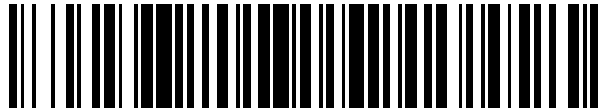


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 253**

51 Int. Cl.:

**B01J 19/00** (2006.01)

**G01N 33/18** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**B01J 4/00** (2006.01)

**B01J 4/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2012 E 12733036 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2731705**

54 Título: **Métodos y aparatos para análisis de sistemas acuáticos químicos y/o biológicos**

30 Prioridad:

**16.07.2011 GB 201112269**

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

**18.02.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE MONS (100.0%)  
Place du Parc 20  
7000 Mons, BE**

72 Inventor/es:

**GROSJEAN, PHILIPPE;  
LEBLUD, JULIEN y  
BATIGNY, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 560 253 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**

Métodos y aparatos para análisis de sistemas acuáticos químicos y/o biológicos

La presente invención se refiere a métodos y aparatos para análisis de sistemas líquidos, particularmente sistemas acuáticos químicos y/o biológicos.

5 La mayoría de los quimiostatos “tradicionales” son biorreactores que funcionan como un reactor continuo tipo tanque agitado (CSTR). Un volumen dado de líquido está contenido en una unidad de reactor bien agitado. En este medio de cultivo (bacterias, algas, células en cultivo, etc.) se produce biomasa. El sistema se estabiliza a lo largo del tiempo: (1) eliminando el exceso de la biomasa producida y subproductos, y (2) añadiendo productos químicos (nutrientes, oxígeno, alimento, etc.) que son consumidos por los organismos vivos. Hay una entrada continua de aditivos y una salida correspondiente de productos (como el volumen del reactor es constante, los caudales de entrada y salida son iguales). Tanto el caudal de entrada/salida como la composición del agua de entrada se ajustan de modo que la composición química del agua en el interior del reactor agitado se mantiene estable. Esto se hace automáticamente midiendo la calidad del agua a la salida y ajustando la cantidad de aditivos como corresponda. Usualmente, la biomasa también se mantiene constante. Esto se regula midiendo la densidad de células en el reactor y cambiando el caudal de entrada/salida para diluir más o menos el medio de cultivo hasta estabilizar la biomasa al nivel deseado en el interior del reactor (denominado estado de régimen del biorreactor).

Dicho sistema es conveniente y eficiente para producir biomasa viva y permite el cálculo del balance de biomasa para productos químicos dados que, a su vez, pueden estimular procesos biológicos, como el crecimiento, respiración, fotosíntesis, etc. El balance de materia para un producto químico dado, por ejemplo O<sub>2</sub>, representado como C en un reactor continuo tipo tanque agitado idealmente es:

$$\frac{dC}{dt} = F_{in} \cdot [C]_{in} - F_{out} \cdot [C]_{out} + \sum_i V_{reactor} \cdot v_i \cdot r_i$$

fórmula en la que F<sub>in</sub> y F<sub>out</sub> son respectivamente caudales de entrada y salida, [C]<sub>in</sub> y [C]<sub>out</sub> son concentraciones del producto químico considerado a la entrada y salida\*, V<sub>reactor</sub> es el volumen de la unidad del reactor, v<sub>i</sub> es el coeficiente estequiométrico de C en la reacción i que se produce en el quimioestato y r<sub>i</sub> es la velocidad de la reacción i. En el caso de un reactor de volumen constante, F<sub>in</sub> = F<sub>out</sub> y como se trata de un quimiostato, se supone que el producto químico no varía significativamente con el tiempo, esto es:

$$\frac{dC}{dt} = 0$$

(suponiendo, por supuesto, que el sistema automático de regulación es eficiente).

La ecuación se simplifica resultando:

$$F_{in} \cdot ([C]_{out} - [C]_{in}) = \sum_i V_{reactor} \cdot v_i \cdot r_i$$

En esta última ecuación, el miembro de la izquierda es un balance de entrada y salida de C en el sistema y el miembro de la derecha es un balance de todas las reacciones que se producen en el interior del quimiostato, esto es, una cuantificación del flujo neto de C entre los organismos vivos que crecen en el quimiostato y el agua circundante. Por ejemplo, para organismos que sólo respiran (no realizan fotosíntesis), el balance de entrada y salida de oxígeno es una buena estimación de la velocidad de respiración de los organismos vivos en el interior del quimiostato. Así es posible estimar la respiración usando tres mediciones hechas en las aguas de entrada y salida: F<sub>in</sub>, [C]<sub>in</sub> y [C]<sub>out</sub>. La concentración de productos químicos puede ser determinada de diversos modos (electroquímica, colorimetría, etc.). En el caso de oxígeno, se puede hacer usando electrodos de oxígeno Clark, u optodos, colocados en las aguas de entrada y salida, y conectados a oxímetros. Medir el caudal es un poco más delicado. Hay diversos sistemas y todos son costosos o relativamente inexactos. Otra opción podría ser usar una bomba de flujo constante muy precisa (muy costosa y también no conveniente para regular el flujo y, por lo tanto, la biomasa en el interior del reactor). Así, en la práctica, se observa que probablemente se podría estudiar una fuente de error que es común a todos los quimiostatos y a todos los productos químicos: el error hecho en la estimación del caudal de entrada/salida.

(\*) Hay que indicar que para un gas no es la concentración sino la presión parcial lo que se considera en las reacciones. En este caso particular se debe leer  $P_{O_2}$  en lugar de  $[O_2]$ , lo cual no cambia significativamente la explicación.

5 Las ecuaciones antes desarrolladas son sólo válidas para reactores continuos tipo tanque agitados idealmente, esto es, reactores en los que hay un mezclado perfecto e instantáneo del agua de entrada y del líquido presente en el interior del reactor. Los sistemas reales no son ideales porque el mezclado se produce durante una cantidad medible de tiempo. Como la salida es síncrona con la entrada, resulta difícil decir exactamente qué cantidad de las adiciones a través de la entrada se elimina a través de la salida incluso antes de tener la posibilidad de contactar con los organismos vivos. También,  $[C]_{out}$  no es una buena aproximación de  $[C]_{inside}$  (en el interior del reactor). La integración a lo largo del tiempo de las ecuaciones que describen un sistema real que no está mezclado de modo idealmente perfecto es difícil y se deben considerar muchos parámetros adicionales relacionados con la dinámica del fluido y el modo de mezclado en el interior del reactor. Así, en la práctica, sólo se pueden usar las ecuaciones para un reactor ideal pero entonces se introducen errores que tienden a una desviación en la cuantificación del proceso biológico en el reactor. La importancia de la desviación depende del tiempo de residencia del producto químico en el interior del reactor en función del tiempo de mezclado. Si el primero es 5-10 veces mayor que el segundo, la aproximación se considera válida para ingeniería (esto es, para la producción industrial de biomasa). Para investigación, en la que el objetivo es la estimación sin desviación de los procesos, esto puede ser un problema.

