

Tesis doctoral

Departament de Genètica i de Microbiologia

Disseny, simulació i prototipatge
de dispositius per a la detecció
de matèria orgànica en mostres d'aigua

Albert Torrents Sallent

Jordi Mas Gordi

Tutor

Francisco Javier del Campo García

Francesc Xavier Muñoz Pascual

Directores

5. ESCALAT DEL SISTEMA (PROJECTE MEDRA)

5.1. INTRODUCCIÓ

Paral·lelament al treball realitzat en el disseny i fabricació del dispositiu miniaturitzat per la detecció ràpida de la DBO, es va donar la possibilitat de participar en el projecte MEDRA (de 21 d'octubre de 2011 a 31 de desembre de 2013 referència TSI-020100-2011-187), que proposa desenvolupar mesures contínues de la càrrega orgànica i respiromètries en estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR), per tal d'optimitzar la introducció d'oxigen als bioreactors, que és el principal consum energètic i econòmic de les EDAR.

Si bé en la preparació del projecte es preveia l'ús de microdispositius per fer les mesures, amb el desenvolupament del treball es va veure que per la naturalesa de l'element a monitorar (aigües residuals i fangs activats) seria més adequat dissenyar un sistema de major escala que facilités el manteniment i la durabilitat del sistema.

Tot amb tot, també es va valorar que l'enfocament seguit per al disseny del microrespiròmetre aportava un enfocament altament vàlid per als objectius continguts en el projecte MEDRA, fent que es veiés interessant estudiar la possibilitat d'adaptar el dispositiu al canvi d'escala.

Aquest canvi d'escala, que inclou tant l'escala de dimensions (de micromètrica a macromètrica) com la temporal (un dispositiu d'un sol ús a un sistema el més durable possible en el temps) implica una important adaptació conceptual en la idea inicial del microrespiròmetre.

Si bé la participació del doctorant en aquest projecte és limitada i centrada en el seu disseny conceptual, es considera prou rellevant com per incloure-la en la present tesi, bo i destacant els altres actors que han participat en la part de posada en pràctica i experimental, i que són:

- a) AEMA, empresa de gestió d'EDAR que ha aportat les dades inicials, les estacions on fer les proves i validacions i part del debat conceptual (<http://www.aemaservicios.com/>).
- b) INKOA, empresa d'enginyeria, gestió de projectes i especialitzada en tractament de senyals que ha estat la responsable de fer un sistema de control que integri els senyals dels sensors i els analitzi per treure'n els resultats i accionar els actuadors que controlen el sistema (<http://www.inkoa.com/>).
- c) CNM (BioMEMS), institut encarregat de dissenyar el sistema de mesura i anàlisi de la DBO en un format simplificat i executable via una document EXCEL.

A continuació es detallen les diferències principals respecte al sistema micromètric i l'enfocament adoptat per al disseny del sistema del projecte MEDRA.

5.1.1. DIFERÈNCIES CONCEPTUALS RELLEVANTS

MODIFICACIONS CAUSADES PER L'ESCALA

La naturalesa de l'aigua a analitzar té seriosos limitants, si no es vol alterar la mostra. Principalment, ens trobem amb aigua provinent de tancs de fangs activats, cosa que comporta 1) una alta presència de flòculs bacterians, 2) la presència de sòlids en suspensió en concentracions considerables i 3) la formació d'agregats orgànics de major mida quan ens trobem amb problemes habituals de les EDAR, com és el creixement exponencial de organismes com fongs filamentosos que incrementen la mida dels flòculs habituals (*bulking*), (Martins et al. n.d.; Jin et al. n.d.; Kotay et al. n.d.).

Per tant, per poder treballar amb dispositius microfluídics s'hauria d'evitar que aquests elements entressin al sistema de mesura, cosa que comporta, d'altra banda, que hi ha una alteració significativa entre les condicions en el dispositiu i les condicions en l'element a monitorar, és a dir, el tanc de fangs actius o, alternativament, a l'arqueta d'homogeneïtzació o a altres elements de l'EDAR.

Atès que ens interessa en la mesura del possible que les condicions al dispositiu i al tanc de fangs actius siguin el més similars possibles, es va optar per un sistema macroscòpic on els flocs i sòlids habituals poden circular lliurement.

DURADA TEMPORAL

L'altra gran modificació conceptual que ens trobem és referida a la durabilitat temporal de l'experiment. Així, mentre que el dispositiu microfluídic cerca mecanismes per accelerar l'obtenció d'una mesura equivalent a la DBO i, per tant, està previst per funcionar un petit nombre d'hores, el sistema contemplat per al projecte MEDRA ha de poder funcionar el major nombre d'hores o dies possibles, amb un mínim manteniment.

Utilitzar sensors comercials de gran mida i poder tenir sistemes de neteja contundents i ràpids per dur a terme el manteniment seran, per tant, elements claus del disseny que trebalem a continuació.

Podem destacar que els condicionants de mida i durada temporal que es proposen convergeixen en aquest sentit, ja que tenim macroelèctrodes que ofereixen una bona durabilitat i requereixen sistemes macrofluídics, fet que al seu torn facilita mètodes contundents de manteniment i permet el pas de flocs i sòlids de certa mida pel circuit fluídic.

5.2. DISSENY DEL DISPOSITIU

5.2.1. CONDICIONS INICIALS

El dispositiu es dissenya per assolir dos tipus de mesures: una de **respiromètrica**, en què volem conèixer la velocitat de respiració (consum d'oxigen) en un moment determinat en el reactor, i una d'**estimació de la DBO**, en què el que se cerca és que no hi hagi limitació en la disponibilitat d'oxigen i el que volem veure és la dinàmica durant un període de temps per tal de poder fer una estimació de la quantitat de matèria orgànica present en el sistema a fi d'adaptar les condicions de depuració a les característiques de l'aigua residual a tractar.

LA MOSTRA JA CONTÉ UN CERT OXIGEN, PERÒ EL DESCONEIXEM

La manera de resoldre-ho és comparar C_0 i C_{final} al tub en el cas de fer proves respiromètriques, en què la dada rellevant és el consum d'oxigen en un període de temps i per un volum predeterminat.

Pel que fa a les proves de DBO o de requeriment total d'oxigen ens interessarà assegurar la saturació a l'inici del sistema, per tal de poder determinar la dinàmica de consum durant un període determinat de temps per avaluar la facilitat de degradació de la matèria orgànica present i idealment arribar a estimar la càrrega orgànica total o DBO de l'aigua en tractament.

CAL EVITAR MICROAEROBIOSI

Tant en el cas de les proves respiromètriques com en les d'estimació de la càrrega orgànica, és necessari que al final de l'experiment (concentració al final del tub que actua de cambra de reacció) hi hagi oxigen per poder assegurar que la mostra no s'ha trobat en condicions d'anaerobiosi durant l'experiment. Així mateix, caldrà que l'oxigen romanent estigui per sobre d'un llindar que no impliqui restriccions en el normal metabolisme aeròbic de la biomassa present. (Vegeu el punt 3.7.2 i 3.7.3 de la DBO.)

