

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 539**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06	(2006.01)
C12M 3/00	(2006.01)
G01N 35/08	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
B01J 19/00	(2006.01)
A61K 6/00	(2006.01)
C12M 1/12	(2006.01)
C12Q 1/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2012 PCT/IB2012/050478**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120384**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2012 E 12704318 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2680961**

54 Título: **Procedimiento de seguimiento de una reacción y sistema de reacción para su implementación**

30 Prioridad:

04.03.2011 FR 1100659

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
SORBONNE UNIVERSITÉ (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BERTHOLLE, FABIEN;
BIBETTE, JÉRÔME;
BAUDRY, JEAN-MARIE;
BREMOND, NICOLAS;
BARABAN, LARYSA y
PANIZZA, PASCAL**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 667 539 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

Procedimiento de seguimiento de una reacción y sistema de reacción para su implementación

- 5 **[0001]** La invención se refiere a un procedimiento de seguimiento de una reacción y a un sistema de reacción para su implementación.
- [0002]** El estudio de entidades microbiológicas, tales como microorganismos uni o pluricelulares, requiere la capacidad de detectar una población de estos microorganismos en uno o varios reactores, así como el desarrollo de
10 estos microorganismos a lo largo del tiempo. También es necesario poder seleccionar con facilidad y extraer las poblaciones de interés.
- [0003]** Actualmente existen máquinas llamadas "*plate reader*" (lectores de placas en español), que se presentan en forma de placas provistas de una multitud de pocillos (actualmente hasta 1.536 en una superficie de
15 127,76 x 85,48 mm) dispuestas en una matriz de dos dimensiones, y en las que los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo dado.
- [0004]** El primer inconveniente de este tipo de máquina es la necesidad de un sistema de exploración bidimensional para que coincida el pocillo que se desea llenar o analizar con una herramienta adecuada (dispositivo de llenado o herramienta de medición). Tal dispositivo es caro, voluminoso y debe ser muy preciso para asegurar
20 una buena coincidencia entre cada pocillo y la herramienta.
- [0005]** Otro inconveniente más importante es la necesidad de tomar precauciones importantes durante la manipulación de la placa para evitar hacer vibrar o invertir la placa y crear contaminación entre los pocillos. No obstante, hay que agitar constantemente los pocillos para mantener un medio homogéneo y, en el caso de los
25 microorganismos, para prevenir la formación de biopelículas. Esto supone que la cantidad de biomasa lograda o detectable en un pocillo es limitada.
- [0006]** Otro inconveniente es la dificultad de controlar la evaporación del medio de cultivo en los pocillos, teniendo en cuenta el bajo volumen de líquido contenido en cada pocillo. Una solución propuesta es la de mantener
30 la placa en atmósfera controlada y/o reaprovisionar regularmente cada pocillo en medio de cultivo para compensar la evaporación.
- [0007]** Tales procedimientos son tediosos y pueden influir en el crecimiento de los microorganismos, induciendo un sesgo en las experimentaciones y las mediciones.
35
- [0008]** En el artículo "Controlled microfluidic interfaces" (Atencia y Beebe, Nature Review, 437, pp. 648-655 2005), ya se ha propuesto realizar un sistema de reacción que comprende:
- 40 • varios depósitos de soluciones de reactivos conectados de forma fluida a un tubo capilar de inyección;
• al menos un depósito de un fluido portador no miscible con las soluciones de reactivos, conectado de forma fluida a un tubo capilar de reacción, el tubo capilar de inyección está montado de forma que desemboca en el tubo capilar de reacción de modo que gotas individuales de reactivos se pueden inyectar en el tubo capilar de reacción, en el fluido portador no miscible, para formar una pluralidad de reactores.
- 45 **[0009]** Este sistema permite realizar numerosas experiencias como resultado, en particular para estudiar los factores que intervienen en la cristalización de las proteínas. Una vez realizada la medición (medición de difracción por rayos X), las gotas son transportadas hacia el extremo del tubo de reacción y eliminadas.
- 50 **[0010]** Otra aplicación consiste en realizar la encapsulación de agentes terapéuticos. Una vez hecha esta encapsulación, se recuperan las gotas a la salida del tubo de reacción y se las acondiciona para su uso.
- [0011]** Este sistema resuelve muchos problemas propuestos por los lectores de placa.
- 55 **[0012]** Sin embargo, este sistema no permite efectuar un seguimiento de la cinética de las reacciones, en particular de la evolución temporal del cultivo de células vivas, así como clasificarlas. La presente invención tiene como objetivo resolver los inconvenientes anteriores y propone un sistema de reacción, en particular de cultivos de microorganismos, económico, a pequeña escala, fácil de implementar, que permita controlar totalmente el medio de cultivo durante toda la experimentación y que permita un seguimiento de la cinética de las reacciones, en particular

de la evolución temporal del cultivo de células vivas y su clasificación.

[0013] Para ello, la invención propone realizar un sistema de reacción capilar, en particular para el cultivo de microorganismos, que comprende un medio de referencia de gotas para identificarlas de forma exclusiva en una serie de gotas y al menos un medio de recirculación de reactores ante al menos un sensor de seguimiento de una reacción.

