo que minimice la degradación de la muestra

- capaz de preservar las muestras, después de la adquisición, mediante la adición automática de un agente de fijación, biocida u otro producto químico dependiendo de la aplicación, para evitar la evolución de la muestra.

Además, diversas realizaciones proporcionan un procedimiento de medición microbiológica automatizado, un instrumento y un sistema que permite la rápida cuantificación y diferenciación de la bacteria, directamente in situ, con requisitos mínimos de mantenimiento. Para responder a los diversos requisitos de las diferentes aplicaciones, y eliminar las desventajas de los procedimientos e instrumentos existentes, el instrumento puede configurarse para satisfacer uno o todos los siguientes aspectos:

- configurado para funcionar directamente en el cuerpo de agua que se va a analizar (para actuar como estación de alerta en el entorno natural para las áreas de natación, la monitorización del agua de origen, la acuicultura, la agricultura, la monitorización del agua de riego, la monitorización de las aguas pluviales, la monitorización de los flujos de aguas residuales, etc.), o integrado en una estación de medición, en un entorno industrial, dentro de una instalación de tratamiento, o en la red de distribución de agua potable

- integración de las capacidades de muestreo, así como de todas las operaciones requeridas de preparación y tratamiento de las muestras (por ejemplo, mezcla con reactivos, garantía de la muestra, control del volumen, incubación con control preciso de la temperatura, filtración, etc.)

- configurado para eliminar, o minimizar, cualquier posibilidad de contaminación cruzada entre diferentes muestras, tal como, por ejemplo, que los residuos a partir de una muestra altamente cargada contaminen las muestras posteriores y conduzcan a mediciones incorrectas.

- los residuos deben estar bien controlados, y contenidos dentro del dispositivo, o eliminados de manera segura

- ser fácil de mantener y descontaminar para que un técnico no especializado pueda volver a desplegarlo directamente en el campo, y de manera ideal ser susceptible de operar utilizando cartuchos de un solo uso (consumibles)

- ser en base a un procedimiento que satisfaga los siguientes criterios:

    ◦ capaz de proporcionar la cuantificación de todas las bacterias objetivo viables en el medio, incluidas las agregadas en partículas, sin interferencia, o con una interferencia mínima, de otras especies de microorganismos o de bacterias muertas

    ◦ capaz de proporcionar la cuantificación de las bacterias dispersas solamente (eliminar la porción agregada)

- configurado para poder comunicar datos de manera remota, bidireccionalmente, al teléfono móvil de un usuario u operador, o a un servidor

- configurado para una medición rápida: los resultados en casos de contaminación grave deben estar disponibles y transmitirse de manera inalámbrica lo antes posible para permitir una respuesta inmediata y una acción correctiva

- configurado para permitir la cuantificación en un amplio intervalo de concentraciones bacterianas (5-6 órdenes de magnitud), sin requerir diluciones sucesivas de la muestra

- no requiere complejas etapas de preparación de muestras

- configurado para ser altamente robusto y no requerir determinaciones ópticas ultrasensibles, las cuales podrían verse afectadas por diversas propiedades ópticas de la muestra no relacionadas y que podrían ser difíciles de implementar de manera fiable en un sensor de campo totalmente autónomo

- configurado para realizar múltiples mediciones en paralelo, y, por lo tanto, monitorizar la rápida dinámica bacteriana, la cual puede ocurrir durante los desbordamientos del alcantarillado combinado, los vertidos accidentales, o las tormentas

- configurado para funcionar en entornos reales de campo, y ser capaz de resistir variaciones de temperatura y humedad, precipitaciones, golpes, inmersión en agua.

Más particularmente, se proporciona un sistema para procesar muestras de un cuerpo de fluido. El sistema incluye una o más botellas de muestra para adquirir una muestra a partir del cuerpo de fluido. Cada botella de muestra retiene inicialmente un fluido de prellenado. Cada botella de muestra incluye un puerto de entrada de fluido y un puerto de salida de la botella. Cada botella de muestra tiene una válvula de retención de entrada acoplada al puerto de entrada de fluido, la válvula de retención de entrada configurada para permitir que el fluido del cuerpo de fluido entre en una botella de muestra a través del puerto de entrada de fluido cuando la diferencia de presión entre el cuerpo de fluido y el fluido dentro de la botella de muestra alcanza un umbral. El sistema incluye además al menos una bomba, el puerto de salida de la botella de cada botella de muestra acoplada de manera selectiva a la al menos una bomba a través de una válvula de control diferente. La al menos una bomba está configurada, en una primera configuración, para eliminar el fluido de prellenado a partir de cada botella de muestra seleccionada de tal manera que, para cada botella de muestra seleccionada, se alcance el umbral de diferencia de presión y se adquiera una muestra a partir del cuerpo de fluido.

La al menos una bomba puede incluir una bomba de vacío y una bomba de presión, y la bomba de presión actúa para presurizar la(s) botella(s) de muestra seleccionada(s). La al menos una bomba puede ser una bomba bidireccional.

La al menos una botella de muestra puede tener un filtro de bombeo asociado que permite el paso del fluido de prellenado, pero no del fluido del cuerpo de fluido, el filtro de bombeo posicionado de tal manera que cualquier fluido que haya entrado en la al menos una botella de muestra a partir del cuerpo de fluido no pase a través de la válvula de control asociada con la al menos una botella de muestra. El filtro de bombeo puede posicionarse o extenderse dentro de la botella de muestreo de tal manera que sólo se permita la entrada de un volumen predeterminado de fluido a partir del cuerpo de fluido en la botella de muestreo. El fluido de prellenado puede ser un gas, y después de que el volumen predeterminado de fluido del cuerpo de fluido haya entrado en la botella de muestreo, un volumen de gas de prellenado permanece en la botella de muestreo.

De acuerdo con aún otras realizaciones relacionadas, el sistema incluye además al menos un controlador para controlar la al menos una bomba y las válvulas de control. Cada botella de muestra puede incluir un tubo de muestreo que extiende el puerto de entrada de fluido de manera distal a partir de la botella de muestreo, permitiendo que la longitud del tubo de muestreo varíe entre diferentes botellas. El sistema puede incluir un componente desechable que se instala antes de desplegar el sistema para obtener una muestra y se desecha después de que la muestra ha sido obtenida, el componente desechable incluye al menos dos de los siguientes elementos: la botella de muestreo, la válvula de retención de entrada, un filtro de bombeo, un filtro de entrada, tuberías, una válvula de descarga, un reactivo, un tabique móvil, un pistón, una bolsa, un diafragma, un mecanismo de sellado, y un mecanismo de bloqueo para asegurar el componente desechable al sistema, o combinaciones de los mismos.

Al menos una de las botellas de muestra puede incluir un puerto de lavado que está equipado con una válvula de retención de lavado, la válvula de retención de lavado configurada para permitir que el fluido de muestra salga de la botella. Al menos una de las botellas de muestra puede incluir un tabique móvil, un pistón, una bolsa y/o un diafragma que separa el puerto de salida de la botella del puerto de entrada de fluido. La botella de muestra puede incluir un agente de fijación, un reactivo de producto químico, un biorreactivo, un medio de crecimiento, un biocida, una sustancia de conservación, o combinaciones de estos, colocados dentro de la botella de muestra antes de adquirir una muestra de modo que se mezclen o reaccionen con el fluido de muestra una vez adquirida ésta. El sistema puede incluir además un conducto, tubo o colector a través del cual puede fluir el cuerpo de fluido, el puerto de entrada de fluido de cada botella de muestra conectado a dicho conducto, tubo o colector.

El sistema puede incluir además un aparato de control de temperatura para controlar la temperatura del fluido de muestra en al menos una de las una o más botellas de muestreo. El aparato de control de la temperatura puede incluir un controlador, el controlador configurado para: determinar una cantidad total de calor necesaria para elevar la temperatura del fluido de muestra en una botella de muestreo a una temperatura deseada; e inyectar inicialmente la cantidad total de calor determinada en el fluido de muestra tan pronto como el aparato de control de la temperatura sea capaz de funcionar.

De acuerdo con aún otras realizaciones relacionadas, el sistema incluye además al menos un sensor óptico para medir las propiedades ópticas del fluido de muestra en una botella de muestreo, en el que el sensor óptico incluye al menos uno de los siguientes: una fuente de luz, una configuración óptica, un detector de luz, o combinaciones de estos. La fuente de luz puede ser una fuente incandescente, una lámpara halógena, una lámpara de descarga de gas, un diodo emisor de luz, un diodo de láser, o combinaciones de estos. La configuración óptica puede ser una disposición de hardware de alineación óptica, guías de ondas ópticas, fibras ópticas, guías de ondas líquidas, canales de luz, filtros ópticos, filtros de densidad neutra, filtros de interferencia, placas de cuarto de onda, polarizadores, filtros ópticos de paso bajo, filtros ópticos de paso de banda, filtros ópticos de paso alto, espejos, monocromadores, colimadores, rejillas de difracción, aberturas, lentes, componentes ópticos activos, componentes ópticos pasivos, o combinaciones de los mismos. El detector de luz puede ser un fotodiodo, un fototransistor, un fotodiodo de efecto cascada, un fotomultiplicador, un fotoamplificador, un sensor CMOS, un sensor CCD, un espectrómetro, un detector piroeléctrico, un bolómetro, o conjuntos o combinaciones de ellos. El sistema puede incluir además un controlador configurado para determinar cuándo se ha obtenido el fluido de muestra en una botella de muestreo en base a la salida del al menos un sensor óptico. El controlador puede estar configurado para determinar la concentración bacteriana del fluido de muestra en una botella de muestra en función de los tiempos de aparición de la señal de fluorescencia y/o absorbencia obtenidos a partir del al menos un sensor óptico durante la incubación del fluido de muestra. El sensor óptico puede estar configurado para determinar al menos una propiedad óptica, tal como la absorbencia de la muestra a determinadas longitudes de onda, la fluorescencia de la muestra tras la excitación a determinadas longitudes de onda, la turbiedad de la muestra, el índice de refracción de la muestra, y combinaciones de estas.

El sensor óptico para medir la absorbencia puede estar configurado para utilizar múltiples longitudes de onda de luz, las cuales pueden ser selectivamente sensibles a determinadas propiedades ópticas de la muestra. A modo de ejemplo, se puede elegir una primera longitud L1 de onda para que sea sensible a un determinado agente colorante de la muestra el cual absorbe la luz en esa longitud de onda (el sensor mide un aumento significativo de la absorbencia en L1 en presencia del agente colorante), pero no absorbe la luz en una segunda longitud L2 de onda (el sensor no registra ningún cambio de absorbencia en presencia del reactivo). La luz en ambas longitudes L1 y L2 de onda puede ser dispersada por las partículas presentes en la muestra y, por lo tanto, responder de manera idéntica a la turbiedad y medir idénticos incrementos de absorbencia en L1 y L2 en presencia de turbiedad. Al restar la absorbencia medida en L2 a partir de la absorbencia medida en L1 para una muestra determinada, las contribuciones correspondientes a la turbiedad se restarán y anularán, mientras que la contribución correspondiente a la presencia del agente colorante persistirá. Por lo tanto, utilizando dos longitudes de onda adecuadamente elegidas, el sensor óptico puede hacerse específico a la presencia del agente colorante, pero insensible a la turbiedad.

El sistema puede incluir un alojamiento, la al menos una bomba posicionada dentro del alojamiento, y al menos un elemento de flotación tal que el alojamiento flote en el cuerpo de fluido. El sistema puede incluir un controlador configurado para activar la bomba durante una duración limitada de modo que adquiera una cantidad conocida de muestra.

Se proporciona un procedimiento de procesamiento de muestras fluídicas a partir de un cuerpo de fluido. El procedimiento utiliza al menos una bomba y una o más botellas de muestra, cada botella de muestra contiene inicialmente un fluido de prellenado e incluye un puerto de entrada de fluido y un puerto de salida de la botella. El puerto de salida de la botella de cada botella de muestra se acopla de manera selectiva a la al menos una bomba a través de una válvula de control diferente. Cada botella de muestra tiene una válvula de retención de entrada acoplada al puerto de entrada de fluido, la válvula de retención de entrada configurada para permitir que el fluido a partir del cuerpo de fluido entre en una botella de muestra a través del puerto de entrada de fluido cuando la diferencia de presión entre el cuerpo de fluido y dentro de la botella de muestra alcanza un umbral. El procedimiento incluye el posicionamiento del puerto de entrada de fluido de cada botella de muestra en el cuerpo de fluido. La válvula de control de al menos una o más de las botellas de muestra se controla para acoplar el puerto de salida de al menos una botella de muestra a la al menos una bomba. La al menos una bomba está configurada, en una primera configuración, para eliminar el fluido de prellenado a partir de cada botella de muestra seleccionada, de tal manera que se adquiere una muestra a partir del cuerpo de fluido en la botella seleccionada.

De acuerdo con las realizaciones relacionadas, la al menos una bomba incluye una bomba de vacío y una bomba de presión, y la bomba de presión actúa para presurizar la(s) botella(s) de muestra seleccionada(s). La al menos una bomba puede ser una bomba bidireccional. Al menos una botella de muestra puede tener un filtro de bombeo asociado que permite el paso del fluido de prellenado, pero no del fluido a partir del cuerpo de fluido, el filtro de bombeo posicionado de tal manera que cualquier fluido que haya entrado en la al menos una botella de muestra a partir del cuerpo de fluido no pase a través de la válvula de control asociada con la al menos una botella de muestra. El filtro de bombeo puede posicionarse o extenderse dentro de la al menos una botella de muestreo de tal manera que sólo se permita la entrada de un volumen predeterminado de fluido procedente del cuerpo de fluido en la botella de muestreo. El fluido de prellenado puede ser un gas, y después de que el volumen predeterminado de fluido del cuerpo de fluido haya entrado en la botella de muestreo, un volumen de gas de prellenado permanece en la botella de muestreo. El

puerto de entrada de fluido de cada botella de muestra puede extenderse a través de un tubo de manera distal a partir de la botella de muestreo. El procedimiento puede incluir el control, mediante un controlador, de la al menos una bomba y las válvulas de control.

Antes de adquirir el fluido de muestra, al menos dos de los siguientes: la botella de muestreo, la válvula de retención de entrada, un filtro de bombeo, un filtro de entrada, la tubería, una válvula de descarga, el reactivo, un tabique móvil, un pistón, una bolsa, un diafragma, un mecanismo de sellado, y un mecanismo de aseguramiento pueden proporcionarse como un componente desechable. Después de adquirir el fluido de muestra, el componente desechable se desecha.

El procedimiento puede incluir además la separación del puerto de salida de la botella del puerto de entrada de fluido de al menos una de las botellas de muestra utilizando un tabique móvil, una bolsa, un pistón y/o un diafragma flexible. Al menos una de las botellas de muestra puede incluir un puerto de descarga que está equipado con una válvula de descarga, el procedimiento incluye además la presurización de al menos una de las botellas de muestra de tal manera que el fluido sale de la botella de muestra a través del puerto de descarga. El procedimiento puede incluir la proporción, dentro de la botella de muestra, de un agente de fijación, un reactivo de producto químico, un biorreactivo, un medio de crecimiento, un biocida, una sustancia de conservación, o combinaciones de estos, y su colocación dentro de la botella de muestra antes de la adquisición de una muestra de modo que se mezcle o reaccione con el fluido de muestra una vez adquirida la muestra.

El cuerpo de fluido puede fluir a través de un conducto, un tubo o un colector, y el procedimiento incluye además la conexión del puerto de entrada de fluido de cada botella de muestra al dicho conducto, tubo o colector, de modo que recupere las muestras de fluido a partir del cuerpo de fluido en el conducto.

El procedimiento puede incluir el control de la temperatura del fluido de muestra en al menos una de las una o más botellas de muestreo. Un controlador puede determinar una cantidad total de calor necesaria para elevar la temperatura del fluido de muestra en una botella de muestreo a una temperatura deseada; e inyectar, mediante un aparato de control de la temperatura, la cantidad total de calor determinada en el fluido de muestra tan pronto como el aparato de control de la temperatura sea capaz de funcionar.

El procedimiento puede incluir la medición de las propiedades ópticas del fluido de muestra en una botella de muestreo utilizando un sensor óptico, en el que el sensor óptico incluye una fuente de luz, una configuración óptica, un detector de luz, o combinaciones de estos. El sensor óptico puede estar configurado para determinar al menos una propiedad óptica seleccionada a partir del grupo que consiste en la absorbencia de la muestra a determinadas longitudes de onda, la fluorescencia de la muestra tras la excitación a determinadas longitudes de onda, la turbiedad de la muestra, el índice de refracción de la muestra, y combinaciones de estas. Un controlador puede determinar cuándo se ha obtenido el fluido de muestra en la botella de muestreo en base a la salida del al menos un sensor óptico.

El procedimiento puede incluir la determinación, mediante un controlador, de la concentración bacteriana del fluido de muestra en una botella de muestra en función de los tiempos de aparición de la señal de fluorescencia y/o absorbencia obtenidos a partir del al menos un sensor óptico durante la incubación de la muestra fluídica.

De acuerdo con aún otras realizaciones relacionadas, la al menos una bomba, la una o más botellas de muestra, un controlador para controlar al menos la bomba, las válvulas de control o combinaciones de estas están encerradas dentro del alojamiento. Las botellas de muestra pueden estar ubicadas fuera del alojamiento, y en la que cuando el alojamiento se coloca en el cuerpo de fluido, las botellas de muestra están sumergidas en el cuerpo de fluido. Las botellas de muestra pueden estar al menos parcialmente encerradas dentro del alojamiento, y en la que el puerto de entrada de fluido de cada botella de muestra se extiende en el cuerpo de fluido a través de un tubo. El procedimiento puede incluir sumergir de manera total o parcial el alojamiento en el cuerpo de fluido. La al menos una bomba puede estar acoplada a un conducto de escape de la bomba que proporciona comunicación fluídica al exterior del cuerpo de fluido. El procedimiento puede incluir el posicionamiento del alojamiento fuera del cuerpo de fluido, con las botellas de muestra sumergidas en el cuerpo de fluido de tal manera que el puerto de entrada de cada botella de muestra esté a una profundidad predeterminada en el cuerpo de fluido. El procedimiento puede incluir el posicionamiento de la al menos una bomba y las botellas de muestra dentro de un alojamiento, y, además, el posicionamiento del alojamiento y las botellas de muestra fuera del cuerpo de fluido, con el puerto de entrada de fluido de cada botella de muestra que se extiende, a través de un tubo, en el cuerpo de fluido a una profundidad predeterminada. El cuerpo de agua puede ser agua potable.

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento de cuantificación de la contaminación de una muestra fluídica por un tipo de bacteria de interés. El procedimiento incluye la adquisición de un fluido de muestra en una botella de muestra. En el fluido de muestra se mezcla un reactivo que proporciona una firma óptica en presencia de la bacteria de interés. Se mide una señal óptica de fluorescencia y/o una señal óptica de absorbencia a partir del fluido de muestra en múltiples tiempos utilizando un sensor óptico, en el que se utilizan un mínimo de dos longitudes de

onda de luz para medir la señal de absorbencia, siendo las dos longitudes de onda seleccionadas de tal manera que una sea más sensible que la otra a la firma óptica del reactivo. El fluido de muestra se incuba antes a, o durante, la medición. La concentración bacteriana del fluido de muestra se determina en función de la forma de una curva de fluorescencia en función del tiempo y/o de una curva de absorbencia en función del tiempo obtenida a partir del al menos un sensor óptico durante la incubación de la muestra fluídica.

De acuerdo con las realizaciones relacionadas de la invención, la determinación puede incluir la comparación de los tiempos de aparición de la señal de fluorescencia y/o absorbencia con una curva de calibración, la curva de calibración es en base a, al menos en parte, la comparación de los tiempos de aparición de la señal de una pluralidad de fluidos de muestra obtenidos previamente con sus concentraciones bacterianas reales determinadas utilizando otra técnica de referencia. La botella de muestra puede incluir un medio de crecimiento que permita el crecimiento de la bacteria de interés. El sistema puede incluir además múltiples botellas de muestra, cada una de las botellas se utiliza para medir una única muestra de fluido, siendo el sistema capaz de realizar múltiples mediciones en paralelo. Puede ser portátil y/o sumergible, y estar configurado para funcionar con batería y transmitir datos de manera inalámbrica.

De acuerdo con la invención, se proporciona un sistema para cuantificar la contaminación de una muestra fluídica por un tipo de bacteria de interés. El sistema incluye una botella de muestra en la cual se adquiere un fluido de muestra, y un reactivo que proporciona una firma óptica en presencia de la bacteria de interés, que se mezcla con el fluido de muestra. Un sensor óptico obtiene una señal óptica de fluorescencia y/o una señal óptica de absorbencia a partir del fluido de muestra en múltiples tiempos, dicho sensor óptico utiliza un mínimo de dos longitudes de onda para medir la señal óptica de absorbencia, en el que las dos longitudes de onda se seleccionan de tal manera que una sea más sensible que la otra a la firma óptica del reactivo. Un aparato controlador de la temperatura incuba el fluido de muestra. Un controlador está configurado para determinar la concentración bacteriana del fluido de muestra en función de una forma de una curva de fluorescencia en función del tiempo y/o de una curva de absorbencia en función del tiempo obtenida a partir del al menos un sensor óptico durante la incubación de la muestra fluídica.

De acuerdo con las realizaciones relacionadas de la invención, la determinación puede incluir la comparación de los tiempos de aparición de la señal de fluorescencia y/o absorbencia con una curva de calibración, la curva de calibración es en base a, al menos en parte, la comparación de los tiempos de aparición de la señal de una pluralidad de fluidos de muestra obtenidos previamente con sus concentraciones bacterianas reales determinadas utilizando otra técnica de referencia. La botella de muestra puede incluir un medio de crecimiento que permita el crecimiento de la bacteria de interés. El sistema puede incluir además múltiples botellas de muestra, cada una de las botellas se utiliza para medir una única muestra de fluido, siendo el sistema capaz de realizar múltiples mediciones en paralelo. Puede ser portátil y/o sumergible, y estar configurado para funcionar con batería y transmitir datos de manera inalámbrica.

De acuerdo con otra realización, un sistema y procedimiento incluye uno o más dispositivos de análisis de muestras para obtener mediciones de muestras a partir de un cuerpo de fluido. Un servidor está en comunicación bidireccional con uno o más dispositivos de análisis de muestras. Un controlador está configurado para activar, en base a al menos una condición, el uno o más dispositivos de análisis de muestras para obtener las mediciones de la muestra. El controlador está configurado además para analizar las mediciones de la muestra para determinar si se cumple una condición de alerta y, si es así, generar una alerta de usuario. El controlador está ubicado en el servidor, en al menos uno de el uno o más dispositivos de análisis de muestras y/o en un dispositivo remoto a partir del servidor que está en comunicación con el servidor.