Via increment de la velocitat de circulació al circuit: en tots els casos serà necessari i suficient predeterminar un nivell mínim d'oxigen al final del tub de reacció (C_{final}) que determini el ritme mínim de bombeig d'aigua al sistema. Així, si la concentració final del circuit és inferior al límit preestablert, el sistema de control haurà d'incrementar el bombeig com a mínim fins a assolir la concentració final per sobre de la concentració limitant.

Actuar d'aquesta manera permet que el sistema s'adapti amb un automatisme a la concentració de matèria orgànica present i al ritme de consum d'oxigen, segons sigui el cas, via incrementar o reduir el temps de retenció total en el sistema.

Via increment d'oxigen a l'entrada: a part del que s'ha comentat en el paràgraf anterior, i només per al cas de les proves d'estimació de la DBO, es preveu tenir un sistema que permeti començar els experiments en condicions de saturació d'oxigen per tal que hi hagi el màxim oxigen disponible per fer les proves. La concentració de saturació es podrà determinar per dues vies, empíricament, en funció de la temperatura de l'aigua present al sistema, i experimentalment, mitjançant la mesura de la concentració inicial al tub de reacció que ens donarà el sensor d'oxigen (C_0).

En el cas de les proves respiromètriques, no ens interessarà alterar la concentració d'oxigen present en el tanc de fangs activats o element equivalent que vulguem monitorar, ja que la finalitat és alterar el mínim les condicions per avaluar com respon el reactor a les condicions d'oxigen i estimar si convé incrementar o disminuir l'aportació d'oxigen al reactor principal per treballar amb la màxima eficiència.

NO CONEIXEM LA BIOMASSA PRESENT AL SISTEMA

Un dels elements importants és que desconeixem la biomassa present al sistema i, per tant, tampoc no coneixem la biomassa present al tub reactor. Aquesta informació és rellevant, ja que el consum d'oxigen està directament relacionat amb la quantitat de microorganismes que el poden utilitzar per descompondre aeròbicament la matèria orgànica present. Ens cal, per tant, conèixer si un determinat consum d'oxigen es deu a un alt consum d'una població microbiana reduïda o a un consum limitat d'una gran població microbiana, la qual cosa ens podria indicar, per exemple, la presència de substàncies tòxiques o inhibidores en l'aigua residual.

Alguns estudis, (Process 2011) troben correlacions significatives entre la biomassa activa present en sistemes de fangs activats i la terbolesa de l'aigua, ja que bona part d'aquesta terbolesa en elements secundaris i terciaris de depuració d'aigua es deu als flòculs bacterians que es formen i que estan compostos per microorganismes. En principi es preveu incloure sensors de terbolesa al sistema per tenir una aproximació a la biomassa present que ens permeti estimar el consum per cèl·lula i per unitat de temps.

Caldrà així mateix fer proves inicials que ens correlacionin la presència de microorganismes actius en una mostra d'aigua amb la lectura del sensor per tal de establir la forma de relacionar ambdues dades.

FLUX: ASCENDENT O DESCENDENT?

Un element rellevant que s'haurà de comprovar en la fase experimental és com mantenim la concentració de la biomassa bacteriana al reactor equivalent a la que es troba present al tanc de fangs activats o altre element a monitorar.

En un sistema de fangs activats, la biomassa es manté en flotació, com a cèl·lules independents o en forma de flòculs bacterians, mitjançant els mecanismes d'aeració o d'agitació (Process 2011). Sense presència d'aquests mecanismes, la biomassa tendirà a sedimentar a una baixa velocitat.

A priori, sembla que un disseny amb un flux ascendent dins del tub de reacció ha de donar unes condicions més similars a les que trobem en un sistema de fangs activats, però pot donar lloc a acumulacions més grans de biomassa, sobretot en velocitats lentes de flux.

Alternativament es pot treballar amb un flux descendent, per evitar l'efecte d'acumulació, bo i assumint que podem treballar amb concentracions menors de biomassa que les de l'element a monitorar. Això es pot donar, sobretot, en condicions de cabals elevats i serà necessari testar ambdues opcions experimentalment per avaluar la millor. En qualsevol cas modificar el sentit del flux és fàcilment assolible amb el disseny proposat.

Un altre aspecte rellevant serà evitar zones de sedimentació o acumulació de biomassa a l'interior del tub reactor, per la qual cosa s'haurà de determinar el rang vàlid de cabals, dissenyar un bon protocol de neteja del sistema i optimitzar els canvis de secció del tub reactor, com per exemple en els punts de connexió dels sensors a utilitzar. (Vegeu l'apartat 5.2.4.)

5.2.2. EVOLUCIÓ DELS DISSENYS PROPOSATS

El disseny del respiròmetre ha anat evolucionant al llarg del projecte, amb les constriccions de durabilitat i facilitat de manteniment comentades al punt 5.2. Així, partint d'un model inicial molt similar conceptualment al proposat per a la mesura ràpida de la DBO, s'ha anat modificant i adaptant als nous requeriments. A la figura 5.1 es presenten els principals dissenys considerats durant el procés.

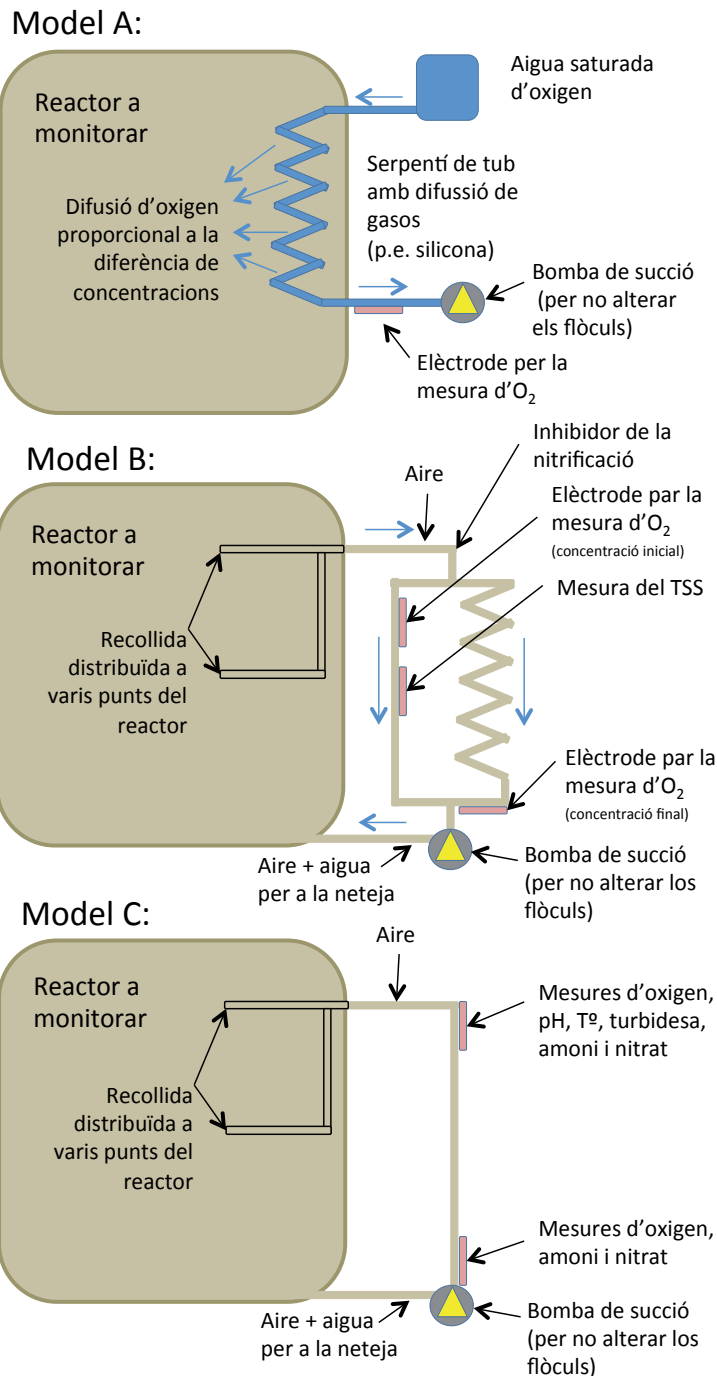


Figura 5.1. Esquema dels principals models dissenyats i les seves característiques.

