

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 315 122**

21 Número de solicitud: 200602390

51 Int. Cl.:

G01N 33/18 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **16.09.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2009

71 Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona
Area I+D-Edifici A-Campus Univ., s/n
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

72 Inventor/es: **Mas Gordi, Jordi;
Vigués Frantzen, Núria;
Campo García, Francisco Javier del;
Ordeig, Olga y
Muñoz, Francisco Xavier**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad del agua.**

57 Resumen:

Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad del agua.

La invención se basa en un sensor de medida para la toxicidad del agua y consiste en una red de micro-electrodos recubiertos de una membrana y de un biofilm. La red de micro-electrodos puede ser estándar, y es posible su funcionamiento con un único electrodo, aunque ello acarrearía una pérdida de sensibilidad. La membrana se usa para evitar la pasivación del electrodo por las bacterias presentes en el agua, y se utilizará en una de las realizaciones posibles "Nafion", aunque también es posible que el sensor trabaje sin membrana, pero ello iría en contra de un funcionamiento adecuado. Mediante la medida del oxígeno (relacionada con la respiración de las bacterias) se puede determinar la contaminación de las aguas, dado que la presencia de sustancias tóxicas inhibe la respiración de las bacterias.

ES 2 315 122 A1

DESCRIPCIÓN

Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad del agua.

5 La presente solicitud de Patente de Invención consiste conforme indica su enunciado en un “Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad del agua”, cuyas nuevas características de construcción, conformación y diseño, cumplen la misión para la que específicamente ha sido proyectado con una seguridad y eficacia máximas.

10 Más concretamente, la invención se basa en un sensor de medida para la toxicidad del agua y consiste en una red de micro-electrodos recubiertos de una membrana y de un biofilm. La red de micro-electrodos puede ser estándar, y es posible su funcionamiento con un único electrodo, aunque ello acarrearía una pérdida de sensibilidad. La membrana se usa para evitar la pasivación del electrodo por las bacterias presentes en el agua, y se utilizará en una de las realizaciones posibles “Nafion”, aunque también es posible que el sensor trabaje sin membrana, pero ello iría en contra de un funcionamiento adecuado. Mediante la medida del oxígeno (relacionada con la respiración de las bacterias) se puede determinar la contaminación de las aguas, dado que la presencia de sustancias tóxicas inhibe la respiración de las bacterias.

15 La finalidad de la invención es como su título indica determinar la contaminación de las aguas, muy necesaria, por cuanto la medida del oxígeno en el agua proveniente de la respiración de las bacterias, permite evaluar la contaminación del agua. La invención puede ser aplicada como una forma de sensor en sistemas de alarma de agua residuales, por ejemplo en el diseño de un sistema de producción de alarmas en continuo de afluentes, donde eventualmente pueden aparecer sustancias tóxicas de forma puntual. Otra aplicación sería utilizar el sensor preconizado en análisis puntuales de toxicidad empleando electrodos de un solo uso.

20 Existen en el mercado y por tanto pueden ser considerados como estado de la técnica sensores de toxicidad, llamados en el sector “respirómetros”, es decir medios que miden el consumo de oxígeno e indican de qué manera dicho consumo se ve afectado por sustancias tóxicas, pero utilizan otros sistemas de medir, como por ejemplo células inmovilizadas, emisión de luz y otros. Estos sistemas convencionales presentan la característica adicional de que son mucho más grandes. También existen biosensores, es decir biofilms depositados sobre sensores, pero ninguno de ellos destinados a la aplicación mostrada en la presente invención. La toxicidad del agua puede pues ser determinada mediante diversos sistemas que se basan fundamentalmente en la respuesta de organismos vivos como peces, algas y bacterias, de manera que con ellos se diagnostica la toxicidad observando y midiendo las alteraciones en la fisiología de estos organismos.