Breve descripción de los dibujos

Las características anteriores de las realizaciones se entenderán más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La Figura 1 muestra un dispositivo de muestreo desplegado cerca de un cuerpo de fluido, en este caso un medio de muestreo líquido, para recolectar muestras cerca de la superficie del medio de muestreo;

La Figura 2 muestra un dispositivo de muestreo que incluye dos bombas;

La Figura 3 muestra una aplicación ejemplar en la cual todo el dispositivo de muestreo está sumergido;

La Figura 4 muestra una aplicación ejemplar en la cual el muestreo se realiza a partir de un conducto cerrado por el que circula el fluido de interés;

La Figura 5 muestra un dispositivo de muestreo que incluye una única bomba bidireccional;

La Figura 6(a) muestra un dispositivo de muestreo en el que cada botella incluye un pistón, que separa el puerto de salida de la botella del puerto de entrada de fluido. La Figura 6b muestra un dispositivo de muestreo

con los puertos de entrada de fluido de las diferentes botellas de muestreo conectados a un colector de fluido, lo que permite que cada muestra se adquiera a partir de la línea de fluido dentro de dicho colector;

La Figura 7 muestra botellas de muestra que incluyen una tercera conexión;

La Figura 8 muestra una botella de muestreo que incluye o está en contacto con un aparato 801 de control de la temperatura;

La Figura 9 muestra gráficamente un gráfico de tiempo en función de la temperatura de varios algoritmos de control de la temperatura;

La Figura 10 muestra la botella de muestra equipada con un sensor óptico, de acuerdo con una realización de la invención;

La Figura 11 muestra una vista superior de un sensor óptico que tiene la forma de un anillo de sensor, de acuerdo con una realización de la invención;

La Figura 12 es un gráfico que muestra cómo se puede utilizar un sensor óptico para detectar el llenado de la botella, con el fin de proporcionar una garantía de la muestra;

La Figura 13 muestra una curva de datos de los valores de absorbencia y fluorescencia medidos a lo largo del periodo de incubación, de acuerdo con diversas realizaciones de la invención;

La Figura 14 muestra otra curva de datos de los valores de absorbencia y fluorescencia medidos a lo largo del periodo de incubación, de acuerdo con diversas realizaciones de la invención;

La Figura 15 es un gráfico que muestra que si las mediciones múltiples, realizadas en muestras de diversas concentraciones bacterianas, se trazan contra el logaritmo de la concentración bacteriana real en la muestra original, medida con otra técnica de referencia, se puede obtener una calibración lineal, de acuerdo con una realización de la invención;

La Figura 16 muestra un dispositivo de análisis de muestras ejemplar hecho para utilizar cartuchos desechables;

La Figura 17 muestra un cartucho desechable que puede utilizarse con el dispositivo de la Figura 16;

La Figura 18 muestra una posición alternativa de la válvula de retención de entrada, dentro de la botella del cartucho desechable;

La Figura 19 muestra un cartucho 1901 desechable siendo insertado en un biorreactor de dispositivo;

La Figura 20 muestra un cartucho desechable acoplado con un biorreactor de dispositivo con elementos de sellado acoplados;

La Figura 21 muestra una configuración de sellado como parte del cartucho desechable;

La Figura 22 muestra un diagrama de flujo esquemático que describe el uso de un dispositivo de análisis de muestras hecho para utilizar cartuchos desechables;

La Figura 23 muestra un diagrama esquemático de un sistema de monitorización bacteriana de un sitio, que incluye un dispositivo de análisis de muestras, y que además incluye un servidor o teléfono móvil con el cual dicho dispositivo puede comunicarse, medios para visualizar y analizar los datos transmitidos por el dispositivo, y medios de generación de una alerta cuando los datos del dispositivo cumplan determinadas condiciones.

Descripción detallada de las realizaciones específicas

Un sistema y metodología de muestreo multiplexado permite la recolección in situ de múltiples muestras de fluidos no contaminados de manera autónoma, sin contaminación cruzada, y a diferentes profundidades dentro de la columna de agua según se desee. El sistema de muestreo multiplexado descrito en la presente memoria puede desplegarse para el muestreo directamente en un cuerpo de agua, (tal como, sin limitación: lagos, ríos, canales, tanques de recolección, estanques y/o aguas costeras) o directamente a partir de un conducto a través del cual se transporta de manera física el agua (red de distribución, instalaciones de tratamiento de agua, etc.). Además, se presenta un módulo y una metodología de preparación y análisis de muestras que, ventajosamente, puede permitir que una muestra se mezcle con un reactivo y se incube durante un período de tiempo, a la vez que en paralelo se realizan mediciones ópticas específicas de la longitud de onda en la muestra. Las curvas de datos de medición óptica en función del tiempo

pueden interpretarse para cuantificar, por ejemplo, la concentración de microorganismos de una especie específica contenida dentro de la muestra adquirida. Los detalles se describen a continuación.

Dispositivo de muestreo multiplexado

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “dispositivo de muestreo” (también llamado, indistintamente: un muestreador; un instrumento o sistema de muestreo; un instrumento, dispositivo o sistema de adquisición de muestras), tal como se utiliza en la presente memoria, significará un dispositivo capaz de adquirir y almacenar múltiples muestras físicas de fluidos de un medio de muestreo (por ejemplo, y sin limitaciones, un cuerpo de fluido tal como, sin limitación, un lago, un depósito, un tanque, un estanque, un río, un acuífero, un flujo de salida, agua costera, agua oceánica de profundidad total, y/o un canal abierto), ya sea cerca de la superficie o en profundidad; o a partir de una tubo, una tubería, un canal cerrado, o cualquier otro tipo de conducto, a menos que el contexto requiera otra cosa.

De manera adicional, tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “fluido”, tal y como se utiliza en la presente memoria, significará un líquido o un gas, a menos que el contexto requiera otra cosa.

La Figura 1 muestra un dispositivo **100** de muestreo desplegado cerca de un cuerpo 101 de fluido, en este caso un medio de muestreo líquido, para recolectar muestras cerca de la superficie del medio de muestreo. El dispositivo **100** de muestreo multiplexado que se describe a continuación elimina muchas de las desventajas y deficiencias de los dispositivos de muestreo existentes, los cuales se han descrito más arriba.

El dispositivo **100** de muestreo multiplexado incluye un módulo **111** de bombeo y múltiples botellas **102** de muestreo. El módulo **111** de bombeo puede estar rodeado por un alojamiento **120**, y puede estar comprendido por una bomba **109**, un colector **107** de bombeo y múltiples válvulas **105** de control (válvulas 1,2, ...N), correspondiendo cada válvula **105** a una botella **102** de muestreo diferente (Botella 1, Botella 2, etc.), permitiendo así la capacidad para multiplexar las operaciones de muestreo. La bomba **109** puede tener su lado de baja presión (o conexión de bomba de baja presión) conectado al colector **107** de bombeo. De manera opcional, uno o múltiples alojamientos de protección adicionales pueden rodear los diferentes componentes del dispositivo **100** de muestreo para protegerlos de los golpes y de que se enreden con materias flotantes, tales como hierbas marinas, algas, ramas, etc., o para proporcionar aislamiento térmico. El alojamiento del módulo de bombeo o el alojamiento **120** de protección pueden incluir además puntos de fijación para asegurar de manera física el dispositivo **100** de muestreo. Las botellas **102** de muestreo pueden, de manera opcional, estar instaladas dentro del alojamiento **120** del módulo de bombeo.

En el módulo **111** de bombeo pueden utilizarse diferentes tipos de bombas. En particular, el módulo **111** de bombeo puede ser unidireccional (capaz de transportar fluido en una sola dirección), o bidireccional (capaz de transportar fluido en ambas direcciones). La bomba puede ser, por ejemplo, una bomba de vacío unidireccional. En este caso, el puerto de la bomba que no está conectado al colector **107** de bombeo (por ejemplo, la conexión de la bomba de alta presión en el caso de la bomba de vacío) puede estar abierto al interior del alojamiento del módulo de bombeo, o de manera opcional puede estar conectado, a través de un tubo o conducto, al exterior del alojamiento **120** del módulo de bombeo (como se muestra en la Figura 1). Un módulo **112** opcional de escape de la bomba puede fijarse al escape de la bomba o al tubo o conducto correspondiente, permitiendo el paso del aire de la bomba, pero bloqueando la entrada de fluido en la bomba **109**. Un tal módulo **112** de escape de la bomba puede ser un medio poroso hidrofóbico el cual permite el paso de los gases pero bloquea el paso de los fluidos debido a los efectos de la capilaridad, o puede ser una válvula de retención unidireccional que permite el paso sólo en una dirección (a partir de la bomba que se mueve hacia afuera en el caso de la bomba de vacío, y que se mueve hacia adentro para la bomba de presión), o puede consistir en cualquier otro dispositivo conocido por el experto en la técnica y que realiza una función sustancialmente similar.

Otra realización incluye la posibilidad de presurizar las botellas **102** de muestreo antes del despliegue. En este caso, puede utilizarse una bomba bidireccional capaz de bombear en sentido inverso, para bombear aire a partir del módulo de escape de la bomba y hacia las diferentes botellas **102** con el fin de presurizarlas antes del despliegue.

La Figura 2 muestra un dispositivo **200** de muestreo que incluye una segunda bomba **204** unidireccional la cual actúa como bomba de presión, además de la bomba **205** de vacío unidireccional. La bomba **204** de presión y la bomba **205** de vacío pueden estar conectadas, en este caso, al colector **220** de bombeo utilizando dos válvulas **206** y **207** (válvulas maestras). De manera alternativa, se puede utilizar una sola bomba **501** unidireccional pero capaz de proporcionar vacío en un puerto (funcionando, así como una bomba de vacío) y aire presurizado en el puerto opuesto (como una bomba de presión), y se puede utilizar, una configuración de válvulas maestras, como se muestra en la Figura 5, para seleccionar qué puerto de la bomba (presión o vacío) está conectado al colector de bombeo y qué puerto al escape. En este caso, cuando la bomba necesita funcionar como bomba de vacío, las Válvulas **502** y **505** Maestras de la Figura 5 se mantienen abiertas, mientras que las Válvulas **503** y **504** Maestras están cerradas. Por otro lado, cuando la bomba necesita funcionar como una bomba de presión, las Válvulas **502** y **505** Maestras están cerradas, y las Válvulas **503** y **504** Maestras abiertas. Se entiende que esta configuración de válvulas es sólo ejemplar, y un experto en la técnica reconocerá que podrían utilizarse muchos tipos de válvulas y configuraciones de válvulas diferentes para lograr una

función similar. Por ejemplo, se pueden utilizar válvulas de tres vías en lugar de simples válvulas de encendido y apagado. Asimismo, pueden utilizarse válvulas de cierre, o válvulas normalmente abiertas o cerradas.

El colector de bombeo, la bomba, o cualquier otro componente que pueda ser presurizado por la bomba de presión puede estar conectado además a un mecanismo de alivio de presión, el cual permite que el aire presurizado escape si la presión aumenta más allá de un límite predefinido. Esto puede proporcionar seguridad contra la explosión, en caso de que la presión aumente de manera incontrolada. Tal protección también puede ser proporcionada directamente por la bomba de presión, en caso de que su presión máxima alcanzable esté por debajo del límite de explosión peligrosa.

El fluido por muestrear es un líquido, y se puede utilizar una bomba de líquido dentro del módulo de bombeo. Una tal bomba de líquido puede ser, por ejemplo, una bomba peristáltica, una bomba centrífuga, una bomba de turbina, o cualquier otro tipo de bomba de líquido conocida en la técnica. Dependiendo de la dirección de rotación del motor de la bomba peristáltica, una tal bomba puede bombear el fluido fuera de, o dentro del colector de bombeo. El puerto de la bomba que no está conectado al colector de bombeo está, en este caso, conectado al exterior del módulo de bombeo. También se puede incluir un mecanismo de alivio de presión, como el descrito más arriba, para proporcionar protección contra la sobrepresurización.

Las válvulas maestras y las válvulas de control descritas más arriba pueden ser operadas utilizando la electrónica de control (no se muestra gráficamente) dentro de, por ejemplo, un controlador, tal como para abrir o cerrar la conexión de la bomba de vacío o de la bomba de presión al colector de vacío. De nuevo con referencia a la Figura 1, el colector **107** puede tener múltiples puertos **126** para las N botellas **102** de muestreo, un puerto para cada botella 1... N. Entre el colector **107** y cada botella **102** existe N válvulas **105** de control, siendo cada una capaz de operar, según las instrucciones de la electrónica de control, la apertura o el cierre de la conexión entre el colector **107** y la respectiva botella **102**. Las válvulas **102** maestras (véase la Figura 5, **502-505**) y de control pueden ser cualquier tipo de válvula conocida por un experto en la técnica, tal como, sin limitación: una válvula solenoide, una válvula de encendido y apagado, una válvula de tres vías, una válvula accionada de manera neumática o hidráulicamente, una válvula mecánica, una válvula accionada por membrana, una válvula capacitiva, una válvula que utilice efectos de tensión superficial del fluido, una válvula MEMS o una válvula microfluídica.

La electrónica de control puede formar parte del módulo de bombeo y está destinada para proporcionar comunicación, control de muestreo y/o capacidad de registro de datos. La electrónica de control, la cual puede ser un controlador o un módulo de control, puede comprender, sin limitación, uno o varios de los siguientes elementos: una o varias placas electrónicas; un reloj de tiempo real; una memoria; una batería, un panel solar, un conector de energía externa, u otro medio de alimentación del módulo de control; uno o múltiples procesadores o microcontroladores, que permiten el control de las válvulas maestras y de control, el registro de un programa de muestreo, la ejecución de dicho programa de muestreo en los tiempos programados, y la comunicación externa. El módulo de bombeo puede incorporar además medios de comunicación externa, tales como, y sin limitación: un puerto de comunicación en serie o paralelo; un puerto USB; un módem de comunicación por cable o inalámbrico y la correspondiente antena. El módulo de bombeo puede contener un módem GSM para comunicarse con un teléfono móvil o con otro módem GSM, o puede contener otros tipos de módulos de comunicación por radio, tal como, sin limitación, Iridium, LoRa o Sigfox, así como las antenas correspondientes. También puede contener una unidad GPS y la antena correspondiente.

La electrónica de control también puede estar conectada a uno o múltiples sensores externos, y ser capaz de leer los valores medidos por tales sensores. Dependiendo de los valores medidos, la electrónica de control puede operar de manera automática el módulo de bombeo, de modo que active, por ejemplo, la adquisición de una muestra por el dispositivo de muestreo. Se puede implementar un algoritmo dentro de la electrónica de control que define qué condiciones que relacionan las lecturas de los sensores actuales y pasados dan lugar a una operación de adquisición de muestras. Los sensores pueden incluir, pero no se limitan a: sensores para medir el nivel del fluido, el caudal del fluido, la velocidad del fluido, o para detectar la precipitación; sensores para medir la conductividad, el pH, la salinidad, la temperatura, u otros parámetros físicos del medio de muestreo; sensores para medir la composición química del medio de muestreo; sensores para medir la fluorescencia, la absorbencia, el color, la turbiedad u otras propiedades ópticas del medio de muestreo; sensores para detectar o medir la contaminación microbiológica; así como cualquier otro tipo de sensores y dispositivos de medición conocidos en la técnica.

Múltiples dispositivos de muestreo pueden ser controlados a partir de una única puerta de enlace central, la cual se comunica con los dispositivos a través de un protocolo por cable o inalámbrico para implementar el control del dispositivo y coordinar las operaciones de muestreo, y para recolectar y procesar los datos opcionales de posicionamiento y del sensor de fluidos.

Las válvulas **105** de control en el módulo **111** de bombeo están fijadas a su respectiva botella **102** de muestreo, ya sea directamente o utilizando cualquier tipo de elementos de conexión, tales como una tubería, una canalización, un canal o microcanal, u otro tipo de conducto o combinaciones de estos conocidos por el experto en la técnica. Tales

elementos de conexión pueden extenderse de manera opcional dentro de la botella. La botella de muestreo puede incluir un recipiente **116** que define un volumen, así como dos conexiones de botella, un puerto **114** de entrada de fluido y un puerto **115** de salida de la botella. Cualquiera de las conexiones **114** y **115** de la botella puede estar fijada directamente al recipiente **116**, o a un adaptador de muestreo separado, a su vez fijado a la botella de manera hermética. Las conexiones **114** y **115** de la botella pueden colocarse en o cerca del tapón de la botella **102**, cerca de la parte inferior de la botella **102**, o en cualquier otra posición relativa a la botella **102**. La función del recipiente **116** es almacenar el fluido muestreado, y puede tener cualquier forma, no necesariamente parecida a una botella. Puede estar hecho de cualquier material, tal como y sin limitación: vidrio, metal, plástico, cerámica, materiales de composite. Es deseable que el recipiente sea químicamente compatible con el medio de muestreo, y que no interfiera química o físicamente con los compuestos de interés de la muestra.

Las botellas **102** de muestreo se llenan inicialmente con un fluido de prellenado el cual puede ser un gas (tal como el aire), o un líquido (tal como el agua). De manera ilustrativa, en las realizaciones en las cuales las botellas **102** están prellenadas con un gas, cada botella puede estar equipada con dos conexiones: un puerto **115** de salida de la botella que permite bombear el gas fuera de la botella **102**, y un puerto **114** de entrada de fluido que permite que el fluido muestreado entre en la botella **102**. Las válvulas **105** de control del módulo **111** de bombeo están conectadas al puerto **115** de salida de cada botella. De manera opcional, se puede instalar un filtro **106** de bombeo entre la válvula **105** de control y la botella **102**, posicionado, por ejemplo y sin limitación, en una de las siguientes posiciones, sin limitación: cerca de la válvula **105** de control; en el elemento de conexión entre la válvula **105** y la botella **102**; sobre la botella **102** o dentro de la botella **102**, o en el adaptador de muestreo (ya sea en el exterior - Botella N de la Figura 1, o en el interior de la botella - Botella 1 de la Figura 1). Dicho filtro **106** de bombeo está destinado para permitir el paso de gas (por ejemplo, aire), pero detener el fluido a partir del cuerpo del fluido/medio **101** de muestreo, evitando así inundar el interior de la bomba **109** de vacío con fluido. El filtro **106** de bombeo puede incluir, como ejemplo no limitativo, un medio poroso hidrofóbico o una membrana la cual permite el paso de gases, pero bloquea el paso de líquidos debido a los efectos de capilaridad. Cuando el filtro **106** de bombeo está instalado dentro de la botella **102**, la posición del filtro **106** de bombeo puede utilizarse para detener físicamente el bombeo de aire fuera de la botella de muestreo por el módulo **111** de bombeo, cuando el bombeo entra en contacto con el medio de muestreo (por ejemplo, y sin limitación, un líquido, tal como el agua), siendo, por lo tanto, capaz de dictar un volumen de muestreo exacto. Un ejemplo de tal filtro **106** puede ser una membrana porosa hecha, por ejemplo, de PTFE o de cualquier otro material hidrofóbico, y que tenga un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para bloquear por efecto capilar el paso del fluido por muestrear cuando se somete a una presión diferencial típica de la producida por la bomba **109** de vacío. El filtro **106** de bombeo puede extenderse además dentro de la botella **113** de muestreo, lo cual permite un mayor control del volumen de muestreo.

La Figura 6(a) muestra un dispositivo **600** de muestreo en el que cada botella **102** puede incluir un pistón **644**, que separa el puerto **615** de salida de la botella del puerto **614** de entrada de fluido. El pistón **644** puede colocarse inicialmente cerca del puerto **614** de entrada de fluido, de tal manera que, cuando el fluido de muestreo entra en la cavidad, se separa completamente del fluido **650** de prellenado (el cual puede ser un gas o un líquido). De manera alternativa, en lugar del pistón **644**, se pueden utilizar otros tipos de elementos flexibles no permeables, tales como una bolsa o un diafragma flexible, los cuales garanticen la misma función de separación del fluido de muestreo que el fluido **650** de prellenado originalmente presente en la botella **602**. Además, cada botella **102** puede ser precargada, en el lado de entrada del pistón **644**, con una pequeña cantidad de agente de fijación, biocida, u otra sustancia o producto químico utilizado dentro de la industria para conservar la muestra. Dicha sustancia o producto químico puede colocarse en la botella **102** entre el pistón **644** y el puerto **614** de entrada de fluido antes de su despliegue. La bomba **601** necesita estar adaptada para bombear el fluido **650** de prellenado inicialmente presente en las botellas **10**2. La bomba **601** puede ser una bomba de vacío en caso de que el fluido **650** de prellenado sea un gas, o una bomba de líquido, en caso de que el fluido **650** de prellenado sea un líquido. Tal bomba **601** puede utilizar cualquier tecnología de bombeo conocida en la técnica, tal como, sin limitación: una bomba de membrana, una bomba peristáltica, una bomba de pistón, una bomba centrífuga, una bomba de desplazamiento positivo, etc. La bomba **601** puede ser unidireccional (configurada para mover el fluido fuera de las botellas), o bidireccional (capaz de mover el fluido en cualquier dirección).

La Figura 6b muestra un dispositivo **650** de muestreo con los puertos **614** de entrada de fluido de las diferentes botellas **102** de muestreo conectadas a un colector **603** de fluido, permitiendo que cada muestra sea adquirida a partir de la línea **604** de fluido dentro de dicho colector **603**. De manera ilustrativa, todas las muestras pueden entrar en el colector **603** a través de una entrada **605** común. La botella **102** conectada a la última salida del colector **603** puede utilizarse para tomar muestras a una pequeña cantidad de fluido antes del muestreo en las otras botellas. Esto permite descargar de manera eficaz la línea **604** de fluido, y asegurar que las muestras adquiridas en las otras botellas estén libres de contaminación del fluido estancado presente en la línea **604** de fluido.

En la Figura 6b, los puertos **614** de entrada de fluido de las diferentes botellas **102** de muestreo se muestran conectados a un colector **603** de fluido, permitiendo que cada muestra sea adquirida a partir de la línea **604** de fluido

dentro de dicho colector. Todas las muestras entran en el colector **603** a través de una entrada **605** común. La botella **606** conectada a la última salida del colector **603** puede utilizarse para tomar muestras a una pequeña cantidad de fluido antes del muestreo en las otras botellas. Esto permite descargar de manera eficaz la línea **604** de fluido, y asegurar que las muestras adquiridas en las otras botellas estén libres de contaminación del fluido estancado presente en la línea **604** de fluido.

La Figura 7 muestra botellas **102** de muestra que incluyen una tercera conexión **701**. La tercera conexión **701**, denominada un puerto de descarga, puede estar ubicada en el mismo lado del pistón **644** que el puerto **614** de entrada de fluido, y la cual está equipada con una válvula de descarga que permite que el fluido de muestreo salga de la botella pero que evita que se desplace en dirección opuesta. Tal puerto **701** de descarga puede incluir, sin limitación, una válvula de retención, una válvula unidireccional, una disposición de bola y resorte, una membrana flexible, un regulador de contrapresión, o puede tener cualquier otra construcción que permita realizar una función similar. Al operar repetidamente la bomba **601** de modo que inicialmente extraiga el fluido de muestreo hacia la botella **102** a través del puerto **614** de entrada de fluido, y luego en dirección opuesta para expulsar el fluido muestreado fuera de la botella a través del puerto **701** de descarga, el interior de la botella **102** de muestreo puede ser descargado de manera eficaz, reduciendo así la cantidad de posible contaminación de la muestra y mejorando su representatividad. Es preferente, en este tipo de operación, asegurar que el fluido que sale del puerto de la bomba conectado al exterior del módulo de bombeo, así como el fluido que sale de los puertos de descarga de las diferentes botellas, sea guiado (utilizando una tubería, una canalización, o cualquier otro tipo de conducto conocido en la técnica) a un área donde no pueda interactuar con, o contaminar, el medio de muestreo.

El puerto **11**4 de entrada de fluido de cada botella **102** puede conectarse, directamente o utilizando una tubería de muestreo, una canalización o cualquier otro tipo de conducto fluídico conocido por el experto en la técnica, a una válvula de entrada y, a continuación, al medio **101** que se va a muestrear. Una tal válvula **103** de entrada puede permitir que el fluido entre en la botella **102** una vez que la presión a través de la válvula **103** alcance un determinado nivel, denominado presión de rotura de la válvula. Una tal válvula **103** de entrada puede consistir, sin limitación, en una válvula de retención, una válvula unidireccional, una disposición de bola y resorte, una membrana flexible, un regulador de contrapresión, o puede tener cualquier otra construcción que permita realizar una función similar. La válvula **103** de entrada también puede actuar como una válvula de retención direccional o unidireccional, bloqueando el desplazamiento del fluido y los gases en la dirección de la botella hacia el exterior. La válvula **103** de entrada también puede desempeñar el papel de aislar la muestra del medio **101** de muestreo después de la adquisición de la muestra. La tubería de muestreo que conecta cada botella con la válvula de entrada correspondiente puede tener diferentes longitudes, y puede extenderse a diferentes ubicaciones, o a diferentes profundidades en el medio por muestrear (como se muestra en las Figuras 2 y 3). De manera alternativa, la tubería de muestreo puede posicionarse cerca de la superficie del agua. Como ya se ha mencionado, el puerto **114** de entrada de fluido puede conectarse a un tubo, a una tubería, o a cualquier otro conducto que contenga o haga circular el fluido por muestrear (véase la Figura 4). De manera ventajosa, los puertos **114** de entrada de fluido y/o las correspondientes válvulas **103** de entrada pueden posicionarse de tal manera que se minimice la cantidad de volumen muerto contenido entre las dichas válvulas **103** de retención y la porción representativa del fluido **101** por muestrear.

