

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 956**

51 Int. Cl.:  
**C02F 3/34** (2006.01)  
**G01N 33/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07700484 .4**
- 96 Fecha de presentación: **15.01.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1996520**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Consortio bacteriano, dispositivo bioelectroquímico y un proceso para la estimación simple y rápida de la demanda biológica de oxígeno del agua residual**

30 Prioridad:  
**10.03.2006 IN DE06482006**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.12.2012**

73 Titular/es:  
**COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH (100.0%)  
Rafi Marg  
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:  
**KUMAR, RITA;  
JOSHI, ABHA;  
KUMAR, ANIL y  
SAXENA, TUSHYA KUMAR**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 391 956 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Consorcio bacteriano, dispositivo bioelectroquímico y un proceso para la estimación simple y rápida de la demanda biológica de oxígeno del agua residual.

Campo de la invención

5 La presente invención divulga un consorcio bacteriano útil para la estimación rápida de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual.

Además, la presente invención también divulga un dispositivo bioelectroquímico útil para la estimación rápida y reproducible de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual.

10 Más específicamente, se refiere a un proceso para la estimación rápida de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual utilizando agua residual.

Antecedentes y estado de la técnica anterior de la invención

15 La prueba de demanda biológica de oxígeno (DBO) es un índice ambiental crucial para determinar las necesidades de oxígeno relativas de las aguas residuales, los efluentes y el agua contaminada. Se refiere a la cantidad de oxígeno requerida por las bacterias y otros microorganismos en la degradación bioquímica y la transformación de la materia orgánica en condiciones aeróbicas. La prueba también se interpreta como una medición de la concentración de material orgánico que puede servir como sustrato para apoyar el crecimiento de los microorganismos.

20 La prueba de DBO, según se utiliza para evaluar la eficiencia del tratamiento de aguas residuales, pretende ser una medición de la demanda carbonosa de oxígeno así como de la demanda nitrogenada. Esto se conoce como DBO final. Debido a que en algunas aguas residuales suele haber amoníaco, se deben utilizar inhibidores de la nitrificación para eliminar el esfuerzo de la demanda nitrogenada de oxígeno. La demanda carbonosa de oxígeno se denomina DBO de la primera etapa y la demanda nitrogenada de oxígeno se denomina DBO de la segunda etapa. En las aguas residuales que no contienen la materia nitrogenada, el oxígeno consumido por los microorganismos heterótrofos es la DBO carbonosa.

25 Existen varios métodos para calcular el potencial de contaminación del agua. Se desarrolló la prueba de demanda química de oxígeno (DQO) debido a que una prueba de DBO5 necesita 5 días para completarse y, por lo tanto, no es adecuada para la evaluación en tiempo real de la eficiencia del tratamiento de aguas residuales ni para el control operacional de los procesos de tratamiento. Se desarrollaron el carbono orgánico total (COT), el carbono orgánico disuelto (COD), la absorción espectrofotométrica ultravioleta a 254 nm para el material orgánico disuelto y los sólidos suspendidos volátiles para el material orgánico particulado como métodos alternativos para medir la fuerza del agua residual en función de una suposición de que el objetivo principal del tratamiento biológico es reducir la concentración de material orgánico en el agua residual.

30 La prueba de DBO convencional presenta determinados beneficios, por ejemplo, es un método universal para medir la mayoría de las muestras de aguas residuales y, además, no se necesitan equipos costosos. Sin embargo, tiene la limitación de que demanda mucho tiempo y, por consiguiente, no es adecuada para la monitorización del proceso en línea. Por lo tanto, es necesario desarrollar un método de medición que pueda evitar la debilidad del método convencional. Los métodos rápidos, portátiles y rentables para la monitorización ambiental han estimulado el desarrollo de diversas herramientas analíticas de campo, por ejemplo, los biosensores. Los biosensores son dispositivos que transducen una respuesta bioquímica selectiva a una señal medible. Se han desarrollado varios métodos de biosensores para la medición de la DBO. El primer informe de biosensor de DBO fue publicado por Karube y colaboradores en 1977. Luego, se han desarrollado varios tipos de sensores microbianos de DBO y se han realizado diversas modificaciones. La mayoría de los sensores de DBO indicados anteriormente consisten en una membrana sintética con un único microorganismo inmovilizado o con una combinación aleatoria de microorganismos inmovilizados que sirve como biocatalizador. Un sensor de DBO rápido y confiable debe ser especialmente capaz de analizar una muestra de componentes complejos con selectividad relativamente baja, pero con sensibilidad alta. Por lo tanto, el sensor puede responder a todos los tipos de solutos orgánicos biodegradables en las muestras. También es importante que el sensor proporcione resultados comparables con los obtenidos utilizando el método de DBO convencional.