El primer disseny, model A, és el més similar conceptualment al dispositiu miniaturitzat per la detecció ràpida de la DBO. Com en el cas del sensor de la DBO, s'opta per treballar amb la permeabilitat a l'oxigen de les parets d'un tub submergit al reactor de fangs activats. Així, la mesura seria la caiguda d'oxigen entre la concentració inicial (saturació) i la concentració observada al final del circuit.

Com diu la teoria dels reactors de fangs activats (Process 2011), aquest ha d'estar sempre pròxim a la saturació per una òptima activitat del reactor. Si la lectura final és pròxima o igual a saturació, podem sobreoxidar el tanc (i, per tant, malbarata energia en el procés) i es pot reduir

la introducció d'oxigen. Per contra, si al final del circuit hi ha una clara disminució de la concentració d'oxigen, significarà que s'està limitant la degradació de la matèria orgànica i que és convenient incrementar l'aportació d'oxigen al reactor.

Amb aquest esquema molt simplificat, s'obté un controlador simple de l'activitat del reactor, que de forma equivalent al dispositiu de Watt d'autoregulació de la pressió en una caldera, permet que el sistema s'adapti al requeriment d'oxigen a diferents condicions.

Un aspecte interessant és que la mostra és en si el total del reactor i no una part, i atès que hi ha una alta agitació, idealment la concentració del reactor serà homogènia, tot i fer una mesura en un espai limitat. Tot i això aquesta és una situació ideal que no sempre es pot assegurar que s'acompleixi. Igualment, aquest és un concepte molt simple en si mateix i fàcil de monitorar.

Els principals inconvenients que presenta aquest disseny són, d'una banda, la dificultat del manteniment de les condicions de permeabilitat a l'aire del tub en un entorn com aquest, on hi haurà una provable proliferació de biofilms i altres elements que la poden comprometre, juntament amb la dificultat d'un manteniment adequat. Per altra banda, un model tan simplificat no permet obtenir cap altra informació rellevant per a l'EDAR, com l'estimació de la càrrega orgànica o possibles inhibicions en el procés.

A partir d'aquí el disseny evolucionarà cap a un model més complex que ens permeti millorar el control i la informació obtinguda del sistema, o el model B. En aquest model, la mostra es treu per succió del reactor a monitorar per tal de no alterar els flòculs presents, i es fa passar per un circuit paral·lel. Aquest circuit té un volum conegut, que combinat amb el cabal bombejat ens dóna una idea precisa del temps de retenció en el tub.

En aquest disseny, es preveuen dos tubs paral·lels, un destinat a funcionar com a reactor, per a la mesura del consum de l'oxigen, i l'altre per a mesures complementàries com la mesura de la concentració inicial d'oxigen o els sòlids en suspensió (que ens donaran una aproximació de la biomassa present, i permetran corregir el consum d'oxigen observat per la biomassa present).

També s'hi inclou un mecanisme opcional d'introducció d'oxigen. Sense introduir oxigen al circuit, tenim una mesura de l'activitat respiradora en el reactor de fangs activats o respirometria (Process 2011), que podem complementar aportant una concentració de saturació a l'inici del sistema que, combinat amb el temps de reacció, ens pot donar informació amb la qual podem estimar la càrrega orgànica o DBO present en el reactor i la seva velocitat de degradació.

En estar separat del reactor principal, facilita les feines de manteniment i permet fer contrarentats amb aigua barrejada amb aire per tornar a les condicions inicials, alhora que s'eviten elements delicats com els tubs porosos o membranes.

Un dels elements que és rellevant incloure és un sistema de mesura del consum d'oxigen que es dóna en el sistema i que no és conseqüència de la degradació orgànica de la matèria orgànica present. Per magnitud, el procés més rellevant és el de la nitrificació ($\text{NH}_4^- \rightarrow \text{NO}_3$). Hi ha diferents maneres d'abordar aquest consum (Process 2011), que són:

- a) Considerar la concentració de compostos nitrogenats poc o molt estable i introduir-ho com una constant al càlcul.
- b) Introduir al sistema substàncies que inhibeixin la nitrificació, que és el recurs utilitzat en molts protocols de DBO (Anon 2002; Wang et al. n.d.) i és la solució que es proposa en aquest model, però que, si bé és vàlid per a l'estimació de la DBO, ens distorsiona les mesures respiromètriques, ja que elimina un consum que es donarà al reactor.

- c) Mesurar les concentracions inicials i finals dels principals compostos rellevants de nitrogen. En aquest sentit, el nitrogen orgànic total és el més difícil d'obtenir de manera ràpida, però ens podem centrar en les altres espècies. Per la seva concentració inferior (entre 1 i diversos ordres de magnitud) i pel fet de ser molt làbil entre les formes més reduïdes i oxidades, es pot considerar innecessari analitzar el contingut en nitrats, de manera que fent un seguiment analític de l'amoni i els nitrats presents en el medi, podem tenir una bona aproximació (**Caldria alguna bona referència**).

Aquest darrer enfocament és el que s'adopta al model C, que permet refinar les dades obtingudes del sistema descomptant l'oxigen consumit en l'oxidació de l'amoni en les valoracions de la DBO, mentre que no altera el consum d'oxigen total, que ens interessa per a mesures respiromètriques.

Així, el model C és una simplificació del model B, però inclou una bateria de sensors que ens permet refinar els resultats. Així s'hi inclou, a més a més de les mesures inicials i finals de concentració d'oxigen, amoni i nitrat, la mesura de la temperatura i el pH, que aportarà informació de les condicions de l'experiment i de la mesura de terbolesa o TSS, que ens ha de permetre estimar la biomassa present en el sistema.

Un dels aspectes a tenir en compte és que els sensors comercials d'aquests diferents paràmetres tenen unes dimensions grans per al sistema i s'ha d'idear un sistema de connexions que permeti introduir-los al circuit sense alterar-lo i evitar zones d'acumulació de sòlids o estrangular el pas d'aigua.