[0014] Con este fin, la invención tiene por objeto un sistema de reacción, en particular de cultivos de microorganismos, que comprende:

10

- al menos un depósito de medio de reacción conectado de forma fluida a un tubo capilar de inyección;
- al menos un depósito de un fluido portador no miscible con el medio de reacción, conectado de forma fluida a un tubo capilar de reacción,
- el tubo capilar de inyección está montado de forma que desemboca en el tubo capilar de reacción de modo que las gotas individuales de medio de reacción se pueden inyectar en el tubo capilar de reacción, dentro del fluido portador no miscible, a fin de formar una serie de reactores,
- al menos un detector de seguimiento de una reacción,

[0015] El sistema de reacción según la invención comprende un medio de referencia de reactores para identificarlos de forma exclusiva en la serie de reactores y al menos un medio de recirculación de los reactores ante al menos un detector de seguimiento de una reacción.

20

[0016] Según otras realizaciones:

- 25 • el medio de recirculación puede comprender un circuito de recirculación de los reactores ante el o los detectores, este circuito de recirculación comprende un capilar que desemboca aguas arriba y aguas abajo del o de los detectores;
- el medio de recirculación puede comprender un medio de recirculación adecuado para invertir el sentido de circulación de los reactores;
- 30 • el medio de reacción puede ser un medio de cultivo de microorganismos, el tubo capilar de reacción es entonces un tubo capilar de cultivo, y los reactores son reactores de cultivo de microorganismos;
- el sistema de reacción puede comprender, además, al menos un depósito de un fluido denominado "de separación" no miscible con el fluido portador y no miscible con el medio de reacción, conectado de forma fluida al tubo capilar de reacción de modo que las gotas de fluido de separación pueden inyectarse en el fluido portador entre dos reactores;
- 35 • el sistema de reacción puede comprender, además, al menos un depósito de reactivo conectado de forma fluida al tubo capilar de inyección y/o al tubo capilar de reacción, de modo que el reactivo pueda mezclarse con el medio de reacción;
- el fluido portador y el fluido de separación pueden ser aceites no miscibles entre sí, el medio de reacción es un medio de reacción que es un medio acuoso no miscible con los aceites anteriormente mencionados;
- 40 • el sistema de reacción puede comprender, además, al menos un depósito de residuos, en conexión fluida con el tubo capilar de reacción;
- el sistema de reacción puede comprender, además, al menos un detector, el tubo capilar de reacción comprende al menos una parte transparente para una señal emitida y/o recibida por el detector;
- 45 • el sistema de reacción puede comprender, además, un tubo capilar de muestreo montado de forma que desemboque en el tubo capilar de reacción de modo que al menos un reactor pueda tomarse;
- el sistema de reacción puede comprender, además, al menos un tubo capilar de derivación montado de forma que desemboque en el tubo capilar de reacción de modo que al menos un reactor puede desviarse a un medio de tratamiento de uno o más reactores;
- 50 • el sistema de reacción puede comprender, además, una unidad central de control conectada al medio de circulación y adecuada para:
 - controlar la inyección de gotas individuales del medio de reacción en el tubo capilar de reacción, dentro del fluido portador, imponiendo una velocidad y una duración de circulación del medio de reacción, a fin de formar una pluralidad de reactores;
 - controlar la circulación del fluido portador imponiendo una velocidad, una duración y un sentido de circulación del fluido portador en el tubo capilar de reacción;
 - contar los reactores en el medio portador y memorizar la posición de cada reactor con respecto a un reactor de referencia;
- 55

o hacer recircular los depósitos en el tubo capilar de reacción;

- la unidad central de control puede ser adecuada para controlar la inyección de gotas de fluido de separación entre dos reactores;

- 5 • la unidad central de control puede ser adecuada para controlar la inyección de al menos un reactivo en el medio de reacción para modificar la composición y/o las propiedades químicas y/o físicas; y/o
- la unidad central de control puede estar, además, conectada al detector y es adecuada para memorizar al menos una medición realizada por el o los detectores.

10 **[0017]** La invención también se refiere a un procedimiento de seguimiento de una reacción en un medio de reacción, que comprende las siguientes etapas:

- a) llenar un tubo capilar de reacción con un medio portador no miscible con el medio de reacción;
- b) inyectar, gracias a un tubo capilar de inyección, una gota individual de medio de reacción en el tubo capilar de reacción, en el fluido portador no miscible;
- 15 c) poner en circulación el fluido portador para que la gota del medio de reacción se desplace en relación con el tubo capilar de inyección;
- e) repetir las etapas b) y c) para crear una serie ordenada de gotas de medio de reacción dentro del fluido portador para formar una pluralidad de reactores;
- 20 f) medir al menos un parámetro representativo de cada reactor;
- g) hacer recircular al menos un reactor para medir al menos dicho parámetro con el tiempo.

[0018] Según otras realizaciones:

25 • el procedimiento puede comprender las siguientes etapas:

- a) llenar un tubo capilar de cultivo con un medio portador no miscible con el medio de cultivo;
- b) inyectar, gracias a un tubo capilar de inyección, una gota individual de medio de cultivo en el tubo capilar de cultivo, en el fluido portador no miscible;
- 30 c) poner en circulación el fluido portador para que la gota de medio de cultivo se desplace con respecto al tubo capilar de inyección;
- e) repetir las etapas b) y c) para crear una serie ordenada de gotas de medio de cultivo en el fluido portador para formar una pluralidad de reactores de cultivo de microorganismos;
- f) medir al menos un parámetro representativo de cada reactor de cultivo, este parámetro puede ser representativo de la cantidad de microorganismos presentes en cada reactor;
- 35 g) hacer recircular al menos un reactor para medir al menos dicho parámetro con el tiempo.