35 La mayoría de los sensores de DBO indicados anteriormente son sensores microbianos tipo biopelícula de células completas, que se basan en la medición de la frecuencia respiratoria bacteriana cercana a un transductor adecuado. Una característica común de estos sensores es que consisten en una película microbiana colocada entre una membrana celulosa porosa y una membrana permeable como el elemento de reconocimiento biológico. Esta película microbiana son poblaciones microbianas inmovilizadas que pueden biooxidar el sustrato orgánico que se va a centrifugar. Generalmente, la respuesta es un cambio en la concentración de oxígeno disuelto (OD) u otro fenómeno, por ejemplo, una emisión luminosa. Se utiliza un transductor físico para monitorizar este proceso. El resultado es un cambio en una señal óptica o eléctrica. La señal se amplifica y se correlaciona con el contenido del material biodegradable medido.

Los documentos 6.511.822 y 6.531.293 de Estados Unidos divulgan un consorcio microbiano inmovilizado que comprende una mezcla sinérgica de bacterias aisladas a saber, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloaca*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter amaloniticus* y *Enterobacter sakazaki*. Se inmoviliza el consorcio microbiano formulado sobre una membrana de nylon cargada. Este consorcio microbiano inmovilizado se une a una sonda de oxígeno disuelta para la preparación de un conjunto de electrodo. Se utiliza el conjunto de electrodo preparado para la estimación rápida y confiable de la DBO.

Un sensor tipo biopelícula de BOD consiste en una sonda OD que incluye la membrana permeable al oxígeno, con otra membrana que contiene bacterias (la biopelícula) entre la membrana y la muestra. El material orgánico se difunde en la biopelícula donde las bacterias actúan sobre este, lo que provoca una caída de los niveles de oxígeno que es medida por la sonda. Se calibra la sonda estableciendo un nivel de referencia ("puesta a cero") con una solución que no contiene material orgánico, seguido de la medición de la respuesta estable en una solución de DBO conocida, normalmente 150 mg de glucosa más 150 mg de ácido glutámico en 1 litro de agua destilada tomada como DBO de aproximadamente 200 mg l-1. La respuesta de las muestras desconocidas se proporciona a la referencia para obtener el resultado de DBO. El tiempo indicado para alcanzar una lectura estable oscila entre menos de 10 minutos y 30 minutos.

Se ha incorporado una técnica relacionada que utiliza la biología de lecho fluidizado (en lugar de la biopelícula) con sondas OD a un instrumento disponible en el mercado.

Otro método utiliza una biopelícula como en el método anterior pero, en lugar de esperar una lectura estable, mide la frecuencia del cambio del oxígeno absorbido por las bacterias, y se obtienen resultados en aproximadamente 1 minuto.

Los métodos son similares a la prueba de DBO que utiliza la actividad bacteriana para sus mediciones y, por consiguiente, responde fuertemente al material fácilmente biodegradable. Muchos investigadores utilizan un monocultivo; en qué medida este aproxima una respuesta a un cultivo mixto dependerá principalmente de la muestra. Algunos investigadores han tenido dificultades en la obtención de resultados reproducibles de los sensores que utilizan microorganismos mixtos del lodo activado.

Además de los efectos de la dilución en la DBO, los sensores de tipo biopelícula no pueden incluir la degradación de la materia orgánica particulada en cualquier medida significativa ya que las bacterias están inmovilizadas dentro del sistema del sensor. Sin embargo, se ha demostrado que las biopelículas se pueden aclimatar a diferentes sustratos (agua residual y componentes puros) para dar mejores respuestas.

