

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 340 118**

21 Número de solicitud: 200800109

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 27/02 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **16.01.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.05.2010

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** (Titular al 50 %)
Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Barcelona (Titular al 50 %)

72 Inventor/es: **Muñoz Berbel, Xavier;**
Muñoz Pascual, Francisco Javier;
Escude Pujol, Roger;
Mas Gordi, Jordi;
Vígues Frantzen, Nuria y
Campo García, Francisco Javier del

74 Agente: **Ungría López, Javier**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para medir concentración de biomasa, y uso de un elemento electrónico chip para medir dicha concentración de biomasa.**

57 Resumen:

Dispositivo y procedimiento para medir concentración de biomasa, y uso de un elemento electrónico chip para medir dicha concentración de biomasa.

La presente invención se refiere a un dispositivo para medir la concentración de biomasa de un medio, que comprende medios para medir el cambio de impedancia eléctrica producido por la presencia de biomasa y medios de procesamiento y control para determinar la concentración de biomasa a partir de dichos medios para medir el cambio de impedancia, caracterizado por el hecho de que dichos medios para medir el cambio de impedancia comprenden por lo menos dos electrodos de configuración adecuada para permitir la medida del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica de la interfase electrodo/solución, producido por la adhesión electrostática de biomasa, y por el hecho de que dichos medios de procesamiento y control determinan la concentración de biomasa a partir de una curva de calibración que correlaciona dicho valor de cambio de capacitancia con la concentración de biomasa. Asimismo, la presente invención se refiere al procedimiento para medir la concentración de biomasa del medio mediante medidas de cambio de impedancia. También se refiere al uso de un elemento electrónico chip para medir dicha concentración de biomasa.

ES 2 340 118 A1

ES 2 340 118 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento para medir concentración de biomasa, y uso de un elemento electrónico chip para medir dicha concentración de biomasa.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un dispositivo y procedimiento para medir la concentración de biomasa del medio mediante medidas de cambio de impedancia. También se refiere al uso de un elemento electrónico chip para medir dicha concentración de biomasa.

Estado de la técnica

La biomasa es un parámetro importante de control en el campo de la fermentación, la industria alimentaria y el diagnóstico clínico, siendo indispensable un buen seguimiento de su actividad. Estos sectores industriales necesitan de dispositivos capaces de diferenciar y cuantificar los microorganismos presentes en el medio.

El control microbiológico de soluciones acuosas en sectores industriales como el del área de las aguas de bebida y consumo, requiere la cuantificación de concentraciones de microorganismos muy bajas del orden de 10^2 unidades formadoras de colonias por centímetro cúbico, en adelante, cfu.cm^{-3} .

Los métodos más extensamente empleados hasta el momento para medir bajas concentraciones de biomasa bacteriana son los basados en siembras en placa y la técnica PCR. La siembra en placas es una técnica sencilla y muy fiable aunque es demasiado lenta (requiere como mínimo 24 horas de incubación).

La espectroscopia electroquímica de impedancias (EEI) es una técnica también usada en caracterización y cuantificación de biomasa, que está basada en la aplicación de un potencial eléctrico de frecuencia variable al medio estudiado, y en la medición de la respuesta en corriente del medio para cada una de las distintas frecuencias, mediante por lo menos dos electrodos. Dicha respuesta en corriente permite obtener la impedancia eléctrica medida en un circuito eléctrico equivalente al modelo eléctrico del medio en estudio.

El barrido de frecuencias da lugar a un espectro de impedancia en el que, a una determinada frecuencia, tiene lugar una caída del valor del módulo de dicha impedancia debida a los cambios producidos en la solución por los productos del metabolismo bacteriano o por las propias células en solución. El valor del cambio de impedancia producido por la presencia de biomasa se utiliza para determinar la concentración de biomasa del medio.

Los dispositivos impedimétricos existentes que determinan la concentración de biomasa mediante espectroscopia de impedancia electroquímica presentan el inconveniente de que son lentos, puesto que requieren largos tiempos de medida, especialmente para concentraciones inferiores a 10^3 cfu.cm^{-3} . Por otro lado, dichos dispositivos presentan también el inconveniente de que son poco fiables para medir bajas concentraciones de biomasa, puesto que la medida que realizan es muy sensible a cambios de temperatura y conductividad del medio donde se cultiva la biomasa. A bajas concentraciones la relación señal/ruido es muy pequeña, por lo que las medidas no pueden realizarse correctamente.

La patente ES 2143 911, describe un método y aparato para medir concentración de biomasa que pretende mejorar la fiabilidad y rapidez de los métodos y dispositivos existentes, sobre todo, por lo que se trata de medidas de biomasa a bajas concentraciones.

El método de la mencionada patente estima la concentración de biomasa a partir de la relación entre la impedancia a alta y baja frecuencia. En una primera opción de proceso, se utilizan directamente los valores de impedancia obtenidos a alta y baja frecuencia y, en una segunda opción, se utilizan dos valores resultantes de ajustar los datos de impedancia de un barrido de frecuencias a una curva. En el método empleado, se acepta por convención un circuito equivalente al modelo eléctrico del medio, que está compuesto por la resistencia del medio extracelular, la resistencia del medio intracelular y la capacitancia de la membrana celular.

El dispositivo impedimétrico descrito en la mencionada patente comprende sondas de medida diseñadas para adaptarse a dos conexiones estándar de un biorreactor industrial, que incluyen un sensor de temperatura y de conductividad del medio y un conjunto de electrodos. Los electrodos de cada sonda se sitúan de dos en dos en los bordes longitudinales de un agujero transversal oblongo o, en otra realización, sobre la placa o soporte en el que se deposita la capa fina de cultivo. En ambos casos, la configuración de los electrodos se ha diseñado por un lado, para limitar de forma definida el campo eléctrico, lo que facilita la medición de biomasa a bajas concentraciones y, por otro lado, para reducir la posibilidad de que burbujas presentes en la biomasa puedan influir sobre la medida.