Una botella **102** de muestreo también puede incorporar un filtro **211** de entrada, como se muestra en la Figura 2, entre el puerto **114** de entrada de fluido y el medio **101** de muestreo. Un tal filtro **211** puede ser un filtro físico utilizado para retener las partículas por encima de un determinado tamaño, o puede ser un filtro químico, el cual retiene determinados componentes químicos, dependiendo de propiedades tales como, sin limitación: polaridad, estructura, hidrofobicidad, peso molecular, presencia de determinados radicales. Un tal filtro **211** puede incluir, por ejemplo, un filtro o columna de extracción en fase sólida, un filtro que recolecta y concentra material radiactivo, un filtro biológico, un medio absorbente, un medio de barrido, un dispositivo de preconcentración, un preconcentrador de cromatografía de gases, un filtro hidrofóbico, un filtro hidrofílico, un filtro o columna de exclusión por tamaño, un filtro mecánico, un tamiz, una membrana porosa, una frita, una esponja, un filtro de hidrocarburos, una columna de separación, un filtro de carbón activado, o cualquier otro tipo de filtro o dispositivo de separación conocido en la técnica, así como sus posibles combinaciones. El filtro **211** puede ser recolectado durante la recuperación de la botella y analizado posteriormente.

Cada botella **102** puede estar, al menos parcialmente, prellenada con un producto tal como, sin limitación: un reactivo químico, un medio de absorción, un biocida, un agente de fijación, un reactivo biológico, un medio de cultivo, o una combinación de estos; mientras que la muestra, cuando entra en la botella **102**, entra en contacto y/o se mezcla con dicho producto.

Cada botella **102** puede estar equipada con un sensor para confirmar que la operación de llenado de la botella se está realizando de manera correcta. Un tal sensor puede consistir en una sonda de temperatura, una sonda de conductividad, un sensor electroquímico, un sensor óptico, un sensor magnético para detectar el movimiento del pistón, un interruptor de láminas, una sonda de densidad, una medida física, una medida de fuerza, una medida de deflexión, una medida química, una medida biológica o bioquímica, o cualquier otro tipo de sensor o combinación de

los mismos conocido por el experto en la técnica y que sea capaz de detectar la presencia del fluido de muestreo en la botella.

Es evidente que el dispositivo de muestreo descrito evita los problemas de contaminación cruzada que son inherentes en otros sistemas de muestreo: utilizando un único puerto de entrada de fluido y una tubería de muestreo por botella, cada muestra se recolecta de manera completamente independiente de las muestras anteriores y posteriores, entrando el fluido de cada muestra únicamente en contacto con los componentes de la botella de muestreo correspondiente.

El dispositivo de muestreo puede estar separado del medio de muestreo (véanse las Figuras 4 y 5) o puede ser parcial (véanse las Figuras 1 y 2) o totalmente sumergido (véase la Figura 3). En caso de sumersión parcial o total, el alojamiento del módulo **111** de bombeo puede ser estanco de modo que proteja la electrónica de control del contacto involuntario con el agua. Los módulos **110** y **112** opcionales de escape de la bomba, así como una antena **301** opcional de comunicación (véase la Figura 3), pueden extenderse a una ubicación por encima del nivel del agua.

Además de ser estanco, el alojamiento del módulo **111** de bombeo también necesita ser capaz de resistir la presión hidrostática a la profundidad en la que se despliega el dispositivo de muestreo, en caso de inmersión total. Esto podría lograrse mediante el uso de materiales y un diseño mecánico que garantice una resistencia mecánica suficiente para resistir la tensión mecánica impartida por la presión hidrostática, o mediante el uso de un enfoque de presión equilibrada, por lo que el interior del módulo **111** de bombeo está completamente lleno con un fluido **702** de presión equilibrada, como se muestra en la Figura 7 (tal como, por ejemplo y sin limitaciones, un aceite mineral no conductor, un aceite de silicona, un aceite fluorado o un material similar) que está sustancialmente a la misma presión que el medio de muestreo. Con el fin de tener en cuenta la contracción y la compresión a medida que el dispositivo se despliega en profundidad, se puede utilizar un módulo **704** de compensación de presión que puede incluir un sistema de fuelle, o un diafragma, o cualquier otra técnica de compensación de presión conocida en la técnica, para igualar la presión del fluido de equilibrio de presión con la del medio de muestreo (véase la Figura 7). Una vez que tales presiones se igualan, las fuerzas que actúan sobre los diferentes elementos mecánicos disminuyen en gran medida, y se reduce la necesidad de resistencia mecánica. Tales enfoques de presión equilibrada se utilizan de manera común en la industria submarina y oceanográfica, con el fin de reducir el tamaño y el peso de los alojamientos de presión para los módulos electrónicos o los motores, y el experto en la técnica reconocerá que se conocen muchas técnicas para realizar un dispositivo de presión equilibrada.

Además del requisito de la sección del módulo de bombeo para resistir las presiones hidrostáticas en profundidad, las botellas **102** de muestreo y los tubos también necesitan ser diseñados con suficiente fuerza mecánica para resistir la tensión mecánica impartida por la presión hidrostática, cuando no se utilizan en la configuración de presión equilibrada. De manera ilustrativa, en el caso de que las botellas **102** de muestra y los tubos estén equilibrados por presión, serán prellenados con fluido en el lado de la bomba del pistón **644** (véase la Figura 6a), a la vez que el lado de entrada del pistón **644** puede ser prellenado con agua desionizada, agua salina, agente de fijación, biocida o cualquier combinación de estos.

El alojamiento del módulo **111** de bombeo o el alojamiento de protección adicional también puede estar equipado con elementos **210** de flotación, como se muestra en la Figura 2, que están hechos de materiales o composites que son menos densos que el agua, tales como (y sin limitación): espuma de célula cerrada, ladrillos de espuma sintáctica, bolsas o componentes llenos de aire, determinados plásticos o madera. Estos elementos **210** de flotación deben proporcionar suficiente flotabilidad para permitir que el dispositivo de muestreo flote en el medio **101** de muestreo. También se puede añadir un peso adicional como lastre, para mantener el dispositivo de muestreo en una orientación deseada a la vez que flota, tal como en orientación vertical, por ejemplo. Existen muchas formas diferentes de lograr el equilibrio y la orientación de un dispositivo flotante en un cuerpo de agua u otro fluido y son conocidas por el experto en la técnica.

Ejemplos de despliegue y funcionamiento del dispositivo de muestreo

A continuación, se describen diversos tipos de despliegue y de operación posibles de un dispositivo de muestreo. Debe entenderse que los siguientes despliegues y la operación del dispositivo de muestreo son ejemplares, y no pretenden ser limitantes.

En un primer ejemplo de aplicación, que se muestra en la Figura 1, el dispositivo se despliega cerca de un medio de muestreo líquido para recolectar muestras cerca de la superficie del medio **101** de muestreo. El módulo **111** de bombeo está posicionado fuera del medio de muestreo, mientras que las botellas **102** pueden estar sumergidas en el medio **101** de muestreo de modo que sus puertos **114** de entrada estén a la profundidad de muestreo deseada. Cuando se solicita la adquisición de una muestra, el módulo de control electrónico ordena la apertura de la válvula **105** de control correspondiente a la botella de muestreo seleccionado, y activa la bomba **109** de vacío. A medida que la bomba comienza a eliminar el aire de la botella a través del colector **107** y el tubo **108** de bombeo, y también a través del filtro

104 de bombeo opcional, la presión en la botella **102** comienza a caer, y la correspondiente presión diferencial a través de la válvula **103** de entrada de la botella aumenta. El aire de la bomba **109** se expulsa a través de un filtro **112** de escape, opcionalmente fijado a la bomba a través de un tubo **110**. Una vez que esta diferencia de presión alcanza la presión de rotura de la válvula de entrada, la válvula **103** de entrada permite que el agua pase a través, llenando así el recipiente **102**.

El volumen total muestreado puede ser controlado por la cantidad de tiempo que la bomba **109** de vacío está activada, y por la caída de presión creada por la bomba **109** de vacío durante la operación. Para permitir un mejor control del bombeo, la electrónica de control también puede estar conectada a un sensor de presión, el cual puede leer la presión en el puerto de baja presión de la bomba de vacío o, de manera alternativa, dentro del colector de vacío. La electrónica de control también puede incluir un segundo sensor que mide la profundidad donde se realiza el muestreo. De manera alternativa, la profundidad de muestreo puede ser suministrada a la electrónica de control por medio de un comando externo o de un parámetro de configuración.

La electrónica de control puede activar la bomba **109** de vacío durante cortos períodos de tiempo para adquirir sólo una pequeña cantidad de fluido cada vez. La electrónica de control puede ajustar la cantidad de tiempo de activación de la bomba **109** en base a una combinación de información a partir del sensor de presión, del sensor de profundidad, o de la profundidad de muestreo conocida, de modo que controle con precisión la cantidad de muestra adquirida en cada operación de muestreo. Esto puede repetirse en intervalos de tiempo, añadiendo las cantidades muestreadas cada vez a la botella **102** de muestreo para crear una muestra de composite. Una aplicación típica puede ser la adquisición de una muestra de composite de 24 horas. Otra aplicación puede ser la adquisición de muestras proporcionales al flujo, mientras que la electrónica de control muestrea pequeños incrementos de fluido a una frecuencia o tasa que es proporcional a la lectura de un sensor de caudal o de velocidad de flujo.

La electrónica de control puede activar la bomba **109** durante el tiempo suficiente para adquirir una sola muestra puntual, la cual llena parcial o totalmente el recipiente. El tiempo de la bomba **109** puede ser controlado de tal manera que recolecte el volumen exacto de muestra deseado.

El filtro de bombeo puede ser instalado fuera de la botella (filtro **104** de bombeo), o dentro de la botella (filtro **106** de bombeo). Mediante la instalación del filtro **106** de bombeo dentro de la botella, el volumen total muestreado puede ser controlado por la posición del filtro de bombeo. Tras la activación de la bomba de vacío, la elevación del nivel de fluido en la botella alcanzará, después de un determinado tiempo T de bombeo, el nivel en el que está instalado el filtro **106** de bombeo. Una vez lleno de fluido, el flujo a través del filtro **106** de bombeo se detendrá, lo cual detendrá de manera eficaz la acción de bombeo. El nivel de fluido puede continuar elevándose ligeramente, hasta que la presión en la botella **102** sea insuficiente para superar la presión de rotura de la válvula de entrada, momento en el cual se detendrá el flujo de fluido hacia la botella **102**. Este procedimiento permitiría controlar el volumen de fluido independientemente de la profundidad a la que se realice el muestreo. El filtro **106** de bombeo puede extenderse dentro de la botella a través de una boquilla o tubería **113**, lo cual permite un mayor control del volumen de muestreo.

En los casos descritos más arriba, la profundidad de muestreo está típicamente limitada por la presión de rotura de las válvulas **103** de entrada utilizadas: de hecho, si la diferencia entre la presión hidrostática del medio **101** de muestreo y la presión dentro de una botella **102** supera la presión de rotura de la válvula **103** de entrada correspondiente, el medio **101** de muestreo entrará en la botella **102** y comenzará a llenarla hasta que la válvula **103** de entrada se cierre de nuevo.

Las botellas **102** también pueden estar ubicadas fuera del medio **101** de muestreo líquido, en cuyo caso sus puertos **114** de entrada de fluido pueden estar conectados con tuberías al medio **101** de muestreo, a la profundidad de muestreo deseada. Tal muestreo requiere la succión de las muestras a partir del medio de muestreo, a través de la tubería de conexión, y hacia las botellas **102**; la altura a la cual las botellas **102** pueden ubicarse por encima del nivel del fluido líquido está limitada, por lo tanto, por un lado, por el rendimiento de la bomba (su capacidad para producir un vacío suficiente) y, por otro, por la altura máxima de la columna de fluido que puede extraerse sin producir cavitación.

En una segunda aplicación ejemplar, el muestreo en profundidad se consigue conectando el puerto **11**4 de entrada de agua de cada botella **102** a la tubería **202** que alcanza la profundidad deseada. De manera ilustrativa, cada botella **102** puede estar configurada para tomar muestras a una profundidad **201** diferente (se muestra en la Figura 2), o todas las botellas pueden tomar muestras a la misma profundidad. Un filtro **211** de entrada opcional puede ser colocado en la tubería de entrada a una botella **102**. Las válvulas **103** de entrada pueden colocarse en el nivel de la botella, o también podrían colocarse en profundidad. Esta última colocación, como se muestra en la Figura 2, limita el acceso del medio **101** de muestreo a la tubería **202** de muestreo hasta que se haya iniciado la operación de muestreo, limitando o eliminando así la contaminación por el fluido contenido en la tubería **202** el cual no sería representativo del medio de muestreo en el momento del muestreo. Con el fin de garantizar que la diferencia entre la presión hidrostática del medio **101** de muestreo y la presión dentro de las botellas **102** no supere la presión de rotura de las válvulas **103**

de entrada, las botellas **102** pueden presurizarse antes del despliegue. Tal presurización puede realizarse de manera manual (por ejemplo, inyectando aire presurizado a través de la válvula **10**3 de entrada de cada botella **102**, estando dicho aire a una presión similar a la presión hidrostática donde se pretende realizar el muestreo), utilizando una bomba manual, un compresor, una bombona de aire presurizado (u otro gas), una línea presurizada, un regulador de presión, o cualquier otro medio conocido en la técnica. En otras realizaciones, y de manera conveniente, el dispositivo de muestreo puede incluir, además de la bomba **205** de vacío, una segunda bomba **204**, denominada “bomba de presión”, cuya función es lograr dicha presurización antes del despliegue. En este caso, la conexión de baja presión de la bomba de vacío, y la conexión de alta presión de la bomba de presión pueden conectarse utilizando válvulas **206**, **207** maestras en el colector. Los escapes de las bombas **204** y **205** también pueden conectarse, mediante tuberías, canalización, u otros tipos de conexión, al exterior del alojamiento de bombeo, y a los módulos **208** y **209** opcionales de escape de la bomba. Tanto la bomba **204** de presión como la bomba **205** de vacío pueden utilizar el mismo módulo de escape, siempre que permita el paso del gas en ambas direcciones (tal como, por ejemplo, una membrana hidrofóbica seca).

Cuando se desea presurizar una determinada botella **10**2, la válvula **206** maestra correspondiente a la bomba **204** de presión, así como la válvula **105** de control correspondiente a la botella **102** se abren, la válvula **207** maestra correspondiente a la bomba **205** de vacío se cierra, y la bomba **204** de presión es operada. Esto bombeará aire a la botella **102**, aumentando así la presión. Por supuesto, todas las válvulas **105** de control podrían abrirse de manera simultánea para la presurización simultánea de todas las botellas **102**. Después de un determinado tiempo de bombeo, o cuando se ha alcanzado una presión predefinida, las válvulas se cierran y la bomba **204** se detiene. Se entiende que, con el fin de lograr y mantener la presurización, las válvulas **103** de entrada de las botellas tendrán que operar como válvulas de retención, manteniendo el gas presurizado dentro de las botellas **102**. Se entiende de nuevo que se puede utilizar un sensor de presión para medir la presión dentro del colector de bombeo, o a la salida de la bomba de presión, de modo que controle la presión aplicada a las botellas.

La Figura 3 muestra una tercera aplicación ejemplar en la cual todo el dispositivo **300** de muestreo puede estar sumergido, de acuerdo con una realización de la invención. Esto puede ser requerido, por ejemplo, si el dispositivo **300** necesita estar oculto de la vista, o necesita realizar el muestreo en profundidad y el uso de tuberías puede ser poco práctico. En este caso, además de las características descritas más arriba, el dispositivo **300** de muestreo puede tener sus módulos **302** y **303** de escape de la bomba y la antena **301** extendidos a la superficie del medio **101** de muestreo, de modo que permita el bombeo y la comunicación. Los cables necesarios de la tubería y de la antena pueden estar separados o integrados en un solo cable, y pueden extenderse hasta la costa o estar fijados a una boya opcional. Dicha boya también puede soportar algo del peso del dispositivo de muestreo bajo el agua, proporcionando flotabilidad para mantener el dispositivo de muestreo a la profundidad deseada. Dicha boya también puede actuar como boya de señalización para marcar la posición del dispositivo **300** de muestreo, y puede estar equipada con luces, radiobalizas u otros medios de señalización de su posición. También puede estar equipada con una antena GPS o un dispositivo para comunicar su posición.

La Figura 4 muestra una cuarta aplicación ejemplar en la cual el muestreo necesita realizarse a partir de un conducto **401** cerrado que circula el fluido de interés, tal como, sin limitación, un tubo, una longitud de tubería, y/o un colector. El conducto **401** puede ser, por ejemplo, un tubo de agua potable, o un tubo de agua para procedimientos industriales. En este caso, las diferentes entradas **114** de fluido de la botella están conectadas al conducto **401** a través de una tubería individual, o a través de un colector. Idealmente, las válvulas **103** de entrada se posicionan lo más cerca posible del conducto **401** que hace circular el fluido de interés, de modo que evite el estancamiento del fluido entre las válvulas **103** de entrada y el conducto **401**. La presión de rotura de las válvulas **103** de entrada, así como la prepresurización opcional de las botellas **102**, necesitan ajustarse de tal manera que, a la presión de funcionamiento dentro del conducto **401**, el fluido de interés no pueda entrar en la botella **102** de muestreo. Cuando se necesita adquirir una muestra en una botella **102** específica, la válvula **207** maestra (opcional) correspondiente a la bomba **205** de vacío y la correspondiente válvula **10**5 de control correspondiente a la botella **201** seleccionada son abiertas por la electrónica de control, y la bomba **205** de vacío operada. Al bajar la presión dentro de la botella **102** seleccionada, eventualmente la diferencia de presión a través de la válvula **103** de entrada supera la presión de rotura de la válvula **103** de entrada, y el fluido comienza a llenar la botella **102**.

En un quinto ejemplo de aplicación, el muestreo de la columna de agua en áreas afectadas por derrames de petróleo puede lograrse utilizando un dispositivo de muestreo similar al que se muestra en la Figura 2. Un tal dispositivo podría instalarse en un área de derrame de petróleo antes de aplicar cualquier tratamiento con tensioactivos al derrame. Puede ser flotante, y puede contener una antena de comunicación, capacidad de ubicación por GPS, así como luces de señalización y/o radiobalizas. También puede contener diferentes tipos de sensores, tales como (por ejemplo) sondas de fluorescencia, sondas de turbiedad, sensores de pH, etc., ubicados a diferentes profundidades. Los tubos de muestreo pueden extenderse a diferentes profundidades, de modo que tome muestras a diferentes porciones de la columna de agua en la ubicación del dispositivo de muestreo. Cuando se activa por un comando externo recibido a través de la antena de comunicación, por una alerta de muestra preprogramada, o cuando se activa por las mediciones

de los sensores externos, la electrónica de control iniciaría entonces la adquisición de una o múltiples muestras, a una o múltiples profundidades. El dispositivo de muestreo también puede comunicar su posición GPS y/o las lecturas del sensor externo, ya sea de manera periódica o cuando se le interroga a través de la antena de comunicación. La comunicación puede lograrse a través de redes y protocolos de telefonía móvil GSM, 3G, 4G, LTE o similares, o mediante un enlace de radio como LoRa, LoRaWAN, Sigfox, o por cualquier otro medio de comunicación remota. Los dispositivos pueden estar fijados a infraestructuras fijas existentes, a boyas existentes, o pueden estar a la deriva. Una vez finalizado el programa de muestreo, los dispositivos pueden ser ubicados utilizando su ubicación conocida o las coordenadas GPS transmitidas, y recuperados junto con las muestras físicas. El despliegue de múltiples dispositivos de este tipo a lo largo de un área de derrame de petróleo permitiría la recolección de datos y muestras físicas a lo largo de un evento de derrame, desde la detección inicial del derrame y durante todo el procedimiento de tratamiento. Además de monitorizar los derrames y liberaciones accidentales, tales dispositivos también podrían utilizarse para monitorizar las filtraciones naturales; para recolectar datos de referencia sobre la calidad del agua del mar antes de las operaciones de perforación; para monitorizar la contaminación durante las operaciones de perforación y revestimiento; para la monitorización operativa a largo plazo durante la fase de producción; para la monitorización durante y después de la fase de desmantelamiento.

En otro ejemplo de aplicación, el muestreo necesita realizarse en profundidad. Tal podría ser el caso del océano, por ejemplo. Puede utilizarse el dispositivo **700** de muestreo presentado en la Figura 7, en el que la bomba **601** puede ser una bomba peristáltica, y el alojamiento del módulo **111** de bombeo podría desplegarse en una configuración de presión equilibrada, de acuerdo con una realización de la invención. La presión equilibrada podría lograrse llenando el interior del alojamiento del módulo **111** de bombeo con un fluido **702** de compensación de la presión que sea compatible con todos los materiales y componentes eléctricos o electrónicos presentes en el alojamiento, y proporcionando un mecanismo **704** de compensación de la presión que permita transmitir la presión del fluido **101** del medio de muestreo al fluido **702** de compensación de la presión, sin permitir la posibilidad de que se mezcle con el fluido **101** de muestreo. Tal mecanismo de compensación de la presión podría ser, sin ninguna limitación, uno de una parte móvil sellada como un pistón, una membrana, una bolsa, una vejiga, un fuelle, o cualquier otro mecanismo similar conocido en la técnica.

Inicialmente, los pistones **64**4 de muestreo están ubicados cerca de los puertos **114** de entrada de las botellas **102**, y las porciones de las botellas **102** opuestas a los puertos **114** de entrada están prellenadas con un fluido de prellenado, el cual puede, en este ejemplo, ser agua (ya sea agua dulce o de mar). Cuando se necesita recolectar una muestra en una botella **102** específica, por ejemplo, se abre la válvula **105** de control correspondiente, se acciona la bomba peristáltica para extraer un determinado volumen del fluido de prellenado de la botella, el cual a su vez tira del pistón **644** en la botella. Una cantidad igual de fluido de muestreo se recupera al mismo tiempo en la botella **102** a través del puerto **114** de entrada.

El puerto de escape de la bomba **601** necesita ser posicionado (o extendido con tubería) de modo que minimice la posible contaminación del medio por muestrear con el fluido de prellenado inicialmente presente en la botella **102**. La bomba **601** peristáltica puede entonces ser accionada para empujar dentro de la botella **102**, la cual entonces empuja el pistón **644** y descarga el fluido de muestreo previamente recuperado a través del puerto **701** de descarga de la botella. Esta operación puede repetirse durante diversos ciclos para descargar completamente el interior de la botella de muestra y, por lo tanto, garantizar que se minimice cualquier contaminación que pueda haber en las botellas o en los tubos y válvulas de muestreo. Después de un número de ciclos de descarga, la bomba **601** se opera para llenar la botella **102** con fluido de muestreo por última vez, luego se detiene la bomba **601** y se cierra la válvula **105** de control. Este modo de funcionamiento permite realizar el muestreo en profundidad, y de tal manera que el peso total del dispositivo no cambie (lo cual habría sido el caso si se hubiera llenado un contenedor previamente vacío con el fluido de muestreo). Este aspecto es particularmente importante y está bien adaptado al muestreo de los planeadores submarinos impulsados por la flotabilidad y los vehículos submarinos autónomos, en los que es esencial mantener la flotabilidad constante del vehículo durante todo el procedimiento de adquisición de la muestra y posteriormente.

De manera alternativa, el pequeño volumen entre el puerto **114** de entrada y el pistón **644** se prellena con un agente de fijación o biocida. Esto puede ser necesario en algunos casos en los que se desea detener la evolución microbiana, química o de algas dentro de la muestra.

Operando la bomba durante periodos cortos de tiempo, de modo que adquiera cada vez un volumen bien definido de fluido de muestreo, ya sea a intervalos igualmente separados o a una tasa que es proporcional a la lectura de un sensor de caudal o de velocidad de flujo, es posible obtener muestras de composite o, respectivamente, proporcionales al flujo.

Tratamiento y medición de las muestras

Otras realizaciones permiten que las muestras adquiridas sean procesadas y monitorizadas dentro del dispositivo de muestreo, de modo que midan determinadas propiedades de las muestras adquiridas.

Mezcla de reactivos: La muestra se adquiere en una botella de muestreo mediante un dispositivo de muestreo como el descrito más arriba. La botella de muestreo puede estar precargada con un reactivo, de modo que, a medida que se adquiere la muestra, ésta se mezcla con el reactivo. El reactivo puede estar en forma sólida, o en forma líquida, sin embargo, se entiende que la mezcla con un reactivo líquido podría ser más rápida y eficaz. El reactivo puede ser un agente de fijación, un reactivo químico, un biorreactivo, un medio de cultivo o crecimiento celular, o una combinación de ellos. El reactivo puede contener, por ejemplo, un medio de crecimiento específico para una determinada cepa o tipo de bacteria, así como especies químicas que podrían ser modificadas por el metabolismo de tal bacteria. Tales modificaciones pueden dar lugar a un cambio de las propiedades observables de la muestra, tal como un cambio de color, la aparición de fluorescencia, el desarrollo de turbiedad, un cambio en el pH o la conductividad, un cambio en otras propiedades de la muestra, o una combinación de ellas. La botella de muestreo puede estar precargada con una combinación de múltiples reactivos de diferentes tipos.