- el procedimiento puede comprender, además, después de la etapa c) y antes de la etapa e), una etapa d) que comprende la inyección, en el fluido portador, de una gota de un fluido denominado "de separación", no miscible con el fluido portador y no miscible con el medio de reacción, de modo que al menos una gota de fluido de separación se intercale entre dos reactores y prevenga su coalescencia;

- la medición puede ser realizada por un procedimiento óptico, tal como mediciones de absorbancia, dispersión o fluorescencia, o por una medición eléctrica tal como impedancia; y/o

- el procedimiento puede comprender, además, después de la etapa e), una etapa f) de recuperación de al menos un reactor de interés por aspiración de dicho reactor de interés en un tubo capilar muestreo montado de forma que desemboca en el tubo capilar de reacción.

[0019] Otras características de la invención se expondrán en la siguiente descripción detallada, con referencia a las figuras anexas que representan, respectivamente:

- 50 - la figura 1, una vista esquemática en sección parcial de una primera parte funcional del sistema de reacción según la invención;
- la figura 2, una foto ampliada de una sección parcial de un tubo capilar de reacciones según la invención;
- la figura 3, una vista esquemática en sección parcial de una segunda parte funcional del sistema de reacción según la invención, según una primera realización;
- 55 - la figura 4, una vista esquemática en sección parcial de una segunda parte funcional del sistema de reacción según la invención, según una segunda realización;
- la figura 5, una vista esquemática en sección parcial de una segunda parte funcional del sistema de reacción según la invención, según una tercera realización; y

- la figura 6, un ejemplo de curvas de mediciones del seguimiento del crecimiento de las poblaciones de microorganismos en un sistema de reacción según la invención.

[0020] En la siguiente descripción detallada, el sistema de reacción descrito es un sistema de cultivo de microorganismos o de células biológicas vivas. En esta solicitud, el medio de reacción es un medio de cultivo de microorganismos. Los otros reactivos pueden ser nutrientes, soluciones para modificar el pH, etc.

[0021] Sin embargo, la estructura descrita se puede utilizar en otros campos (química o experimental) para realizar un seguimiento de las reacciones a lo largo del tiempo.

[0022] En la siguiente descripción detallada, un tubo capilar es un tubo fluido a escala milimétrica, es decir, que presenta un diámetro interior del orden de la décima de milímetro al milímetro, preferentemente entre 0,5 y 1 mm. Por ejemplo, se pueden utilizar para implementar la presente invención, conectores y tubos capilares para cromatografía. Una realización preferida utiliza tubos de 0,5 milímetros de diámetro, que permiten obtener gotas de medio de cultivo de aproximadamente 100 nL.

[0023] La invención propone un procedimiento de cultivo de microorganismos en un medio de cultivo que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) llenar un tubo capilar de reacción con un medio portador no miscible con el medio de reacción;
- b) inyectar, gracias a un tubo capilar de inyección, una gota individual de medio de reacción en el tubo capilar de reacción, en el fluido portador no miscible;
- c) poner en circulación el fluido portador para que la gota del medio de reacción se desplace en relación al tubo capilar de inyección;
- 25 e) repetir las etapas b) y c) para crear una serie ordenada de gotas de medio de reacción en el fluido portador para formar una pluralidad de reactores;
- f) medir al menos un parámetro representativo de cada reactor o una señal resultante de la actividad de estos microorganismos;
- g) hacer recircular al menos un reactor para medir el o los parámetros representativos con el tiempo. Esta recirculación puede ser las idas y vueltas y/o los pasos sucesivos de la serie de gotas ante el detector gracias al medio de recirculación, para la medición con el tiempo de la cantidad de microorganismos.

[0024] Para implementar este procedimiento, la invención propone un sistema de reacción 100 de cultivos de microorganismos cuya primera parte funcional se ilustra en la figura 1.

[0025] El sistema de reacción 100 de cultivos comprende uno o más depósitos M1 de medio de cultivo 1 conectado de forma fluida a un tubo capilar de inyección 10. Esta conexión fluida se establece a través de conexiones en T.

[0026] El tubo capilar de inyección 10 está montado de forma que desemboca en un tubo capilar de cultivo 20 a través de una válvula de dos vías 102.

[0027] Al menos un depósito F1 de un fluido portador 21 no miscible con el medio de cultivo 1, está conectado de manera fluida al tubo capilar de cultivo 20 a través de una válvula de dos vías 102.

[0028] El sistema de reacción 100 de cultivos según la invención también comprende al menos un medio de circulación del medio de cultivo 1, del fluido portador 21 y de cualquier otro fluido utilizado en el sistema de reacción 100 según la invención.

[0029] Este medio de circulación es adecuado para generar un caudal en los diferentes capilares y para controlar las válvulas de dos vías 102 del conjunto del sistema de reacción 100.

[0030] Ventajosamente, el medio de circulación permite generar un caudal en los dos sentidos en al menos algunos capilares. En otras palabras, es capaz de invertir el sentido de circulación del fluido portador y, por tanto, de los depósitos, en algunos capilares.