25 Los biofilms son conjuntos de bacterias los cuales se asocian de forma totalmente espontánea a superficies en orden a mejorar su ratio de supervivencia en ciertos medios. Los biofilms que se utilizan en la invención utilizan como medio de crecimiento un cultivo, que es medido a su vez por un sistema de electrodos. Sin embargo también podrían utilizarse biofilms que han crecido de forma natural en el medio de medida. El proceso de cultivo lleva aproximadamente entre diez y quince días, después estos biofilms permanecen estables. El consumo de oxígeno en dichos biofilms está fuertemente influenciado por los parámetros del entorno, particularmente por la presencia de nutrientes y tóxicos, y su ratio de respiración puede ser utilizado como un indicador de toxicidad media.

30 La invención muestra un biofilm basado en un dispositivo micro-respirómetro posibilitando la monitorización de la toxicidad aguda del agua. Todas las mediciones en las que se han implicado biofilms, fueron realizadas en medios libres de fuentes de carbono. Por consiguiente en ausencia de nutrientes, un biofilm se comporta como una mera barrera a la difusión, dado que el biofilm no requiere una cantidad significativa de oxígeno. Sin embargo, tan pronto como los nutrientes estén disponibles, las cantidades de consumo de oxígeno son un resultado de la actividad metabólica de las bacterias.

35 El ratio de consumo de oxígeno está afectado por la presencia de componentes tóxicos, los cuales, si están en concentraciones elevadas pueden destruir una amplia fracción de las bacterias que forman el biofilm. A pesar de esto, se precisan algunas horas para destruir todas las bacterias de un biofilm desarrollado.

40 No se conocen antecedentes relevantes de la invención, por ejemplo en la Patente de Invención japonesa n° 2004-208228 se describe un método y/o aparato de detección de sustancias tóxicas usando microorganismos biosensores y membranas sensoras, que a diferencia de la invención preconizada utilizan una capa celular colocada en el sensor de forma artificial, mientras que la capa utilizada por la presente invención es un biofilm, que crece de forma totalmente espontánea y sin intervención exterior, por otra parte en el antecedente se miden cambios de volumen del material que se utiliza como electrodo. El dispositivo de la invención mide exclusivamente corriente de reducción de oxígeno disuelto en agua. También se conoce la utilización del Nafion con la misma finalidad, sin embargo en esa aplicación no se utilizan biofilms. La función de la membrana es la de evitar la pasivación del electrodo que forma parte del sensor por parte de las bacterias presentes, y se usa a título meramente experimental una membrana de Nafion, para evitar que fuera atravesada por iones, (por ejemplo, de este modo el cloro no afecta la medida de oxígeno), en cualquier caso el sensor puede funcionar sin membrana pero su funcionamiento es mucho peor. La utilización del Nafion aporta la ventaja frente a otras membranas de que aparte de proteger el electrodo, ofrece una buena resistencia al ataque químico (por lo que se espera un mayor tiempo de vida útil del sensor), a la vez que se evita el paso de sustancias electroactivas cargadas negativamente, como por ejemplo el hipoclorito, que pudieran existir en el medio y dieran lugar a errores de estimación.

ES 2 315 122 A1

En definitiva el sistema sirve como indicador de toxicidad, los resultados pueden ser expresados en porcentajes de inhibición de la actividad respiratoria. El dispositivo objeto de la invención puede ser utilizado para el control de la toxicidad en fuentes de agua sin tratamiento para el consumo humano, y también en la gestión de desechos en las plantas de tratamiento del agua reduciendo la toxicidad.

5

Otros detalles y características de la invención se irán poniendo de manifiesto en el transcurso de la descripción que a continuación se da, en la que se hace referencia a las figuras que se acompañan en la presente memoria. Esta realización se muestra a título de ejemplo ilustrativo pero no limitativo de la invención.

10

La figura nº 1 es una representación esquematizada de la invención en la que se pueden ver dos válvulas de regulación del nivel de Nitrógeno y Aire que se mezclan a la salida de dichas válvulas y que alimentan un baño en el que se encuentra el sensor, y los correspondientes electrodos.

15

La figura nº 2 muestra unas gráficas representativas (a) de la evolución de la respuesta electroquímica de distintas combinaciones aire-nitrógeno en la solución empleada en el sensor y (b) de la respuesta del sensor.

La figura nº 3 es un diagrama representativo (sin escala) de la estructura interfacial del micro-respirómetro en solución.