En un ejemplo, el reactivo puede contener un medio de crecimiento, así como el producto químico MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido). La bacteria Escherichia Coli (E. Coli) contiene una enzima (β-glucuronidasa) la cual hidroliza el MUG y lo transforma en MUF (4-metilumbeliferil), el cual es fluorescente. La presencia de este compuesto fluorescente puede ser un indicador de la presencia de la bacteria E. Coli. En otro ejemplo, el reactivo puede contener un medio de crecimiento, así como el producto químico ONPG (orto-nitrofenil-β-galactósido). Las bacterias coliformes hidrolizan el ONPG y lo transforman en ONP (orto-nitrofenol), el cual tiene un color amarillo característico. La presencia de este compuesto cromogénico puede ser un indicador de la presencia de la bacteria coliforme en general. En aún otro ejemplo, el reactivo puede contener tanto MUG como ONPG.

Control de la temperatura (incubación): La Figura 8 muestra una botella de muestreo que incluye o está en contacto con un aparato **801** de control de la temperatura. El aparato **801** de control de la temperatura puede ser un aparato de calentamiento, un aparato de enfriamiento, o puede realizar tanto funciones de calentamiento como de enfriamiento. El aparato **801** de control de la temperatura puede incluir un calentador resistivo ubicado en el interior de la botella; podría ser un generador de microondas o una fuente de luz infrarroja, ubicado en las proximidades de la botella; un calentador de convección; un horno o equivalente; podría ser una tira de calentamiento o una manga de calentamiento que rodee la botella; un bloque de calentamiento; un dispositivo Peltier; una bomba de calor; o cualquier otro tipo de dispositivo de calentamiento conocido en la técnica, así como combinaciones de los mismos. El aparato **801** de control de la temperatura, o la botella de muestra, puede incluir además un transductor que mide la temperatura, tal como un detector de temperatura resistivo (RTD), un termopar, un termistor, un sensor de temperatura contenido dentro de un circuito integrado, o cualquier otro tipo de dispositivo de medición de temperatura conocido en la técnica. El aparato **801** de control de la temperatura, así como el transductor de temperatura, pueden ser operados por la electrónica de control, la cual puede entonces modular la cantidad de potencia de calentamiento producida por el aparato de calentamiento o la cantidad de calor eliminado por el aparato de enfriamiento, de modo que controle la temperatura de la botella con precisión. Se conocen diferentes tipos de algoritmos en la técnica para controlar con precisión un parámetro del procedimiento, tal como la temperatura del aparato de control de la temperatura o de la botella de muestra, incluyendo, pero sin limitarse a, el control de encendido y apagado, el control proporcional, el control PID, así como cualquier combinación de estos. Una batería u otra fuente de energía contenida dentro del dispositivo puede energizar el aparato de control de la temperatura. El aparato de control de temperatura puede incluir o estar rodeado por una capa **802** de aislamiento térmico, para limitar el intercambio de calor con el entorno y, por lo tanto, reducir el consumo de energía. El aparato **801** de control de la temperatura puede aplicar diferentes perfiles de temperatura a la muestra. Por ejemplo, puede calentar o enfriar la muestra inicialmente a una primera temperatura T_1 durante una duración t_1, luego calentar o enfriar la muestra a una temperatura T_2 durante una duración t_2, y así sucesivamente. El aparato de control de la temperatura también puede aplicar rampas de temperatura controladas, mientras que la temperatura aumenta o disminuye a una tasa controlada.

Se entiende que cada botella puede estar en contacto con un aparato de control de la temperatura individual, o que todas las botellas pueden estar en contacto con un único aparato de control de la temperatura. El aparato de control de la temperatura puede mantenerse a una temperatura fija (control de la temperatura convencional), o pueden imponerse perfiles de temperatura más complejos. En el caso de un dispositivo que requiera el funcionamiento con batería, puede ser preferente disponer de un aparato de control de la temperatura individual para cada botella, el cual permita el control independiente de las temperaturas de las botellas. Esto minimiza en gran medida la energía requerida, ya que el calentamiento sólo se aplica a las botellas que requieren control de temperatura y no a la totalidad de las botellas. Además, esto permite calentar de manera diferente las diferentes botella, de modo que, por ejemplo, se mantengan a diferentes temperaturas, o impongan diferentes rampas de temperatura a cada muestra.

Control inteligente de la temperatura: En determinadas aplicaciones, puede ser importante llevar la muestra a la temperatura objetivo deseada lo antes posible después de la adquisición de la muestra en la botella. La Figura 9 muestra gráficamente un gráfico de tiempo en función de la temperatura de varios algoritmos de control de la temperatura, de acuerdo con una realización de la invención. Utilizando el control de temperatura convencional, el cual consiste en mantener la temperatura del aparato de control de la temperatura a la temperatura objetivo, la muestra

podría alzar la temperatura objetivo de manera asintótica, en un tiempo relativamente largo - curva **902**. Con el fin de acortar el tiempo requerido para que la muestra alcance la temperatura objetivo - curva **901**, el aparato de control de la temperatura puede incorporar un algoritmo de control inteligente de la temperatura.

Por ejemplo, en las realizaciones en las que se desea el calentamiento de la muestra y el aparato de control de la temperatura consiste en un aparato de calentamiento, el algoritmo de control inteligente de la temperatura puede inyectar inicialmente una mayor cantidad de calor (en el momento del muestreo) con el fin de llevar rápidamente la muestra a la temperatura objetivo, y luego mantener esa temperatura constante sin sobrepasar la temperatura - curva **901**. Tal algoritmo podría calcular y luego inyectar la cantidad exacta de calor inicial que se necesita para calentar la muestra hasta la temperatura objetivo, basando su cálculo en el conocimiento de la temperatura inicial del bloque de calentamiento y de la botella, el conocimiento de la cantidad de fluido que se va a muestrear y de su temperatura y propiedades térmicas, el conocimiento de las propiedades mecánicas y térmicas de todos los materiales implicados en la construcción del aparato de calentamiento y de la botella de muestra, o una combinación de tal información. Considerando T_S y T_H las temperaturas iniciales del medio de muestreo antes del muestreo, y del aparato de calentamiento y del conjunto de botellas de muestra, respectivamente, y T_T la temperatura objetivo deseada que se debe alcanzar, y considerando las capacidades de calor de la muestra adquirida, C_S, y del aparato de calentamiento y del conjunto de botellas de muestra, C_H, es posible deducir la cantidad total de energía E que necesita ser inyectada en el bloque de calentamiento con el fin de elevar la temperatura de la muestra, la botella y el bloque de calentamiento hasta la temperatura objetivo deseada T_T:

$$E=C_H\times(T_T-T_H)+C_S\times(T_T-T_S).$$

Dependiendo del tipo de dispositivo de calentamiento utilizado, la cantidad de energía E que necesita ser inyectada puede generarse por diferentes medios, y eso se traduce en diferentes medios para activar el calentador. Por ejemplo, si se considera un dispositivo de calentamiento consistente de un calentador resistivo de resistencia R, y que la energía E se inyecta aplicando una tensión V CC al dispositivo de calentamiento durante una determinada cantidad de tiempo t, el tiempo t puede calcularse a partir de $t=E\times R/V^2$.

Inyectar el calor E rápidamente en el aparato de calentamiento puede conducir a un exceso de temperatura en el aparato de calentamiento, pero no en la temperatura de la muestra, ya que se inyecta inicialmente la cantidad exacta de calor requerido, y el calor siempre fluye a partir del cuerpo más caliente al más frío, en este caso a partir del aparato de calentamiento a la botella, y luego a la muestra. Una vez que la temperatura del aparato de calentamiento desciende de nuevo a T_T, después de la inyección inicial de calor E, la muestra de fluido, la botella de muestra y el aparato de calentamiento se equilibran en temperatura, y se puede reanudar el control de temperatura convencional para mantener la temperatura del aparato de calentamiento constante en el valor T_T.

El experto en la técnica reconocerá que el C_H y el C_S introducidos anteriormente pueden medirse utilizando un equipo calorimétrico convencional, o pueden calcularse a partir del conocimiento de los diferentes materiales implicados, así como de sus pesos y calores específicos. Por ejemplo, si el medio de muestreo es un fluido que tiene calor específico C_S, densidad d, y el volumen total muestreado es V, entonces la capacidad de calor de la muestra puede ser calculada como $C_S= c_s\times d\times V$.

Se entiende que el ejemplo anterior proporciona sólo una posible implementación de un algoritmo de control de temperatura inteligente. Se entiende además que pueden incluirse en la fórmula anterior correcciones adicionales para factores tales como la pérdida de calor a través de la conducción, convección y radiación, para diferentes temperaturas iniciales del bloque de calentamiento y de la botella de muestra, o para diferentes geometrías de la botella de muestreo y del aparato de calentamiento, con el fin de mejorar su precisión. También se entiende que, aunque el ejemplo anterior se refiere al caso de del calentamiento de una muestra utilizando un aparato de calentamiento, el mismo algoritmo de control inteligente de la temperatura puede utilizarse para el enfriamiento de una muestra utilizando un aparato de enfriamiento, en cuyo caso E representa la cantidad de energía que necesita ser eliminada por el aparato de control de la temperatura.

La medición de determinadas propiedades de la muestra puede depender críticamente del histórico de la temperatura de la muestra. Por ejemplo, la cuantificación del contenido bacteriano inicial dentro de una muestra puede ser en base a la medición del tiempo t_l de incubación requerido a una determinada temperatura T_T objetivo antes de que se produzcan determinados efectos observables. Tal efecto observable podría ser, por ejemplo, la aparición de fluorescencia o absorbencia debido a la presencia de determinados compuestos producidos por reacciones enzimáticas. Utilizando un control de temperatura convencional, la temperatura de la muestra se acercaría de manera asintótica a la temperatura T_T objetivo, en un tiempo que es relativamente largo y que depende de un número de parámetros, tales como la temperatura inicial de la muestra, y el volumen total muestreado. Mediante la implementación del algoritmo de control inteligente de la temperatura descrito más arriba, el calentamiento a partir de la temperatura T_S del medio de muestreo hasta la temperatura T_T objetivo puede realizarse ventajosamente de forma

más rápida y bien controlada, ya que la cantidad exacta de calor requerida se inyecta o elimina en el momento del muestreo. Esto dará lugar a un tiempo t_i de incubación mucho más reproducible, lo cual a su vez conducirá a resultados de cuantificación más precisos.

Por ejemplo, para las cepas bacterianas silvestres de Escherichia Coli (E. Coli), se conoce que el tiempo de duplicación en un medio de crecimiento apropiado a 37 grados Celsius está entre 20 y 30 minutos. Por lo tanto, un error de 20 a 30 minutos en la medición del tiempo de incubación puede introducir un factor de error de 2 en la cuantificación. Este ejemplo ilustra claramente la importancia de implementar el algoritmo de control inteligente de la temperatura descrito más arriba, el cual permite un control más preciso y rápido de la temperatura.

Mediciones ópticas: La Figura 10 muestra la botella de muestra equipada con un sensor **1003** óptico, de acuerdo con la invención. El sensor **1003** óptico puede ser capaz de medir diferentes propiedades ópticas de la muestra, tales como el cambio de color, la absorbencia a longitudes de onda específicas, la turbiedad, la fluorescencia, la birrefringencia, o cualquier otro tipo de medición óptica conocido en la técnica. De acuerdo con la invención, el sensor óptico puede obtener una señal óptica de fluorescencia y/o una señal óptica de absorbencia a partir del fluido de muestra utilizando un mínimo de dos longitudes de onda para medir la señal de absorbencia.

Tal sensor óptico puede medir diferentes propiedades ópticas de la muestra ubicada en la botella de muestra enviando luz a la botella utilizando una o múltiples fuentes de luz, y midiendo la intensidad de la luz utilizando uno o múltiples detectores de luz. Las fuentes de luz pueden consistir en fuentes incandescentes, lámparas de halógeno, lámparas de descarga de gas, diodos emisores de luz, diodos de láser u otros tipos de fuentes de láser, y cualquier otro tipo de fuente de luz conocido en la técnica. Los detectores de luz pueden consistir en fotodiodos; fototransistores; fotodiodos de efecto cascada; fotoamplificadores; sensores CMOS; sensores CCD; espectrómetros; detectores piroeléctricos; bolómetros; y cualquier otro dispositivo conocido en la técnica y capaz de medir o cuantificar la intensidad de la luz, así como todas las combinaciones y conjuntos o matrices de tales dispositivos. Tales fuentes de luz y detectores de luz pueden utilizarse directamente, o pueden acoplarse a guías de ondas ópticas, fibras ópticas, guías de ondas líquidas, canales de luz, o cualquier otro tipo de componentes de guía de luz conocidos en la técnica, así como cualquier combinación de estos. Las fuentes de luz y los detectores de luz pueden utilizarse solos, o acoplados a otros tipos de componentes ópticos, tales como filtros ópticos; filtros de densidad neutra; filtros de interferencia; placas de cuarto de onda; polarizadores; filtros ópticos de paso bajo; de paso de banda o de paso alto; espejos; monocromadores; colimadores; rejillas, incluidas las de difracción; aberturas; lentes; cualquier otro tipo de dispositivo óptico activo o pasivo conocido en la técnica, así como cualquier combinación de los mismos.

El sensor **1003** óptico puede ser controlado por, o comunicar sus valores a una unidad informática, la cual contiene una forma de memoria para almacenar las mediciones. Tal unidad informática puede ser un microprocesador, un microcontrolador, un ordenador de mesa o portátil, un teléfono inteligente, un reloj inteligente, una tableta, un ordenador de placa única, o cualquier otro tipo de dispositivo capaz de registrar y procesar las mediciones producidas por el sensor **1003** óptico.

El sensor óptico puede utilizarse junto con el aparato de control de la temperatura, o de manera separada. De acuerdo con la invención, como se muestra en la Figura 10, el sensor **1003** óptico se posiciona alrededor de la botella y del aparato **1001** de control de la temperatura, mientras que las fuentes de luz y los detectores de luz se alinean con las aberturas **1002** (ventanas ópticas) proporcionadas en el aparato de control de la temperatura, para permitir que la luz viaje desde la fuente de luz hasta la botella, a través de la muestra **1004** recolectada dentro de la botella, y hasta el detector de luz.

La Figura 11 muestra una vista superior de un sensor óptico que tiene la forma de un anillo **1101** de sensor, de acuerdo con una realización de la invención. Las fuentes **1103**, **1104**, **1107** de luz de tal sensor óptico pueden ser LED's monocromáticos, y el detector de luz puede ser un fotodiodo **1105**. Los LED's **1103**, **1104** para medir la absorbencia de la muestra a longitudes de onda específicas pueden colocarse en una posición que está opuesta al fotodiodo **1105**. Los LED's **1103** y **1104** pueden ser elegidos para operar a longitudes de onda que permitan detectar una coloración específica de la muestra independientemente de que la muestra se vuelva turbia debido, por ejemplo, al crecimiento bacteriano. Los LED's **1107** para excitar la fluorescencia pueden ser posicionados de tal manera que la luz del LED alcance la botella en la proximidad del fotodiodo **1105**, pero en un ángulo tal que la luz reflejada no alcance el fotodiodo **1105**. Los LED's **1103**, **1104**, **1107** y el fotodiodo **1105** pueden estar alineados con las aberturas del aparato de control de la temperatura (ventanas ópticas). El fotodiodo **1105** puede estar equipado con un filtro **1106** óptico que bloquea la longitud de onda de excitación de la fluorescencia, a la vez que permite el paso de la señal de fluorescencia emitida, así como la luz de los otros LED's. De manera opcional, el sensor óptico también puede estar equipado con un sensor **1102** de temperatura, para medir la temperatura de diferentes componentes ópticos, o la del aparato de control de la temperatura.

El sensor óptico puede incluir dos LED's **1103**, **1104** posicionados de manera opuesta al fotodiodo **1105**. Uno de tales LED's puede emitir luz a una longitud de onda en la que la muestra, o de un reactivo mezclado con la muestra, absorbe

la luz, mientras que el segundo LED puede emitir luz a una longitud de onda en la que la muestra o el reactivo no absorben. Los LED's **1103**, **1104** pueden ser posicionados de tal manera que la luz de los LED's **1103**, **1104** al fotodiodo **1105** sigan trayectos ópticos similares. En este caso, la dispersión debida a la turbiedad de la muestra afectará a la luz de ambos LED's **1103**, **1104** de manera similar, mientras que la absorción afectará a la luz del primer LED solamente. Por lo tanto, al medir la luz de ambos LED's **1103**, **1104**, es posible corregir cualquier dispersión de la luz debido a la turbiedad de la muestra, y, por lo tanto, tener una medición precisa de la absorbencia sin ningún artefacto o influencia de la turbiedad.

El sensor óptico puede ser posicionado en la parte inferior de la botella, tal como para medir a través de la parte inferior de la botella. Sin embargo, tal medición puede ser afectada por los depósitos de la muestra, los cuales tienden a acumularse en la parte inferior. En una disposición preferente, el sensor óptico se posiciona a la altura media de la muestra en la botella. Esto permite realizar mediciones precisas sin ninguna influencia de los depósitos de la parte inferior.

Garantía de la muestra: La Figura 12 es un gráfico que muestra cómo se puede utilizar un sensor óptico para detectar el llenado de la botella, con el fin de proporcionar una garantía de la muestra. Por ejemplo, la electrónica de control puede realizar una medición óptica (fluorescencia, absorbencia o ambas) antes de activar el muestreo, y luego otra vez, después del momento en que se activa el muestreo. Una diferencia entre las dos mediciones representa la confirmación de que las propiedades ópticas de la botella han cambiado, y por lo tanto proporcionan la prueba de que la muestra fue adquirida correctamente. Un ejemplo de garantía óptica de la muestra se da en la figura 12, la cual muestra la evolución de tiempo de la señal obtenida a partir del sensor de fluorescencia. El primer punto **1201** de datos se midió antes de adquirir la muestra, el segundo **1202** y los puntos posteriores corresponden a mediciones realizadas después de adquirir la muestra **1203**. Como se puede apreciar en la Figura 12 (área resaltada con un óvalo), existe una diferencia en la señal óptica, lo cual puede utilizarse para confirmar la adquisición correcta de la muestra.

Instrumento y procedimiento para cuantificar la contaminación bacteriana

De acuerdo con la invención, se proporciona un aparato para medir la concentración bacteriana. El aparato puede incluir, sin limitación, un dispositivo de muestreo de los tipos descritos más arriba, y representado gráficamente en las Figuras 1-7. Cada botella de muestreo, así como el hardware asociado, puede ser, de manera opcional, de un tipo desechable de un solo uso.

Cada botella de muestra incluye un medio de crecimiento que permite el crecimiento bacteriano. Un tal medio de crecimiento puede ser específico para determinadas bacterias, o puede ser un medio no específico, tal como una simple solución de glucosa. Tal reactivo puede venir precargado en cada botella de muestreo (por ejemplo, cuando la botella es de tipo desechable) o puede introducirse de manera manual en cada botella durante una operación de mantenimiento previa al despliegue del aparato. El reactivo puede incluir además un producto químico que puede utilizarse como indicador de una bacteria específica. Por ejemplo, el reactivo puede incluir MUG u ONPG, como se ha descrito más arriba, para detectar la presencia de E. Coli y Coliformes en general, respectivamente, o puede incluir ONPG2 para detectar Enterococos, u otros tipos de sustancias las cuales pueden sufrir cambios observables en presencia de una bacteria. El reactivo puede incluir una combinación de múltiples sustancias de este tipo.

Cada botella de muestreo está en contacto con un aparato de control de la temperatura equipado con un sensor óptico. Tal aparato de control de la temperatura permite la incubación de la mezcla de muestra/medio de crecimiento/reactivo a una temperatura que permite el crecimiento de la bacteria de interés. Tal temperatura puede ser seleccionada para permitir, preferentemente, el crecimiento de determinados tipos de bacteria o, de manera alternativa, para inhibir el crecimiento de otros tipos de bacteria. Por ejemplo, una temperatura de incubación más alta puede permitir que determinados tipos de coliformes se desarrollen preferentemente (específicamente los coliformes fecales).

Dado que tal aparato realiza una etapa de cultivo o incubación la cual permite que las bacterias vivas se multipliquen, la medición de la concentración bacteriana no se ve afectada por las células muertas presentes en el medio.

El sensor óptico está configurado para medir repetidamente las propiedades ópticas de la muestra/medio de crecimiento/mezcla de reactivos a partir del momento en que se adquiere la muestra, y durante todo el período de incubación. Un período típico para realizar tales mediciones puede ser del orden del segundo, de varios segundos, del minuto, de varios minutos, o de la hora. Tales propiedades pueden incluir absorbencia, fluorescencia, turbiedad, u otras propiedades ópticas. Las mediciones ópticas pueden ser procesadas además por la unidad informática, la cual también puede comunicarlas a un sistema remoto, tal como un ordenador o un servidor, para su visualización y descarga. Tal comunicación puede realizarse por cualquier medio de comunicación por cable o inalámbrico conocido en la técnica. El aparato o el servidor remoto pueden producir alertas automáticas y enviarlas a un operador.

Cada botella de muestreo puede tener un filtro en su entrada, además de la válvula de retención de entrada. Un tal filtro puede tener un tamaño de poro que permita que las bacterias dispersas entren en la botella de muestra, pero

que impida que las bacterias fijadas a las partículas entren en la botella de muestra. Esto permitiría medir sólo las bacterias totalmente dispersas (si se utiliza el filtro), o el total de bacterias, incluidas las fijadas a las partículas (si no se utiliza el filtro). El tamaño de poro se ajustará dependiendo del tamaño característico de la bacteria utilizada, para garantizar que todas las bacterias dispersas puedan pasar a través, pero limitando en lo posible las partículas más grandes. Un tamaño de poro de filtro típico que es eficaz para separar las partículas de E. Coli dispersa, por ejemplo, puede estar en el intervalo de 2µm a 5µm.

Ejemplo: Procedimiento para realizar mediciones de E. Coli y coliformes totales

En un caso, el aparato para medir la concentración bacteriana se instala cerca de un área sensible que requiere una monitorización reforzada de la calidad del agua para la presencia y cuantificación de E. Coli y coliformes totales (TC). Una tal área puede ser, pero no se limita a: un lugar de natación recreacional, una entrada de agua potable, una zona de acuicultura, o una salida de aguas residuales.

El aparato puede ser activado para realizar una medición bacteriana. Una tal activación puede ser un comando remoto recibido por el aparato, o podría ser una medición de un sensor externo que caiga fuera de su intervalo normal. Las botellas de muestreo en el aparato contienen una combinación de medio de crecimiento, MUG y ONPG, como se ha descrito más arriba. Una vez recibida la activación de la medición, el aparato adquiere una muestra en una de las botellas de muestra. Se realiza una medición óptica de garantía de la muestra para confirmar la adquisición de la muestra. A continuación, el aparato comienza la incubación de la mezcla de muestra/medio de crecimiento/reactivo a una temperatura de 37 grados Celsius, y realiza repetidas mediciones ópticas de absorbencia y fluorescencia, de modo que detecte la aparición de MUF y ONP producidos por la actividad enzimática de E. Coli y coliformes totales, respectivamente. La absorbencia podría medirse, por ejemplo, a una longitud de onda de 430 nm, la cual corresponde al pico de absorbencia del ONP, mientras que la fluorescencia podría excitarse a una longitud de onda de 385 nm (permitiendo la excitación de la fluorescencia del MUF) y detectarse a una longitud de onda típicamente mayor que 400 nm. Podría realizarse una medición adicional de la absorbencia a una longitud de onda en la que el ONP o el MUF no absorban, por ejemplo, en o alrededor de 610 nm. Esta medición óptica puede utilizarse para cuantificar y corregir efectos, tales como la turbiedad de la muestra.