Las técnicas de biopelículas permiten el control rápido del proceso, es muy probable que resulten útiles en la monitorización de un residuo consistente del proceso orgánico.

#### Objetos de la invención:

La presente invención utiliza un consorcio bacteriano útil para la estimación rápida de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual.

La presente invención utiliza un dispositivo bioelectroquímico útil para la estimación rápida y reproducible de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual.

La presente invención utiliza un dispositivo bioelectroquímico, el cual dispositivo mide la DBO del agua residual en muy poco tiempo y la medición es altamente reproducible.

Un propósito de la presente invención es proporcionar un proceso para la estimación rápida de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual utilizando agua residual.

#### Resumen de la invención:

La presente invención utiliza un dispositivo bioelectroquímico útil para la estimación rápida de la DBO del agua residual de las bebidas que utiliza una membrana de nylon cargada con un consorcio unido de al menos cinco bacterias con la ayuda de un electrodo, un multímetro y una estación de trabajo portátil con un software desarrollado instalado. Este dispositivo comprende un consorcio de bacterias específicas inmovilizadas en una membrana de nylon unida al electrodo. La medición de la DBO del agua residual de las bebidas que utiliza este dispositivo es rápida, reproducible y eficaz en comparación con los métodos convencionales basados en la valoración. Este dispositivo también excluye la estimación de la DQO requerida para la estimación de la DBO del agua residual.

#### Descripción detallada de la invención:

En consecuencia, la presente invención utiliza un consorcio bacteriano útil para la estimación rápida de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual de las bebidas, en el cual el consorcio consiste en *Aeromonas*

hydrophila con el número ATCC PTA-3751, Pseudomonas aeruginosa con el número ATCC PTA-3748, Yersinia enterocolitica con el número ATCC (PTA-3752), Pseudomonas fluorescens con el número ATCC (PTA-3749), Enterobacter cloaca con el número ATCC (PTA-3882), depositadas en el Depósito Internacional (Colección Americana de Cultivos Tipo) reconocido por el tratado de Budapest.

- 5 En una realización de la presente invención, se mezclan en proporciones iguales las cepas bacterianas utilizadas Aeromonas hydrophila con el número ATCC PTA-3751, Pseudomonas aeruginosa con el número ATCC PTA-3748, Yersinia enterocolitica con el número ATCC PTA-3752, Pseudomonas fluorescens con el número ATCC PTA—3749, Enterobacter cloaca con el número ATCC PTA-3882.

En otra realización de la presente invención, las bacterias utilizadas tienen las siguientes características:

- 10 a) Aeromonas hydrophila con el número ATCC PTA-3751 tiene las siguientes características: bacilos Gram negativos, móvil por un flagelo polar único, el metabolismo de la glucosa es respiratorio y fermentativo, positiva a la oxidasa, positiva a la catalasa, fermenta salicina, sacarosa y manitol.
- b) Pseudomonas aeruginosa con el número ATCC PTA-3748 tiene las siguientes características: gram negativa, bacterias aerobias con forma de bastoncillo, tiene flagelos polares, el metabolismo es respiratorio, nunca es fermentativa, positiva a la oxidasa, positiva a la catalasa y positiva a la desnitrificación.
- 15 c) Yersinia enterocolitica, número ATCC PTA-3752 tiene las siguientes características: bacilos Gram negativos, anaerobia facultativa, tiene tipos de metabolismo respiratorio y fermentativo, negativa a la oxidasa, móvil, produce ácido de la sacarosa, la celobiosa, la sorbosa y el sorbitol.
- d) Pseudomonas fluorescens con el número ATCC PTA-3749 tiene las siguientes características: gram negativa, bacterias aerobias con forma de bastoncillo, tiene flagelos polares, el metabolismo es respiratorio, nunca es fermentativa, positiva a la catalasa, produce pioverdina y positiva a la licuación de la gelatina.
- 20 e) Enterobacter cloaca con el número ATCC PTA-3882 tiene las siguientes características: bacilos rectos Gram negativos, móviles por flagelos peritricos, anaerobio facultativo, fermenta glucosa con producción de ácido y gas, KCN y gelatinasa positiva, nitrato reductasa positiva.