10 El documento WO 2010/110773 A1 se refiere a un "Reactor metanogénico", el documento US 2004/0024493 A1 describe un método, sistema y subsistema para procesar una reacción química y el documento CN 101 709 263 A se refiere a "Dispositivo de cultivo continuo en un quimiostato".

20 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un modo práctico y económicamente viable de conseguir análisis de sistemas líquidos, particularmente sistemas líquidos químicos y/o biológicos, con un nivel deseable de precisión analítica.

25 De acuerdo con uno de sus aspectos, la presente invención proporciona un método de analizar el comportamiento de una muestra química y/o biológica en un medio líquido, por ejemplo, un medio líquido de ensayo, de acuerdo con la reivindicación 1. De acuerdo con otro de sus aspectos, la presente invención proporciona aparatos, por ejemplo, un aparato de ensayo, para analizar el comportamiento de un sistema, por ejemplo, un sistema de ensayo, que comprende una muestra química y/o biológica en un medio líquido, de acuerdo con la reivindicación 7. En las reivindicaciones dependientes se definen realizaciones alternativas y preferidas de la invención.

30 En base a las consideraciones de que: (1) el caudal es una causa principal de error en quimiostatos y (2) se produce una desviación en quimiostatos reales debido a la ausencia de un mezclado instantáneo perfecto, se ha diseñado un reactor químicamente estabilizado que funciona diferentemente. En lugar de entrada y salida constantes, estas son intermitentes. El volumen del reactor es variable, por lo que es posible añadir un suplemento (denominado en lo sucesivo líquido de compensación) sin que se permita que salga líquido del reactor en una primera etapa. Después, todo (el fluido presente en el reactor y la adición) se mezcla durante tiempo suficiente para homogeneizar el contenido del interior del reactor. Sólo entonces, se elimina del reactor un volumen similar de la mezcla por lo que se recupera el volumen inicial y se eliminan subproductos. Este modo o sistema se comporta como un reactor ideal tipo tanque agitado, pero intermitente.

35 Tanto la cantidad de adición como la cantidad de líquido que se elimina se pesan. Las balanzas de laboratorio están muy difundidas y permiten una determinación muy precisa del peso de líquido añadido y eliminado después del reactor. Otro beneficio es que la concentración expresada en términos ponderales, esto es, la molalidad o molinidad no varía con la temperatura. La concentración del mismo producto químico expresada en términos volumétricos (que naturalmente se obtiene por mediciones del caudal en volumen por unidad de tiempo), esto es, la molaridad, varía con la temperatura. La causa de error es baja pero puede ser significativa cuando se requieran determinaciones muy precisas.

40 Se puede conseguir un volumen variable usando un compartimento de gas encima del compartimento de líquido en el reactor cuyo volumen puede fluctuar. La función del compartimento de gas no está limitada a este fin. También es un compartimento que puede simular la atmósfera encima del sistema acuático presente en el quimiostato y, así, también se pueden simular en la unidad intercambios de gases aire-agua. Además, se puede usar un compartimento de gas para regular la presión parcial de oxígeno en el interior del reactor y/o la presión parcial de uno o más de otros gases. Como la unidad funciona intermitentemente, es una unidad cerrada durante un período significativo de tiempo. Durante esta etapa, se modifica la composición química del agua presente en el interior del reactor así como cambios entre los compartimentos de gas y líquido. Al ser considerado como quimiostato, las fluctuaciones deben ser razonablemente pequeñas (es decir, no mayores que el 5% de la concentración de los productos químicos) y ser fácilmente equilibradas una vez se hayan realizado las adiciones de líquido. Esto se puede conseguir eligiendo cuidadosamente la biomasa por unidad de reactor y el tiempo entre dos adiciones. A veces, efectos también ayudan

a estabilizar el medio. Por ejemplo, el pH está bien tamponado en agua del mar y cambia menos rápidamente debido a acumulación de CO<sub>2</sub> procedente de la respiración que el oxígeno que se consume. En un litro de agua del mar, hay 5 a 7 mg de oxígeno disuelto; éste puede ser eliminado rápidamente cuando organismos vivos respiran en una unidad cerrada. En el sistema de acuerdo con la invención, un compartimento de gas que contiene aire permite almacenar mucho más oxígeno en todo el sistema: a 1 atmósfera y 20°C, hay aproximadamente 240 mg de oxígeno en un litro de aire. Así, un sistema compuesto de 1 litro de agua del mar y 1 litro de aire encima contiene aproximadamente 246 mg de oxígeno en total. El mismo reactor lleno completamente de agua del mar contiene sólo 12 mg de oxígeno, esto es, más de 20 veces menos. Si los intercambios de gases aire-agua son suficientemente rápidos (por ejemplo, cuando el líquido y el gas están bien agitados), la concentración de oxígeno será mucho más estable en el reactor con 1 litro de agua del mar y 1 litro de aire, para la misma biomasa de organismos vivos.

El sistema preferido de acuerdo con la invención contiene un líquido y una fase gaseosa que simula intercambios de gases aire-agua y permite una concentración más estable de oxígeno (o de otros componentes gaseosos) en el agua. La estabilización del oxígeno en el quimiostato también puede ser mediada por sustitución intermitente de la fase gaseosa, simultánea a la sustitución parcial de la fase líquida. Esto último funciona intermitentemente, estando desacopladas en el tiempo las adiciones y eliminaciones de líquidos para asegurar que el medio está bien mezclado antes de eliminar líquido. Así no hay desviación en las ecuaciones usadas para cuantificar flujos de los productos químicos. Finalmente, la unidad no requiere bombas de flujo fijo costosas ni caudalímetros de precisión porque no es necesario medir caudales. Los líquidos que se añaden o eliminan son muestras discretas y estas muestras pueden ser pesadas con precisión, originando errores mucho menores en la determinación de entradas y salidas que en quimiostatos tradicionales. Este diseño origina un sistema que se optimiza para cuantificar flujos, incluidos los que usualmente son difíciles de medir con mucha exactitud, como el flujo neto de CO<sub>2</sub> en un medio tamponado, por ejemplo, agua del mar, en presencia de organismos vivos y, así, con muchos procesos diferentes que impactan sobre estos flujos (respiración, fotosíntesis, calcificación, nitrificación, desnitrificación, etc.) combinados con un sistema químico complejo (especies inorgánicas de carbono en el agua de mar).

A continuación se describe un ejemplo no limitativo de la invención con referencia a las figuras siguientes:

La figura 1 que es una representación esquemática de un aparato de acuerdo con la presente invención, la figura 2 que es una representación esquemática que muestra un ciclo preferido de funcionamiento, y la figura 3 que es una representación esquemática de una posible disposición de un ciclo de 24 horas.