5.2.3. DIFERÈNCIES RELLEVANTS RESPECTE AL DISPOSITIU DE MESURA RÀPIDA DE LA DBO

MANTENIM L'ESQUEMA D'UN CANAL

Es manté l'esquema de fer la prova en un conducte en el qual podem modificar la velocitat de flux per tal d'adaptar-nos a les condicions de la mostra, modificant el temps de retenció en el reactor.

NO ENS CAL MEMBRANA DE SEPARACIÓ

El fet d'utilitzar sensors industrials per realitzar les mesures d'oxigen fa que aquests ja duguin internament membranes per protegir l'elèctrode de la passivació. Per tant, en aquest dispositiu podem unificar la cambra de reacció i el canal de l'electròlit en un sol conducte, estalviant-nos els problemes d'enginyeria de la membrana selectiva al pas d'oxigen esmentats en el cas del sensor de DBO.

5.2.4. CONNEXIÓ DELS SENSORS AL CIRCUIT

Com s'ha comentat, els sensors industrials d'oxigen tenen unes dimensions considerables i se solen instal·lar en unes condicions menys exigents que les requerides per al dispositiu proposat, o bé directament submergits en el tanc de fangs activats o similar, a un punt d'entrada o sortida de l'element a monitorar (vegeu la figura 5.2), o bé en una conducció mitjançant una T.

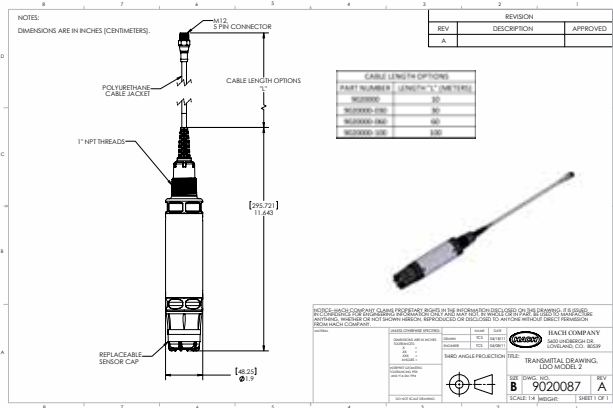


Figura 5.2. a) Esquema d'un sensor electroquímic d'oxigen estàndard per operar en una estació depuradora. b) Instal·lació habitual del sensor d'oxigen a la sortida d'un tanc de fangs activats.

Aquest darrer sistema és el més similar a les condicions amb què preveiem instal·lar-los, però en la seva instal·lació estàndard presenta dos inconvenients rellevants per al bon funcionament del sistema:

- a) El sensor instal·lat queda dins del tub de monitoratge, de manera que en redueix la secció i pot provocar turbulències locals.
- b) L'espai circumdant entre el sensor i la T pot afavorir la fixació de biofilms i l'acumulació de biomassa bacteriana, alhora afavorit per les turbulències esmentades en el punt anterior i deixa zones de difícil accés per a la neteja i manteniment.

Per tal de minimitzar aquests dos factors, s'han dissenyat sistemes de connexió del sensor al tub de reacció de forma que no escanyin la secció del tub i evitin les zones d'acumulació de biomassa mitjançant l'ús de formes arrodonides de millor hidrodinàmica i limitant els espais buits.

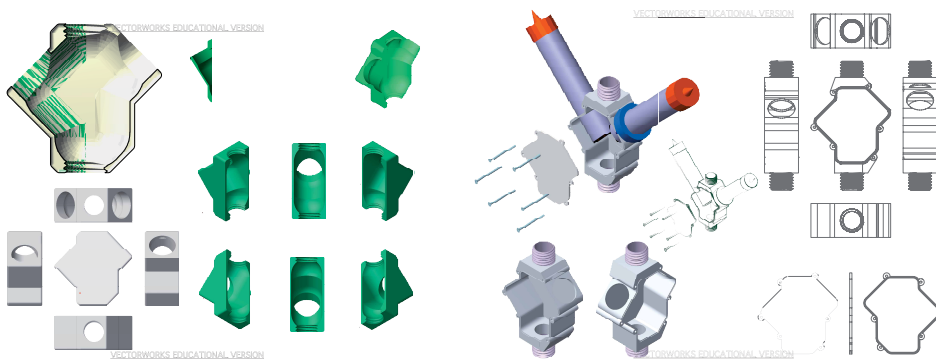


Figura 5.4. a) Diferents talls i perspectives per fabricar amb formiga (similar a una impressora 3D) un adaptador del sensor estàndard electroquímic de mesura de l'oxigen dissolt per adaptar-lo al sistema. b) El mateix adaptador per ser fabricat amb una fresadora. La forma se simplifica per tal de poder-hi accedir amb les freses.

A la figura 5.4 es presenten dos dissenys equivalents per connectar els sensors al sistema, que essencialment només divergeixen lleugerament segons el procés de fabricació. Així, el primer disseny (a) és per ser fabricat amb tècniques d'impressió làser 3D, el qual es basa en una fabricació per sobreposició de capes de material polimeritzable i, per tant, no té limitacions a l'accés d'eines al seu interior. Com que aquesta tècnica encara té uns costos considerables,

s'ha dissenyat una peça equivalent però realitzable mitjançant tècniques de micromecanitzat com les utilitzades en la fabricació de la carcassa del dispositiu de la DBO, que es presenta a la part (b).

5.2.5. DISSENY DEFINITIU PROPOSAT

El disseny finalment proposat per a la realització de les proves experimentals del projecte MEDRA és el que es presenta a la figura 5.6.

1. T de connexió del sensor d'oxigen que dona la mesura de concentració inicial (C_0) al tub reactor.
2. T de connexió del sensor d'oxigen que dona la mesura de concentració final (C_f) al tub reactor.
3. Filtre de grollers que permeti el pas de floculs bacterians.
4. Dipòsit d'aeració de la mescla per proves de DBO.
5. Tub flexible de mitja polzada.
6. T de connexió: diàmetre d'una polzada, sortida vertical de mitja polzada.
7. Connector de tub rígid-flexible de mitja polzada.
8. Purgador de gasos per extreure l'excés d'aire i possibles gasos resultants de la descomposició.
9. Ràcord de connexió.
10. Adaptador de roscat del sensor d'oxigen dissolt.
11. Sensor d'oxigen dissolt.
12. Connector de tub rígid-flexible d'una polzada.
13. Tub d'una polzada de diàmetre interior, de material transparent, que actua de tub de reacció.
14. Clau de pas.
15. Reducció d'una polzada a mitja polzada.
16. Connector a tub flexible per a bomba peristàltica.
17. Bomba peristàltica.
18. Tub peristàltic.
19. Entrada d'aigua neta a pressió per a contrarentat i neteja del sistema.
20. Clau de pas.
21. Sortida de l'aigua i l'aire utilitzat per a la neteja del dispositiu.
22. Entrada d'aire per millorar la neteja del dispositiu mitjançant bombolleig.
23. Retorn a l'element a monitorar.

Tant per dinàmiques del projecte, que va limitar el temps destinat a mesures experimental, com perquè les que s'han obtingut corresponen a un projecte industrial amb la propietat industrial que pertany a les empreses participants, així com a la limitada intervenció pròpia en la fase experimental, en aquest moments no disposem d'uns resultats publicables .