20

La figura nº 4 es la representación en ordenadas-abscisas de los valores de las corrientes de oxígeno registradas en el micro-respirómetro.

25

La figura nº 5 es la representación en unos ejes de ordenadas-abscisas de las tres etapas de desarrollo del biofilm. La figura nº 6 es una gráfica de las corrientes de oxígeno registradas en una solución salina saturada de oxígeno.

En la Fig. 1, se muestra una de las realizaciones preferidas del objeto de la presente invención, en donde el sensor precisa al menos de:

30

- Un bioreactor 1 para la formación de un biofilm.
- Un biofilm 2 con un grosor de entre 20 a 60 micras.
- Unas líneas de aire 3 y nitrógeno 4 controladas y reguladas mediante unas válvulas de nivel 5, 6, que suministran dichos fluidos a una solución 7.
- Una solución 7 formada por agua pura desionizada con una resistividad no menor que $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$.
- Un micro-electrodo 8 formado por 256 discos, de 10 micras de diámetro ordenados según una distribución espacial cúbica.
- Una protección 9 del electrodo 8 anterior a base de "Nafion".

40

La protección del electrodo con una membrana tiene el objetivo de proteger el electrodo de la pasivación por adsorción de moléculas orgánicas procedentes del medio o del biofilm. La ventaja del Nafion es que, además de proteger al electrodo, ofrece una buena resistencia al ataque químico (por lo que se espera que aporte un mayor tiempo de vida al dispositivo) y que evite el paso de sustancias electroactivas cargadas negativamente (como el hipoclorito) que pudiera haber en el medio y dieran lugar a errores de estimación, aunque podrían usarse membranas de otro tipo que consiguiesen la protección deseada o incluso podría no usarse membrana aunque ello reduciría el rendimiento del electrodo.

50

El bioreactor para la fabricación del biofilm para el sensor preconizado, está formado por un cultivo puro de cualquier tipo de bacteria con capacidad de formar biofilms y de llevar a cabo respiración aeróbica, por ejemplo, *Pseudomonas putida* el cual ha sido preparado con suministro de oxígeno controlado y a 37°C de temperatura. Las bacterias crecen con un nutriente a base de sales con glucosa. El biofilm se desarrolla vigorosamente en estado sólido en la superficie del microespirómetro, en función de la sensibilidad requerida pueden utilizarse espesores de 20 a 60 micras, aunque son posibles otros espesores fuera de los valores anteriormente indicados.

55

El electrodo usado en el sensor y experimentado conforme a los resultados que se muestran en la figura nº 2, se ha construido a base de 256 discos, de 10 micrones de diámetro, y ordenados en una distribución espacial cúbica, con una distancia entre centros de 100 micras. Otras disposiciones espaciales, tales como hexagonales o similares son posibles con rendimientos similares.

60

Con el fin de proteger de contaminación la superficie de los electrodos del contacto directo con las bacterias del biofilm, el micro-electrodo ha sido protegido con una capa de Nafion a modo de membrana. La membrana no es un elemento esencial, ya que el sensor puede trabajar sin membrana, por lo que la naturaleza de la misma será cualquiera siempre que cumpla los requisitos de impedir el paso de los productos de desecho bacteriano hasta la superficie del electrodo, y suponga para el oxígeno solo una mera barrera difusional, que pueda servir a los propósitos de la invención.

65

ES 2 315 122 A1

Debido a la naturaleza del sensor propuesto en esta invención, esquematizado en la figura n° 3, es necesario determinar el coeficiente de difusión del oxígeno en el Nafion. Las propiedades del Nafion han sido explicadas extensamente en la documentación científica. En esta invención los parámetros tenidos en cuenta son tales como el coeficiente de difusión del oxígeno, la solubilidad del oxígeno y el coeficiente de distribución del oxígeno en la mezcla agua-Nafion. En orden a estimar estos parámetros se han llevado a cabo algunos experimentos de crono-amperometría, en un entorno de oxígeno saturado ($[O_2] = 8.1 \text{ ppm}$).