El aparato de la realización descrita puede ser considerado como un tipo especial de biorreactor que contiene un sistema acuático químico o biológico en una unidad que tiene su propia atmósfera contenida. Las características fisicoquímicas del compartimento acuoso están estabilizadas y normalizadas. Cualquier intercambio entre el compartimento acuoso y el sistema químico o biológico en estudio puede ser monitorizado, así como todos los intercambios de gases con la atmósfera interna en la unidad. En el ejemplo, el sistema estudia principalmente cambios objetivos en las especies químicas de carbono, pero también se puede usar para cuantificar intercambios, por ejemplo, de nitrógeno, fósforo, sílice, calcio, etc.

La figura 1 muestra un proceso general y el diagrama de instrumentación de una realización de un aparato conglomerado de ensayo que comprende una pluralidad de reactores individuales 11 (de los que sólo se muestra uno), cada uno de los cuales contiene un sistema químico o biológico en estudio 50 en agua 111 y aire 112 en un recipiente transparente provisto de un agitador magnético 14. Un soporte de reactor 12, en forma de un baño a temperatura constante 12, contiene cada reactor 11 bajo una luz artificial controlable 13 de modo que cada reactor está sometido a condiciones externas controladas sustancialmente idénticas. Cada aparato de ensayo comprende un sistema de circulación de gas 21 (en este ejemplo el gas es aire de composición conocida) que comprende una bomba de diafragma 22 que hace circular el aire en el interior del reactor 11 y aumenta los intercambios de gases en la superficie aire-agua 23 y válvulas de solenoide de estrangulamiento controlado (V1, V2, V3 y V4). También, una bomba peristáltica con tuberías autobloqueables puede sustituir a la bomba de diafragma 22 cuando se requieran condiciones estériles.

Diversa instrumentación opcional (en este ejemplo, una sonda de pH 24 y un sonda de oxígeno 25) monitorizan en continuo el agua que constituye el medio líquido de ensayo. Igualmente, hay conectados analizadores de gases para analizar la fase gaseosa. En este ejemplo, un analizador infrarrojo de gases (IRGA) 41 mide la presión parcial de CO<sub>2</sub> en una tubería de entrada de gas 61 que se puede seleccionar a partir del aire de referencia y el gas de la atmósfera interna del reactor. Un filtro mecánico 42 protege al analizador de gases contra contaminación procedente de gotitas de agua, bacterias, etc.

Cada aparato de ensayo comprende también una serie de bombas peristálticas de adición/toma de muestras (P1-P4) que están configuradas y controladas para añadir automáticamente soluciones de compensación al medio

líquido de ensayo 111 y recoger muestras de éste en el reactor 11 (con lavado correspondiente de los recipientes de las muestras).

La unidad conglomerada comprende una pluralidad (típicamente más de 2 y/o menos de 12) de aparatos de ensayo que funcionan en paralelo, cada uno de los cuales se puede conectar selectivamente con los analizadores de gases, por ejemplo el IRGA 41, mediante una válvula apropiada V4.

La figura 2 muestra una representación esquemática de un ciclo preferido de funcionamiento:

- Durante una etapa de reacción, que se produce durante la mayor parte de este ciclo de funcionamiento, el sistema funciona como una unidad cerrada (figura 2a) en la que las válvulas V2 y V3 están configuradas para que la bomba de diafragma 22 haga circular por un circuito cerrado al gas de referencia introducido previamente para incrementar el contacto con el medio líquido de ensayo 111 en el reactor 11. Durante esta etapa se alimenta al IRGA 41 (no se muestra) gas de referencia procedente de una fuente externa 61 para registrar una línea de referencia con el analizador de gases.
- En un modo de adición (figura 2b) la válvula V3 evita alimentar al IRGA 41 gas de referencia procedente de una fuente externa 61 y se para la bomba de diafragma 22 por lo que no hay circulación forzada de gas en el interior de la unidad, pero gas procedente del interior de la unidad puede fluir libremente al IRGA 61, desplazado por la adición de solución de compensación 71 procedente del recipiente 72 al reactor usando una de las cuatro bombas peristálticas (Px) en la unidad. Durante esta etapa puede fluir libremente gas de referencia 61 al recipiente 72 para evitar vacío durante el funcionamiento. La solución de compensación 71 se pesa antes de su uso.
- En un modo de lavado (figura 2c) la bomba peristáltica (Px) lava el recipiente de líquido combinado de compensación y el recipiente 72 receptor de la muestra líquida con agua líquida homogeneizada de la reacción 111 procedente del reactor 11 gracias al funcionamiento alternante de la bomba Px en una y otra dirección. Durante esta etapa, se alimenta gas de referencia 61 al reactor 11 a un caudal suficientemente grande para obtener al término del modo de lavado la misma o sustancialmente la misma composición química de la fase gaseosa en el reactor 11 que el gas de referencia. El gas de referencia 61 también puede fluir libremente al recipiente 72 para evitar una diferencia de presión encima del líquido. Opcionalmente, la bomba de diafragma 22 puede funcionar también para mezclar mejor la fase gaseosa en el interior del reactor 11.
- En un modo de toma de muestras (figura 2d) se recoge una muestra homogeneizada del agua líquida de la reacción 111 mientras el gas de referencia es lavado todavía en el interior del reactor 11. Una vez completado esto, se hace retornar la unidad desde este ciclo que constituye una etapa de toma de muestras a su configuración de unidad cerrada para una etapa posterior de reacción. El nivel de líquido en el reactor 11 vuelve a aproximadamente el mismo valor que en la figura 2a. La muestra líquida 73 recién recogida puede ser pesada para un balance exacto de materia y analizada después con un método adecuado para determinar niveles de compuestos químicos o biológicos en el reactor 11 al término del ciclo (por ejemplo, nutrientes, alcalinidad, carbono orgánico disuelto, nitrógeno o fósforo, bacterias, algas, etc.).
- El funcionamiento de la unidad es controlado por un controlador 80, preferiblemente un ordenador configurado apropiadamente.

En una disposición prototipo en la que la muestra biológica a ensayar en el medio líquido de ensayo fue un trocito del coral *Seriatopora hystrix*, la duración preferida de las etapas es: etapa de reacción en la unidad cerrada (figura 2a) 3 horas y 50 minutos; etapa de adición (figura 2b) 4 minutos; etapa de lavado (figura 2c) 2 minutos; etapa de extracción de muestras (figura 2d) 4 minutos.

La siguiente es una descripción más detallada del funcionamiento de la realización ilustrada.