La Figura 13 muestra una curva de datos de los valores de absorbencia y fluorescencia medidos a lo largo del periodo de incubación, al igual que la Figura 14, de acuerdo con diversas realizaciones de la invención. Los valores pueden ser almacenados por la unidad informática en la memoria interna, o transmitidos a un servidor externo, o ambos. La unidad informática o el servidor externo pueden procesar las curvas de datos utilizando un algoritmo para determinar los tiempos de aparición de la señal de absorbencia y fluorescencia. Tal algoritmo de procesamiento de datos puede consistir en detectar el punto **1303**, **1403** más temprano en la curva de datos después del cual la señal aumenta de manera constante (estos puntos de detección están marcados por líneas verticales en las Figuras 13 y 14, para las señales de absorbencia y fluorescencia). Antes de tal detección, los valores de absorbencia y fluorescencia son relativamente estables (**1301**, **1401**). Pasado el punto de detección, las señales aumentan rápidamente (1302, 1402). Un experto en la técnica puede reconocer que se pueden utilizar muchos tipos diferentes de algoritmos para detectar los tiempos de aparición de la señal, y que el ejemplo dado en este caso es sólo una posibilidad.

Dado que las bacterias vivas se multiplican constantemente, la cantidad de MUF y ONP producida aumenta rápidamente. Pasado un determinado umbral, el sensor óptico puede detectar fácilmente la presencia de estos compuestos (véanse las Figuras 13 y 14). El tiempo de cultivo o incubación que se requiere antes de tal detección (tiempos de aparición de la señal) depende del número inicial de bacterias vivas presentes en la muestra, y por lo tanto los tiempos de aparición de la señal y las concentraciones bacterianas iniciales (E. Coli y TC) están correlacionados. En particular, un tiempo de aparición de la señal más corto significa una mayor concentración bacteriana en la muestra inicial. La Figura 15 muestra que, si se trazan múltiples mediciones 1501, realizadas en muestras de diversas concentraciones bacterianas, frente al logaritmo de la concentración bacteriana real en la muestra original, medida con otra técnica de referencia, se puede obtener luego una calibración lineal (línea 1502 negra), de acuerdo con una realización de la invención. Esta calibración puede utilizarse entonces con el fin de determinar la concentración real de la bacteria inicialmente presente en la muestra midiendo el tiempo de aparición de la señal (tiempo de aparición de la fluorescencia en el caso de la bacteria E. Coli, representado en la Figura 15). Se pueden obtener diferentes calibraciones para diferentes matrices de agua.

Una ventaja de la técnica de medición presentada más arriba es que es particularmente robusta, ya que no requiere mediciones ópticas extremadamente precisas (absorbencia o fluorescencia). Dado que la medición se centra en el tiempo de aparición de la señal, y no en los valores reales de la señal óptica, no es necesario que los valores de la señal sean precisos, siempre que se capte correctamente su evolución en el tiempo. Esto tiene una consecuencia importante para las aplicaciones prácticas: a la vez que un cambio en la posición de la botella de muestreo de una medición a la siguiente puede desplazar los valores globales medidos por el sensor óptico, la forma de la curva y el tiempo de detección correspondiente permanecerán inalterados y, por lo tanto, no tendrán ningún impacto en la

cuantificación bacteriana resultante. Del mismo modo, la cantidad de fluorescencia o absorbencia generada por diferentes reactivos puede depender de otros parámetros de la muestra, tales como el pH, pero su evolución de tiempo general puede no verse afectada, por lo tanto, no tiene un efecto negativo en la cuantificación bacteriana.

Esta es una ventaja extremadamente importante en comparación con otras técnicas rápidas cuya medición puede depender de la cuantificación precisa de la cantidad de fluorescencia o absorbencia de la muestra, afectando el valor real de la medición a la cuantificación bacteriana resultante. Para tales procedimientos, es necesario medir y/o controlar todos los parámetros de la muestra que pueden afectar a los valores de la señal óptica, lo cual crea complicaciones adicionales para su implementación en un instrumento automático.

La unidad informática o el servidor remoto que recibe los datos a lo largo de un ciclo de incubación puede aplicar de manera periódica el algoritmo para detectar los tiempos de aparición de la señal, y cuando se realiza una detección entonces puede utilizar la calibración almacenada para calcular la concentración bacteriana. La unidad informática o el servidor remoto pueden entonces generar una alerta automática y transmitir el resultado a un operador, mediante correo electrónico, SMS, llamada telefónica, ventana emergente o cualquier otro procedimiento disponible para la comunicación. Si aún no se puede realizar ninguna detección a partir de los datos disponibles, la unidad informática o el servidor remoto pueden proporcionar un valor de límite superior, en base al valor de cuantificación correspondiente al tiempo de incubación actual. Tal límite superior también puede ser comunicado al operador.

La unidad informática o el servidor remoto pueden estar conectados a una pantalla gráfica, o pueden proporcionar una interfaz gráfica a través de una conexión de red (tal como un sitio web). En una tal interfaz gráfica, el operador puede visualizar los datos, incluidas las curvas de la señal y los tiempos de detección automática (como se muestra en las Figuras 13, 14). Además, se puede permitir que el operador, tras la inspección de los datos, valide o anule la detección automática proporcionada por la unidad informática o el servidor remoto. La interfaz gráfica también puede utilizarse para enviar comandos de control al aparato, de modo que inicie una recolección y análisis de la muestra, u obtener datos operativos.

Dispositivo que emplea cartuchos desechables

Se entiende además que las botellas y parte o todo el hardware asociado (cualquier combinación de adaptadores, válvulas de entrada, válvulas de descarga, tuberías, filtro de bombeo, filtro de entrada, reactivo, pistón, bolsa, diafragma) pueden ser componentes de un solo uso (cartuchos desechables) que se instalan antes del despliegue y se desechan después de recuperar las muestras. El uso de tales componentes de un solo uso puede simplificar en gran medida la logística de operación de un dispositivo de muestreo y/o medición. Al proporcionar las botellas de muestreo como cartuchos desechables, desecharlas después de completar la medición, y sustituirlos con un nuevo cartucho para un nuevo despliegue, se pueden lograr las siguientes ventajas:

- El operador no entra en contacto directo con las muestras anteriores, las cuales pueden contener cultivos bacterianos y posiblemente altas concentraciones de patógenos, y, por lo tanto, su seguridad mejora.
- Los nuevos cartuchos ya están limpios y libres de contaminación, por lo que no es necesario realizar operaciones adicionales de limpieza y mantenimiento del dispositivo. Esto acelera el procedimiento de mantenimiento y permite que la unidad sea reparada de manera rápida directamente en el campo.
- Los cartuchos pueden venir precargados con el reactivo químico o biológico de interés, lo cual elimina la etapa de cargar el reactivo en las botellas antes del despliegue del dispositivo.
- Al proporcionar cartuchos de calidad controlada durante el procedimiento de fabricación, se minimiza el riesgo de errores humanos al limpiar y preparar el dispositivo para un nuevo despliegue.

La Figura 16 muestra un dispositivo de análisis de muestras ejemplar hecho para utilizar cartuchos desechables. El dispositivo ejemplar puede incluir, fijado a la pared **1601** externa del dispositivo, un biorreactor que contiene el aparato **1602** de control de la temperatura y el sensor **1603** óptico. El aparato de control de la temperatura y la pared del dispositivo pueden estar aislados utilizando un material **1605** de aislamiento térmico. El biorreactor puede estar conectado, a través de una válvula **1604** de control, a la bomba de los dispositivos (no se muestra). También pueden incluirse elementos **1606** y **1607** de sellado a prueba de agua y/o aire, y pueden consistir en juntas, juntas tóricas de diversas secciones transversales, o cualquier otro tipo de solución de sellado conocida en la técnica.

La Figura 17 muestra un cartucho desechable que podría utilizarse con el dispositivo de la Figura 16. El cartucho desechable puede incluir una botella 1701 de muestra que está fijada a una placa **1704** de soporte de la botella. De manera alternativa, los dos pueden ser fabricados como una sola pieza. La botella **1701** incluye, además, o está fijada a, una válvula **1705** de retención de entrada, así como un filtro **1702** de bombeo, en cualquiera de las configuraciones enseñadas previamente en la presente invención. El cartucho puede incluir además superficies **1706** y **1707** de sellado, las cuales están diseñadas para conectarse con los sellos **1606** y **1607** del dispositivo de análisis de muestras.

La Figura 18 muestra una posición alternativa de la válvula **1805** de retención de entrada, dentro de la botella **1801** del cartucho desechable, de acuerdo con una realización de la invención. El experto en la técnica entenderá que son posibles una multitud de configuraciones para el posicionamiento de los diferentes elementos aquí descritos, y los ejemplos enseñados son sólo algunas posibles realizaciones.

La Figura 19 muestra el cartucho **1901** desechable siendo insertado en el biorreactor **1902** del dispositivo. La Figura 20 muestra el cartucho desechable conectado con el biorreactor del dispositivo con los elementos de sellado acoplados (**2001**, **2002**). La Figura 21 muestra otra configuración de sellado, con los elementos **2101**, **2012** de sellado como parte del cartucho desechable.

La Figura 23 muestra de manera esquemática los componentes de un sistema para realizar la monitorización bacteriana de un sitio **2301** acuático. El sistema incluye uno o múltiples dispositivos **2302** de análisis de muestras, tales como los descritos anteriormente, los cuales además son capaces de establecer una comunicación bidireccional inalámbrica **2303** o por cable **2304** con un servidor **2305** y/o un teléfono **2306** móvil. El servidor **2305** puede ser accesible a partir de un terminal **2307** informático de usuario, a través de una red informática. El servidor **2305** puede, de manera opcional, ser capaz de comunicarse directamente con el teléfono **2306** móvil. El sistema puede estar configurado para realizar un procedimiento **2308**, el cual puede utilizar los datos proporcionados por los dispositivos **2302** de análisis de muestras, y de otras fuentes, tales como (sin ninguna limitación) un reloj, un sensor independiente, un centro de control, teléfono **2306** móvil o terminal **2307** informático, una interfaz de usuario o un comando generado por el operador, y en base a los datos recibidos, puede esperar hasta que se cumpla una condición de activación, etapa **2309**, momento en el cual puede iniciar un evento de muestreo y medición, etapa **2310**, por uno o varios de los dispositivos **2302** de análisis de muestras. El procedimiento **2308** entonces, etapa **2311**, utilizará y analizará los datos recuperados a partir del dispositivo **2302**, y comprueba si se cumple una condición de alerta, etapa **2312**. Si tal condición no se cumple, el procedimiento **2308** regresa a la etapa **2311** y continúa recuperando datos y comprobando. Si la condición de alerta se cumple, el procedimiento **2308** genera una alerta de usuario, etapa **2313**, la cual puede ser comunicada a través del teléfono **2306** móvil, el terminal **2307** informático, o por cualquier otro medio de comunicación. El procedimiento **2308** decide entonces si continúa la medición, etapa **2314**. Si la medición necesita ser continuada, regresa a la etapa **2311** y continúa recuperando datos y comprobando la condición de alerta. Si la medición debe detenerse, el procedimiento **2308** regresa a la etapa **2309**. Se entiende que el procedimiento **2308** puede ser implementado directamente dentro del controlador del dispositivo **2302**, dentro del servidor **2305**, dentro del teléfono **2306** móvil, dentro del terminal 2307 informático de usuario, o dentro de un controlador o unidad informática separada. Además, el procedimiento puede implementarse en hardware, software, o una combinación de ellos.

El experto en la técnica reconocerá que los ejemplos anteriores son sólo algunas de las muchas formas posibles de utilizar la invención aquí descrita. Por ejemplo, el uso de cartuchos desechables también es posible para otro tipo de aplicaciones además de la detección bacteriana. Tales ejemplos de aplicación podrían ser la recolección de muestras, o la realización de mediciones químicas.

Otras especies de bacterias podrían medirse utilizando los procedimientos enseñados en la presente memoria, utilizando diferentes tipos de reactivos selectivos, variando las temperaturas de incubación, o diferentes longitudes de onda para la interrogación óptica. Cualquiera de las variantes de los dispositivos de muestreo descritos en la presente memoria podría utilizarse junto con este procedimiento de medición bacteriana; lo que permitiría realizar mediciones bacterianas similares en una multitud de ubicaciones, tal como: en agua procedente de un tubo, de la superficie o de diferentes profundidades en un entorno natural, o incluso de aguas profundas en el océano o el mar.

Las realizaciones de la invención, por ejemplo y sin limitación, porciones del controlador, porciones de la electrónica de control, porciones del aparato de control de la temperatura, y/o porciones de cualquier módulo de análisis utilizado, pueden ser implementadas en su totalidad o en parte en cualquier lenguaje de programación informático convencional. Por ejemplo, las realizaciones preferentes pueden implementarse en lenguaje ensamblador, un lenguaje de programación procedimental (por ejemplo, “C”) o un lenguaje de programación orientado a objetos (por ejemplo, “C++”, Python). Las realizaciones alternativas de la invención pueden implementarse como elementos de hardware preprogramados, otros componentes relacionados, o como una combinación de componentes de hardware y software.

Las realizaciones pueden implementarse en su totalidad o en parte como un producto de programa informático para su uso con un sistema informático (por ejemplo, el controlador). Tal implementación puede incluir una serie de instrucciones informáticas fijadas en un medio tangible, tal como un medio legible por ordenador (por ejemplo, un disquete, un CD-ROM, una ROM, o un disco fijo) o transmisibles a un sistema informático, a través de un módem u otro dispositivo de interfaz, tal como un adaptador de comunicaciones conectado a una red a través de un medio. El medio puede ser un medio tangible (por ejemplo, líneas de comunicación ópticas o analógicas) o un medio implementado con técnicas inalámbricas (por ejemplo, microondas, infrarrojos u otras técnicas de transmisión). La serie de instrucciones informáticas incorporan toda o parte de la funcionalidad descrita anteriormente en la presente memoria con respecto al sistema. Los expertos en la técnica deberían apreciar que tales instrucciones informáticas

pueden ser escritas en un número de lenguajes de programación para su uso con muchas arquitecturas informáticas o sistemas operativos. Además, tales instrucciones pueden almacenarse en cualquier dispositivo de memoria, tal como dispositivos de memoria semiconductores, magnéticos, ópticos o de otro tipo, y pueden transmitirse utilizando cualquier tecnología de comunicación, tal como la óptica, la de infrarrojos, la de microondas, u otras tecnologías de transmisión. Se espera que tal producto de programa informático pueda distribuirse como un medio extraíble con documentación impresa o electrónica adjunta (por ejemplo, un software envuelto en plástico), precargado con un sistema informático (por ejemplo, en la ROM del sistema o en un disco fijo), o distribuido a partir de un servidor o tablón de anuncios electrónico a través de la red (por ejemplo, Internet o la World Wide Web). Por supuesto, algunas realizaciones de la invención pueden implementarse como una combinación tanto de software (por ejemplo, un producto de programa informático) como de hardware. Aún otras realizaciones de la invención se implementan completamente en hardware, o completamente en software (por ejemplo, un producto de programa informático).

La lógica de hardware (incluida la lógica programable para su uso con un dispositivo lógico programable) que implementa toda o parte de la funcionalidad descrita anteriormente en la presente memoria puede diseñarse utilizando procedimientos manuales tradicionales, o puede diseñarse, capturarse, simularse, o documentarse de manera electrónica utilizando diversas herramientas, tales como el Diseño Asistido por Ordenador (CAD), un lenguaje de descripción de hardware (por ejemplo, VHDL o AHDL), o un lenguaje de programación PLD (por ejemplo, PALASM, ABEL, o CUPL)

Las realizaciones de la invención descritas más arriba pretenden ser simplemente ejemplares; numerosas variaciones y modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Todas estas variaciones y modificaciones están destinadas para estar dentro del ámbito de la presente invención tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para cuantificar la contaminación de una muestra fluídica por un tipo de bacteria de interés, el sistema comprende:

una botella (102) de muestra en la cual se adquiere un fluido de muestra;
un reactivo que proporciona una firma óptica en presencia de la bacteria de interés, que se mezcla con el fluido de muestra;
un aparato (801) controlador de temperatura para incubar el fluido de muestra;
un sensor (1003) óptico para obtener una señal óptica de fluorescencia y/o una señal óptica de absorbencia a partir del fluido de muestra en múltiples tiempos, dicho sensor (1003) óptico utiliza un mínimo de dos longitudes de onda para medir la señal óptica de absorbencia, mientras que las dos longitudes de onda se seleccionan de tal manera que una sea más sensible que la otra a la firma óptica del reactivo; dicho sensor (1003) óptico comprende fuentes (1103, 1104, 1107) de luz y un detector (1105) de luz,
un controlador configurado para determinar la concentración bacteriana del fluido de muestra en función de una forma de una curva de fluorescencia en función del tiempo y/o de una curva de absorbencia en función del tiempo obtenida a partir de al menos un sensor óptico durante la incubación de la muestra fluídica,
el sistema es **caracterizado porque**:

el aparato (801) controlador de temperatura se posiciona alrededor de la botella (102) de muestra y comprende aberturas (1002); y
el sensor (1003) óptico está posicionado alrededor del aparato controlador de temperatura, las fuentes (1103, 1104, 1107) de luz y el detector (1105) de luz están alineados con las aberturas (1002) del aparato (801) controlador de temperatura.

2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sensor (1003) óptico tiene la forma de un anillo (1101) de sensor.

3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el sensor (1003) óptico está posicionado a una altura media del fluido de muestra en la botella (102) de muestra.

4. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el controlador está configurado para comparar los tiempos de aparición de la señal de fluorescencia y/o absorbencia con una curva de calibración, la curva de calibración en base a, al menos en parte, la comparación de los tiempos de aparición de la señal de una pluralidad de fluidos de muestra obtenidos previamente con sus concentraciones bacterianas reales determinadas utilizando otra técnica de referencia.

5. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la botella (102) de muestra incluye un medio de crecimiento que permite el crecimiento de la bacterias de interés.

6. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene además múltiples botellas (102) de muestra, cada botella (102) se utiliza para medir una única muestra de fluido, siendo el sistema capaz de realizar múltiples mediciones en paralelo.

7. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema es portátil y/o sumergible, y está configurado para funcionar con batería y transmitir datos de manera inalámbrica.

8. Un procedimiento de cuantificación de la contaminación de una muestra fluídica por un tipo de bacteria de interés, el procedimiento comprende:

adquirir un fluido de muestra en una botella (102) de muestra;
mezclar el fluido de muestra con un reactivo que proporciona una firma óptica en presencia de la bacteria de interés;
medir en múltiples tiempos, utilizando un sensor (1101) óptico, una señal óptica de fluorescencia y/o una señal óptica de absorbencia a partir del fluido de muestra, mientras que para medir la señal de absorbencia se utilizan como mínimo dos longitudes de onda de luz, siendo las dos longitudes de onda seleccionadas de tal manera que una sea más sensible que la otra a la firma óptica del reactivo; dicho sensor (1003) óptico comprende fuentes (1103, 1104, 1107) de luz y un detector (1105) de luz,
incubar el fluido de muestra antes a, o durante la medición por medio de un aparato (801) controlador de temperatura;
determinar la concentración bacteriana del fluido de muestra en función de una forma de una curva de fluorescencia en función del tiempo y/o de una curva de absorbencia en función del tiempo obtenida a partir

del al menos un sensor óptico durante la incubación de la muestra fluídica; el procedimiento es **caracterizado porque**
el aparato (801) controlador de temperatura se posiciona alrededor de la botella (102) de muestra y comprende aberturas (1002)
el sensor (1003) óptico está posicionado alrededor del aparato controlador de temperatura, las fuentes (1103, 1104, 1107) de luz y el detector (1105) de luz están alineados con las aberturas del aparato (801) controlador de temperatura.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sensor (1003) óptico tiene la forma de un anillo (1101) de sensor.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, el sensor (1003) óptico está posicionado a una altura media del fluido de muestra en la botella (102) de muestra.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la determinación incluye la comparación de los tiempos de aparición de la señal de fluorescencia y/o absorbencia con una curva de calibración, la curva de calibración en base a, al menos en parte, la comparación de los tiempos de aparición de la señal de una pluralidad de fluidos de muestra obtenidos previamente con sus concentraciones bacterianas reales determinadas utilizando otra técnica de referencia.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la botella (102) de muestra incluye un medio de crecimiento que permite el crecimiento bacteriano.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, incluye además el análisis de múltiples muestras en botellas separadas, de manera sucesiva o en paralelo.