- 25 Además, en otra realización de la presente invención, se cultivan las cepas bacterianas anteriores en medios nutritivos y se monitoriza el crecimiento para obtener la DO deseada a 30°C/120 rpm/12 a 18 horas.

En otra realización de la presente invención, se monitoriza el crecimiento de las cepas bacterianas a 650 nm.

- 30 En otra realización de la presente invención, se centrifuga el cultivo bacteriano y se suspende en tampón de fosfato, 0,025 a 0,075 M, pH de 6,4 a 7,2 para formar el consorcio. En otra realización de la presente invención, se recolecta el sedimento centrifugado y se disuelve en 2,0 a 4,0 ml de tampón de fosfato, 0,025 a 0,075 M, pH de 6,4 a 7,2, para obtener una suspensión de células para la inmovilización de las células.

En otra realización de la presente invención, se seca la membrana microbiana inmovilizada obtenida.

En otra realización de la presente invención, se almacena la membrana microbiana inmovilizada seca y se verifica la viabilidad de los microorganismos en la membrana microbiana inmovilizada.

- 35 Además, la presente invención también utiliza un dispositivo bioelectroquímico útil para la estimación rápida y reproducible de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual de las bebidas, en el cual el dispositivo comprende:

- (a) un electrodo microbiano inmovilizado,
- (b) un multímetro y;
- 40 (c) una estación de trabajo portátil con el software necesario instalado.

En una realización de la presente invención, se prepara el electrodo microbiano inmovilizado colocando la membrana microbiana inmovilizada entre una membrana penetrada por oxígeno y una membrana porosa, seguido por su fijación directamente al cátodo de platino de una sonda de O<sub>2</sub> disponible en el mercado.

- 45 En otra realización de la presente invención, se prepara la membrana microbiana inmovilizada inmovilizando el consorcio microbiano en la membrana.

Además, en otra realización de la presente invención, la membrana utilizada para preparar la membrana microbiana inmovilizada es una membrana de nylon.

En otra realización de le presente invención, la membrana penetrada por oxígeno utilizada es una membrana de teflón.

En otra realización de la presente invención, la membrana porosa utilizada es una red de nylon (malla 00-400).

En otra realización de la presente invención, se conecta el multímetro a la estación de trabajo portátil a través de una tarjeta de interfaz electrónica.

En otra realización de la presente invención, el multímetro puede medir la corriente en nanoamperios.

5 En otra realización de la presente invención, el electrodo utilizado es un electrodo tipo Clark.

En otra realización de la presente invención, el software utilizado es "BioSensBOD" necesario para las pantallas gráficas, el cálculo de la DBO, la obtención de datos en línea y otros cálculos.

La presente invención también proporciona un proceso para la estimación rápida de la DBO del agua residual de las bebidas utilizando un dispositivo bioelectroquímico, en el cual el proceso comprende las siguientes etapas:

10 a) proporcionar un dispositivo bioelectroquímico;

b) aplicar un voltaje de polarización externa de -0,62 a -065 V al conjunto de electrodo microbiano inmovilizado del dispositivo bioelectroquímico;

c) estabilizar el conjunto de electrodo en tampón de fosfato 0,025 a 0,075 M, a un pH de 6,4 a 7,2 durante 30 a 45 minutos seguido de la adición de 5 a 60 mg/ml de glucosa-ácido glutámico (GGA) en tampón de fosfato;

15 d) observar la estabilidad de la membrana microbiana inmovilizada a través de un software que utiliza un conjunto de electrodos estabilizado del dispositivo mediante la medición del cambio en la concentración de oxígeno en términos de corriente que cubre un intervalo de concentraciones de glucosa-ácido glutámico (GGA), es decir, de 15 a 75 mg/l;

e) calibrar el cambio en la corriente para las diferentes concentraciones de GGA obtenidas de la etapa (d) con los valores de DBO convencionales;

20 f) reemplazar la solución de GGA por tampón de fosfato fresco y estabilizar el conjunto;

g) añadir el agua residual de las bebidas en tampón de fosfato 0,025 a 0,075 M a un pH de 6,4 a 7,2 para mantener el porcentaje determinado por el software;

h) observar el cambio en la concentración de oxígeno en términos de corriente con la ayuda del software;

25 i) calcular los valores de DBO utilizando un software con la ayuda de una curva de calibración poniendo el cambio en la corriente.