El aparato de ensayo es una unidad cerrada en la que durante la mayor parte del tiempo se realiza la etapa de reacción, con las válvulas V2 y V3 desviando gas de referencia al analizador de gases, por ejemplo, al analizador IRGA de CO<sub>2</sub> 41. Todas las bombas peristálticas (P1, P2, P3, P4) están paradas. El agitador magnético 14 homogeneiza el agua en el interior de la unidad y la bomba de diafragma 22 mezcla aire en el interior de la unidad y aumenta los intercambios de gases agua-aire. La calidad del agua se monitoriza usando la instrumentación 24, 25 instalada en el interior del reactor 11.

Después de permitir que un sistema químico y/o biológico 50 que está en contacto con el medio líquido de ensayo reaccione durante un tiempo de reacción predeterminado [que se calcula para permitir un cambio suficiente del gas (por ejemplo, presión parcial de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) para cuantificar flujos, pero no excesivo para evitar cambios fisicoquímicos (esto es, aproximadamente 5-10% por encima o por debajo del valor de consigna podría ser

aceptable para la mayoría de sistemas biológicos, aunque depende del experimento particular a ensayar), se inicia una etapa de toma de muestras que comprende un ciclo de adición/toma de muestras usando una o las cuatro bombas peristálticas P1-P4. La toma de muestras se realiza del modo siguiente.

5 La unidad se conmuta a su modo de adición. La bomba de diafragma 22 se desconecta para limitar intercambios de gases agua-aire en esta etapa. Se conmuta la válvula V3 para abrir la fase gaseosa de la unidad al analizador IRGA 41 de CO<sub>2</sub> y bloquear el suministro del aire de referencia 61. La bomba peristáltica seleccionada se activa a modo de adición: la solución de compensación 71 presente en el recipiente correspondiente de líquido de compensación se inyecta al interior del reactor 11. Esa solución 71 se formula para compensar exactamente cambios químicos que se producen en la unidad entre las etapas de toma de muestras. Como se incrementa el volumen de agua en el reactor 10 11, el agua empuja aire desde la fase gaseosa de la unidad al analizador IRGA 41 de CO<sub>2</sub> (efecto pistón), que medirá la presión parcial de CO<sub>2</sub> de la fase gaseosa en la unidad después de que las tuberías y la célula de medida de infrarrojos hayan sido lavadas completamente (en una realización prototipo se inyectan 70-80 ml de solución de compensación). Las bombas peristálticas se configuran para tener un caudal que permita la inyección de toda la solución de compensación durante un tiempo que representa la mitad a dos tercios del tiempo en que la bomba está 15 funcionando en modo de adición (dos a tres minutos en la realización prototipo mientras que el modo de adición dura cuatro minutos). De este modo, no son necesarias bombas peristálticas de flujo exacto y todo el líquido de compensación se inyecta con un margen durante el cual se inyecta al reactor 11 aire de referencia procedente del recipiente de líquido de compensación. Así, no es el caudal de la bomba lo que se usa para determinar qué cantidad de la solución de compensación se inyecta sino la pesada de esa solución antes de su uso (así, una medición que es por lo menos de un orden de magnitud más exacto que una estimación del caudal y tiempo).

20 La unidad se conmuta después a un modo de lavado durante un tiempo de 2 minutos. La bomba peristáltica funciona tres veces durante 20 segundos en una dirección y durante 20 segundos en la otra dirección. El fondo del recipiente de líquido de compensación se lava así tres veces con el agua del medio líquido de ensayo procedente del reactor 11. Entretanto, el agua del medio líquido de ensayo y la solución de compensación se homogeneizan progresivamente en la unidad del reactor gracias al agitador magnético 14.

En esta etapa se inicia también el reequilibrio de la atmósfera interna: se pone en marcha de nuevo la bomba de diafragma y se conmuta la válvula V2 para alimentar aire de referencia a la unidad.

30 La unidad se configura después en modo de extracción de muestras, que dura otros cuatro minutos. Se activa la bomba peristáltica y el recipiente de líquido combinado de compensación y el recipiente receptor de muestras 72 se llenan completamente con una muestra 73 cuyo volumen es aproximadamente igual que el volumen de la solución de compensación que se había añadido. Esto se asegura por la tubería colectora del interior del reactor que está sumergida en la unidad justo lo suficiente para corregir el volumen de solución pero que se lava con aire una vez el agua llega justo por debajo del nivel requerido. De nuevo también, la bomba peristáltica funciona durante un tiempo un poco mayor que el tiempo requerido para recoger la muestra y expulsará del reactor justo una pequeña cantidad de aire de lavado durante el tiempo restante (la atmósfera interna se lava todavía con aire de referencia a un caudal mayor que el caudal de la bomba peristáltica en este modo).

35 La muestra 73 es así un homogeneizado perfecto (no un homogeneizado aproximado teórico) de (i) el agua del medio líquido de ensayo cuya composición ha sido modificada ligeramente durante la etapa previa de la reacción y que ha estado en contacto con el sistema químico y/o biológico en estudio y (ii) la solución de compensación que se ha añadido. Una vez más, su cantidad no se estima por medición del caudal sino que se mide muy exactamente pesando después la muestra. Se puede usar para un análisis químico adicional (alcalinidad, calcio, amonio, nitrito, 40 nitrato, ortofosfato, silicato, etc.).

45 Si la solución de compensación ha sido formulada correctamente, la composición química de esta muestra debe ser idéntica o muy próxima a valores objetivos en un quimiostato equilibrado idealmente. Como la composición de la solución de compensación se anticipó usando un modelo matemático dinámico y cualquier desviación observada en la composición química de la muestra denota una sobre- o subestimación de esa composición química por el modelo, se tiene una validación a tiempo real del modelo como parte constituyente del aparato y/o del propio modelo.

50 La etapa (y el ciclo) de toma de muestras se termina cuando la unidad se configura de nuevo como una unidad cerrada en su configuración de etapa de reacción parando la bomba peristáltica e invirtiendo las válvulas V2 y V3. Puede empezar entonces un nuevo ciclo, que usará otra de las cuatro bombas peristálticas y recipientes de solución de compensación, con otra solución de compensación lista para ser inyectada.