Sin embargo, el dispositivo y método descrito en la mencionada patente sigue presentando limitaciones, puesto que las moderadas variaciones que experimenta la conductividad del medio extracelular (conductividad de la solución) en el cultivo pueden enmascarar la medida de concentraciones de biomasa bajas.

La patente ES2183677 constituye una mejora de la patente anteriormente citada, encaminada a mejorar la fiabilidad del método de detección a bajas concentraciones de biomasa. El método mejorado propuesto incluye la medición de

la impedancia eléctrica del medio en dos regiones; una carente de biomasa y otra con biomasa. La medición se lleva a cabo en las dos regiones mediante conjuntos de electrodos idénticos con el objetivo de obtener información sobre las variaciones de conductividad del medio en la región carente de células. La información obtenida se utiliza para corregir la estimación de la concentración de biomasa del medio en la región con biomasa.

Sin embargo, a pesar de las mejoras propuestas, el método de medición de la mencionada patente resulta complejo y, además, poco efectivo, puesto que sigue presentando limitaciones a la hora de medir concentraciones de biomasa inferiores a 10^5 cfu.cm⁻³.

10 Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es resolver los inconvenientes mencionados, desarrollando un dispositivo y método para medir bajas concentraciones de biomasa que presenta la ventaja de que es rápido, sencillo y muy fiable.

De acuerdo con este objetivo, según un primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para medir la concentración de biomasa de un medio, que comprende medios para medir el cambio de impedancia eléctrica producido por la presencia de biomasa y medios de procesamiento y control para determinar la concentración de biomasa a partir de dichos medios para medir el cambio de impedancia. El dispositivo se caracteriza por el hecho de que los medios para medir el cambio de impedancia comprenden por lo menos dos electrodos de configuración adecuada para permitir la medida del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica de la interfase electrodo/solución, producido por la adhesión electrostática de biomasa, y por el hecho de que los medios de procesamiento y control determinan la concentración de biomasa a partir de una curva de calibración que correlaciona dicho cambio de capacitancia con la concentración de biomasa.

Atendiendo al mismo objetivo, según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para medir la concentración de biomasa de un medio mediante el dispositivo reivindicado, que se caracteriza por el hecho de que comprende las etapas de:

a) polarizar el medio aplicando un potencial eléctrico a los electrodos del dispositivo reivindicado, al objeto de adherir biomasa sobre la superficie de dichos electrodos,

b) medir el cambio de impedancia eléctrica del medio polarizado,

c) determinar en el circuito equivalente al modelo eléctrico del medio, el valor del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica de la interfase electrodo/solución (Cdl), a partir del valor del cambio de impedancia de la etapa b),

d) determinar la concentración de biomasa del medio a partir del valor del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) mediante la correspondiente curva de calibración que correlaciona dicho valor de variación de capacitancia con la concentración de biomasa del medio.

Por último, según un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un elemento electrónico chip que comprende por lo menos dos electrodos integrados en un sustrato de material, para medir la concentración de biomasa de un medio mediante espectroscopia de impedancia electroquímica.

El dispositivo y procedimiento reivindicados están basados en la medida de los cambios producidos en la interfase electrodo/solución, debido a la adhesión de biomasa.

Los experimentos efectuados han permitido observar que la biomasa adherida a la superficie del electrodo de trabajo, durante los primeros minutos de colonización, modifica las características electroquímicas de la doble capa eléctrica de la interfase del electrodo. El cambio detectado depende de la cantidad de biomasa adherida, la cual a su vez es proporcional a la concentración de dicha biomasa en el medio. Este hecho ha permitido el desarrollo de un dispositivo y procedimiento para cuantificar la concentración de biomasa, previa calibración del dispositivo en el medio, temperatura y biomasa de interés, que presenta la ventaja de que es rápido, directo y sencillo.

La doble capa eléctrica de la interfase electrodo/solución es considerada de forma común como similar a un condensador eléctrico, por lo que los cambios producidos en esta capa pueden ser fácilmente monitorizados por espectroscopia de impedancia electroquímica.

Los experimentos efectuados han permitido observar que la biomasa adherida a la superficie del electrodo de trabajo se comporta, a determinadas frecuencias de trabajo, como un material dieléctrico que modifica el valor de la capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) de los electrodos del dispositivo. La variación de la capacitancia de la doble capa (Cdl) se ha visto dependiente de la concentración de biomasa del medio, por lo que la monitorización de los cambios de capacitancia de dicha capa se ha visto que permite la detección de la concentración de biomasa del medio, de un modo sencillo y muy fiable, mediante la correspondiente curva de calibración.

En el dispositivo reivindicado, la configuración de los electrodos (en particular, su área y distancia entre ellos) debe ser la adecuada para permitir la medida del cambio de capacitancia de la interfase electrodo/solución producido por la

ES 2 340 118 A1

adhesión de biomasa. Es decir, debe de ser la adecuada para permitir limitar el campo eléctrico a la zona de la interfase que es la zona en la que se miden los cambios electroquímicos producidos por la presencia de la biomasa adherida al electrodo de trabajo.

5 Sorprendentemente, se ha observado que como el método propuesto está basado en una medida sobre la interfase del electrodo, características del medio como, por ejemplo, la conductividad, no afectan sensiblemente en la toma de medidas.