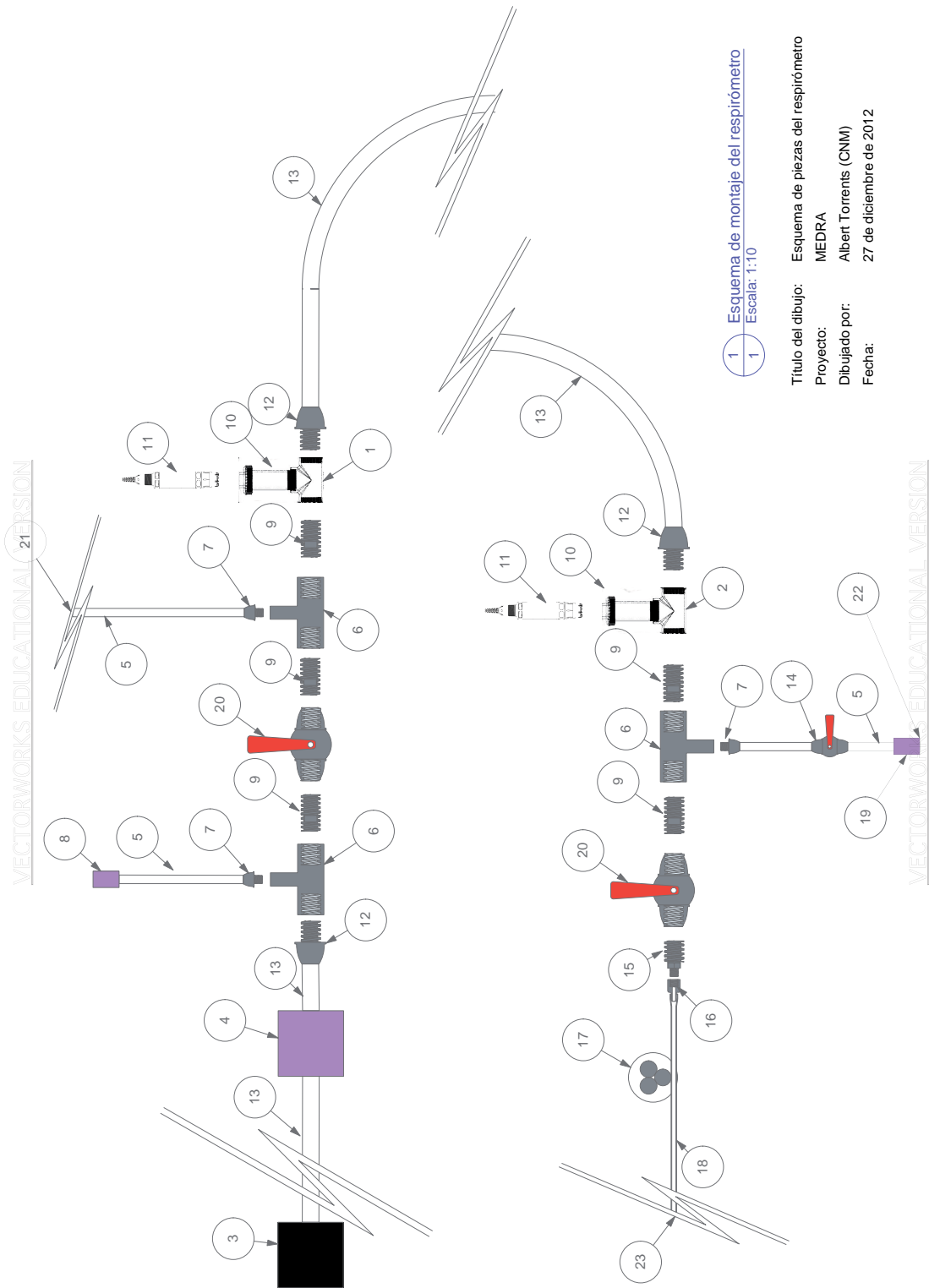


Figura 5.6. Detall del sistema definitiu proposat i de les peces que el componen.

5.3. CONCLUSIONS

- i. És possible adaptar l'enfocament utilitzat per al sensor ràpid de la DBO a sistemes de caracterització i control del funcionament d'EDAR.
- ii. El disseny permet refinar les mesures de respirometria que s'utilitzen habitualment, així com aproximar la càrrega orgànica present al sistema.
- iii. Cal adaptar el disseny al canvi d'escala i objectius, i seran determinants aspectes com:
 - a. No alterar la mostra, permetent que flòculs i biomassa circulin lliurement pel sistema.
 - b. Considerar dissenys que incrementin la durabilitat, com és l'ús de macrosensors comercials i conduccions macrofluídiques.
 - c. Considerar dissenys que incrementin l'estabilitat, com és la simplificació dels elements i facilitar i automatitzar els processos de neteja i manteniment.
- iv. Es presenten tres models bàsics que varien tant en la complexitat dels elements que integren com en la qualitat de la informació que en podem obtenir.
- v. D'aquests tres models inicials s'escull el model C com a millor candidat a assolir les constriccions més rellevants.
- vi. El sistema permet fer mesures de respirometria mitjançant la concentració inicial i el seguiment de la seva dinàmica. Alterar les condicions de la concentració inicial d'oxigen permet conèixer millor els límits del tractament.
- vii. El sistema permet fer estimacions de la matèria orgànica. La comparació de la concentració inicial i final d'oxigen, així com el temps de residència al sistema seran els elements claus.
- viii. El sistema és fàcilment adaptable a diferents concentracions de matèria orgànica o a experiments, mitjançant la modificació del cabal que afectarà directament el temps de residència.
- ix. Introduir oxigen al sistema és necessari per a les estimacions de DBO i permet incrementar les possibilitats d'utilitzar-lo com a element experimental.
- x. Les proves experimentals que permet aquest disseny sobrepassen les possibilitats de la respirometria habitualment emprada com a sistema de control d'EDAR.
- xi. Cal realitzar un treball experimental del sistema per adaptar-lo a diferents aspectes, per tal que sigui plenament funcional:
 - a. Millores per adaptar la connexió dels sensors al sistema, sense interferir en la hidrodinàmica.
 - b. Avaluació i millora dels mecanismes que evitin acumulacions de massa i zones de sedimentació.
 - c. Caracteritzar i correlacionar les mesures del sistema amb aspectes com l'estimació de biomassa i la mesura estimada de la DBO amb mètodes estàndards com la DBO₅, la DQO i el COT.

5.4. BIBLIOGRAFIA

- Anon, 2002. Microbial BOD sensors for wastewater analysis., 36(15), pp.3786–3802.
- Jin, D. et al., Analysis of bacterial community in bulking sludge using culture-dependent and -independent approaches. *Journal of Environmental Sciences*, 23(11), pp.1880–1887.
- Kotay, S.M. et al., Biocontrol of biomass bulking caused by *Haliscomenobacter hydrossis* using a newly isolated lytic bacteriophage. *Water research*, 45(2), pp.694–704.
- Martins, A.M.P. et al., Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water research*, 38(4), pp.793–817.
- Process, I.T.G.O.R.I.C.O.T.A.S., 2011. *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process: Benchmarking Control Strategies* 2002nd ed. J. B. C. H. S. P. A. Vanrolleghem, ed., IWA Publishing.
- Wang, J. et al., An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement. *Biosensors & bioelectronics*, 25(7), pp.1705–1709.