[0031] La disposición que desemboca del tubo capilar de inyección 10 en el tubo capilar de cultivo 20 permite la inyección, por el medio de circulación, de gotas individuales 30 de medio de cultivo 1 en el tubo capilar de cultivo 20, en el fluido portador 21 no miscible con el medio de cultivo 1. Ventajosamente, el tubo de inyección está

montado de forma que desemboca en el tubo de cultivo a través de las uniones, tal como una unión en T o una unión en cruz, equipado con una o varias válvula(s) adaptada(s).

[0032] El fluido portador 21 es ventajosamente un aceite mientras que el medio de cultivo 1 es acuoso.

[0033] Por tanto, es posible diseñar gotas de emulsión inversa (agua en aceite) monodispersas controlando los caudales (o la presión) de los fluidos inmiscibles. Al imponer una velocidad y una duración de circulación del medio de cultivo y/o del fluido portador, es posible inyectar con precisión un volumen determinado de medio de cultivo en el fluido portador en forma de gotas individuales.

[0034] Cada gota 30 constituye un reactor de cultivo de microorganismos en el fluido portador 21.

[0035] El sistema de reacción de cultivos de microorganismos según la invención comprende ventajosamente uno o más depósitos R1, R2 de reactivo 51, 52 conectados de forma fluida al tubo capilar de inyección 10 a través de conexiones en T (véase la figura 1) y/o al tubo capilar de cultivo 20 (véase el depósito R3 de la figura 3 conectado directamente al tubo de cultivo 20), de modo que el reactivo 51, 52 se pueda mezclar con el medio de cultivo 1. Esto permite modificar la composición y/o las propiedades químicas y/o físicas del medio de cultivo, con referencia 1'. Por ejemplo, es posible enriquecer o empobrecer un reactor 30 de elementos nutritivos, modificar el pH, inyectar moléculas de marcado, por ejemplo, fluorescentes, inyectar moléculas cuyo poder estimulante o inhibidor debe ensayarse en los microorganismos (por ejemplo, antibióticos), etc.

[0036] Por lo tanto, es posible definir la composición del medio de cultivo con precisión mediante el ajuste de los caudales de los fluidos que componen la fase acuosa.

[0037] Para evitar los riesgos de coalescencia y las dificultades de detección relacionada con la aproximación de los depósitos 30, la invención propone ventajosamente intercalar otro fluido no miscible con el medio de cultivo 1, 1' y con el fluido portador 21.

[0038] Por lo tanto, después de la etapa c) y antes de la etapa e), la invención prevé una etapa d) que comprende la inyección, en el fluido portador 21, de una gota de un fluido denominado "de separación", no miscible con el fluido portador y no miscible con el medio de cultivo, de modo que al menos una gota 40 de fluido de separación se intercala entre dos reactores de cultivo 30 y previene su coalescencia.

[0039] Con este fin, el sistema de reacción de cultivos de microorganismos según la invención comprende ventajosamente al menos un depósito F2 de un fluido 41 de separación no miscible con el fluido portador 21 y no miscible con el medio de cultivo 1, 1'.

[0040] Este depósito F2 está conectado de manera fluida al tubo capilar de cultivo 20 a través de una válvula de dos vías 102 de modo que las gotas 40 de fluido de separación se pueden inyectar en el fluido portador 21 entre dos reactores de cultivo 30.

[0041] El fluido portador 21 y el fluido de separación 41 son, preferentemente, aceites no miscibles entre sí, como por ejemplo aceite fluorado como fluido portador y aceite mineral para el fluido de separación, el medio de cultivo 1, 1' es un medio acuoso no miscible con los aceites 21, 41 antes mencionados.

[0042] La longitud del tubo capilar de cultivo, en el que se forman los reactores, y los caudales impuestos definen la cantidad de reactores que pueden ser utilizados por experiencia y el periodo de tiempo entre cada medición. Es posible trabajar en varios miles de reactores en paralelo. Este procedimiento de manipulación de gotas con una dimensión permite conservar la identidad de cada gota durante un experimento, controlar perfectamente su composición evitando cualquier pérdida por evaporación o reversión.

[0043] Según una realización preferida, el procedimiento según la invención comprende, después de la etapa e), una etapa f) de medición de uno o más parámetros representativos de cada reactor de cultivo 30, este parámetro puede ser representativo, por ejemplo, de la cantidad de microorganismos presentes en cada reactor.

[0044] La medición puede llevarse a cabo por un procedimiento óptico, tal como mediciones de absorbancia, dispersión o fluorescencia, o por una medición eléctrica tal como impedancia.

[0045] Una primera realización de una segunda parte funcional del sistema de reacción según la invención se

ilustra en la figura 3. Esta segunda parte funcional permite implementar las etapas del procedimiento mencionadas anteriormente.

[0046] Para este fin, el tubo capilar de cultivo 20, al menos, comprende al menos una parte transparente para una señal emitida y/o detectada por un detector S, o un detector L-P.

[0047] El detector S puede ser un sensor eléctrico de impedancia.

[0048] El detector L-P está constituido, en este ejemplo, de un láser L que emite una radiación óptica de excitación y un fotodiodo P sensible a la radiación emitida por el depósito 30 bajo la excitación del láser que se puede colocar en el eje o en un ángulo de la radiación de excitación (en el caso de dispersión de luz se puede observar la luz dispersada por la gota a 90 ° del láser o cualquier otro ángulo).