10 Concretamente, se ha observado que mientras que la capacitancia de la doble capa incrementa de forma continua con la concentración de biomasa, la resistencia de la solución, que informa sobre la conductividad media del medio, permanece constante con el incremento de concentración de biomasa. Por lo tanto, sorprendentemente el valor del cambio de capacitancia de la interfase no se ve modificado por el cambio de conductividad del medio durante la fase de cultivo, constituyéndose en un parámetro muy fiable para medir la concentración de biomasa. Gracias a ello, el dispositivo y procedimiento reivindicados presentan la ventaja de que permiten la detección de concentraciones muy
15 bajas de biomasa, del orden de hasta 10^2 cfu-cm⁻³, de un modo muy fiable.

Otra ventaja del dispositivo y procedimiento reivindicados radica en la rapidez con la que puede efectuarse la medida de concentración. Ello es debido al hecho de que se ha observado que el cambio de señal impedimétrica producido por la adhesión de biomasa puede medirse en un tiempo de exposición muy corto, del orden de unos pocos
20 minutos.

Una vez calibrado, el dispositivo permite determinar la concentración de biomasa a partir de una única medida de impedancia, así como monitorizar dicha concentración de biomasa a lo largo de un periodo de incubación del medio. Después de cada medida será necesario llevar a cabo la limpieza de la superficie de los electrodos y, si procede, la re-
25 calibración del dispositivo.

En la presente invención, por biomasa se entenderá en general, material biológico constituido por una o más células procariotas o eucariotas, y en particular, microorganismos tales como levaduras, hongos, etc.... Dicha biomasa estará dispuesta en suspensión en cualquier tipo de medio, aunque, preferiblemente, el medio empleado será un medio o
30 solución acuosa.

El tamaño de los electrodos del dispositivo incide en la sensibilidad de la medida. En este sentido, preferiblemente, los electrodos serán micro-electrodos. No obstante, opcionalmente, se ha previsto que los electrodos puedan ser nano-
35 electrodos al objeto de mejorar todavía más dicha sensibilidad.

Según una realización preferida, los electrodos del dispositivo están integrados en un sustrato de material, constituyendo dichos electrodos integrados en dicho sustrato un elemento electrónico de pequeño tamaño o elemento electrónico chip susceptible de ser inmerso en el medio en el que se lleva a cabo la medida de concentración de
40 biomasa.

Gracias a ello, la medida de biomasa puede llevarse a cabo mediante un elemento electrónico chip, el cual, gracias a su reducido tamaño, permite realizar las medidas en volúmenes de muestra muy pequeños, y empleando tiempos de medida muy cortos, inferiores al minuto.

45 El chip o elemento electrónico de pequeño tamaño proporciona un dispositivo sensor de biomasa muy versátil para aplicar en una gran diversidad de campos industriales; alimentario, diagnóstico clínico, aguas, etc..., en los que es necesario el control microbiológico del medio.

Ventajosamente, dicho elemento electrónico chip comprende medios de conexión inalámbrica a los medios de procesamiento y control del dispositivo. De este modo, el dispositivo resulta todavía más versátil, adaptándose a un
50 número mayor de situaciones.

Otra vez ventajosamente, el elemento electrónico chip comprende integrado, en el mismo sustrato o en un sustrato próximo, por lo menos un sensor para medir parámetros del medio en el que se lleva a cabo la medida de concentra-
55 ción de biomasa. Dicho sensor puede seleccionarse de un grupo que comprende sensores para caudal, temperatura, conductividad, pH, oxígeno, o puede tratarse, por ejemplo, de un sensor selectivo a biocidas.

La adición de uno o más sensores útiles para medir distintos parámetros del medio, viene a incrementar todavía más la versatilidad del dispositivo de la presente invención.
60

Según una realización, los electrodos están integrados en el sustrato del chip en forma de micro- discos. Esta geometría resulta muy simple y eficaz. No obstante, la geometría de los electrodos integrados puede ser muy variada, al igual que el número de electrodos. De igual modo, el material con el que están fabricados los electrodos puede ser variado; de tipo conductor o semiconductor. En este último caso, el dispositivo resultará especialmente adecuado para
65 minimizar los fenómenos de corrosión de determinados medios.

Por lo que se refiere al procedimiento de la presente invención, según una realización preferida de dicho procedimiento, la capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) del circuito equivalente en el que se mide la impedancia

ES 2 340 118 A1

eléctrica, es aproximada a un elemento de fase constante (CPEdl), siendo determinado en la etapa c) el valor de la variación del módulo (Kdl) de dicho elemento de fase constante.

5 El elemento de fase constante tiene en cuenta la pérdida de idealidad capacitativa de la doble capa eléctrica de la interfase debida a la rugosidad superficial de los electrodos, por lo que resulta un parámetro muy útil que mejora el ajuste de la curva de calibración empleada en el procedimiento.

10 Los experimentos realizados ponen de manifiesto que la variación del módulo del elemento de fase constante (Kdl) presenta una relación lineal de alta calidad con la presencia de biomasa en un amplio rango de concentraciones, por lo que resulta un parámetro muy adecuado para medir la concentración de biomasa mediante el procedimiento de la presente invención.

15 Según otra realización del procedimiento de la presente invención, la concentración de biomasa de la etapa d) se determina a partir del valor diferencial de dos medidas de cambio de capacitancia (Cdl) tomadas en un intervalo de tiempo predeterminado.

20 Los experimentos que se han llevado a cabo ponen de manifiesto que la variación del diferencial del cambio de capacitancia de la doble capa, presenta una relación lineal con la concentración de biomasa en un rango de concentraciones superior. De este modo, se puede medir un rango de concentraciones de biomasa todavía más amplio, que incluye valores muy bajos, del orden de 10^1 cfu·cm⁻³, hasta valores más altos, superiores a 10^8 cfu·cm⁻³.