6. FUTURS DESENVOLUPAMENTS

Degut a diferents motius, el més significatiu els resultats obtinguts amb les membranes, hi ha diferents aspectes que caldrà seguir treballant per tal de arribar a un dispositiu funcional de mesura ràpida de la DBO.

Així mateix, no disposar d'unes membranes que donessin prou garantia ha impedit progressar en altres aspectes que es tenien planificats de cara a validar el dispositiu.

A continuació es defineixen els apartats que poden ser més importants de cara a assolir aquest objectiu:

- i. Fabricació
 - a. Substituir les membranes de silicona de 130 micres per altres que permetin un major transport selectiu de l'oxigen. En aquest sentit les darreres membranes provades semblen aptes per aquest fi, si més no en els anàlisis preliminars. S'han plantejat altres enfocats que poden donar bon resultat com la fabricació de membranes compostes, per exemple membranes amb bona resistència estructural combinades amb membranes de silicona de 25 micres, que tenen un bon nivell de difusió de l'oxigen.
 - b. Aquest canvi de membranes pot fer recomanable estudiar la readaptació del dispositiu, per exemple per adaptar-lo a un major gruix del conjunt canals, membrana i elèctrodes.
- ii. Validació de la mesura
 - a. Caldrà definir un protocol de mesura que tingui en compte aspectes com:
 - i. Tractament previ a la mostra analitzar, com serà el filtrat per evitar l'entrada al sistema microfluídic de sòlids de certa mida, confirmar si cal aplicar altres tècniques habituals en mètodes de mesura de la DBO, com la compensació del balanç carboni nitrogen o l'adició d'oligoelements.
 - ii. Avaluar la possibilitat de desenvolupar un dispositiu multicanal que pugui treballar en paral·lel, com s'apunta a la patent, per poder fer a la vegada i amb iguals condicions (a) una prova blanc, per comprovar la mesura electroquímica, (b) una prova blanc amb una concentració coneguda d'una font de carboni i una població microbiana conegudes, per comprovar el valor de la senyal obtinguda, (c) Canals que permetin repeticions de la mesura, per obtenir amb un sol anàlisis, valors amb variància que facilitin el tractament estadístic dels resultats, a banda de ser un contrast del bon funcionament microfluídic i electroquímico.
 - iii. Establir un programa d'anàlisis de les mateixes mostres amb el dispositiu i mètodes analítics estàndards, principalment la DBO₅, la DQO i el COT. Això ha de permetre (a) correlacionar els valors obtinguts amb el dispositiu als dels diferents mètodes experimentals vigents, (b) fer aquest anàlisis per a diferents tipus de matèria orgànica amb ritmes diversos de degradació per definir els tipus de mostres més o menys adequades a mesurar amb el dispositiu.
- iii. Treball microbiològic
 - a. Contrastar els resultats obtinguts amb diferents poblacions microbianes, que a priori poden ser:
 - i. Cultius enriquits obtinguts de la pròpia mostra d'aigua.
 - ii. Cultius monoespecífics obtinguts en laboratori.

- iii. Consorcis o combinacions microbianes multiespecífiques.
 - b. Contrastar la viabilitat de treballar amb diferents concentracions microbianes, com són:
 - i. Cultius rics obtinguts bé en laboratori, bé per enriquiment de les poblacions endògenes de la mostra.
 - ii. Cultius concentrats per centrifugació, però que ja estan actius, tot i que aquests aspectes dificulten el treball in situ.
 - iii. Cultius liofilitzats o conservats amb tècniques similars, que poden ser molt homogènis i fàcilment transportables i conservables, però pels quals s'ha de definir un protocol clar d'activació previ a la mescla amb la mostra.
- iv. Desenvolupar l'assaig in situ, el qual, a part dels aspectes microbians descrits en el punt anterior, també comportarà:
 - a. Adaptar sistemes de mesura electroquímica que es puguin fer el lloc de mostreig, sense disposar d'un potenciostat estàndard.
 - b. Adaptar sistemes de bombament d'aigua prou exactes que puguin treballar a camp.
 - c. Estudiar la adaptació automàtica del dispositiu a diferents condicions de variables com la temperatura i el pH. Ambdós condicionen el model i la mesura, alhora que es poden mesurar electroquímicament, i poden ser per tant mesurats al propi dispositiu o una adaptació del mateix.
 - d. Integrar aquests aspectes i altres que sorgeixin en un sol dispositiu, no és res més en el fons que adaptar el sistema a un esquema de lab-on-a-chip, que idealment hauria de permetre fer la mesura in situ i estalviar el transport i les alteracions de la mostra entre la recollida i la mesura.
- v. Model matemàtic i simulació: Un cop disposem del model basal que hem analitzat, aquest és fàcilment adaptable a les noves condicions que determinin les noves membranes, geometria, etc. En aquest sentit es veu interessant treballar en:
 - a. Adaptar i refinar el model a les noves característiques per tal de poder contrastar els resultats obtinguts experimentalment amb el resultat de les simulacions.
 - b. Si aquest model respon bé a les proves experimentals, hauria de ser la base per desenvolupar un model simplificat que relacioni el senyal obtingut amb les mesures estàndards.
 - c. Refinar el model en aquells aspectes que han estat més simplificat, especialment la reacció de degradació biològica o la complexitat de les fonts de carboni, per obtenir uns millors resultats.

7. ANNEXOS

ANNEX 1: SENSOR DE LA DBO EN CURT TEMPS

En aquest annex es presenten diferents documents publicats sobre el sistema de detecció ràpida de la DBO. El principal document és l'article publicat sobre el disseny les simulacions dutes a terme per a la proposta del sensor.

També es presenta un article publicat en una conferència internacional de COMSOL MultiPhysics, que descriu el mateix element, fent més incidència en els aspectes de l'organització del model i de les tècniques emprades per tal d'assolir la seva estabilitat de manera que permetés realitzar les simulacions.

Finalment s'adjunta un document presentat en forma de pòster al congrés d'ANQUE de Sevilla del 2012, que és un resum del treball dut a terme.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej

Design of a microfluidic respirometer for semi-continuous amperometric short time biochemical oxygen demand (BOD_{st}) analysis

Albert Torrents^a, Jordi Mas^b, Francesc Xavier Muñoz^a, Francisco Javier del Campo^{a,*}

^a Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Esfera UAB, Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i Microbiologia, Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2012

Accepted 27 April 2012

Available online xxx

Keywords:

Modeling
BOD biosensor
Respirometry
Electrochemistry
Microfluidics
Finite element method

ABSTRACT

This paper presents the design of a miniaturized electrochemical respirometer to monitor organic content in water samples semi-continuously, in contrast to current biochemical oxygen demand, BOD, methods. We demonstrate the use of finite element method simulations as design tool for a novel concept microfluidic respirometer. The device is based on a flow cell separated by a thin membrane from a bioreactor. Simulations show that once membrane material and thickness are chosen, oxygen supply rate still provides sufficient flexibility to allow the measurement of samples spanning a very wide range of organic matter concentrations. The design presented here uses an electrochemical oxygen sensor, and the whole system is amenable to fabrication using standard microfabrication and rapid prototyping techniques.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