[0049] La realización ilustrada en la figura 3 comprende un medio de recirculación de los depósitos que comprenden un circuito de recirculación de los reactores ante el o los detectores S, L-P. Este circuito de recirculación comprende por lo tanto un capilar que desemboca aguas arriba y aguas abajo del o de los detectores S, L-P. En este caso, el medio de circulación de los fluidos (medio de cultivo, fluido portador) puede funcionar únicamente en un solo sentido de circulación.

[0050] Por tanto, es posible realizar un seguimiento del crecimiento de los microorganismos en cada depósito desplazando mecánicamente el fluido portador, haciendo pasar y volviendo a pasar (recirculación de los reactores) cada reactor ante el o los detectores S o L-P, en el mismo sentido de circulación. Este desplazamiento es muy fácil de implementar, y no corre el riesgo de revertir los reactores, como con las placas del estado de la técnica. Por lo tanto, la velocidad de desplazamiento se puede acelerar, especialmente si hay gotas de fluido de separación entre cada reactor 30.

[0051] Alternativamente, como se ilustra en la figura 4, o en combinación, como se ilustra en la figura 5, el medio de circulación de los fluidos puede funcionar de forma bidireccional, es decir, haciendo que los fluidos en los capilares circulen en un sentido o en el sentido opuesto.

[0052] Por lo tanto, es posible realizar un seguimiento del crecimiento de microorganismos en cada depósito desplazando mecánicamente el fluido portador según las idas y vueltas, para hacer recircular cada reactor ante el o los detectores S o L-P.

[0053] La combinación de un circuito de recirculación y de un medio de circulación de fluidos que funcionan de una manera bidireccional (figura 5) permite reducir el tiempo entre dos pases de un mismo reactor ante el o los detectores, mediante la optimización de la recirculación en función de las distancias aguas arriba y aguas abajo del depósito con respecto a los detectores. Así, según la necesidad del usuario y, según el caso, será ventajoso invertir el sentido de circulación de fluido para llevar un reactor de interés ante el o los detectores S o L-P, o, por el contrario, para continuar la circulación del fluido portador en el mismo sentido, para hacer recircular el reactor de interés a través del circuito de recirculación.

[0054] Al conocer con precisión la posición de cada reactor en la serie de reactores, y conociendo las características químicas y/o físicas del medio de cultivo, es posible analizar la influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de los microorganismos. Las curvas de medición C_1 , C_2 , C_n de la población de microorganismos en una pluralidad de reactores se ilustran en la figura 6.

[0055] Por tanto, es posible medir la variación de la población de microorganismos en cada depósito sucesivo con el tiempo al practicar pases sucesivos de los depósitos, en el mismo sentido de circulación (figuras 3 y 5) y/o al alternar los sentidos de circulación (figuras 4 y 5), ante los detectores. Cada curva representa un reactor identificado y cada punto representa el pase del reactor considerado ante el detector en un intervalo de tiempo dado. De este modo, cada gota se identifica, mide y ajusta.

[0056] Un depósito R4 de fluido portador se puede montar de forma que desemboque en el capilar de cultivo 20 para separar las gotas antes de clasificarlas (figura 4). Este depósito R4 puede, por supuesto, proporcionarse en combinación con uno o más depósitos R3 de reactivos tales como se ilustra en las figuras 3 y 5.

[0057] Como se ilustra en las figuras 3 a 5, el clasificador de cultivo de microorganismos según la invención comprende preferentemente al menos un depósito de desechos W, en conexión fluida con el tubo capilar de cultivo

20 para evacuar los reactores después de la experimentación y las válvulas 101-102 para orientar las gotas.

[0058] La invención también hace que sea fácil seleccionar y extraer un reactor de cultivo de interés. Por lo tanto, la invención propone, después de la etapa e), una etapa f) de recuperación de al menos un reactor de cultivo de interés por aspiración de dicho reactor de interés en un tubo capilar de muestreo 60 montado de forma que desemboca en el tubo capilar de cultivo 20.

[0059] Ventajosamente, el tubo capilar de muestreo permite el depósito del reactor tomado en un soporte de cultivo 65, tal como una capa de agar o en los pocillos de una microplaca.

[0060] Por lo tanto, durante la detección, cada reactor está etiquetado por su posición en la serie, y un detector de recuento permite identificar los depósitos. Por medio de las válvulas 102, el o los reactores de interés están orientados en el tubo capilar de muestreo 60, mientras que los otros reactores permanecen en el tubo capilar de cultivo 20. El o los reactores de interés se recuperan a la salida del tubo capilar de muestreo 60.

[0061] Lo contrario también es posible: los reactores de interés se retienen en el tubo capilar de cultivo 20, mientras que los otros reactores se toman y eliminan. Solo queda en el tubo de cultivo 20 los reactores de interés para la experimentación.

[0062] Alternativamente o en combinación, la invención prevé ventajosamente al menos un tubo capilar de derivación 70 montado de forma que desemboca en el tubo capilar de cultivo 20 de modo que al menos un reactor 30 de cultivo se puede derivar a un medio de tratamiento 80 de uno o más reactores 30. Este medio de tratamiento 80 puede ser un medio de regulación térmica que puede calentar o enfriar uno o más reactores. Otros medios de tratamiento pueden proporcionarse de tal manera que la adición de medio de cultivo o la extracción de una porción del reactor permita la realización de un quimiostato (biorreactor en el que crecen, de una manera controlada, los organismos (bacterias, fitoplancton).