25 Tal y como se ha comentado anteriormente, características del medio como, por ejemplo, los cambios de conductividad, no afectan sensiblemente en la toma de medidas. No obstante, se ha observado que medios poco salinos, de baja conductividad, son preferibles, puesto que en estos medios el límite de detección de biomasa es más bajo.

30 El rango de frecuencias de trabajo del flujo electrónico generado por la medida de la impedancia de la etapa b) puede variar en función de la configuración y material de los electrodos empleados. No obstante, preferiblemente, se emplearán frecuencias inferiores a 1MHz, en particular, frecuencias del orden de KHz, puesto que se ha demostrado que dichas frecuencias son las que resultan más adecuadas para medir la capacitancia de la interfase electrodo/solución.

35 En cualquier caso, las frecuencias empleadas serán las adecuadas para facilitar que la biomasa adherida se comporte como un material dieléctrico que modifica el valor de la capacitancia de la doble capa (Cdl). En este sentido, se evitarán aquellas frecuencias de trabajo para las que el flujo de corriente generado atraviese las paredes celulares.

40 Preferiblemente, el tiempo empleado para llevar a cabo por lo menos las etapas a) y b) del procedimiento será inferior a 1 minuto. Se ha observado que este tiempo de medida mejora la correlación obtenida entre la capacitancia y la concentración de biomasa.

45 Según una realización, la concentración inicial de biomasa del medio se determina de forma indirecta mediante la correspondiente curva de crecimiento de dicha biomasa, tras monitorizar la concentración de biomasa a lo largo de un periodo de incubación predeterminado con el dispositivo de la presente invención. De este modo, es posible detectar de forma indirecta concentraciones de biomasa del medio incluso inferiores a 10^2 cfu·cm⁻³.

Breve descripción de los dibujos

50 Para mayor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos en los que, esquemáticamente y sólo a título de ejemplo no limitativo, se representan varios casos prácticos de realización.

En dichos dibujos,

55 la figura 1 es una vista esquemática en planta de la estructura de un primer tipo de elemento electrónico de pequeño tamaño o elemento electrónico chip utilizado para medir concentración de biomasa.

la figura 2 es una vista esquemática en planta de la estructura de un segundo tipo de elemento electrónico chip utilizado para medir concentración de biomasa.

las figuras 3a y 3b son dos representaciones esquemáticas de un electrodo de trabajo del dispositivo, tras ser polarizado.

60 las figuras 4a y 4b son dos representaciones esquemáticas del mismo electrodo de trabajo de la figura 3, que muestran dicho electrodo al inicio del proceso de adhesión de biomasa, momento en el que se lleva a cabo la medida.

las figuras 5a y 5b son dos representaciones esquemáticas del mismo electrodo de trabajo de la figura 3, después de una larga exposición a la solución con biomasa,

65 la figura 6 es una representación gráfica que muestra la variación de la capacitancia de la doble capa eléctrica con la concentración de biomasa bacteriana del medio, en dos medios de conductividad diferente.

ES 2 340 118 A1

la figura 7 es una representación gráfica que muestra la variación de la resistencia de la solución (medida en la interfase) con la concentración de biomasa bacteriana, en dos medios de conductividad diferente.

la figura 8 es una representación gráfica que muestra la variación del diferencial del cambio de capacitancia con la concentración de biomasa, en medidas tomadas en un intervalo de tiempo de cuarenta minutos.

Descripción de ejemplos y realizaciones preferidas

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, en una realización preferida del dispositivo de la presente invención, la medida de impedancia eléctrica se lleva a cabo mediante un chip 1 o elemento electrónico de pequeño tamaño, que lleva integrados los electrodos 2 con los que se realiza la medida de impedancia eléctrica.

Tal y como se ha comentado, el chip 1 es un elemento electrónico de pequeño tamaño que presenta la ventaja de que permite realizar de una forma muy cómoda medidas de concentración de biomasa en volúmenes de muestra muy pequeños.

La figura 1 muestra uno de los tipos de chip 1 utilizados en la presente invención, que lleva integrados en un mismo sustrato 3 dos micro-electrodos 2 en forma de micro-discos; electrodo auxiliar y electrodo de trabajo, y un tercer electrodo 2 de referencia de geometría distinta. En la figura 2, se muestra un segundo tipo de chip 1 que comprende, en este caso, un total de cinco electrodos 2.

El material del sustrato 3 y de los electrodos 2 del chip 1 puede ser muy variado, no habiéndose encontrado ninguna limitación al respecto. Así, entre los materiales probados para el sustrato 3, se citan el vidrio y el cuarzo. Mientras que para los electrodos 2, se citan materiales conductores como el oro, platino, carbono, iridio, etc... No obstante, también pueden emplearse materiales semiconductores, tales como óxidos y nitruros, los cuales presentan la ventaja de que minimizan los fenómenos de corrosión causados por el medio.

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, el dispositivo y procedimiento reivindicados están basados en la medida de los cambios producidos en la interfase electrodo/solución, debido al fenómeno de adhesión de biomasa.

Las figuras 3 a 5 muestran de una forma esquemática los cambios que tienen lugar en la superficie del chip 1 mientras se lleva a cabo la medida de concentración de biomasa.

En la primera etapa del proceso que muestran las figuras 3a y 3b, se aplica un potencial eléctrico a los electrodos 2 que se traduce en una separación de cargas que da lugar a la aparición de la doble capa eléctrica 4 en la interfase electrodo de trabajo/solución. Dicha separación de cargas atrae a la biomasa 5 que se encuentra en suspensión en el medio, la cual rápidamente se adhiere sobre la superficie del electrodo 2 de trabajo del chip 1.