This work focuses on the design of a novel miniaturized system for the continuous determination of BOD_{st} (short-time biochemical oxygen demand) in aqueous samples. The determination of BOD consists on the oxidation of organic matter by living organisms (i.e., bacteria, yeast, and fungus present in water) under well-defined conditions and time [1]. In the typical BOD procedure a sample is placed in the dark and in a tight-sealed biological reactor, and inoculated with a microbial population, nutrients and excess oxygen [2]. After an adaptation time the amount of oxygen consumed over a typical period of 5 days is determined. This long analysis time makes BOD₅ expensive and unsuitable for process control, and opens a window of opportunity to rapid methods. Perhaps the first example of a rapid BOD sensor was presented in 1977 [3]. Karube et al. immobilized a microbial population within a collagen membrane in contact with an oxygen electrode. Karube's method was reportedly able to provide close BOD estimates within 1 h. Since then, different approaches have been taken in an attempt to reduce both the analysis time of BOD methods and the physical size of the corresponding instrumentation [3,4]. The evolution of so-called rapid BOD methods has been recently reviewed by Ponomareva et al. [5]. BOD methods can be classified according to the relation between the microbial population and the sample, and according to

whether the microbial population comprises a single organism or a mixture of different strains. Regarding the first criterion, with few exceptions, most of these systems are closely related to biosensors and rely on the immobilization of a bacterial population in the vicinity of an oxygen sensor that can be either electrochemical [6–8] or, more recently, optical [9]. Other systems rely on the use of bioreactors where the sample to be analyzed and the biomass are mixed together, and an oxygen sensor is introduced to monitor the transient evolution of oxygen concentration [10]. In both cases, there is a sufficient supply of oxygen to the sample so that the sensors can measure a maximum signal in the absence of respiration. Systems of the first kind allow a faster measurement because the membrane contains higher bacterial concentrations than the bioreactor/chemostat type, but they are less reproducible and each membrane or constructed biofilm needs to be calibrated individually. On the other hand, BOD systems operating in a bioreactor are more stable and reliable as the sensors can be replaced without affecting the activity of the biomass, but they are bulkier than the biosensor type, and less suitable for field work.

A recent approach introduced in bioreactor/chemostat systems consists in the use of redox mediators, which overcomes the rate limitations imposed by the relatively low oxygen saturation concentration in water, and is thought to extend the linear range of current BOD biosensors [11,12]. This work describes the design of a miniaturized respirometer that combines some of the advantages of biofilm biosensors and bioreactor BOD sensors, aiming to provide BOD information within a few hours. This is possible thanks to miniaturization and microfluidics. Miniaturization by itself does

* Corresponding author. Tel.: +34 93 594 77 00x2406; fax: +34 93 580 14 96.
E-mail address: javier.delcampo@csic.es (F.J. del Campo).

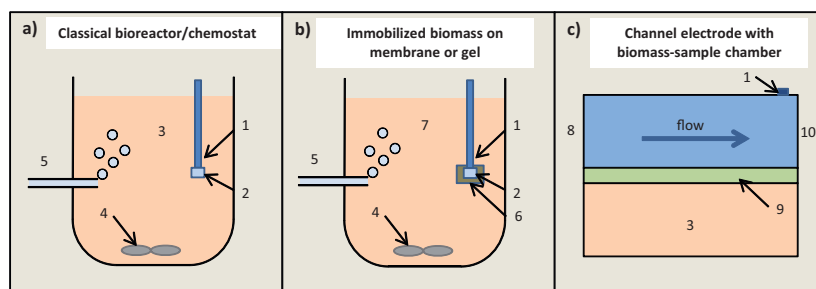


Fig. 1. Classical BOD respirometric systems configurations. Schematic of classical BOD sensors and our proposed scheme; (a) a classical Clark-type electrode placed inside a bioreactor; (b) modified Clark-type electrode with concentrated biomass around the electrode; (c) electrolyte channel and bioreactor chamber separated by an oxygen permeable membrane. Notes: 1 – oxygen sensor; 2 – Teflon-type protection against electrode passivation; 3 – sample plus bacterial biomass; 4 – stirring; 5 – oxygen supply; 6 – membrane sandwich or gel immobilized bacterial biomass; 7 – sample without bacterial biomass; 8 – inflow of oxygen saturated electrolyte; 9 – oxygen permeable membrane; 10 – outlet.

not necessarily imply faster reaction rates, but it allows the concentration of biomass to be increased; i.e., bacteria may be collected from a culture and re-suspended in a smaller volume. Also, miniaturization facilitates the control on parameters such as temperature and mass transport through microfluidics, and makes the transport of dissolved reagents more efficient. The goal of this system is to report short-time BOD, BOD_{st} which, despite not exactly matching a BOD₅ reading [1], it usually correlates heavily with it.

The miniaturization of electrochemical systems is a very active field of research [13–15] spanning from single microelectrodes and microelectrode arrays [16], to lab-on-a-chip devices [17,18], including fuel cells [19]. To the best of our knowledge, very few works so far have addressed the fabrication of microfluidics-based BOD sensors [20–22]. The novelty of Cho's work was both in the polymeric material used to fabricate the device, and in its disposable character. That microsystem comprised two twin electrochemical oxygen sensors located in parallel chambers. The electrodes were protected by a silicone membrane, and one of them was subsequently modified by a thin agarose layer containing *Trichosporon cutaneum*, a yeast.

The concept presented here differs from that of Cho et al. in that it is a microfluidic version of the bioreactor and not strictly a biosensor.

We began by optimizing the system geometry and membrane to maximize oxygen transport to the biomass/sample chamber, so that diffusion across the membrane did not become a limiting factor. We then studied the effect of reaction kinetics on the oxygen concentration in the electrolyte channel and how flow rate is a key variable that could be controlled to measure BOD_{st} under a wide concentration range of organics.

2. Model and simulation procedure

Fig. 1 depicts the two main types of BOD sensors and the respirometric device presented in this paper. Our design consists of a double flow cell in which two microchannels are separated by an oxygen permeable membrane. One of the channels, the so-called reaction chamber, holds the sample and microbial mixture and has no flow during the experiment. The other channel, the electrolyte channel, has a constant flow of electrolyte saturated with oxygen. These two channels are separated by a thin oxygen-permeable membrane. Oxygen diffuses from the electrolyte channel to the reaction chamber, where it is consumed by the microbial aerobic decomposition of the sample. Additionally, the membrane prevents biological cells and other organics which might arrive to the

electrolyte channel and eventually passivate the electrodes in a real system. This oxygen consumption establishes a concentration gradient between both chambers that causes oxygen to permeate from the electrolyte channel to the biomass chamber. The remaining oxygen content is measured at the end of the electrolyte channel and provides information on the overall respiration rate. The electrolyte flow rate can be adjusted so that the oxygen concentration measured by the sensor remains above a certain threshold to ensure that oxygen is not limiting the reaction in the biomass chamber and that there is no anaerobic activity.

2.1. Mathematical model

Our respirometer model accounts for three fundamental phenomena, which are mass transport, respiration kinetics and electrode kinetics.