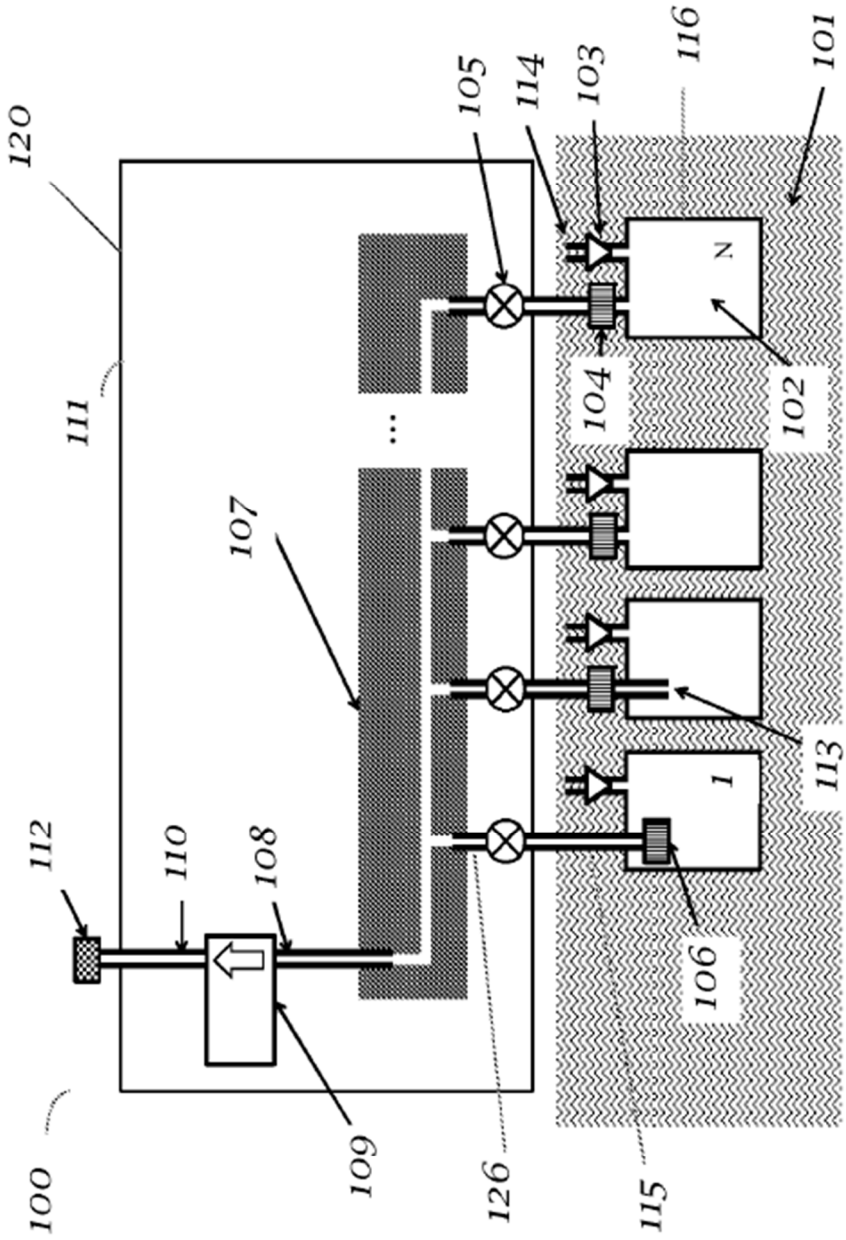

120
111
105
114
103
116
101
N
104
102
107
113
1
112
110
108
106
109
126
115
100

Fig. 1

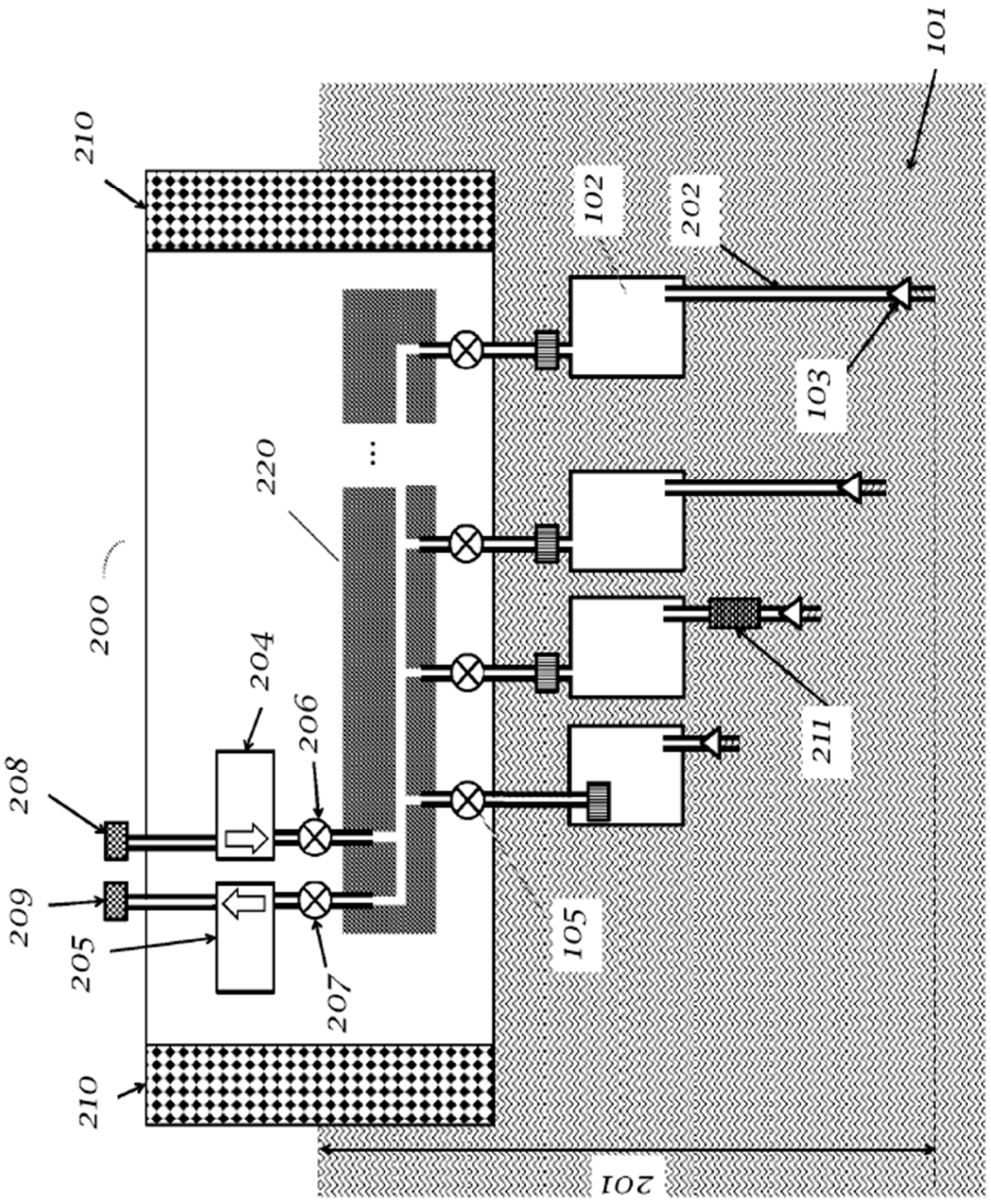

101
210
102
202
103
220
200
204
206
208
209
205
207
211
105
201
210

Fig. 2

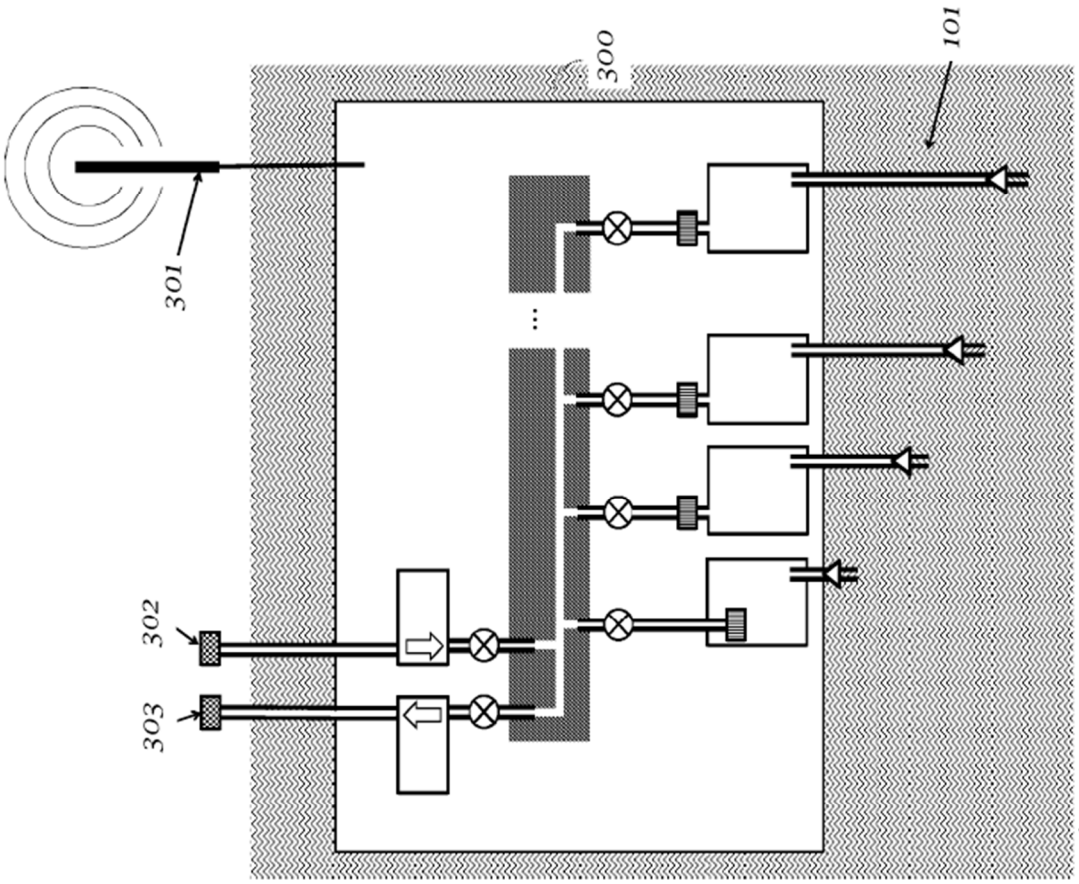


Fig. 3

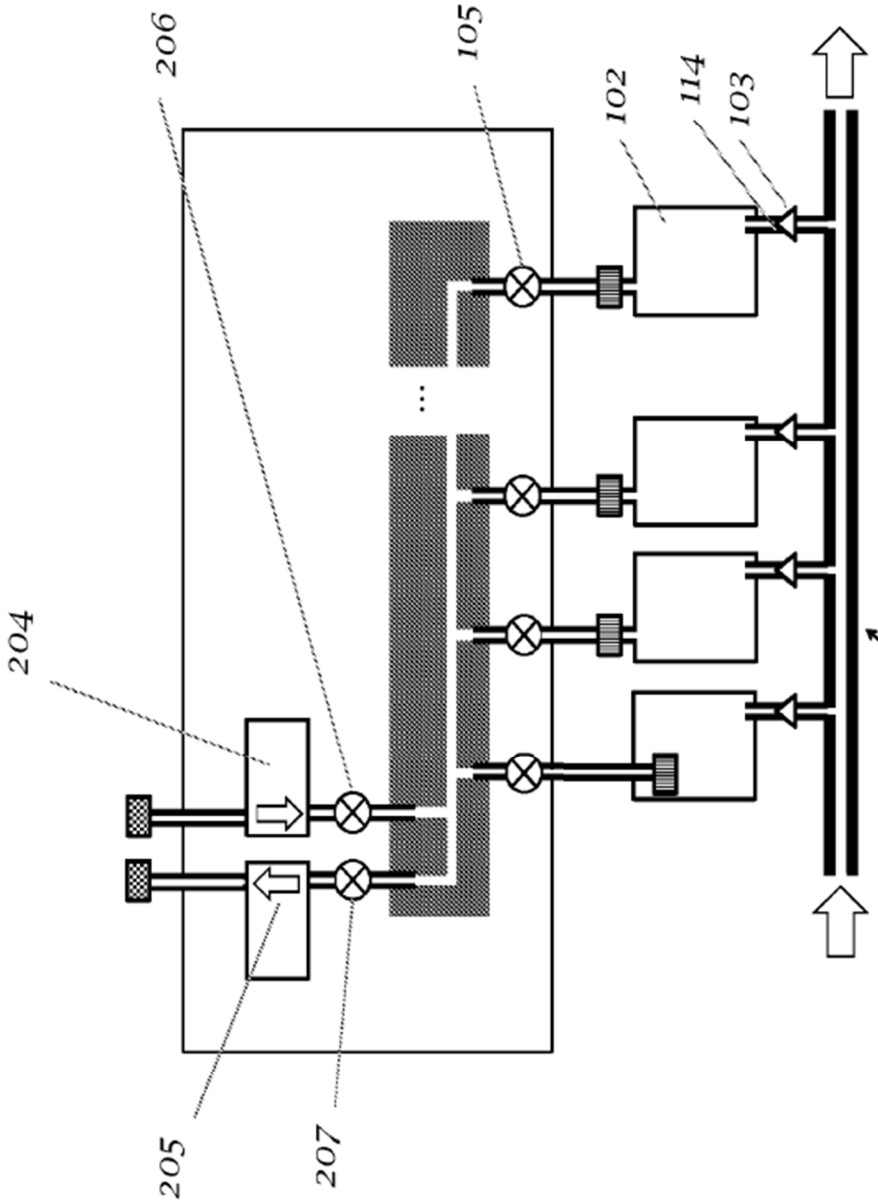


Fig. 4

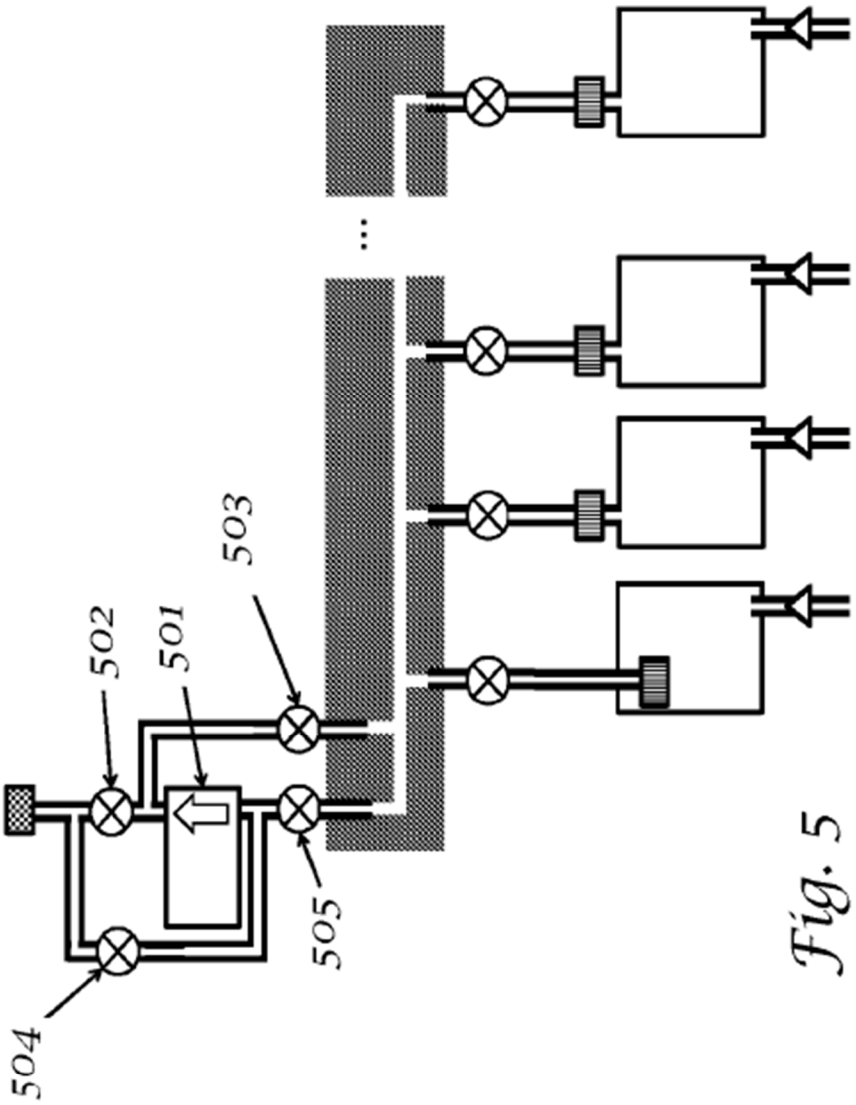


Fig. 5

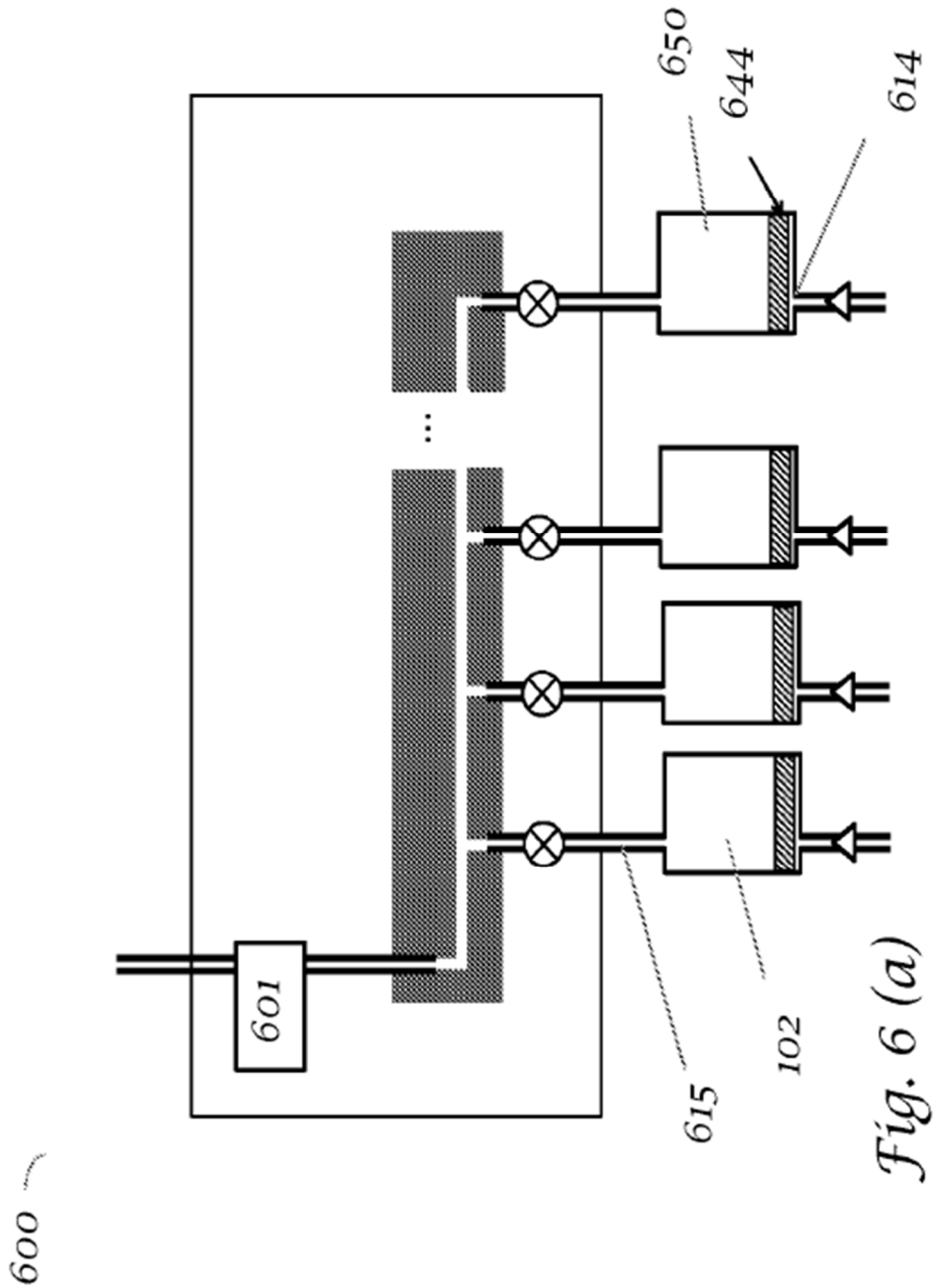


Fig. 6 (a)

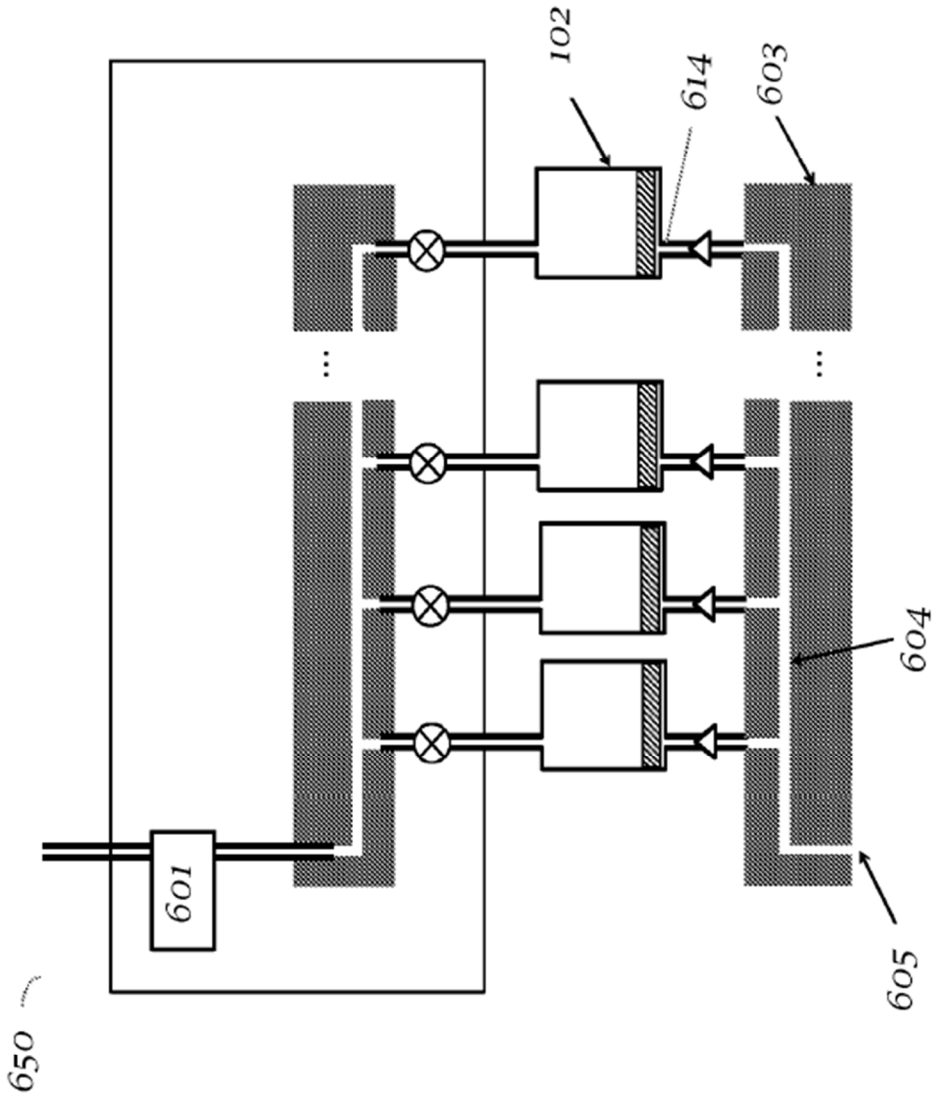


Fig. 6 (b)