El potencial eléctrico aplicado puede variar en función del medio. No obstante, se ha observado que los potenciales aplicados más bajos se traducen en un área menor de electrodo 2 cubierta por biomasa 5, lo que facilita la medida en concentraciones del medio altas. La sensibilidad del procedimiento también varía con el potencial aplicado, observándose que cuanto más bajo es dicho potencial, menor es la pendiente de la curva de calibración y, por lo tanto, menor es la sensibilidad del proceso.

Durante las primeras etapas de colonización de biomasa 5, se establece un equilibrio dinámico entre las células adheridas y las liberadas que modifica física y electroquímicamente la doble capa eléctrica 4 de la interfase del electrodo 2 de trabajo. Las figuras 4a y 4b muestran el estado de la doble capa eléctrica 4 en el momento en que se lleva a cabo la medida del cambio de impedancia eléctrica del proceso.

La medida de impedancia se lleva a cabo mediante espectroscopia de impedancia electroquímica, en un rango de frecuencias inferior a 1 MHz, preferiblemente, del orden de 1 KHz. En este ambiente eléctrico la biomasa bacteriana adherida a la superficie del chip 1 se comporta como un material dieléctrico que modifica el valor de la capacitancia de la doble capa eléctrica (Cdl) del micro-electrodo de trabajo 2 del dispositivo.

La variación del cambio de capacitancia es monitorizado por espectroscopia de impedancia electroquímica, ajustando los espectros de impedancia a un circuito equivalente compuesto, además de por la capacitancia de la doble capa (cdl), por la resistencia de la solución (Rs) y por la capacitancia del electrodo de referencia (Celec), en el caso de que se utilice en la medida.

La concentración de biomasa del medio se determina a partir del valor del cambio de capacitancia (Cdl) mediante una curva de calibración que correlaciona el valor del cambio de capacitancia de la doble capa (Cdl) con la concentración de biomasa en el rango de trabajo.

La figura 6 muestra una representación gráfica de la variación de la capacitancia de la doble capa eléctrica (4) con la concentración de biomasa (5) del medio, en dos medios de conductividad diferente. En dicha figura, el valor de capacitancia ha sido ajustado al valor del módulo del elemento de fase constante (Kdl), ya que se ha comprobado

ES 2 340 118 A1

experimentalmente que la variación de dicho módulo presenta una relación de alta calidad en un amplio rango de concentraciones con la concentración de biomasa.

La figura 7 es una representación gráfica que muestra la variación de la resistencia de la solución (medida en la interfase) con la concentración de biomasa bacteriana, en los dos medios de conductividad diferente empleados en la figura 6.

Los resultados que se muestran en ambas figuras 6 y 7, han sido obtenidos en experimentos realizados con muestras de biomasa bacteriana en suspensión en una solución acuosa de suero fisiológico estéril.

Tal y como puede observarse en dichas figuras 6 y 7, la variación del módulo del elemento de fase (Kdl) muestra un aumento continuo con la concentración de biomasa, en ambos medios de conductividades diferentes. Sin embargo, la resistencia de la solución (Rs) de ambos medios, que informa sobre la conductividad media, permanece constante a lo largo del rango de concentraciones. De estos resultados se deduce que el valor de la capacitancia no se ve modificado por un cambio de conductividad local del medio debido al incremento de biomasa, pero sí, en cambio, por un incremento de la concentración bacteriana de la muestra, obteniéndose una relación lineal de alta calidad entre el valor del cambio de capacitancia y la concentración de biomasa, en rangos que van desde 10^1 cfu.cm⁻³ hasta 10^6 cfu.cm⁻³.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, el valor del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica (4) de la interfase es un parámetro útil y muy fiable para medir bajas concentraciones de biomasa (5).

De las figura 6 y 7 también se deduce que la magnitud del cambio de capacitancia de la interfase varía en función del tipo de conductividad del medio. Así, para una misma concentración bacteriana, a conductividades del medio bajas se mostraron valores de cambio de capacitancia (Kdl) inferiores.

La diferencia de conductividad del medio de partida no se traduce en una mejora de la sensibilidad del proceso la cual es idéntica en ambos casos (misma pendiente de la curva). No obstante, la disminución de la conductividad del medio trabajo se ha visto que mejora el límite de detección que se reduce de 10^2 cfu.cm⁻³ hasta 10^1 cfu.cm⁻³. Por lo tanto, los medios poco salinos resultan más adecuados para medir bajas concentraciones de biomasa.

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, al objeto de medir un rango de concentraciones de biomasa más amplio, se ha definido un parámetro que mide la diferencia del valor del cambio de capacitancia de dos medidas tomadas en un intervalo de tiempo predeterminado.

La figura 8 muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos en un experimento en el que se midió la variación del diferencial del cambio de capacitancia con la concentración de biomasa bacteriana, en medidas tomadas en intervalos de tiempo de 40 minutos.

Los resultados muestran una relación lineal de alta calidad en un rango de concentraciones que va desde 10 cfu.cm⁻³ hasta 10^8 cfu.cm⁻³.

REIVINDICACIONES

5 1. Dispositivo para medir la concentración de biomasa (5) de un medio, que comprende medios para medir el cambio de impedancia eléctrica producido por la presencia de biomasa (5) y medios de procesamiento y control para determinar la concentración de biomasa (5) a partir de dichos medios para medir el cambio de impedancia, **caracterizado** por el hecho de que dichos medios para medir el cambio de impedancia comprenden por lo menos dos electrodos (2) de configuración adecuada para permitir la medida del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica (4) de la interfase electrodo/solución, producido por la adhesión electrostática de biomasa (5), y por el hecho de que dichos medios de procesamiento y control determinan la concentración de biomasa (5) a partir de una curva de calibración que correlaciona dicho valor de cambio de capacitancia con la concentración de biomasa (5).