55 Todo el sistema ilustrado en esta realización tiene así una autonomía de cuatro ciclos. En este prototipo, se dispone el sistema químico y/o biológico para que cada ciclo dure cuatro horas sin un cambio demasiado grande en la composición química del líquido y del medio gaseoso de ensayo en el interior del reactor. De este modo, la unidad

tiene una autonomía de 16 horas fuera de la jornada laboral y todavía se aproxima satisfactoriamente a un entorno ideal estático químicamente, a pesar de las correcciones hechas a intervalos de tiempo discretos. Durante la jornada laboral, se realizan dos ciclos adicionales con las bombas P1 y P2 después de recoger todas las muestras y formular otras soluciones de compensación (véase la figura 3). Esto completa un período de tiempo de 24 horas. Deja también suficiente tiempo de trabajo para que un técnico analice todas las muestras recogidas. Antes del término de la jornada laboral se recogen las dos muestras y se formulan todas las soluciones de compensación para completar un estudio de 24 horas. Esto significa que se tienen seis muestras en 24 horas y, con un período de luz de 12 horas, se tienen dos muestras recogidas exactamente cuando se apaga o enciende la luz: dos muestras adicionales recogidas con luz natural y dos muestras adicionales recogidas en la oscuridad. Se puede usar esta configuración para evaluar cómo se comporta el sistema bajo un ciclo circadiano, que incluye quizás cambios durante el día y/o la noche (una característica clave del dispositivo para sistemas biológicos con grandes variaciones que se podrían esperar en un ciclo de 24 horas).

La figura 3 ilustra intervalos de toma de muestras de 4 horas (configuración usada en el prototipo) que puede proporcionar tiempo de resolución suficiente en un ciclo circadiano para cuantificar cómo varían ciertos procesos, por ejemplo, fotosíntesis, respiración, calcificación, etc., durante el día, incluidas las fases de luz y de oscuridad. Usando 4 bombas distintas (cada una para completar un ciclo individual), se puede programar un ciclo corto con 2 bombas P1 y P2 durante la jornada laboral y otro ciclo largo con las cuatro bombas P1-P4 hasta el día siguiente. En la figura 3 las flechas muestran qué muestras se recogen, y usando qué bomba, al término de cada ciclo completo. También se pueden calcular diferentemente las soluciones de líquido de compensación, dependiendo de la hora del día en que se añadirán.

Hay que indicar que el error en los flujos netos durante varios ciclos no es mayor que la suma de errores de cada ciclo, que se mantienen al mínimo por diseño. Para un tiempo de resolución menor, pero con una precisión mayor durante un período largo, se pueden reunir y analizar juntas varias muestras sucesivas. Por otro lado, durante ciclos sucesivos se acumulan errores ligeros en el cálculo por el modelo de las diversas soluciones de compensación, originando una detección mejor de discrepancias todavía ligeras entre el modelo y el sistema real químico y/o biológico en estudio. Este diseño se optimiza también para medir con mayor precisión flujos netos y balances netos que actualmente se miden por otros medios o balanceando ecuaciones que contienen varias mediciones, y en las que los errores tienden a acumularse en una extensión mucho mayor en la estimación final. Por ejemplo, aquí no se calcula el flujo neto crucial de CO<sub>2</sub> entre el agua de la reacción del medio líquido de ensayo y el aire de la fase gaseosa en el contexto de investigaciones sobre la acidificación de los océanos, sino que se mide directamente con la mayor precisión en nuestro sistema artificial con el analizador IRGA de CO<sub>2</sub> una vez por ciclo cuando se realiza la etapa de toma de muestras. Los cambios observados en la P<sub>CO2</sub> del aire son las acumulaciones de intercambios de aire-agua que se producen a lo largo de un ciclo (menos el tiempo requerido para la adición – lavado – toma de muestras, que es justo 10 minutos en el prototipo) cuando la unidad funciona como unidad cerrada. Además, se usa el mismo IRGA para medir selectivamente el aire del gas de referencia y el gas de referencia alternativamente, minimizando más el error en la cuantificación de cambios de P<sub>CO2</sub> entre los dos gases.

El sistema se destina particularmente al estudio de sistemas acuáticos químicos y/biológicos. Las aplicaciones posibles incluyen pero sin carácter limitativo:

– Procedimiento experimental para estudiar propiedades químicas de cristales de carbonato cálcico en agua del mar. La química de la disolución y precipitación de carbonato cálcico en agua del mar es muy compleja y muy distinta de un sistema ideal. Hay varias formas diferentes de cristales de carbonato cálcico (aragonito, calcita, calcita magnésica, carbonato cálcico precipitado química o biológicamente) y muchos iones que pueden interferir en la precipitación o disolución de dichos cristales en agua del mar, incluidos, pero sin carácter limitativo, estroncio y ortofosfato. El carbonato cálcico está muy sobresaturado (entre 3 y 5 veces) en el agua superficial del mar, pero la acidificación del agua podría originar un cambio notable en el estado de sobresaturación del agua del mar, o incluso una subsaturación en aguas del Antártico cerca del 2100. El sistema permite un estudio cómodo y exacto de la química del carbonato cálcico en agua del mar

– El sistema se puede usar como tipo de respirómetro sofisticado y muy exacto. Un respirómetro es una cámara en la que se cuantifica la respiración (y, por lo tanto, el metabolismo) de organismos vivos. Los respirómetros simples son completamente cerrados y permiten mediciones de la respiración sólo durante un período de tiempo corto (no es posible un estudio completo de 24 horas). Los respirómetros más complejos funcionan en sistemas abiertos, pero son mucho menos precisos porque adolecen de las mismas causas de errores de medición que los quimiostatos tradicionales (por ejemplo, la estimación del oxígeno consumido depende de la precisión en la estimación de caudales y en la falsa suposición de que la solución es instantáneamente una mezcla perfecta en el respirómetro). En comparación, la invención se puede usar para una medición precisa del consumo de oxígeno (o de la producción de dióxido de carbono) en la respiración y para mediciones repetidas a lo largo de un período de tiempo de 24 horas o incluso mayor.

5 – El sistema se puede usar como dispositivo experimental para investigar el impacto de la acidificación de los océanos sobre organismos vivos, para lo que fue diseñada en principio la aplicación. Todos los parámetros, como volumen y tamaño de la unidad, volumen de la fase gaseosa de la atmósfera atrapada, tiempo entre dos ciclos sucesivos y volumen de cada adición y de la muestra, se someten a una selección apropiada de acuerdo con el sistema biológico en estudio.

10 – El sistema se puede usar para cultivar bacterias, protistas, hongos, fitoplancton, zooplancton, etc., en condiciones fisicoquímicas especificadas y para monitorizar su crecimiento y cambios fenotípicos en estas condiciones. Se pueden concebir dos aplicaciones objetivos principales: (1) como en aplicaciones anteriores, el dispositivo se puede usar como unidad experimental para investigaciones en estudios ecofisiológicos y (2) el dispositivo se puede usar para medir con precisión el modo en que funciona el sistema biológico para diseñar mejor quimiostatos industriales, gracias a la caracterización completa y precisa de flujos entre el sistema biológico y los medios líquido y gaseoso.

– El sistema se puede usar también para cultivar células suspendidas en un medio líquido cuando se requiera una cuantificación precisa de los intercambios entre las células y el medio líquido y/o la fase gaseosa. Esto es útil en situaciones experimentales en los campos de la fisiología, medicina, veterinaria o ecología.