En una realización de la presente de invención, se recolecta el agua residual de cualquier industria de bebidas.

En otra realización de la presente invención, se sumerge el electrodo en tampón de fosfato 0,025 a 0,075 M, pH de 6,4 a 7,2, agitando en un agitador magnético.

30 Además, en otra realización de la presente invención, el dispositivo es capaz de calcular la carga de la DBO del agua residual que oscila entre 300 y 2250 mg/l de DBO en diversos períodos.

Se utilizan las siguientes bacterias para desarrollar un dispositivo bioelectroquímico que es útil para la estimación rápida y reproducible de la DBO del agua residual de las bebidas.

N.º S	Cultivo	N.º de deposición
1.	Aeromonas hydrophila	PTA-3751 (ATCC)
2.	Pseudomonas aeruginosa	PTA-3748 (ATCC)
3.	Yersinia enterocolitica	PTA-3752 (ATCC)
4.	Pseudomonas fluorescens	PTA-3749 (ATCC)
5.	Enterobacter cloaca	PTA-3882 (ATCC)

35 Se aíslan los cultivos bacterianos del consorcio microbiano anterior de las aguas residuales. Se recolectan muestras de aguas residuales de Okhla Coronation Plant cerca de Okhla, Nueva Delhi.

Para desarrollar el dispositivo bioelectroquímico para la estimación rápida y reproducible de la DBO del agua residual de las bebidas, se han organizado diferentes componentes biológicos y electrónicos. El electrodo utilizado en la invención es un electrodo tipo Clark que se conecta al multímetro que, a su vez, se conecta a una estación de

trabajo portátil con un software instalado necesario para las pantallas gráficas requeridas, la obtención de datos en línea y otros cálculos.

5 Para la preparación del conjunto de electrodo, se coloca la membrana microbiana inmovilizada entre una membrana de teflón penetrada por oxígeno y una membrana porosa, es decir, una membrana de acetato de celulosa, una red de nylon, etc. La membrana microbiana inmovilizada se fija directamente al cátodo de platino de una sonda de O<sub>2</sub> disponible en el mercado.

10 Se realiza la inmovilización de las bacterias en la membrana de nylon mediante la inoculación de las cepas individuales de las bacterias mencionadas anteriormente por separado en un caldo nutritivo que contiene (por litro) 5,0 g de digerido péptico de tejido animal, 5,0 g de cloruro de sodio, 1,5 g de extracto de carne, 1,5 g de extracto de levadura y 0,2 ml de tween-80. Todos los cultivos se incuban preferentemente a 37°C durante aproximadamente 16 a 24 horas en un agitador de incubación. Para una agitación suave, se mantiene el agitador de incubación a las rpm adecuadas, preferentemente a 75 rpm. Después de obtener el crecimiento suficiente, se toman las células bacterianas de estos cultivos individuales en proporciones iguales en función de la densidad óptica y luego se mezclan para la formulación del consorcio microbiano. La suspensión bacteriana resultante se centrifuga a las rpm adecuadas, preferentemente a 10.000 rpm durante un período de 20 minutos. Se lava el sedimento resultante disolviéndolo en una cantidad mínima de tampón de fosfato 0,05 M, pH 6,8 y se recentrifuga a las rpm adecuadas, preferentemente a 10.000 rpm durante un período de aproximadamente 20 minutos. Durante la centrifugación, la temperatura se mantiene preferentemente a 4°C. Se inmoviliza el sedimento así obtenido en diversas membranas/soportes, por ejemplo, una membrana de nylon cargada.