15 2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dichos por los menos dos electrodos (2) están integrados en un sustrato (3) de material, constituyendo dichos electrodos (2) integrados en dicho sustrato (3) un elemento electrónico chip (1) susceptible de ser inmerso en el medio en el que se lleva a cabo la medida de concentración de biomasa (5).

20 3. Dispositivo según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que dicho elemento electrónico chip (1) comprende medios de conexión inalámbrica a dichos medios de procesamiento y control.

4. Dispositivo según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que dicho elemento electrónico chip (1) comprende por lo menos un sensor para medir parámetros del medio en el que se lleva a cabo la medida de concentración de biomasa (5).

25 5. Dispositivo según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que dichos electrodos (2) están integrados en el sustrato (3) en forma de micro-discos.

6. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que el material de dichos electrodos (2) es un material semiconductor.

30 7. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dicha biomasa (5) está constituida por una o más células procariotas o eucariotas.

35 8. Uso de un elemento electrónico chip (1) que comprende por los menos dos electrodos (2) integrados en un mismo sustrato (3) de material, para medir la concentración de biomasa (5) de un medio mediante espectroscopia de impedancia electroquímica.

9. Procedimiento para medir la concentración de biomasa de un medio mediante el dispositivo reivindicado, **caracterizado** por el hecho de que comprende las etapas de:

40 a) polarizar el medio aplicando un potencial eléctrico a los electrodos (2) del dispositivo reivindicado, al objeto de adherir biomasa sobre la superficie de dichos electrodos (2),

b) medir el cambio de impedancia eléctrica del medio polarizado,

45 c) determinar en el circuito equivalente al modelo eléctrico del medio, el valor del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica (4) de la interfase electrodo/solución, a partir del valor del cambio de impedancia de la etapa b),

50 d) determinar la concentración de biomasa (5) del medio a partir del valor del cambio de capacitancia de la doble capa eléctrica (4) mediante la correspondiente curva de calibración que correlaciona dicho valor de cambio de capacitancia con la concentración de biomasa (5) del medio.

55 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que la capacitancia de la doble capa eléctrica (4) del circuito equivalente es aproximada a un elemento de fase constante, siendo determinado en la etapa c) el valor de la variación del módulo de dicho elemento de fase constante.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que la frecuencia de trabajo del flujo electrónico generado por la medida de la impedancia de la etapa b) es inferior a 1 MHz.

60 12. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que la concentración de biomasa de la etapa d) se determina a partir del valor diferencial de dos medidas de cambio de capacitancia tomadas en un intervalo de tiempo predeterminado.

65 13. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que la concentración inicial de biomasa (5) del medio se determina de forma indirecta, mediante la correspondiente curva de crecimiento de biomasa (5), tras monitorizar la concentración de biomasa (5) a lo largo de un periodo de incubación predeterminado.

ES 2 340 118 A1

14. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que dicha biomasa (5) está constituida por una o más células eucariotas o procariotas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG.1