[0063] El tubo capilar de derivación 70 permite así un tratamiento selectivo de uno o más reactores con respecto a otros reactores que permanecen en el tubo de cultivo 20. Se entiende que varios tubos de derivaciones se pueden proporcionar para tratar de manera diferente los reactores 30 derivados selectivamente.

[0064] La invención se implementa ventajosamente por medio de una unidad central de control conectada al medio de circulación y adecuada para:

- 35 • controlar la inyección de gotas individuales de medio de cultivo en el tubo capilar de cultivo, en el fluido portador, mediante la imposición de una velocidad y una duración de circulación del medio de cultivo, a fin de formar una pluralidad de reactores 30 de cultivo de microorganismos;
- controlar la circulación de fluido portador mediante la imposición de una velocidad, una duración y un sentido de circulación del fluido portador en el tubo capilar de cultivo mediante el control de las válvulas;
- 40 • contar los reactores 30 de cultivo en el medio portador y memorizar la posición de cada reactor con respecto a un reactor 30 de referencia;
- hacer recircular los depósitos (30) en el tubo capilar de reacción;
- controlar la inyección de gotas 41 de fluido de separación entre dos reactores 30 de cultivo;
- controlar la inyección de al menos un reactivo 51, 52 dentro del medio de cultivo 1, 1' con el fin de modificar la
- 45 composición y/o las propiedades químicas y/o físicas;
- controlar la extracción de al menos un reactor de interés; y/o
- controlar la derivación de al menos un reactor de interés hacia un medio de tratamiento, a su vez ventajosamente controlado por la unidad central.

[0065] Ventajosamente, la unidad central de control está, además, conectada al detector S, L-P y es adecuada para memorizar al menos una medición realizada por el detector.

[0066] Ventajosamente, el sistema de reacción comprende un medio de regulación térmica de los reactores, que está dispuesto preferentemente para permitir una regulación térmica en todo el sistema de reacción. Esta regulación térmica puede ser homogénea, es decir, significativamente idéntica en todo el sistema, en el que heterogéneo, es decir, significa que la temperatura se puede aumentar en algunos lugares y disminuir en otros puntos del sistema.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de reacción, en particular de cultivos de microorganismos, que comprende:
- 5 • al menos un depósito (M1) de medio de reacción (1, 1') conectado de forma fluida a un tubo capilar de inyección (10);
- al menos un depósito (F1) de un fluido portador (11) no miscible con el medio de reacción (1, 1', 51, 52), conectado de forma fluida a un tubo capilar de reacción (20),
 - el tubo capilar de inyección (10) está montado de forma que desemboca en el tubo capilar de reacción (20) de modo que las gotas individuales (30) de medio de reacción se pueden inyectar en el tubo capilar de reacción (20), en el fluido portador (11) no miscible, a fin de formar una serie de reactores,
- 10 • al menos un detector de seguimiento de una reacción,
- caracterizado porque** comprende un medio de referencia de los reactores para identificarlos de forma exclusiva en la serie de reactores, y al menos un medio de recirculación de los reactores ante al menos un detector de seguimiento de una reacción.
- 15
2. Sistema de reacción según la reivindicación 1, en el que el medio de recirculación comprende un circuito de recirculación de los reactores ante el o los detectores (S, L-P), este circuito de recirculación comprende un capilar que desemboca aguas arriba y aguas abajo del o de los detectores (S, L-P).
- 20
3. Sistema de reacción según la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de recirculación comprende un medio de recirculación adaptado para invertir el sentido de circulación de los reactores.
- 25
4. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el cultivo de microorganismos, en el que el medio de reacción es un medio de cultivo de microorganismos, el tubo capilar de reacción es un tubo capilar de cultivo, y los reactores son reactores de cultivo de microorganismos.
5. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, al menos un depósito (F2) de un fluido (41) denominado "de separación" no miscible con el fluido portador (21) y no miscible con el medio de reacción (1, 1'), conectado de forma fluida al tubo capilar de reacción (20) de modo que las gotas (40) de fluido de separación pueden inyectarse en el fluido portador (21) entre dos reactores (30).
- 30
6. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende, además, al menos un depósito (R1, R2) de reactivo (51, 52) conectado de forma fluida al tubo capilar de inyección (10) y/o al tubo capilar de reacción (20), de modo que el reactivo se pueda mezclar con el medio de reacción.
- 35
7. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el fluido portador (21) y el fluido de separación (41) son aceites no miscibles entre sí, el medio de reacción (1, 1') es un medio acuoso no miscible con los aceites (21, 41) mencionados anteriormente.
- 40
8. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, además, al menos un depósito de residuos (W), en conexión fluida con el tubo capilar de reacción (20).
- 45
9. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además, al menos un detector (S, L-P), el tubo capilar de reacción comprende al menos una parte transparente para una señal emitida y/o recibida por el detector.
10. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende, además, un tubo capilar de muestreo (60) montado de forma que desembogue en el tubo capilar de reacción (20) de modo que al menos un reactor (30) se puede tomar.
- 50
11. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende, además, un tubo capilar de derivación (70) montado de forma que desemboca en el tubo capilar de reacción (20) de modo que al menos un reactor (30) se puede derivar a un medio de tratamiento de uno o más reactores (30).
- 55
12. Sistema de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende, además, una unidad central de control conectada al medio de circulación y adecuada para:

- controlar la inyección de gotas individuales del medio de reacción en el tubo capilar de reacción, dentro del fluido portador, imponiendo una velocidad y una duración de circulación del medio de reacción, para formar una pluralidad de reactores (30);
 - controlar la circulación del fluido portador imponiendo una velocidad, una duración y un sentido de circulación del fluido portador en el tubo capilar de reacción;
 - contar los reactores (30) en el medio portador y memorizar la posición de cada reactor con respecto a un reactor (30) de referencia;
 - hacer recircular los depósitos (30) en el tubo capilar de reacción.
- 10 13. Sistema de reacción según las reivindicaciones 5 y 12, en el que la unidad central de control es adecuada para controlar la inyección de gotas (41) de fluido de separación entre dos reactores (30).
14. Sistema de reacción según las reivindicaciones 6 y 12 o 6 y 13, en el que la unidad central de control es adecuada para controlar la inyección de al menos un reactivo (51, 52) en el medio de reacción (1, 1') para modificar la composición y/o las propiedades químicas y/o físicas.
15. Sistema de reacción según las reivindicaciones 1 y 11, en el que la unidad central de control está, además, conectada al detector (S, L-P) y es adecuada para memorizar al menos una medición realizada por el o los detectores.
- 20 16. Procedimiento de seguimiento de una reacción en un medio de reacción, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
- a) llenar un tubo capilar (20) de reacción con un medio portador (21) no miscible con el medio de reacción (1, 1');
 - 25 b) inyectar, gracias a un tubo capilar de inyección (10), una gota individual (30) de medio de reacción en el tubo capilar de reacción (20), en el fluido portador (21) no miscible;
 - c) poner en circulación el fluido portador (21) para que la gota del medio de reacción se desplace en relación al tubo capilar de inyección;
 - e) repetir las etapas b) y c) para crear una serie ordenada de gotas de medio de reacción en el fluido portador para formar una pluralidad de reactores (30);
 - 30 f) medir al menos un parámetro representativo de cada reactor;
 - g) hacer recircular al menos un reactor para medir al menos dicho parámetro representativo con el tiempo.
17. Procedimiento de seguimiento de una reacción en un medio de reacción según la reivindicación 16, para el cultivo de microorganismos en un medio de cultivo, que comprende las siguientes etapas:
- a) llenar un tubo capilar (20) de cultivo con un medio portador (21) no miscible con el medio de cultivo (1, 1');
 - b) inyectar, gracias a un tubo capilar de inyección (10), una gota individual (30) de medio de cultivo en el tubo capilar de cultivo (20), en el fluido portador (21) no miscible;
 - 40 c) poner en circulación el fluido portador (21) para que la gota del medio de cultivo se desplace en relación con el tubo capilar de inyección;
 - e) repetir las etapas b) y c) para crear una serie ordenada de gotas de medio de cultivo en el fluido portador para formar una pluralidad de reactores (30) de cultivo de microorganismos;
 - f) medir al menos un parámetro representativo de cada reactor de cultivo, este parámetro puede ser representativo de la cantidad de microorganismos presentes en cada reactor;
 - 45 g) recircular al menos un reactor para medir al menos dicho parámetro representativo con el tiempo.
18. Procedimiento de seguimiento de una reacción en un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, que comprende, además, después de la etapa c) y antes de la etapa e), una etapa d) que comprende la inyección, en el fluido portador (21), de una gota de un fluido denominado "de separación", no miscible con el fluido portador y no miscible con el medio de reacción, de modo que al menos una gota (40) de fluido de separación se intercala entre dos reactores (30) y previene su coalescencia.
- 50 19. Procedimiento de seguimiento de una reacción en un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que la medición se realiza por un procedimiento óptico, tal como mediciones de absorbancia, dispersión o fluorescencia, o por una medición eléctrica tal como impedancia.
- 55 20. Procedimiento de seguimiento de una reacción en un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, que comprende, además, después de la etapa e), una etapa f) de recuperación de al

menos un reactor de interés por aspiración de dicho reactor de interés en un tubo capilar de muestreo montado de forma que desemboca en el tubo capilar reacción.