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención y no debe considerarse que limiten el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### Preparación de una membrana microbiana inmovilizada

25 Se realiza la técnica de inmovilización del consorcio microbiano formulado de la presente invención mediante la inoculación de las cepas individuales de las bacterias mencionadas anteriormente por separado en un caldo nutritivo que contiene (por litro) 5,0 g de digerido péptico de tejido animal, 5,0 g de cloruro de sodio, 1,5 g de extracto de carne, 1,5 g de extracto de levadura y 0,2 ml de tween-80. Todos los cultivos se incuban preferentemente a 37°C durante aproximadamente 16 a 24 horas en un agitador de incubación. Para una agitación suave, se mantiene el agitador de incubación a las rpm adecuadas, preferentemente a 75 rpm. Después de obtener el crecimiento suficiente, se toman las células bacterianas de estos cultivos individuales en proporciones iguales en función de la densidad óptica y luego se mezclan para la formulación del consorcio microbiano. La suspensión bacteriana resultante se centrifuga a las rpm adecuadas, preferentemente a 10.000 rpm durante un período de 20 minutos. Se lava el sedimento resultante disolviéndolo en una cantidad mínima de tampón de fosfato 0,05 M, pH 6,8 y se recentrifuga a las rpm adecuadas, preferentemente a 10.000 rpm durante un período de aproximadamente 20 minutos. Durante la centrifugación, la temperatura se mantiene preferentemente a 4°C. Se inmoviliza el sedimento así obtenido en diversas membranas/soportes, por ejemplo, una membrana de nylon cargada y alcohol polivinílico + tela de nylon.

40 Para la inmovilización del consorcio microbiano formulado sobre la membrana de nylon cargada, se disuelve el sedimento del consorcio microbiano formulado en 2 ml de tampón de fosfato 0,05 M, pH 6,8 y se filtra al vacío. Se preparan varias membranas microbianas inmovilizadas en diversas condiciones de densidad celular y en la fase del crecimiento celular. Se dejan secar las membranas microbianas inmovilizadas así obtenidas a temperatura ambiente durante 4 a 6 horas y se almacenan a una temperatura adecuada, preferentemente a 4°C.

45 Se caracterizan las membranas microbianas inmovilizadas así obtenidas con respecto a la densidad celular y a las fases del crecimiento celular. Para esto, los microorganismos individuales crecen durante diferentes períodos y se utiliza un intervalo de concentración de células para la inmovilización en la membrana de nylon cargada. Se verifica la viabilidad y la estabilidad del consorcio microbiano inmovilizado almacenando a pH diferentes y a temperaturas diferentes. Para verificar la viabilidad de las membranas microbianas inmovilizadas, se coloca la membrana en una placa de agar en posición invertida y se incuba a 37°C durante la noche. Se observó el crecimiento de las colonias en las placas de agar. Para el estudio de la estabilidad, se almacenan las membranas microbianas inmovilizadas preparadas a temperaturas diferentes, es decir, a 4°C, a 15°C, a 25°C y a 37°C y a pH diferentes que oscilan entre 6,4 y 7,2. Se observa la respuesta de las membranas microbianas inmovilizadas a intervalos de tiempo regulares.

#### Ejemplo 2

##### Preparación de una curva de calibración para la membrana microbiana inmovilizada

55 Se utilizó GGA como un estándar de referencia para todas las mediciones de la DBO y también para la calibración del sensor de bebidas. Se preparó la solución madre de GGA con una concentración de 12.000 mg/l. Se añadieron diferentes alícuotas de la solución madre de GGA en la célula de medición del sistema del sensor de DBO, para lograr las concentraciones de GGA deseadas de 15 a 300 mg/l (con una DBO de 11 a 220 mg/l). Se observó y se

registró la respuesta del sensor con diferentes concentraciones de GGA. Se graficaron las lecturas y, en la misma gráfica, se dibujó una segunda mantisa que muestra los valores de las DBO convencionales (DBO5) para las mismas concentraciones de GGA utilizadas con el sensor de DBO desarrollado. Se observó una linealidad de GGA de entre 15 mg/l y 60 mg/l determinada con el dispositivo bioelectroquímico (gráfico 1).