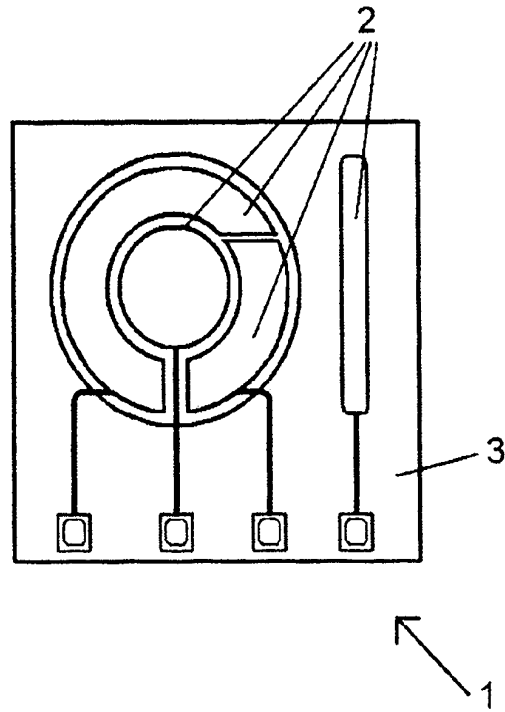


FIG.2

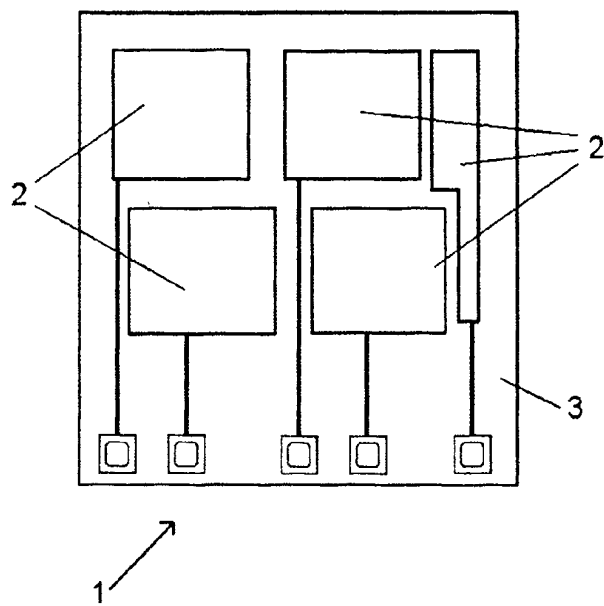


FIG.3A

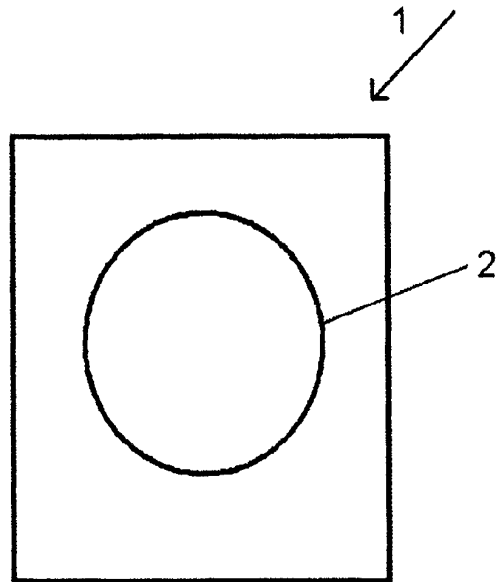


FIG.3B

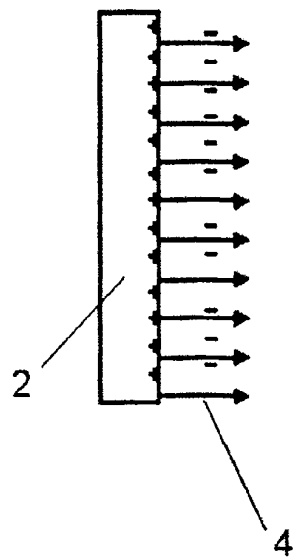


FIG.4A

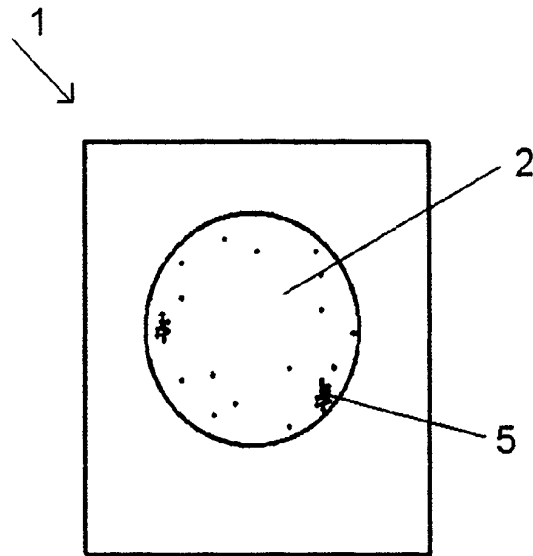


FIG.4B

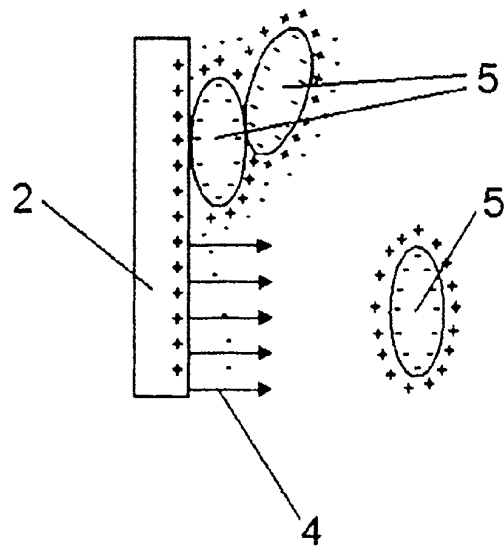


FIG.5A

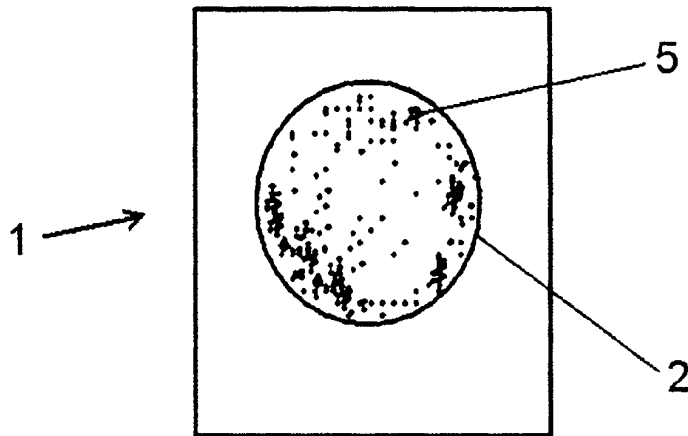


FIG.5B

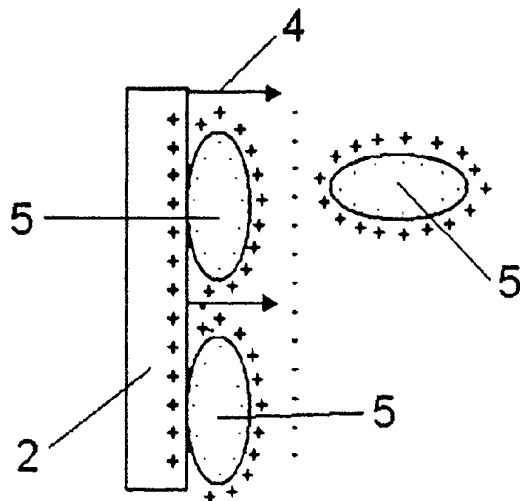


FIG.6

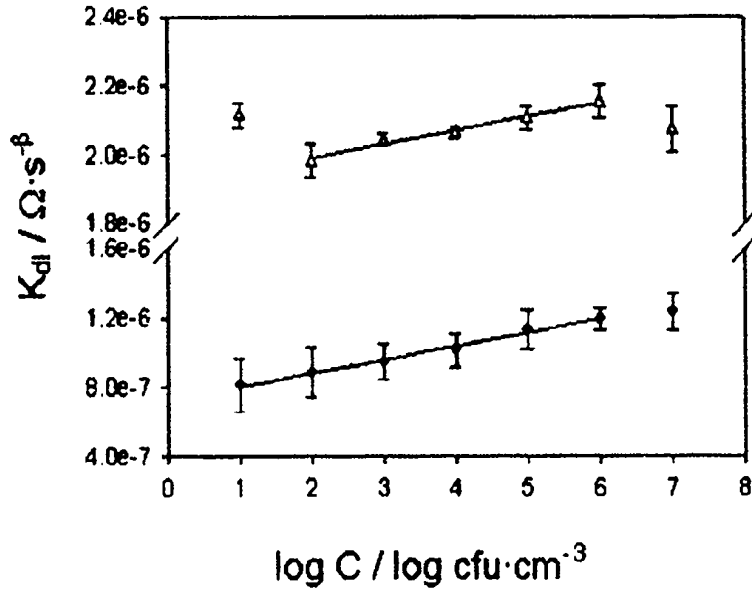


FIG.7

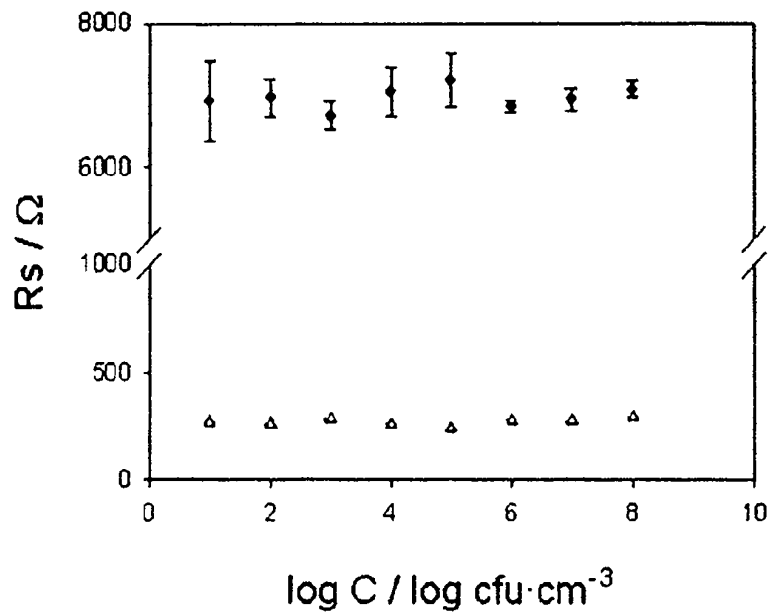
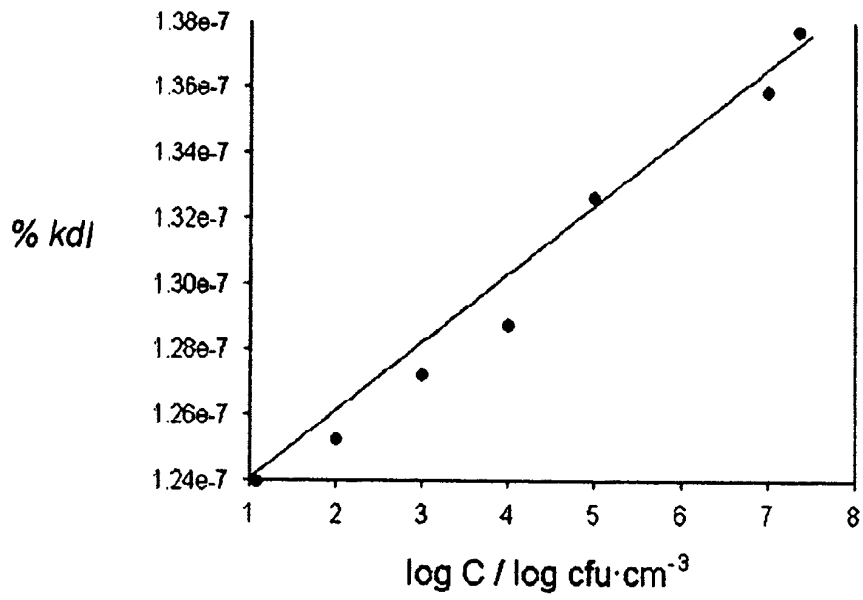


FIG.8





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 118

② Nº de solicitud: 200800109

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.01.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 0277789 B1 (KABUSHIKI KAISHA KOBE SEIKO SHO) 10.08.1988, página 3, línea 53 - página 4, línea 4; figuras 6,7; página 4, línea 48 - página 5, línea 3.	1-14
X	US 6496020 B1 (DAVEY et al.) 17.12.2002, columna 2, línea 53 - columna 3, línea 13; columna 4, línea 60 - columna 6, línea 16.	1-14
X	US 4810650 A1 (KELL et al.) 07.03.1989, resumen; columna 1, línea 51 - columna 2, línea 38; columna 5, línea 5 - columna 6, línea 47.	1-14
X	EP 1784480 A1 (NANOTEC SOLUTION) 16.05.2007, resumen.	1
A	EP 0689051 B1 (MATSUHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 27.12.1995, párrafo [0032].	2
A	ES 2143911 A1 (NTE, S.A.) 16.05.2000, columna 4, línea 9 - columna 6, línea 56.	1
A	ES 2183677 A1 (NTE, S.A.) 16.03.2003, columna 3, línea 8 - columna 4, línea 33.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.05.2010

Examinador

L. García Aparicio

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 27/02 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)