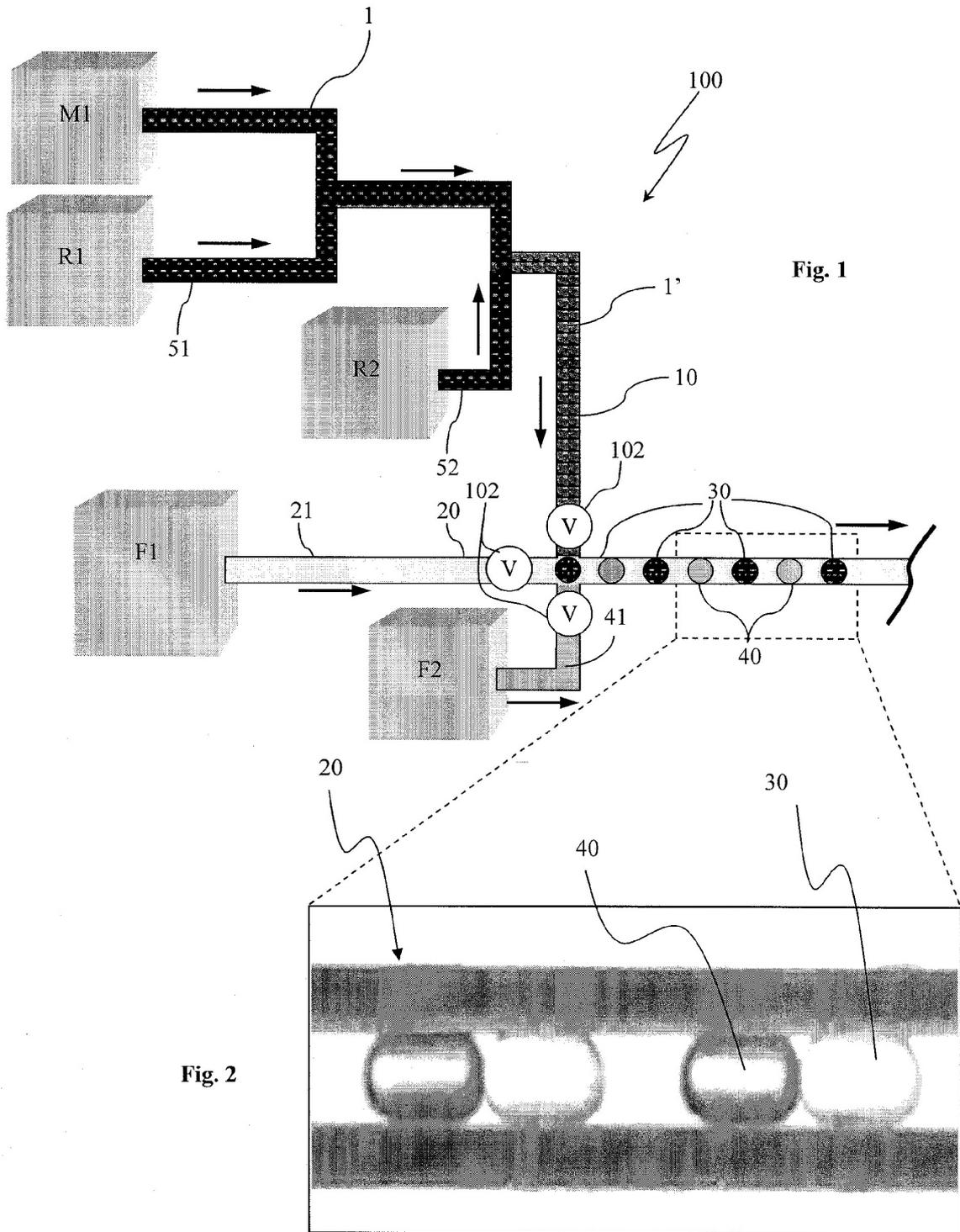


Fig. 3

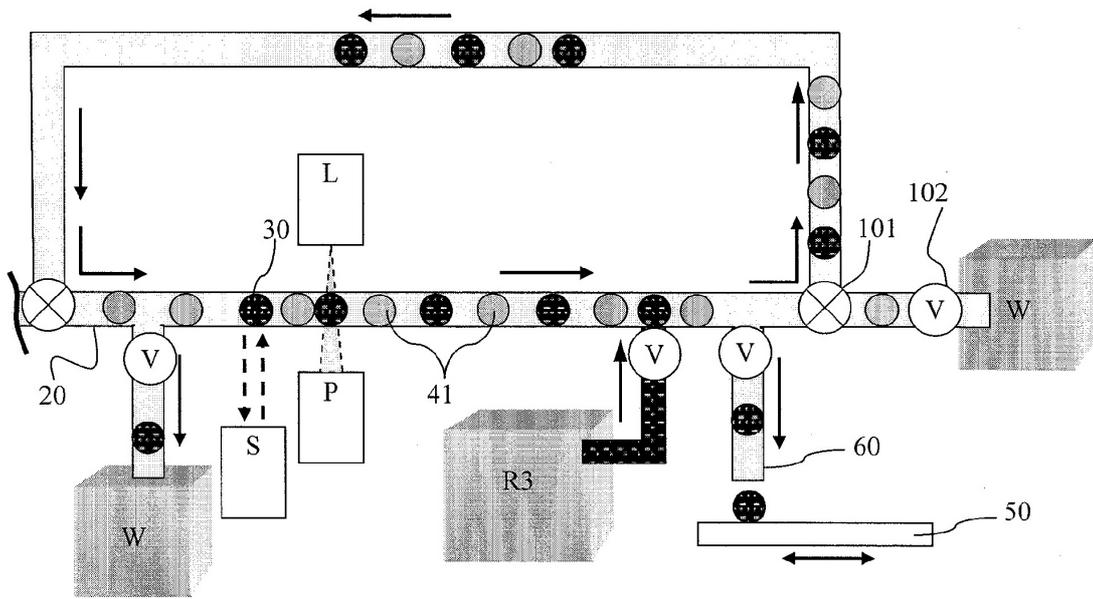


Fig. 4