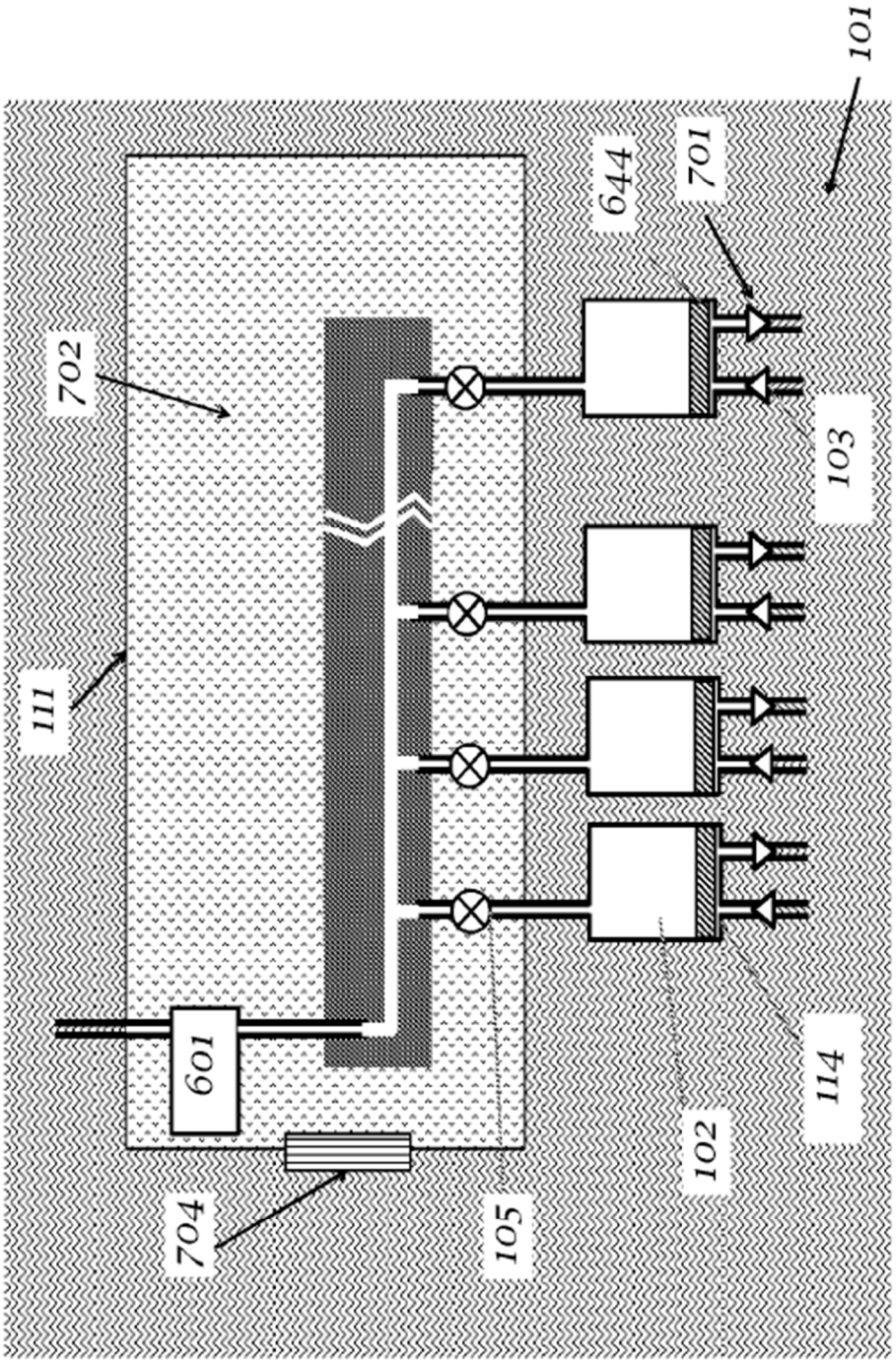


Fig. 7

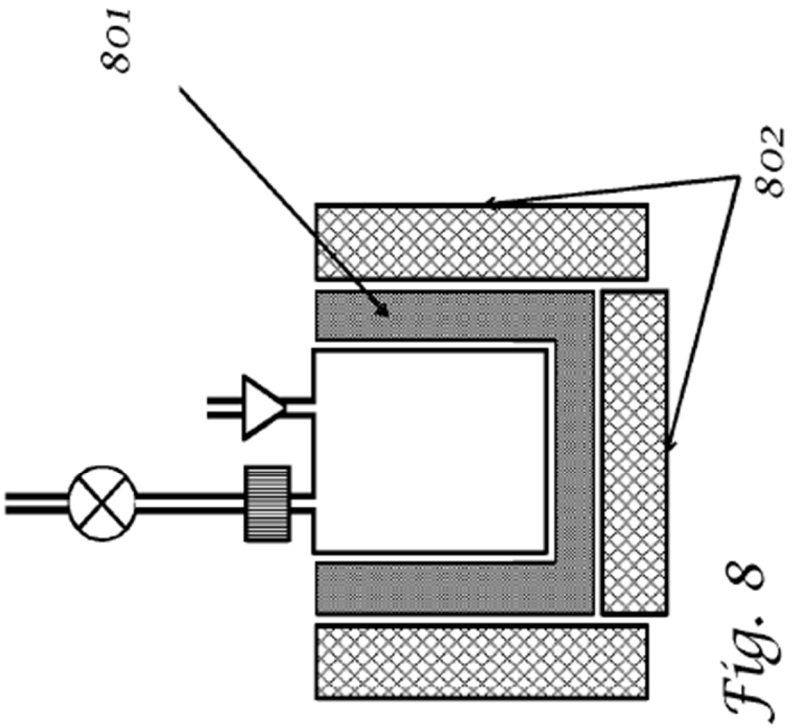


Fig. 8

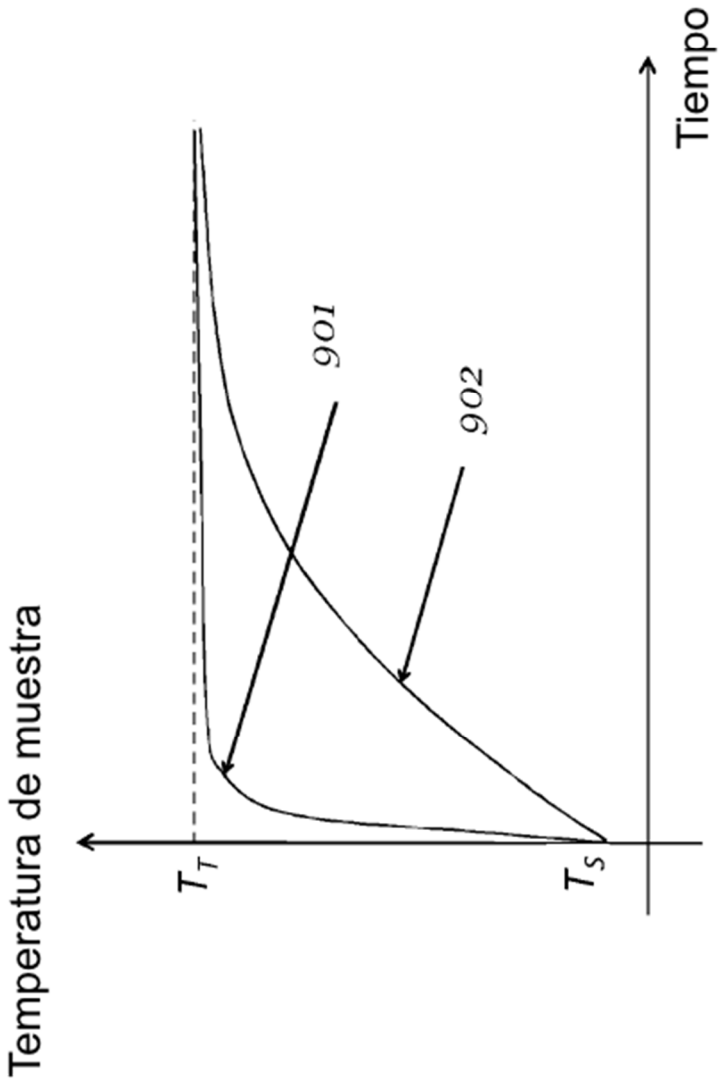


Fig. 9

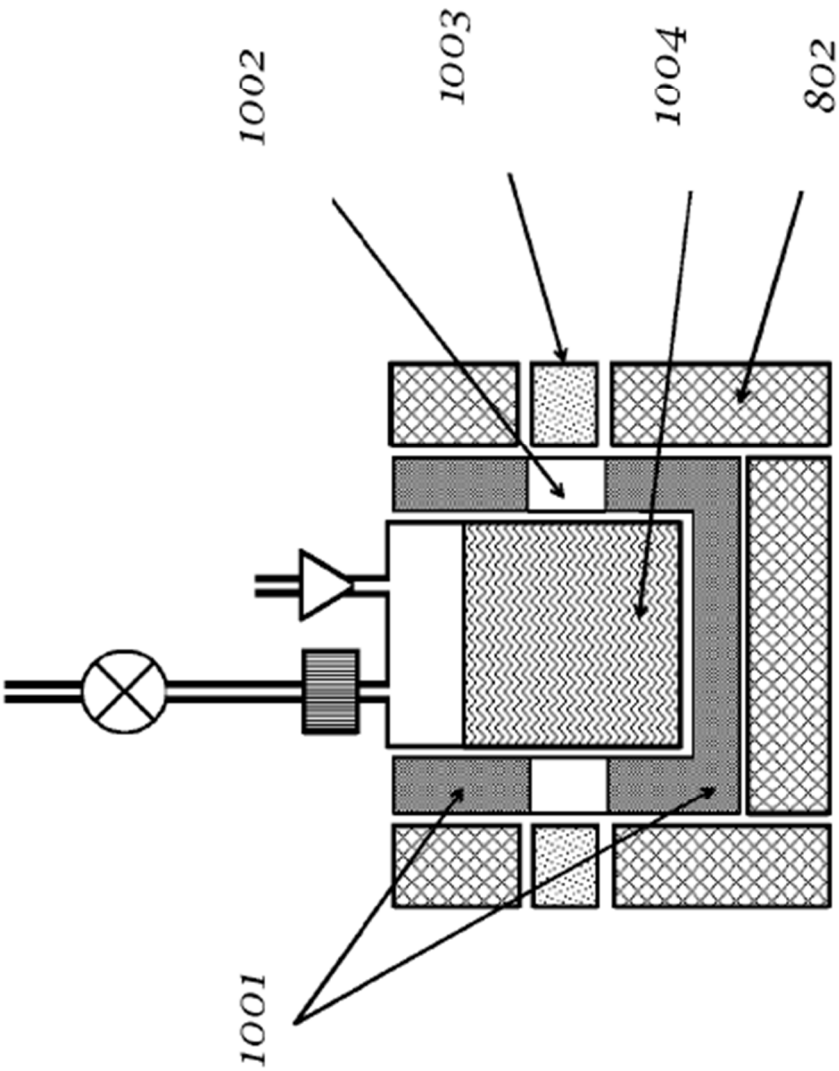


Fig. 10

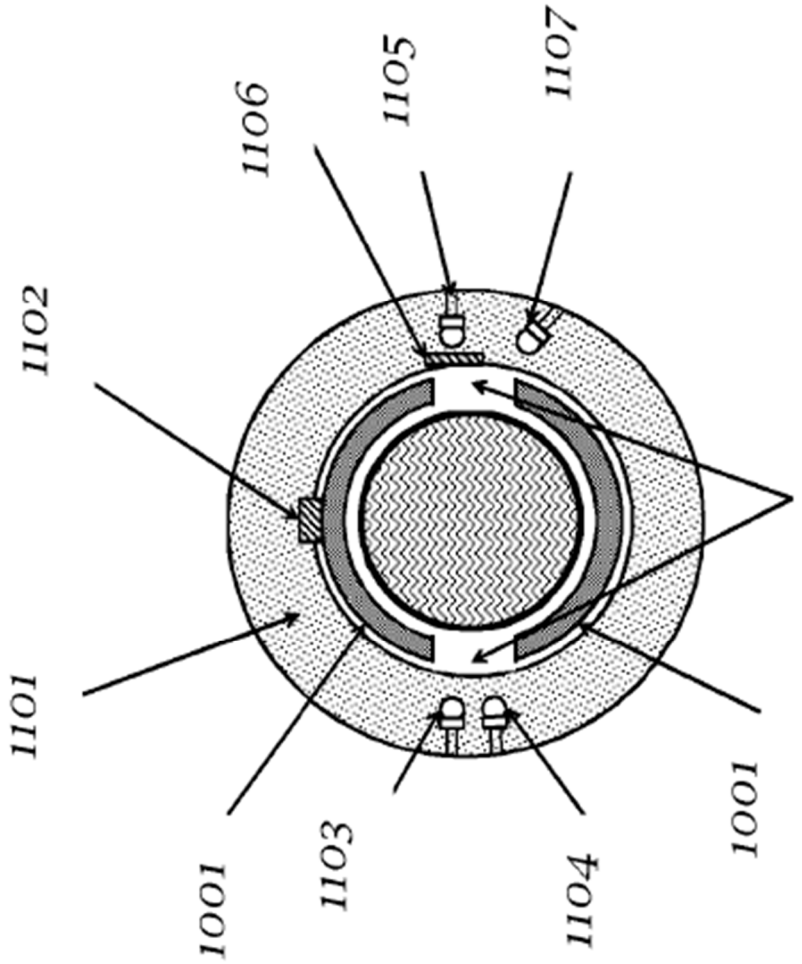


Fig. 11

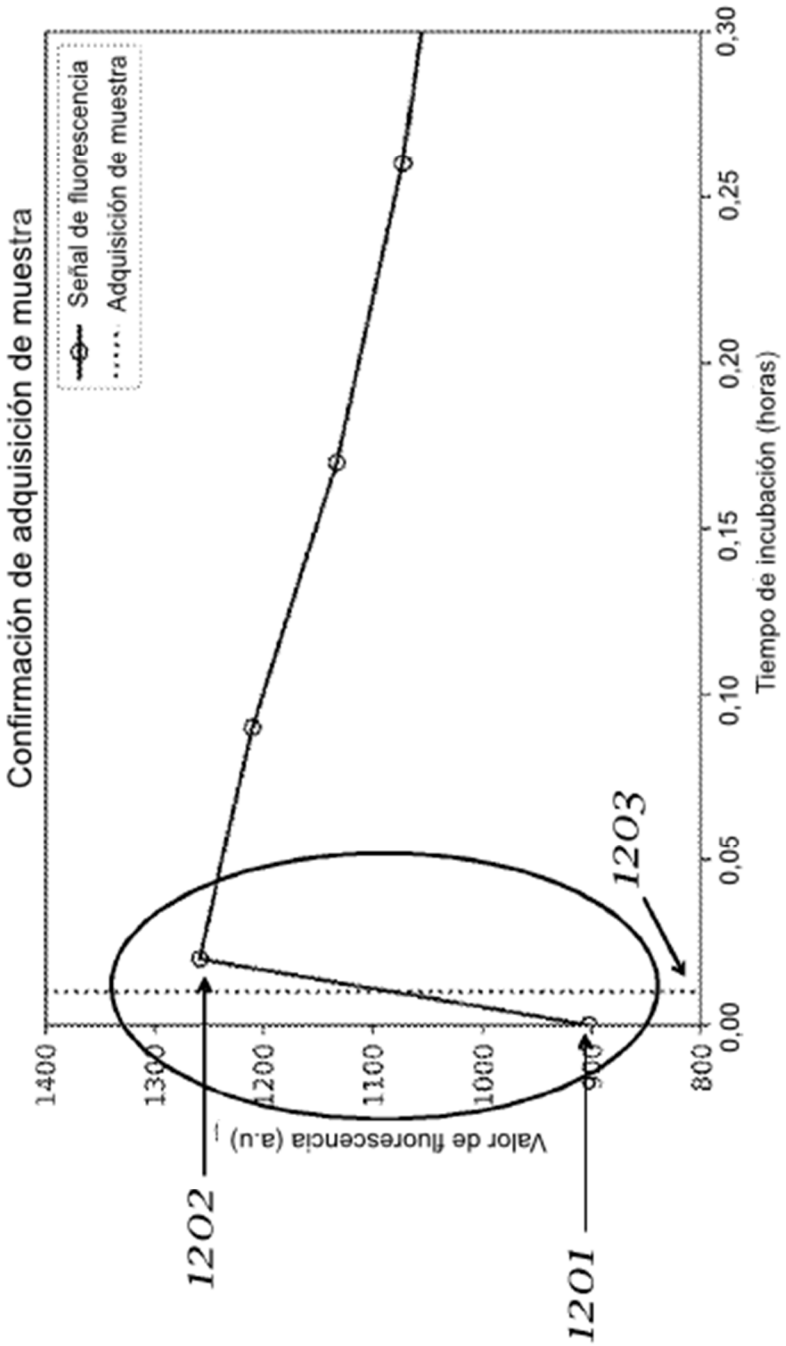

Confirmación de adquisición de muestra
Señal de fluorescencia
Adquisición de muestra
Valor de fluorescencia (a.u)
Tiempo de incubación (horas)
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
0,30
1202
1201
1203

Fig. 12

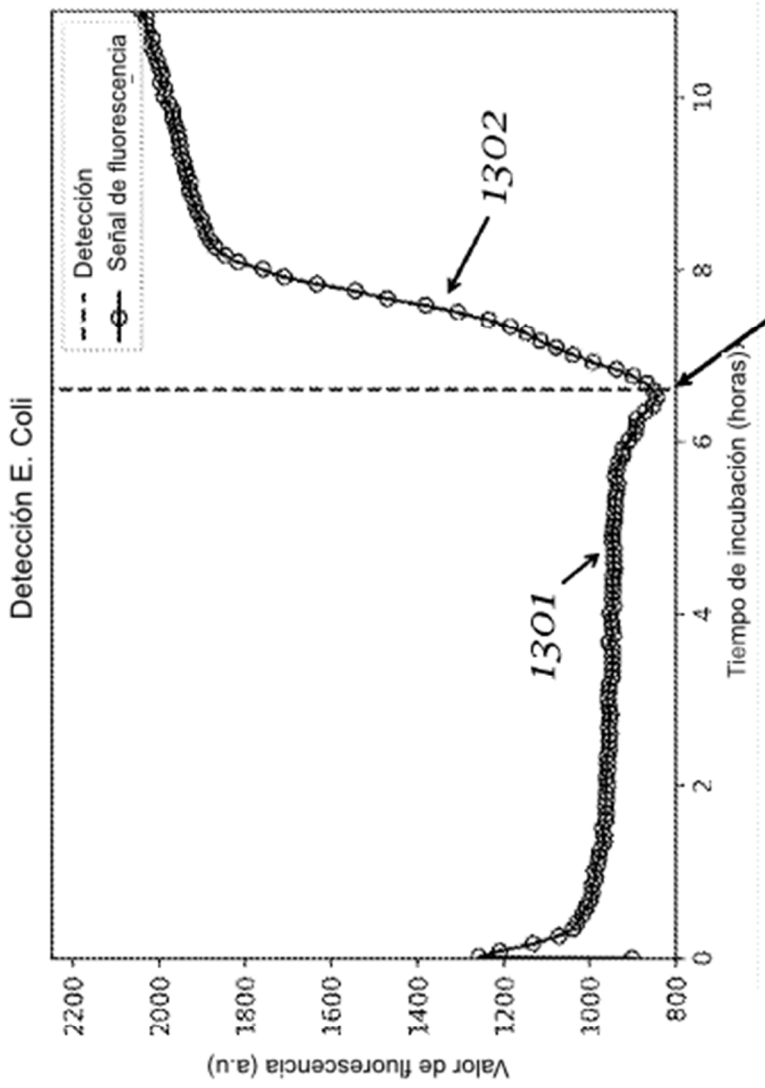

Detección E. Coli
Detección
Señal de fluorescencia
1301
1302
1303
Valor de fluorescencia (a.u)
Tiempo de incubación (horas)
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
0
2
4
6
8
10

Fig. 13

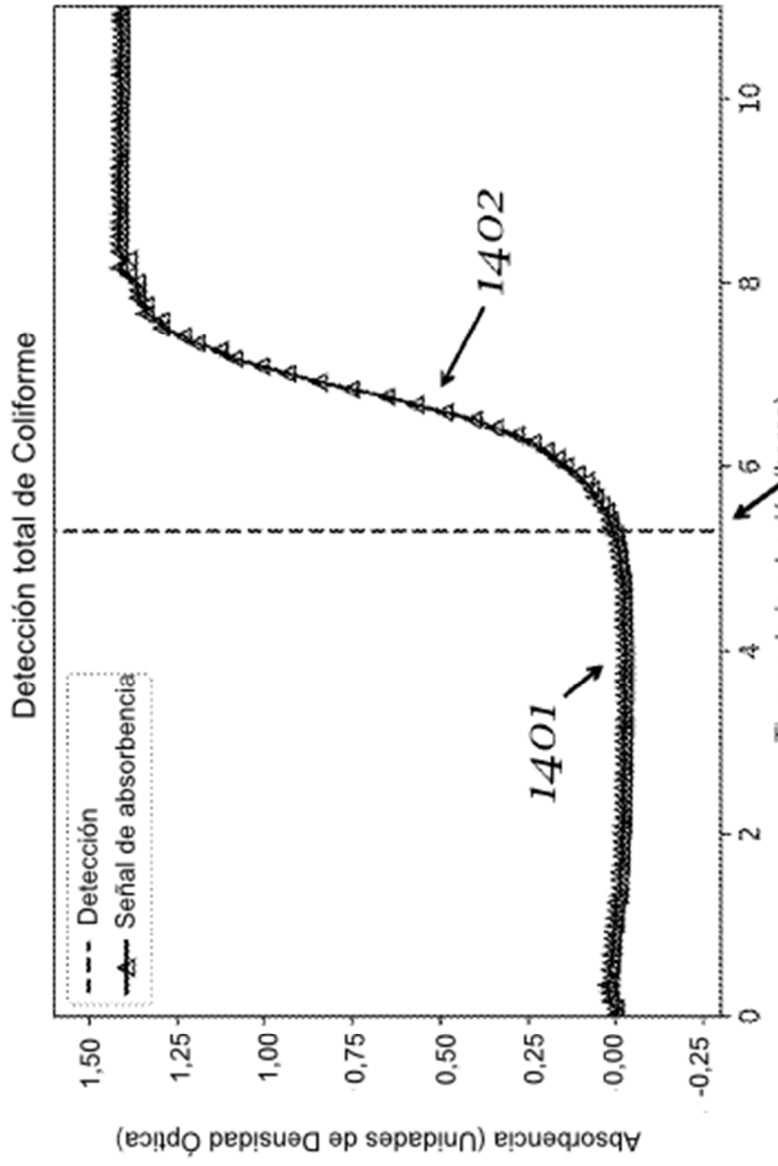

Detección total de Coliforme
Detección
Señal de absorbencia
Absorbencia (Unidades de Densidad Óptica)
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-0,25
0
2
4
6
8
10
Tiempo de incubación (horas)
1401
1402
1403

Fig. 14

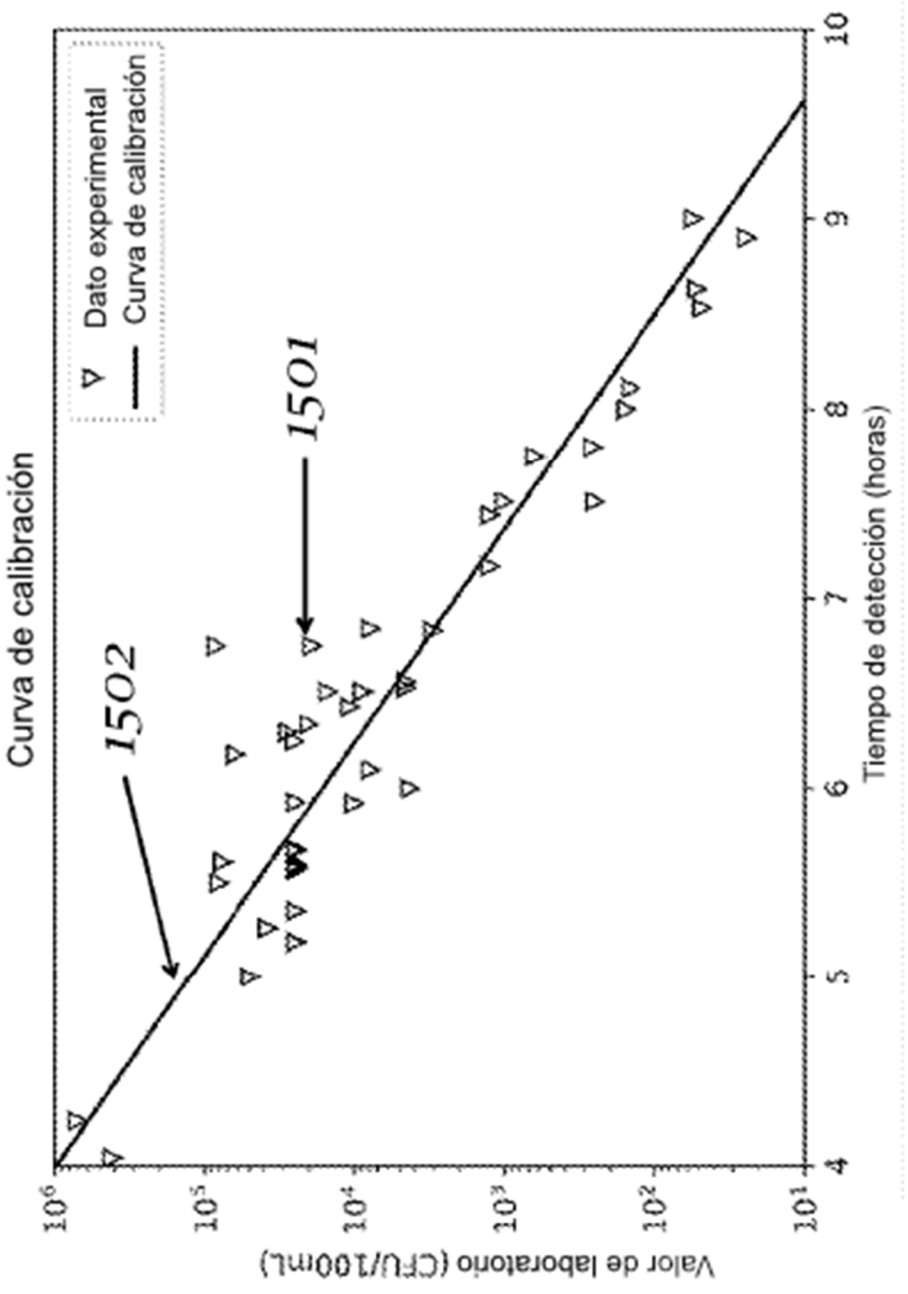

Curva de calibración
Dato experimental
Curva de calibración
1501
1502
Valor de laboratorio (CFU/100mL)
Tiempo de detección (horas)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
4
5
6
7
8
9
10