15 – El sistema biológico también puede comprender sedimentos y, en este caso, se pueden estudiar los intercambios entre los sedimentos, los organismos vivos y el medio líquido. Por ejemplo, se pueden caracterizar flujos entre sedimentos procedentes del fondo del mar o del fondo de un río o lago y el agua. Esto puede incluir estudios ecotoxicológicos en los que, usando dicho dispositivo, se pueden evaluar con precisión el secuestro o liberación de sustancias tóxicas, como metales pesados, PCB, hidrocarburos, etc., en los sedimentos y/o en los organismos vivos.

20 – También se pueden usar radioisótopos estables en las soluciones de compensación y/o en el gas de referencia para seguir mejor flujos específicos en el sistema. Por ejemplo, el gas de referencia puede estar compuesto de aire en el que  $^{14}\text{N}_2$  (más de 99% en aire) ha sido sustituido por  $^{15}\text{N}_2$ . Los flujos de  $^{15}\text{N}_2$  dentro de los organismos biológicos cuantifican la fijación de nitrógeno. Por otro lado, los flujos de  $^{14}\text{N}_2$  en el aire cuantifican procesos de desnitrificación. Estos dos flujos se pueden medir con el presente dispositivo, permitiendo una medición directa de la  
25 fijación de nitrógeno o de la desnitrificación, una tarea apenas posible actualmente con otro sistema.

Más ejemplos de aplicabilidad industrial del sistema serán evidentes inmediatamente a los expertos.

30 Por ejemplo, una de las consecuencias del incremento de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera es un desplazamiento del equilibrio del carbono inorgánico en los océanos, que origina la denominada acidificación de los océanos (neutralización parcial del pH alcalino del agua del mar). Desde el inicio de la era industrial, el pH del agua del mar ha descendido aproximadamente 0,1 unidades y se espera un descenso adicional de 0,2-0,3 unidades el siglo próximo, y así sucesivamente. Actualmente es cierto que este descenso del pH tiene un impacto sobre la vida acuática. Este descenso impacta sobre la velocidad de la calcificación y la velocidad de la fotosíntesis, así como también sobre otras reacciones bioquímicas que son sensibles al pH extracelular. El horizonte de la saturación del carbonato cálcico (tanto aragonito como calcita) es la profundidad en la que la correspondiente forma de carbonato cálcico está  
35 en equilibrio en el agua del mar. Por encima, el agua está sobresaturada y favorece la precipitación (principalmente por acreción por organismos vivos). Por debajo, el carbonato cálcico se disuelve por erosión química en las profundidades de los océanos. Estos horizontes de saturación se producen a profundidades mayores y menores cuando disminuye el pH del agua del mar. Debido al gran número de efectos potenciales sobre la fisiología de plantas, animales y microbios marinos, a sus efectos indirectos sobre los ecosistemas globales y a cambios en el estado químico global relativos a la precipitación y disolución del carbonato cálcico, todavía no está claro cuántos entornos acuáticos quedarán impactados a gran escala por este descenso del pH. Esto es actualmente el campo de investigaciones intensivas por parte de la comunidad científica.

40 En este contexto, es importante saber qué sistema actúa como sumidero (consume más carbono inorgánico que el que produce) o como fuente (lo contrario). En realidad, las acciones posibles para limitar el incremento de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera incluyen la gestión de recursos que favorezcan sumideros contra fuentes de carbono inorgánico en el planeta Tierra. Esto requiere la cuantificación y el conocimiento agudo del ciclo del carbono en nuestro planeta. Si un sistema químico y/o biológico actúa como sumidero o como fuente de carbono inorgánico no es fácil de cuantificar porque esto es el resultado de varios flujos de carbono en direcciones opuestas (los sistemas biológicos, en particular, son muy dinámicos). El balance neto se cuantifica frecuentemente con un gran grado de incertidumbre,  
50 como el resultado neto de muchos flujos que se cuantifican individualmente con un error significativo (fotosíntesis, respiración, calcificación, nitrificación, desnitrificación, precipitación o disolución química, etc.). Estos errores se acumulan en las ecuaciones.

La cuantificación más precisa de los flujos netos de carbono es por medición directa. En sistemas acuáticos, el sistema de la presente invención se puede usar para poner el sistema químico o biológico en estudio en condiciones



tales que se puedan medir directamente y con precisión los intercambios netos resultantes en la interfaz de aire-agua.

Otro objetivo del sistema es permitir el funcionamiento como quimiostato (el entorno químico es estático), con un control de la composición inorgánica del agua, su pH y su carga de nutrientes (para sistemas biológicos).

- 5 Un tercer objetivo es permitir la determinación concurrente de los mecanismos más importantes que alteran la química del carbono inorgánico del agua y su pH en sistemas naturales, esto es, la precipitación o disolución de carbonato cálcico, fotosíntesis y respiración, nitrificación y desnitrificación, intercambios en la interfaz de aire-agua, etc. El sistema de la presente invención se puede usar para la medición objetivo de estos mecanismos simultáneamente, con la mayor precisión posible, no destructivamente y sin usar isótopos radiactivos (por ejemplo, 10 mediciones por incorporación de  $^{14}\text{C}$ ). También es crucial una resolución temporal: el sistema se debe mantener suficientemente estable durante unos pocos días y varias mediciones al día deben permitir cambios circadianos en los procesos.

- 15 Un cuarto objetivo es conseguir un buen conocimiento mecanicista de los procesos que se producen en la unidad. La investigación que se hace posible de acuerdo con la invención se puede usar para invertir el modo usual de funcionamiento entre un sistema experimental y un modelo matemático (dinámico). Usualmente, primero se estudia un sistema experimental. Al ser un quimiostato, se requiere estabilizar la composición química del medio. Esto se hace por mediciones en el agua de salida y ajuste del agua de entrada para estabilizar la concentración de los productos químicos presentes en la unidad, independientemente del modelo matemático. Finalmente el modelo se ajusta con los datos experimentales pero nunca interacciona directamente con el modo en que está funcionando la 20 unidad experimental (el quimiostato). El modelo es así un tipo de representación matemática pasiva de los cambios que se producen independientemente en la unidad experimental. Al contrario que una unidad experimental, el sistema de la presente invención puede ser (y en algunas configuraciones debe ser) gestionado directamente por el modelo matemático. Este último se usa para anticipar cambios que se pueden producir en el sistema unas pocas horas antes y para formular suplementos para obtener las correcciones requeridas. La compatibilidad del modelo 25 con el sistema real en estudio se cuantifica por las variaciones observadas con el tiempo que se deben a una predicción incorrecta por el modelo. En tal caso, primero se debe corregir el modelo y se realiza de nuevo el experimento en el sistema hasta que se establezca todo el sistema. En ese momento, se obtiene una validación experimental directa del modelo matemático puesto que éste demuestra que se han previsto y anticipado correctamente los cambios en el sistema.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de analizar el comportamiento de un sistema que comprende una muestra química y/o biológica en un medio líquido, comprendiendo el método:

un primer ciclo que comprende:

- 5 – una primera etapa de reacción que comprende permitir que la muestra química y/o biológica reaccione en un reactor durante un tiempo de la etapa de la primera reacción (t1) en un sistema cerrado en un medio líquido; y
- una primera etapa de toma de muestras que comprende las etapas secuenciales de: (i) combinar y homogeneizar sustancialmente un primer líquido de compensación de peso y composición predeterminados conocidos con el medio líquido; y (ii) separar una porción del medio líquido homogeneizado para su análisis;
- 10 y

un segundo ciclo que comprende:

- una segunda etapa de reacción que comprende permitir que la muestra química y/o biológica reaccione en el reactor durante un tiempo de la etapa de la segunda reacción (t2) en un sistema cerrado en el medio líquido resultante del primer ciclo; y
- 15 – una segunda etapa de toma de muestras que comprende las etapas secuenciales de: (i) combinar y homogeneizar sustancialmente un segundo líquido de compensación de peso y composición predeterminados conocidos con el medio líquido procedente del segundo ciclo; y (ii) separar una porción del medio líquido homogeneizado para su análisis.

20 2. Un método de analizar el comportamiento de un sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición de por lo menos uno de los líquidos de compensación se selecciona de modo que se iguale a una composición anticipada del medio líquido en el tiempo en el que se combinan el líquido de compensación y el medio líquido, determinándose la citada composición del líquido de compensación por modelación.

25 3. Un método de analizar el comportamiento de un sistema de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la modelación de la composición del líquido de compensación incluye usar datos obtenidos de análisis del medio líquido procedente de una etapa previa de toma de muestras.

4. Un método de analizar el comportamiento de un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medio líquido contacta con un gas de referencia durante la etapa de reacción.

30 5. Un método de analizar el comportamiento de un sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en el que (i) durante la etapa de reacción se proporciona el gas de referencia en un sistema cerrado y en el que (ii) el método comprende analizar por lo menos una propiedad del gas de referencia de un modo destinado a determinar posibles cambios en esa propiedad inducidos durante la etapa de reacción.

6. Un método de analizar el comportamiento de un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el comportamiento del sistema se analiza pesando cada líquido que se añade al reactor y se separa de éste.

35 7. Un aparato para analizar el comportamiento de un sistema que comprende una muestra química y/o biológica en un medio líquido, destinándose el aparato a ser conmutado entre el funcionamiento en un ciclo de reacción en circuito cerrado y el funcionamiento en un ciclo de toma de muestras, comprendiendo el aparato:

un reactor destinado a ser mantenido en un entorno controlado y destinado a contener la muestra química y/o biológica en el medio líquido;

40 un sistema de gas de circulación destinado a admitir en el sistema un gas de referencia antes de un ciclo de reacción, para hacer circular en el sistema el gas en un circuito cerrado durante el ciclo de reacción para que el gas contacte con el medio líquido, y para suministrar una porción del gas circulado para su análisis durante el ciclo de toma de muestras.

45 por lo menos un recipiente de líquido de compensación destinado a contener un líquido de compensación para combinarlo con el medio líquido durante el ciclo de toma de muestras, destinándose el recipiente del líquido de compensación a ser suministrado con el gas de referencia;

un sistema de combinar líquidos, destinado a combinar y homogeneizar sustancialmente el líquido de compensación y el medio líquido como parte del ciclo de toma de muestras;

un sistema de toma de muestras líquidas, destinado a separar del medio líquido una porción de muestra como parte del ciclo de toma de muestras;

por lo menos un recipiente receptor de líquido, destinado a recibir la porción de muestra del medio líquido como parte del ciclo de toma de muestras; y

5 un controlador destinado a conmutar el sistema entre el ciclo de reacción y su ciclo de toma de muestras.

8. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el mismo recipiente se destina a servir como recipiente de líquido combinado de compensación y como recipiente receptor de muestras líquidas.

9. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el aparato comprende una pluralidad de recipientes de líquido de compensación y de recipientes receptores de muestras líquidas o una pluralidad de recipientes de líquido combinado de compensación, y en el que el aparato está configurado de modo que cada  
10 recipiente receptor de muestras líquidas se destina a recibir una muestra líquida procedente de un ciclo diferente de reacción del aparato.

10. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que un sistema de toma de muestras líquidas comprende una o más bombas que tienen asociadas tuberías de suministro, estando configuradas cada  
15 bomba y sus tuberías asociadas de suministro para transferir líquido entre el reactor y un recipiente receptor de muestras líquidas.

11. Un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el aparato comprende además por lo menos una sonda, especialmente una sonda de pH y/o una sonda de oxígeno, destinadas a medir una característica del medio líquido.

20 12. Un aparato conglomerado que comprende una pluralidad de aparatos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el aparato conglomerado comprende un soporte del reactor destinado a contener los reactores de cada aparato en una configuración tal que cada reactor está sometido a condiciones externas sustancialmente idénticas.

25 13. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el gas de circulación se destina a suministrar selectivamente una porción del gas circulado procedente de cada aparato individual a un analizador simple de gases durante el ciclo de toma de muestras de cada aparato individual.

30 14. Uso de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o de un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 para analizar un sistema seleccionado del grupo que consiste en un sistema configurado para analizar el impacto de la acidificación de los océanos sobre organismos vivos, un sistema configurado para cuantificar el consumo de oxígeno y/o la producción de dióxido de carbono de organismos vivos, y un sistema para estudiar propiedades químicas de cristales de carbonato cálcico en agua del mar.