5 Ejemplo 3

Selección de una dilución de agua residual de las bebidas para calcular la DBO del agua residual utilizando el dispositivo desarrollado

10 El intervalo lineal del dispositivo bioelectroquímico desarrollado era hasta una concentración de GGA de 60 mg/l. Las muestras de aguas residuales industriales con una alta carga de DBO calculada a partir del análisis de DBO5 no entran en el intervalo lineal de la curva de calibración. Por lo tanto, deben diluirse los efluentes industriales antes de su estimación de la DBO utilizando el sensor de DBO desarrollado. Para el objetivo anterior, debe calcularse el porcentaje de cada muestra de agua residual industrial de acuerdo con la siguiente fórmula establecida:

$$\% \text{ de agua residual industrial} = (\text{Intervalo lineal del sensor} \times \text{vol. del tampón en la célula de medición}) / (\text{Valores de la DBO5 del agua residual industrial})$$

15 Finalmente, se comprobó un intervalo de concentraciones para cada muestra de agua residual por encima y por debajo del porcentaje calculado con relación a su carga de DBO con la ayuda del dispositivo bioelectroquímico desarrollado para lograr resultados auténticos y precisos.

Se observó que los valores de la DBO determinados por el dispositivo bioeléctrico que utiliza la fórmula anterior fueron comparables con la DBO5 (tabla 1).

20 Tabla 1

Valores de la DBO del agua residual de las bebidas determinados por el sensor de DBO y comparación de los valores con la DBO5 y la DBO esperada

Nº de S	DQO (mg/l)	DBO esperada (mg/l)	% esperado	Sensor de DBO		DBO5	% desviación Sensor/DBO5
				% usado	DBO		
1.	1294	906	4,96	4,00	1025	890	+5,6
				4,25	1082		
				4,50	1000		
				4,75	989		
				5,00	940		
				6,00	733		
2.	823	576	7,8	6,00	680	550	+12,7
				7,00	663		
				8,00	620		
				8,25	545		
				8,50	553		
				8,75	560		
				9,00	522		
3.	1085	760	6,0	4,00	650	564	-2,5
				5,00	500		
				6,00	550		

ES 2 391 956 T3

4.	990	697	6,45	5,00	640	620	+3,2
				8,00	513		
				10,00	380		
5.	992	694	6,48	5,00	760	693	+1,7
				6,00	720		
				7,00	705		
6.	1500	1050	4,0	4,00	1050	1098	-4,4
				5,00	1087		
7.	1077	754	5,96	5,00	800	815	+2,2
				6,00	833		
8.	512	358	12,56	10,00	460	410	-2,4
				11,00	409		
				12,00	400		
9.	3370	2359	1,9	1,00	2286	2250	-8,9
				1,50	2105		
				2,00	2050		
				3,00	1733		
10.	417	292	15,4	14,00	314	300	-1,7
				15,00	307		
				15,25	295		
				15,50	316		
				15,75	311		
				16,00	256		
11.	1150	805	5,6	5,00	940	777	+5,1
				6,00	817		
				6,50	831		
				6,75	785		
				7,00	729		
12.	2576	1803	2,49	2,00	2050	1820	+3,3
				2,50	1880		
				2,60	1808		
				2,70	1778		
				3,00	1533		
13.	1946	1362	3,3	2,00	1400	1245	+2,4
				3,00	1467		
				4,00	1275		

Ejemplo 4

Determinación directa de una carga de DBO utilizando el dispositivo bioelectroquímico con la ayuda de un software

- 5 Para calcular la DBO del agua residual de las bebidas utilizando el dispositivo bioelectroquímico desarrollado, primero, se unió la membrana microbiana inmovilizada con el electrodo para la preparación del conjunto de electrodo. Se ensambló el dispositivo conectando el electrodo inmovilizado al multímetro que, a su vez, se conecta a una estación de trabajo portátil a través de una tarjeta de interfaz. Se instala el software "BiOSensBOD" desarrollado

basado en la plataforma Visual Basic en la estación de trabajo portátil. Este software toma los valores de “cambio en la corriente” en tiempo real y los manipula en las pantallas gráficas deseadas.