El crecimiento del biofilm fue seguido electro-químicamente. Las muestras fueron extraídas del cultivo y se sumergieron en una solución salina con el oxígeno suficiente. Bajo estas condiciones, la concentración de oxígeno disuelto fue siempre de $8.2 \pm 0.2 \text{ ppm}$ (ca. 0.25 mM).

Descrita suficientemente la presente invención en correspondencia con las figuras anexas, es fácil comprender que podrán introducirse en la misma cualesquiera modificaciones de detalle que se estimen convenientes siempre y cuando no se altere la esencia de la invención que queda resumida en las siguientes reivindicaciones.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua del tipo utilizado para la medida del consumo de oxígeno y que indica de qué manera queda afectado dicho consumo de oxígeno por sustancias tóxicas presentes en el agua, también llamados respirómetros con el fin de evaluar la contaminación del agua **caracterizado** porque dicho sensor está formado al menos por:

- Un biofilm (2) con un espesor en función de la sensibilidad requerida
- 10 - Unos medios (5, 6) que regulan unas líneas de suministro (3, 4) de nitrógeno y aire a una solución contenida en un recipiente formando parte de un bioreactor.
- Una red de electrodos (8)
- 15 - Una protección (9) para dichos electrodos (8) a base de una membrana.

20 2. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque para la preparación del biofilm para el sensor se utiliza cualquier tipo de bacteria con capacidad de formar biofilms y de llevar a cabo respiración aeróbica.

3. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque la red de electrodos está formada por, como mínimo, un electrodo.

25 4. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque cada uno de los electrodos en la red de electrodos está formado por una pluralidad de discos con una separación entre centros de los discos que forman un electrodo de 100 micras.

30 5. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque el electrodo está protegido con una capa de Nafion.

6. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque los medios de suministro que regulan las líneas (3, 4) de oxígeno y nitrógeno son unas válvulas de nivel.

35 7. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque el sensor dispone de un electrodo formado por 256 discos de 10 micras de diámetro ordenados espacialmente en una distribución cúbica.

40 8. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque el sensor dispone de un electrodo formado por una red de electrodos distribuidos espacialmente de forma hexagonal o similar.

9. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la segunda reivindicación **caracterizado** porque el sensor dispone de un cultivo de *Pseudomonas putida*.

45 10. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la novena reivindicación en **caracterizado** porque dicho cultivo ha sido preparado con un suministro de oxígeno y nutrientes controlado y a 37°C de temperatura.

50 11. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la segunda reivindicación, **caracterizado** porque el biofilm ha crecido en el medio de medida.

12. Sensor perfeccionado para la medida de la toxicidad en el agua según la primera reivindicación **caracterizado** porque dicho sensor está formado al menos por:

- 55 - Un biofilm con un espesor de entre 20 a 60 micras.
- Unas válvulas de nivel (5, 6) que regulan unas líneas (3, 4) de suministro de nitrógeno y aire a una solución contenida en un recipiente (1) formando parte de un bioreactor.
- 60 - Una solución formada por agua pura desionizada con una resistividad no mayor de 18 MΩ·cm⁻¹.
- Un electrodo (8) formado por 256 discos, de 10 micras de diámetro ordenados espacialmente en una distribución cúbica.
- 65 - Una protección (9) para el electrodo anterior a base de “Nafión”.