Fig. 15

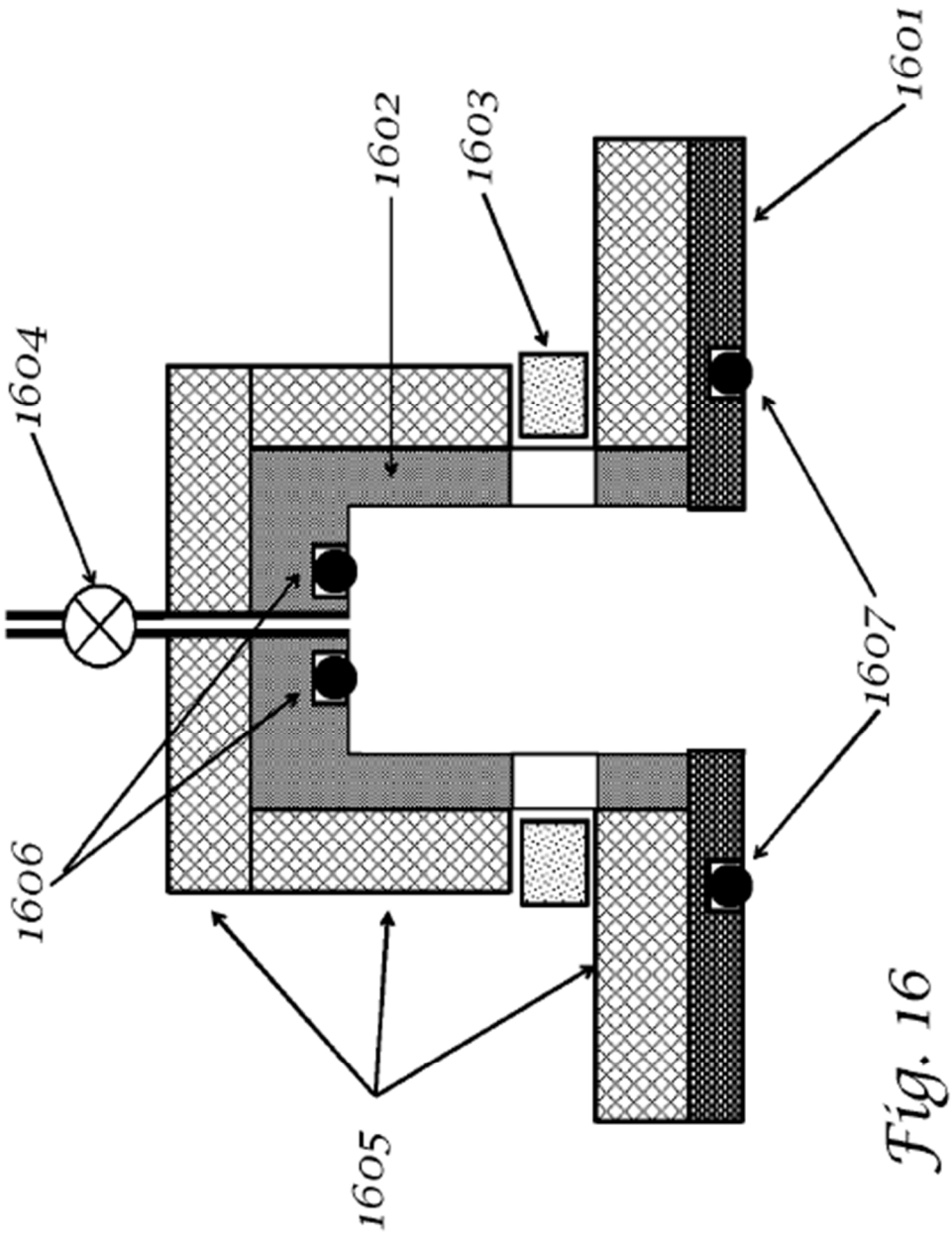


Fig. 16

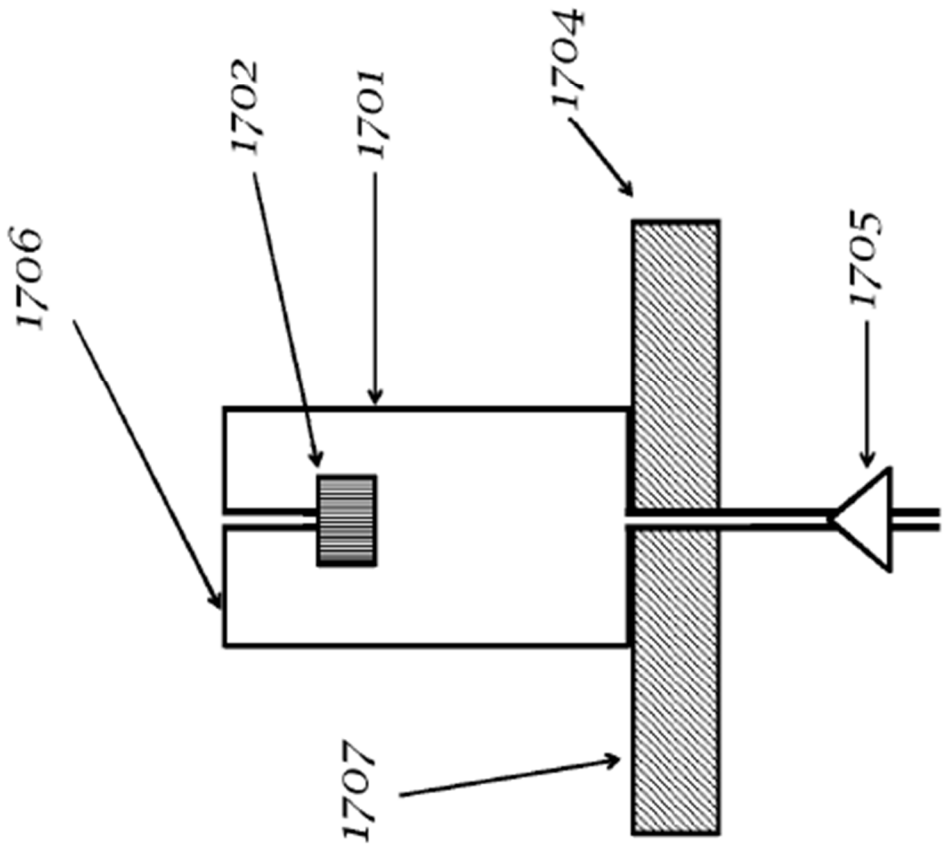


Fig. 17

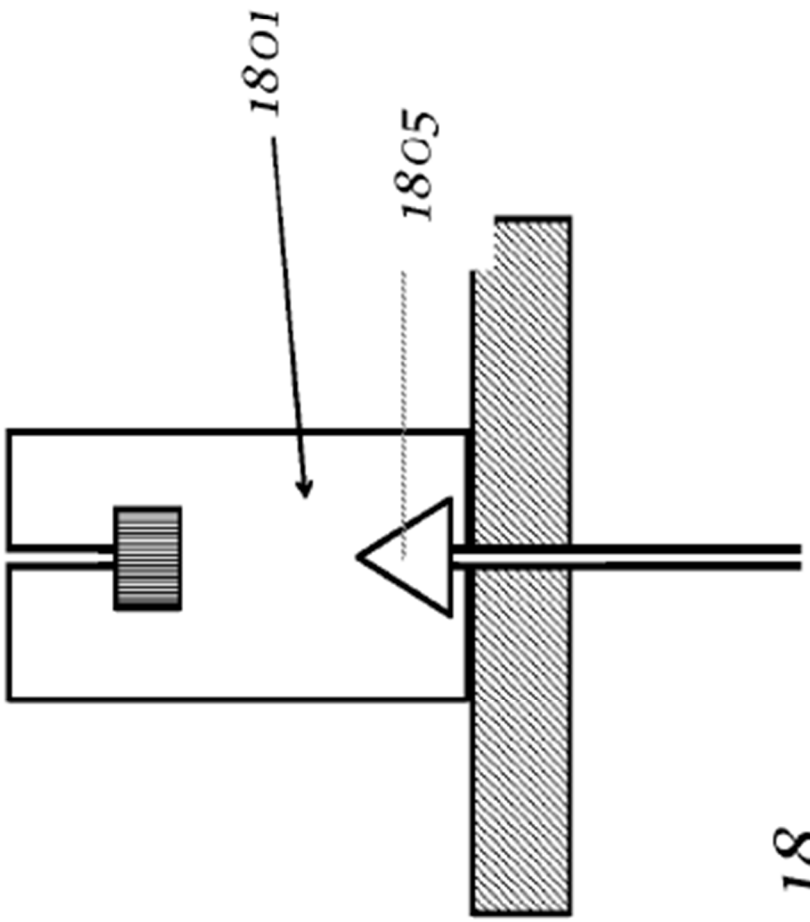


Fig. 18

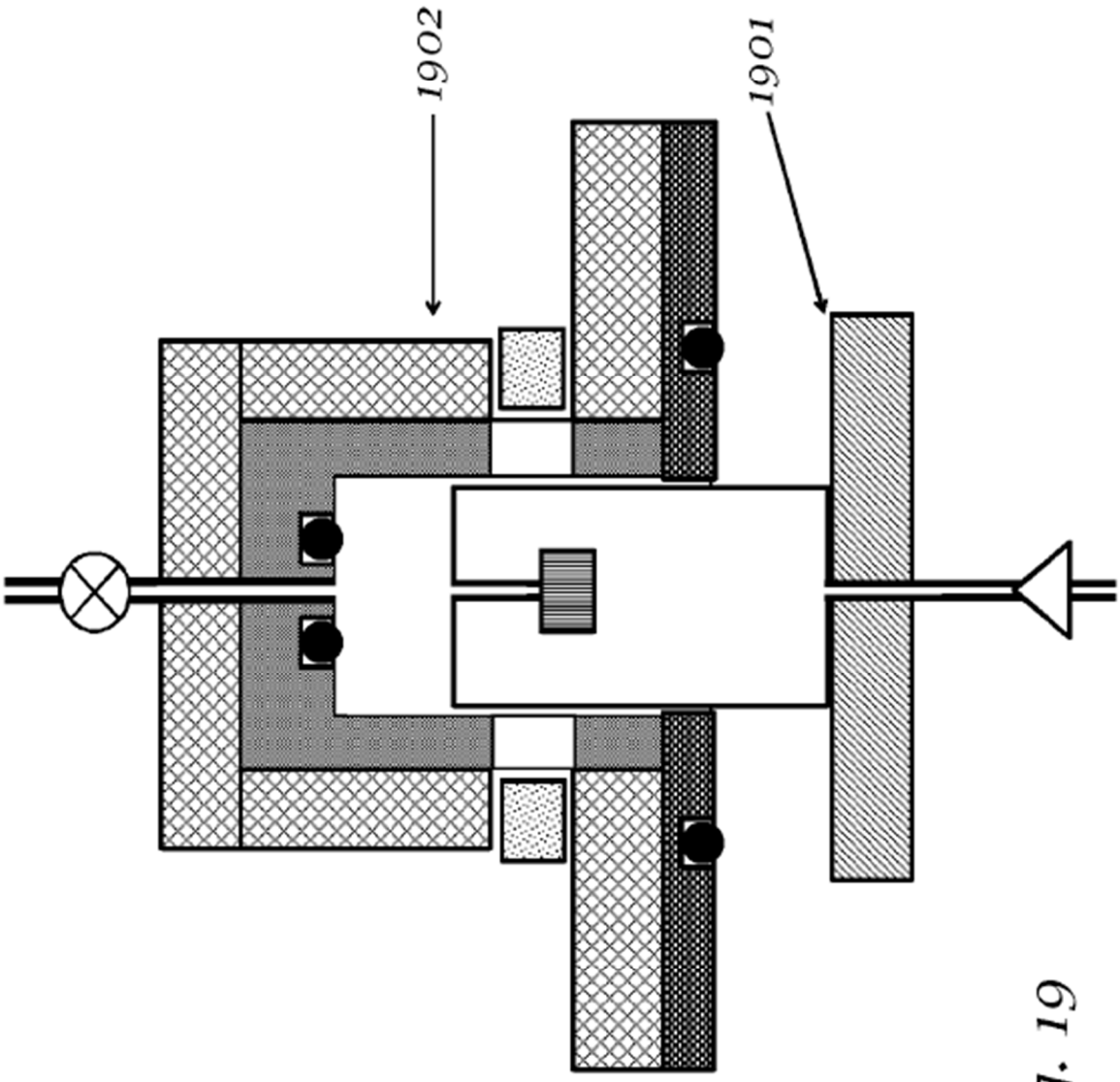


Fig. 19

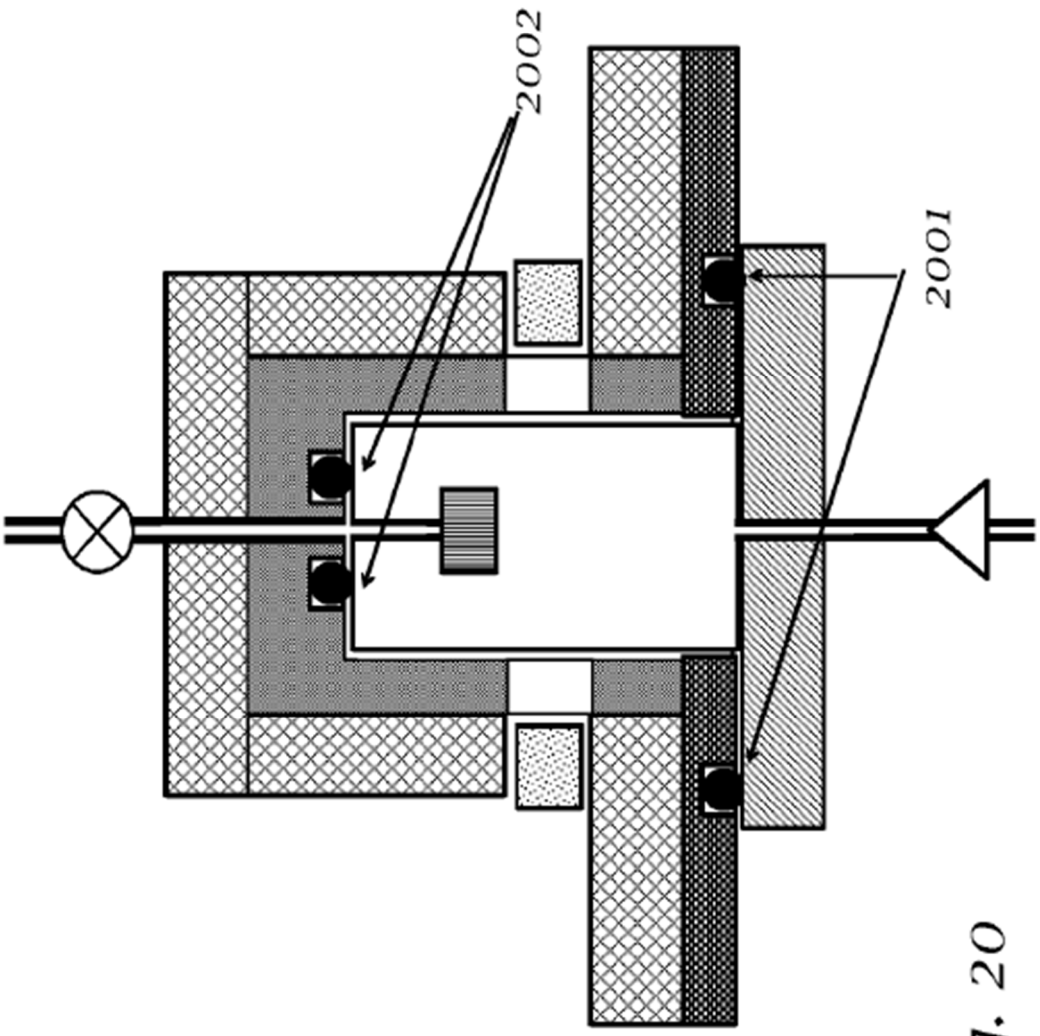


Fig. 20

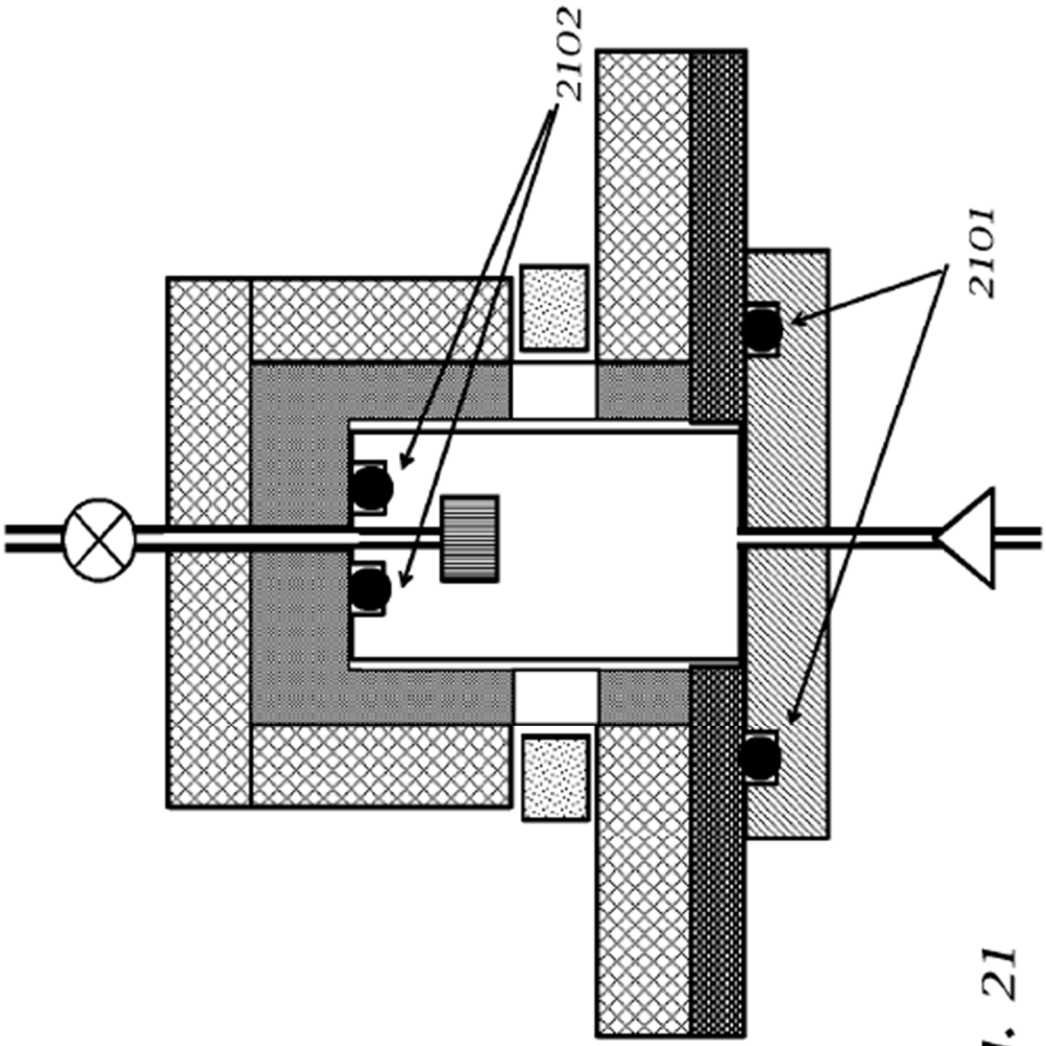


Fig. 21

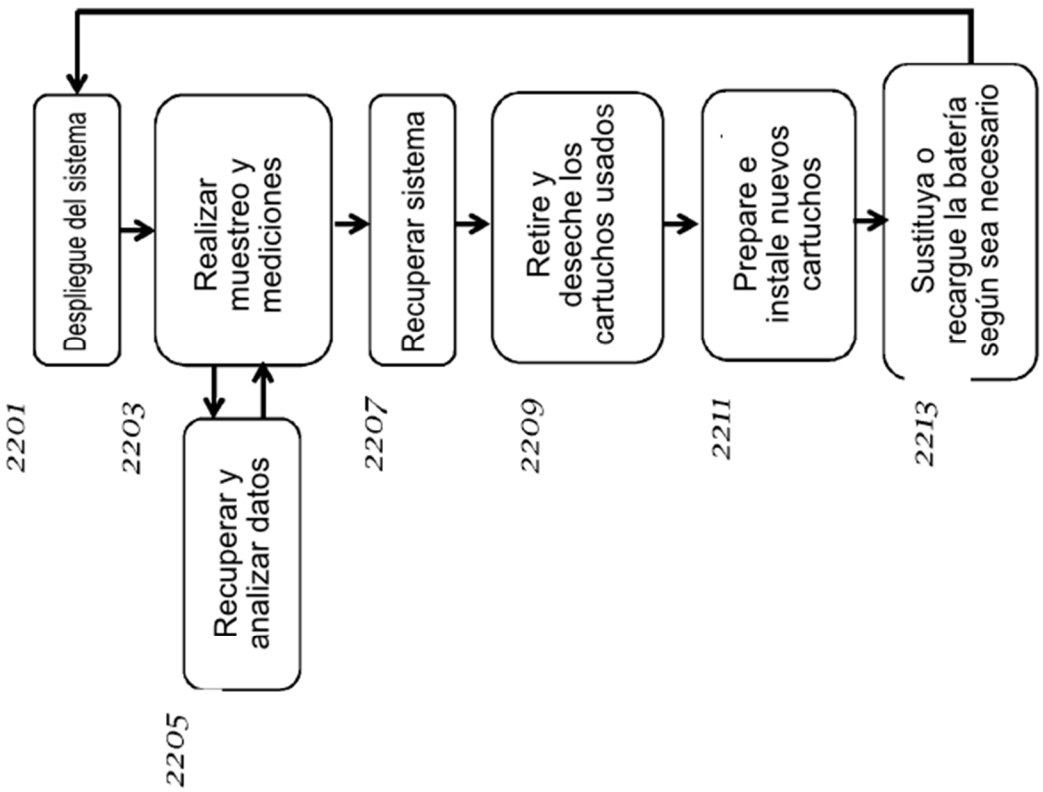

Despliegue del sistema
Realizar muestreo y mediciones
Recuperar y analizar datos
Recuperar sistema
Retire y deseche los cartuchos usados
Prepare e instale nuevos cartuchos
Sustituya o recargue la batería según sea necesario
2201
2203
2205
2207
2209
2211
2213

Fig. 22

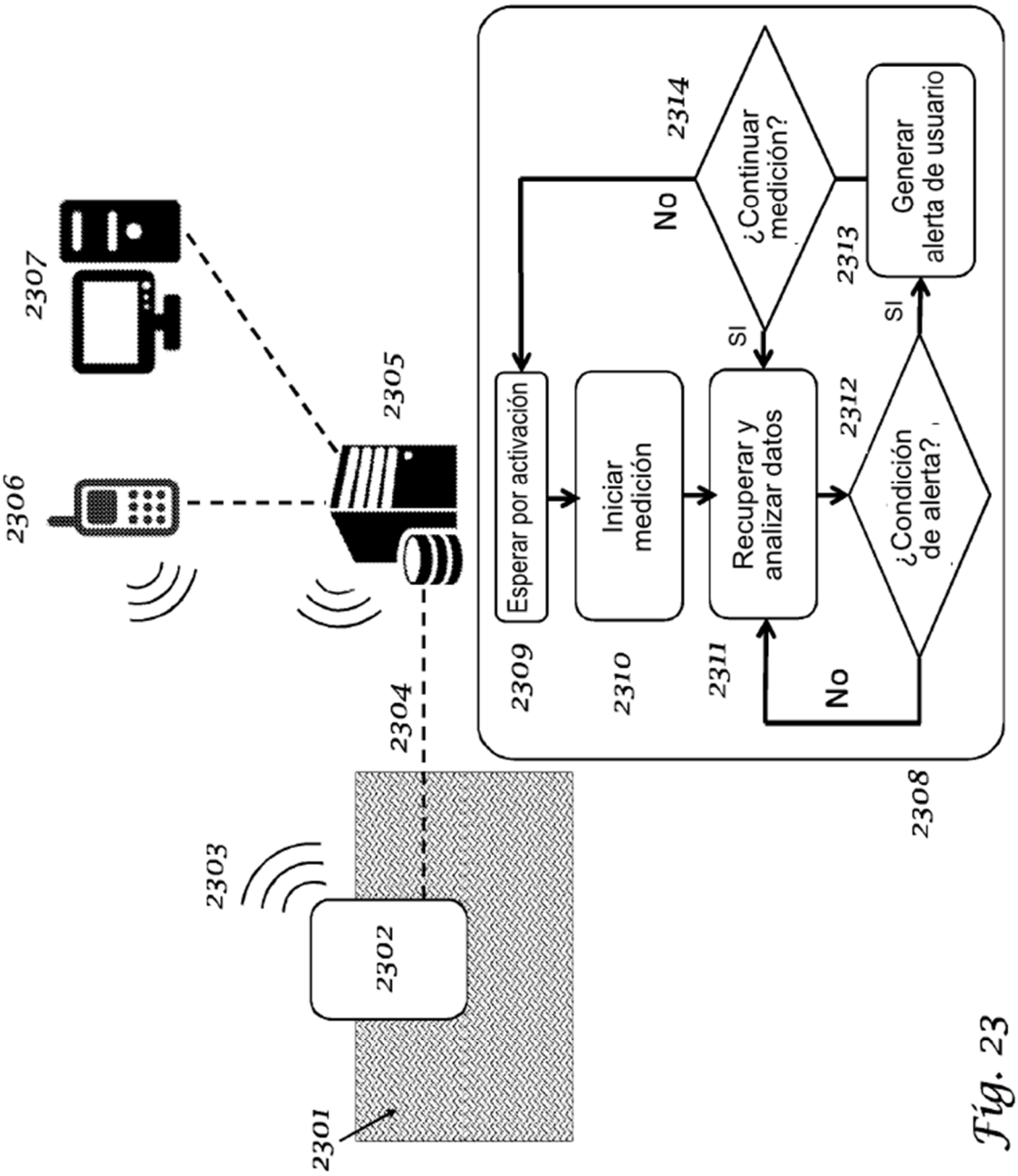

2307
2306
2305
2304
2303
2302
2301
2308
2309
Esperar por activación
2310
Iniciar medición
2311
Recuperar y analizar datos
2312
¿Condición de alerta?
No
Sí
2313
Generar alerta de usuario
Sí
2314
¿Continuar medición?
No

Fig. 23