Fig. 1

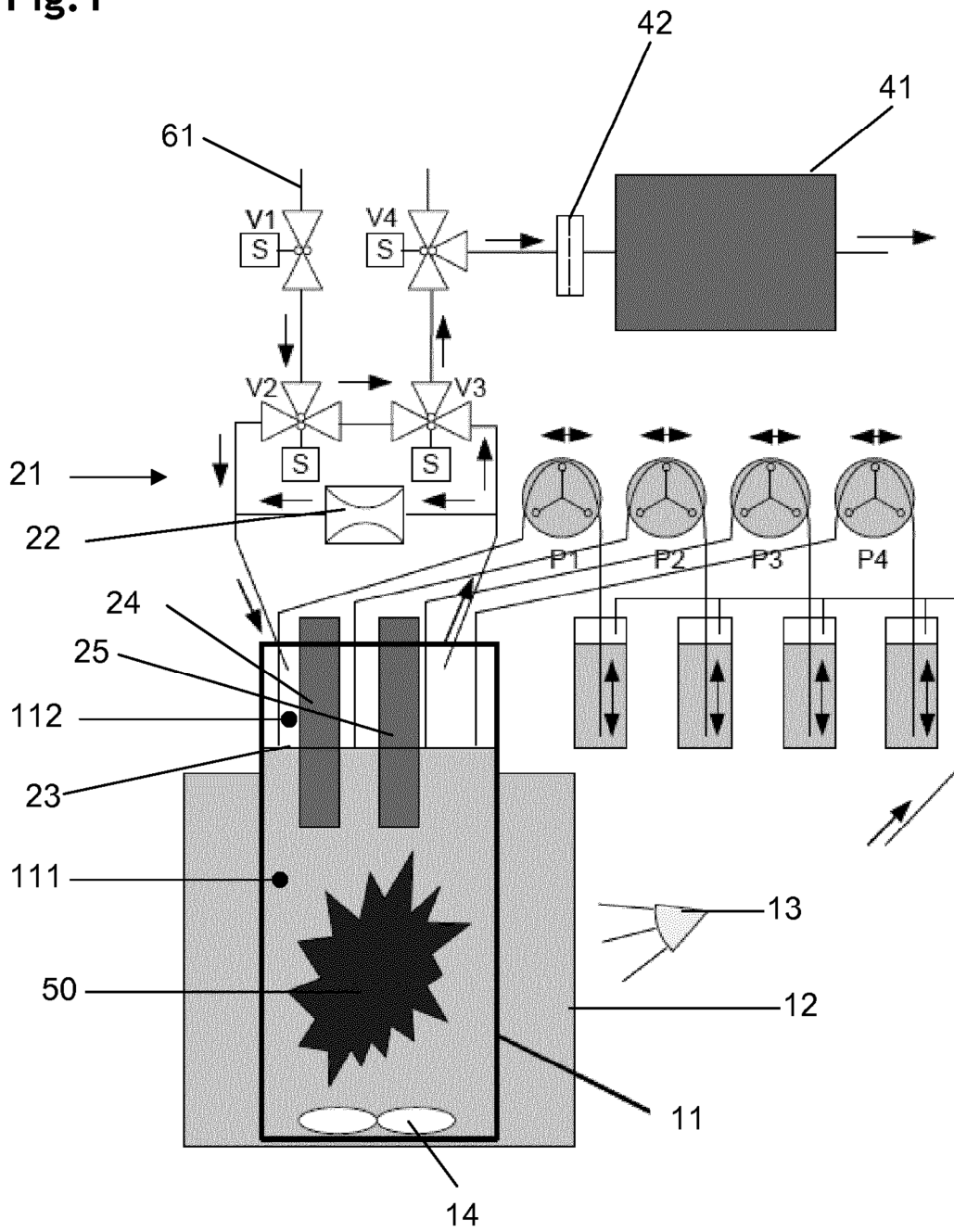


Fig.2

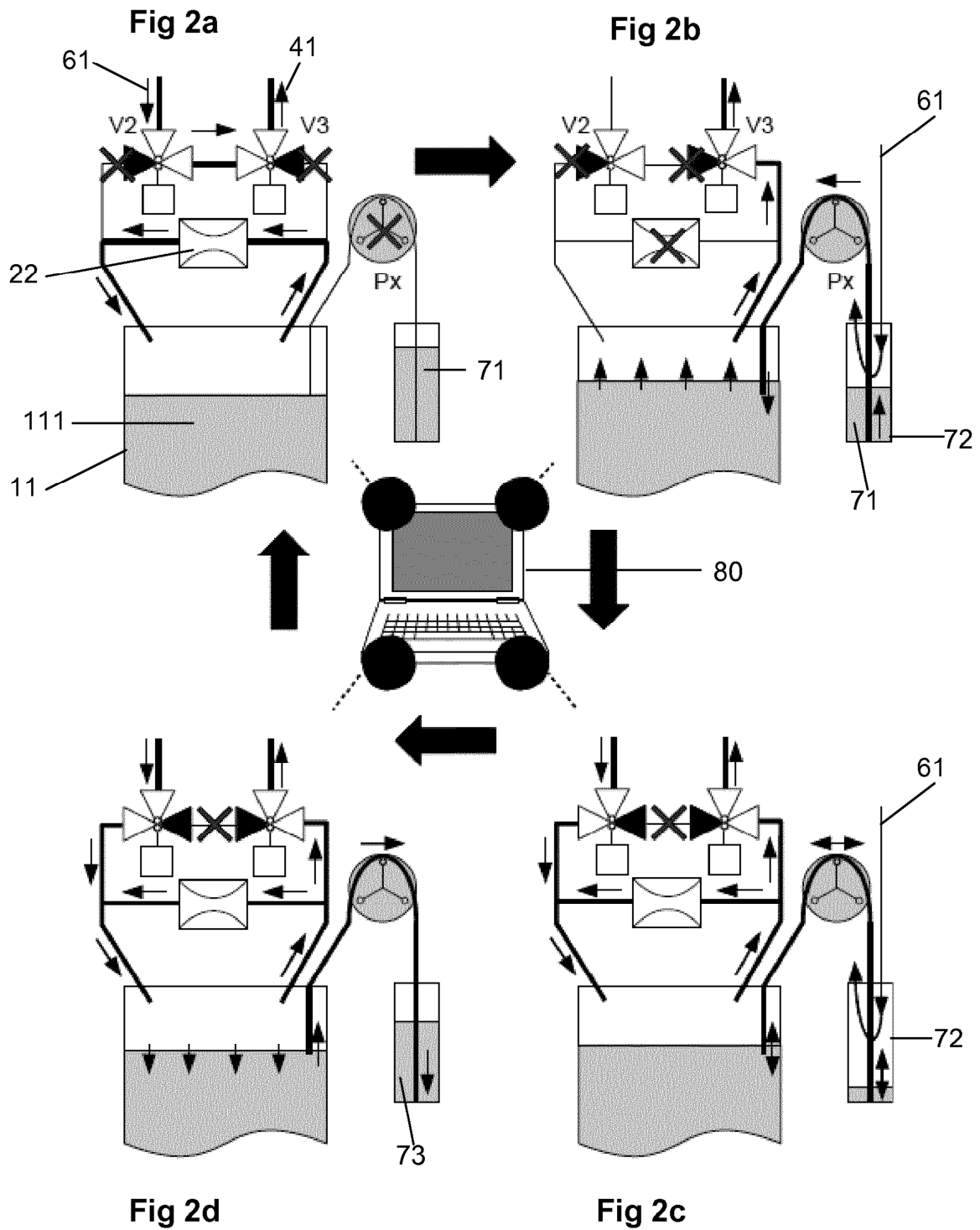


Fig. 3