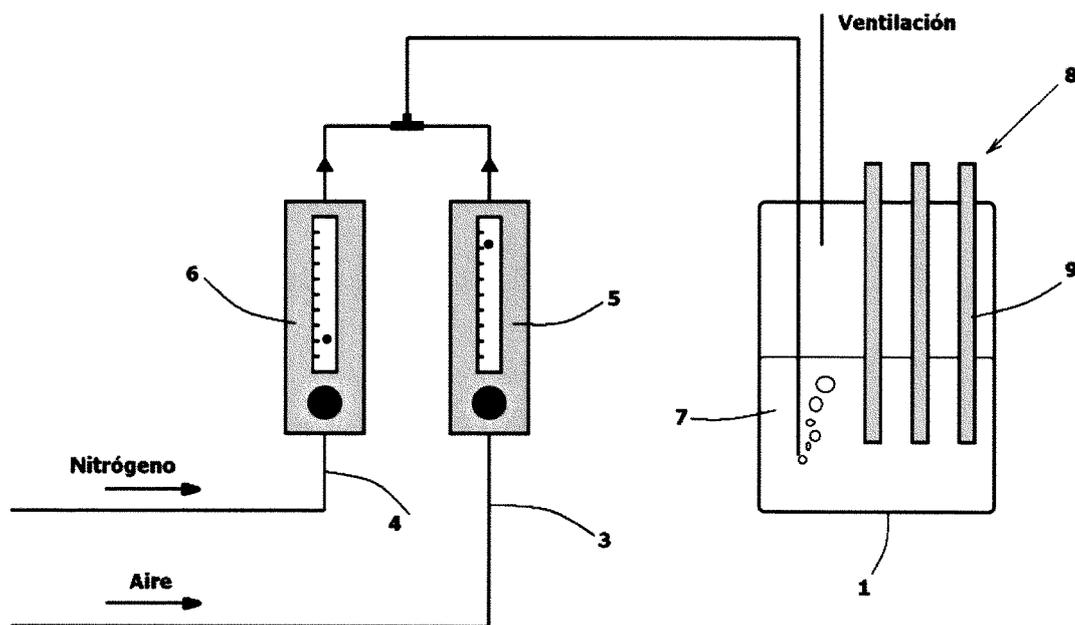


Fig. 1

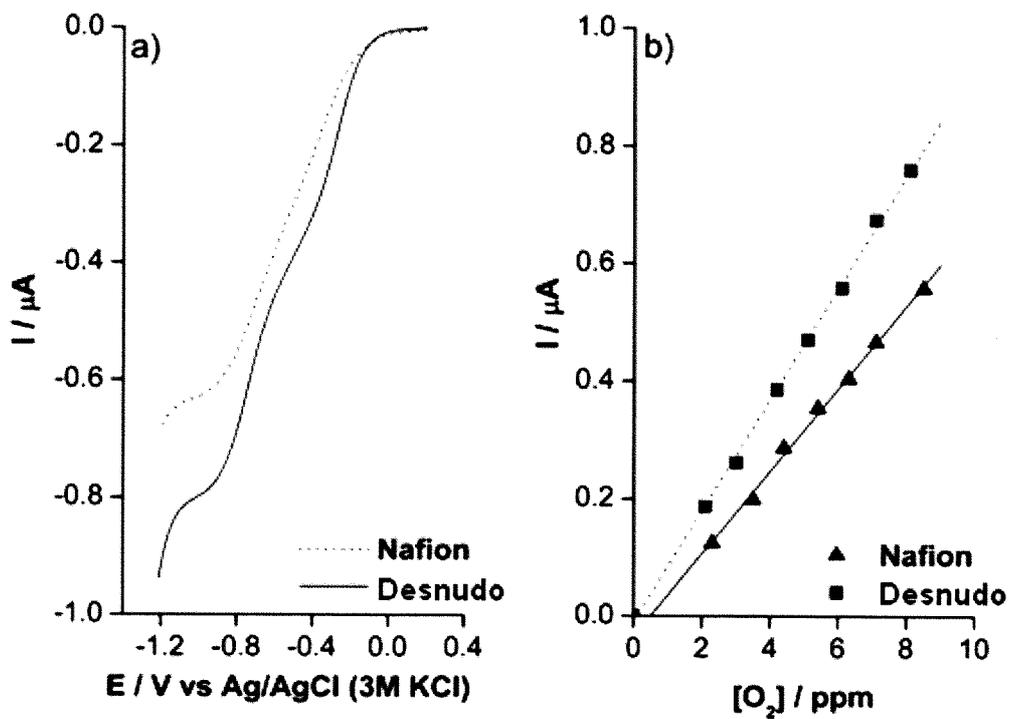


Fig. 2

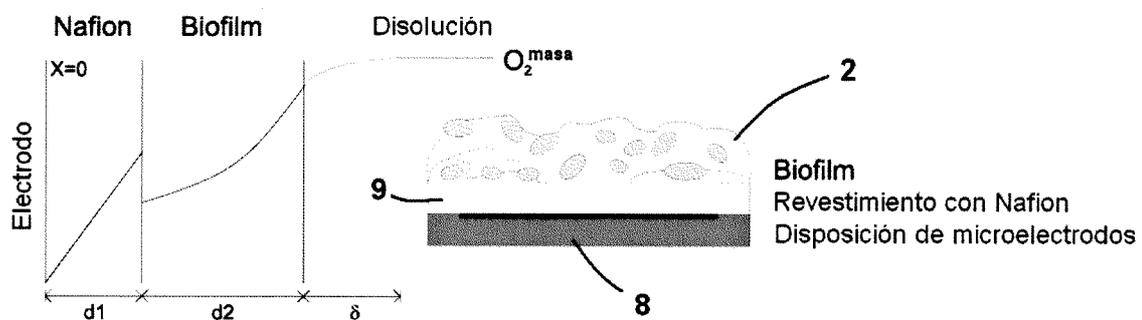


Fig. 3

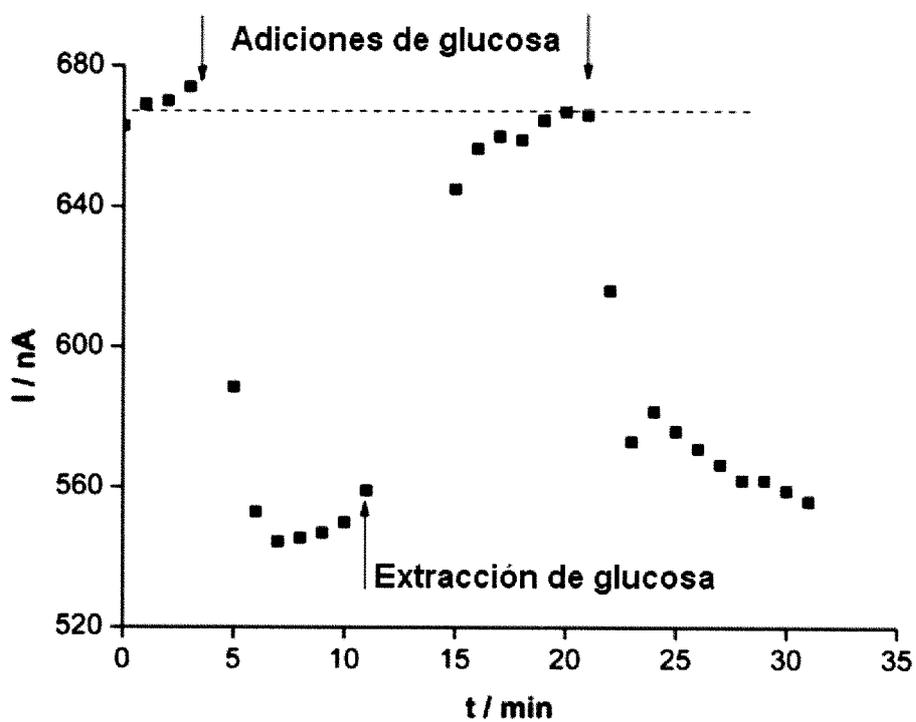


Fig. 4

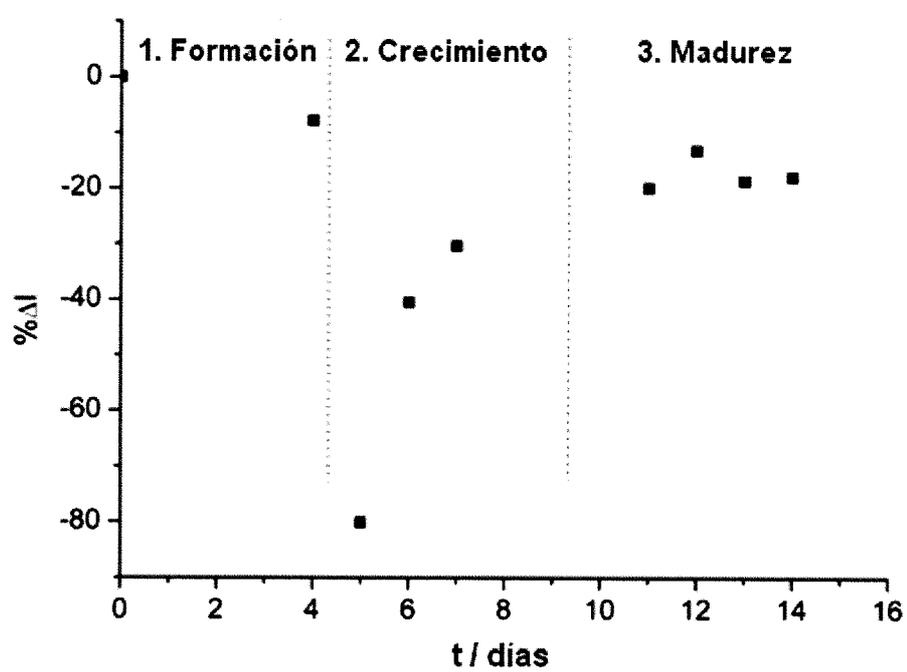


Fig. 5

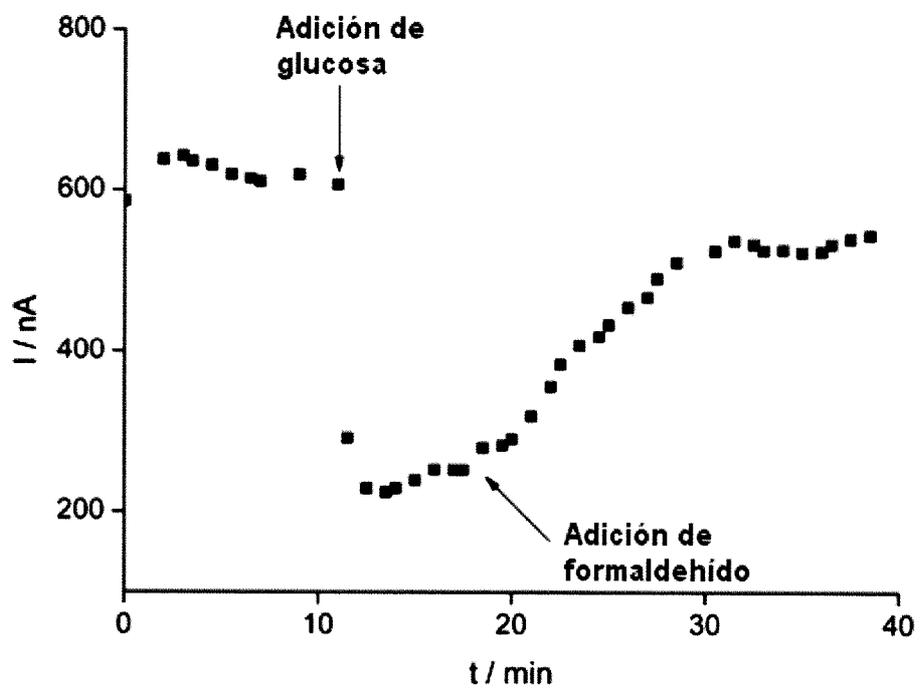


Fig. 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 315 122

② Nº de solicitud: 200602390

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.09.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/18** (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | LIU J., MATTIASSON B. Microbial BOD sensors for wastewater analysis. Water Research. 2002. Vol.36, páginas 3786-3802. | 1-3,5,9-11 |
| Y | | 4,7,8,12 |
| Y | DAVIES T. The cyclic and linear sweep voltammetry of regular arrays of microdisc electrodes: Fitting of experimental data. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2005. Vol. 585, páginas 51-62. | 4,7,8,12 |
| A | GB 1492637 A (KAELLE REGULATORER AB) 23.11.1977, página 1, líneas 73-83; página 2, línea 32 - página 3, línea 13. | 1-12 |
| A | ES 2121705 A1 (BIOSENSORES SL) 01.12.1998, columna 2, línea 58 - columna 3, línea 25; columna 4, línea 59 - columna 5, línea 12. | 1-12 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

| | | |
|--|--------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe 19.02.2009 | Examinador B. Aragón Urueña | Página 1/1 |
|--|--------------------------------|---------------|