5 Inicialmente, se sumergió el electrodo en tampón de fosfato colocado en el agitador y se aplicó voltaje de polarización externa a través del multímetro. Se estabilizó la corriente aplicada a través del multímetro. Luego, se observó la estabilidad de la membrana microbiana inmovilizada que mostró el software desarrollado instalado en la estación de trabajo portátil que, a su vez, se conecta a un multímetro a través de una tarjeta de interfaz electrónica. Se midió el cambio en la concentración de oxígeno en términos de corriente cubriendo un intervalo de concentraciones de GGA. Se calibró el cambio en la corriente para las diferentes concentraciones de GGA. Se reemplazó la solución de GGA por tampón de fosfato fresco y se estabilizó el conjunto. Se añadió agua residual de las bebidas real diluida diez veces en tampón de fosfato para mantener el porcentaje de agua residual para calcular la DBO real determinada por el software. Luego, se observó el cambio en la concentración del oxígeno en términos de corriente que mostró el software desarrollado. Finalmente, se calculó el valor de la DBO del agua residual, 621 mg/ml, con la ayuda de la curva de calibración poniendo el cambio en la corriente observado a través del software. Este valor de la DBO fue comparable con la DBO5 determinado por el método basado en la valoración como se muestra a continuación.

Muestra	Estimación de la DBO por dispositivo bioelectroquímico	Estimación de la DBO por método convencional basado en la valoración
Agua residual de las bebidas	621 mg/ml	610 mg/ml

Ventajas:

- 20 1. El dispositivo bioelectroquímico desarrollado es útil para la estimación rápida y reproducible de la DBO del agua residual de las bebidas.
2. El dispositivo desarrollado excluye el análisis DQO requerido para la estimación de la DBO por el método convencional basado en la valoración.
3. El dispositivo es potable y se puede utilizar para la monitorización en línea de la DBO del agua residual de las bebidas en la planta industrial.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la estimación rápida de la DBO del agua residual de las bebidas utilizando un dispositivo bioelectroquímico en el cual el proceso comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar un dispositivo bioelectroquímico que comprende
- 5 i) un electrodo microbiano inmovilizado;
- ii) un multímetro; y
- iii) una estación de trabajo portátil con un software instalado configurado para tomar el cambio en los valores de la corriente en tiempo real y para manipular los valores en las pantallas gráficas deseadas; en el cual los microbios forman un consorcio bacteriano que consiste en *Aeromonas hydrophila* (PTA—3751), *Pseudomonas aeruginosa* (PTA-3748), *Yersinia enterocolitica* (PTA-3752), *Pseudomonas fluorescens* (PTA-3749), *Enterobacter cloaca* (PT A-3882);
- 10 b) aplicar una polarización externa de -0,62 V a -0,67 V al electrodo microbiano inmovilizado del dispositivo bioelectroquímico;
- c) estabilizar el conjunto de electrodo en tampón de fosfato 0,025 a 0,075 M a un pH de 6,4 a 7,2 durante 30 a 45 minutos, seguido de la adición de glucosa-ácido glutámico (GGA) en tampón de fosfato;
- 15 d) observar la estabilidad de la membrana microbiana inmovilizada a través de un software que utiliza un conjunto de electrodos estabilizado del dispositivo mediante la medición del cambio en la concentración de oxígeno en términos de corriente que cubre un intervalo de concentraciones de GGA utilizado, es decir, de 15 a 75 mg/l;
- e) calibrar el cambio en la corriente para las diferentes concentraciones de GGA obtenidas de la etapa (d) con los valores de DBO convencionales;
- 20 f) reemplazar la solución de GGA por tampón de fosfato fresco y estabilizar el conjunto;
- g) añadir el agua residual de las bebidas en tampón de fosfato 0,025 a 0,075 M a un pH de 6,4 a 7,2 para mantener el porcentaje determinado por el software;
- h) observar el cambio en la concentración de oxígeno en términos de corriente con la ayuda del software;
- 25 i) calcular los valores de DBO utilizando un software con la ayuda de una curva de calibración poniendo el cambio en la corriente como se observa en la etapa (h)
2. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 1 en el cual se recolecta el agua residual de cualquier industria de bebidas.
3. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 1 en el cual el electrodo microbiano inmovilizado comprende una membrana microbiana inmovilizada colocada entre una membrana penetrada por oxígeno y una membrana porosa, fijadas directamente al cátodo de platino de una sonda de oxígeno.
- 30 4. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 1 en el cual el dispositivo es capaz de calcular la carga de la DBO del agua residual que oscila entre 300 y 2250 mg/l de DBO en diversos períodos.

Fig. 1 (gráfica 1): Curva de calibración que presenta la correlación de un dispositivo bioelectroquímico con la DBO5 convencional.