2.1.1. Mass transport

The modes of mass transport operating in our system are diffusion in the two chambers and the membrane, and convection by laminar flow in the electrolyte channel.

The laminar flow in the electrolyte channel is described by the Navier–Stokes equations for an incompressible Newtonian fluid:

$$\begin{aligned} \rho(u \cdot \nabla)u - \eta \nabla^2 u + \nabla p &= 0 \\ \nabla \cdot u &= 0 \end{aligned} \quad (1)$$

where ρ and η are the density and kinematic viscosity of the fluid, respectively, u is the velocity vector and p is the pressure.

In addition, mass transport of dissolved species in the two chambers and in the membrane [23,24] is described by:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -D_i \nabla^2 C_i + r_i \quad (2)$$

where C_i and D_i are the concentration and diffusion coefficient of species i , respectively.

An additional reaction term, $-r_i$, needs to be added to the mass transport equation in the biomass chamber, to account for the consumption of oxygen and organics. This term is described in detail in the following section.

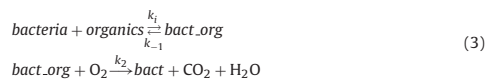
2.1.2. Respiration kinetics

Oxygen is consumed by bacteria as they metabolize aerobically the organic matter present in the sample. We assumed that the medium can be considered homogeneous – no suspended solids – and a Michaelis–Menten-like mechanism where the bacteria first

Table 1
Model boundary conditions.

Fluid flow	Equations	Boundary
	$u = (u_0, 0)$	$x = 0, y_2 < y < y_4$
	$u = (0, 0)$	$0 < x < l, y = y_2, y = y_4$
	$p = 0$	$x = l, y_2 < y < y_4$
Species transport	$O_2 = O_2^{sat}$	$x = 0, y_2 < y < y_4$
	$\frac{\partial O_2}{\partial x} = 0$	$0 < x < l, y = y_4$
	$\frac{\partial O_2}{\partial x} = 0$	$x = 0, y_1 < y < y_3$
		$x = l, y_1 < y < y_3$
		$0 < x < l, y = y_3$
	$D_{O_2}^{electrolyte} \frac{\partial O_2}{\partial y} \Big _{h_2^+} = \chi_f [O_2]^{electrolyte} - \chi_b [O_2]^{membrane}$	
	$D_{O_2}^{membrane} \frac{\partial O_2}{\partial y} \Big _{h_2^-} = \chi_b [O_2]^{membrane} - \chi_f [O_2]^{electrolyte}$	$0 < x < l, y = y_3$
	$D_{O_2}^{membrane} \frac{\partial O_2}{\partial y} \Big _{h_1^+} = \chi_b [O_2]^{membrane} - \chi_f [O_2]^{bioreactor}$	$0 < x < l, y = y_2$
	$D_{O_2}^{bioreactor} \frac{\partial O_2}{\partial y} \Big _{h_1^-} = \chi_f [O_2]^{bioreactor} - \chi_b [O_2]^{membrane}$	$0 < x < l, y = y_2$
Electrode kinetics	$D_{O_2} \frac{\partial O_2}{\partial x} = k_f O_2$	$x_0 < x < x_e, y = y_4$

reach an equilibrium with the organic matter present and then take up oxygen to decompose that matter into CO₂ and water:



where *bact* is the number of microbial cells without reduced organic matter in their cytosol, *organics* is the amount of organic matter as function of the oxygen required to be degraded, *bact.org* represents the microbial cells with reduced organic matter in its cytosol and *k*₁ and *k*₋₁ are the forward and backward reaction kinetic rates respectively. *k*₂ is the irreversible kinetic rate for respiration, and O₂ is the amount of oxygen present, CO₂ and H₂O are the final products of the reaction. Although this is oversimplifying the actual process, it suffices for our simulation purposes: the design of a microsystem. The activated sludge process, and in particular the aspects related to its aerobic respiration, are thoroughly described in the literature, and we would like to highlight the works of Spanjers et al. [25–29].

The steady-state approximation to the above mechanism yields the following rate equations for oxygen and organics:

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{-k_1 k_2 Bact_0 \cdot Organics \cdot O_2}{k_{-1} + k_2 O_2 + k_1 Organics} \quad (4)$$

and

$$\frac{dOrganics}{dt} = Bact_0 \cdot Organics \left\{ \frac{k_1 (k_{-1} Organics + k_{-1})}{k_{-1} + k_2 O_2 + k_1 Organics} - k_1 \right\} \quad (5)$$

where, *Bact*₀ is the initial concentration of bacteria. Note that the values of *k*₁, *k*₋₁, and *k*₂ have been chosen arbitrarily.

2.1.3. Electrode kinetics

The last part in our model is the electrochemical detection of oxygen at an electrode. The overall reaction is:



The mechanism of this process is rather complex, as it involves two separate two-electron steps and is pH dependent [23,30,31]. While Eq. (2) describes mass transport of oxygen to the electrode, electron transfer is described by Butler–Volmer kinetics and the current is calculated as:

$$I = nFD_{O_2} w \int_0^{x_e} \frac{\partial O_2}{\partial y} \Big|_{y=0} dx \quad (7)$$

where *w* represents electrode width, and *x*_e electrode length. *F* is the Faraday constant, and *D*_{O₂} and *n* are the diffusion coefficient of oxygen and the number of electrons involved in the process.

Table 1 summarizes the values used for the different constants used in the simulations, and Table 2 summarizes the boundary conditions.

To study the main transport phenomena in isolation, we first looked at how oxygen crosses the membrane in an “infinitely” long respirometer. Next, we considered the consumption of oxygen at the biomass chamber and, last, we studied the best placement for the electrochemical oxygen sensor. Note that although the concentration of dissolved oxygen is strongly dependent on temperature and salinity of the solution, we did not consider these parameters as input variables in our model for convenience.

2.2. Meshing and accuracy

Meshing is crucial to finite element methods (FEM) as it controls the accuracy of the results [32]. We are aware of the limitations of the method and have taken the steps to achieve results that are accurate between 1% and 0.5% unless otherwise stated. Simulated currents were compared with those predicted by the Levich expression [33] for a microband inside a single microchannel.

Three model features forced us to work with a greater number of nodes, which increased the calculation requirements. The first was that the ratio between magnitudes in the *x* and *y* directions was about three orders of magnitude (*l* = 13 cm versus 125 < *h* < 300 μm), which meant that to avoid the propagation of significant errors along the simulation domains we needed to work with very fine elements over an extensive domain. The second factor was the need to minimize the sources of error in the calculation of oxygen fluxes across the membrane domain, where particularly fine meshes were used. Third, the strong oxygen concentration gradients at the electrode-solution boundary also required a refined mesh. Taking the previous considerations into account, meshes ranging from 14 × 10⁴ to over 45 × 10⁴ triangular elements, with a minimum element quality ranging from 0.78 to 0.84, and an average mesh quality ranging from 0.98 to 0.99 were used in the different models [34]. We would like to stress that achieving an outstanding accuracy for each configuration tested was not the main aim of this work. The main aim was to obtain a semi-quantitative picture of the performance of the system under a range of configurations, and obtain design guidelines for the fabrication of a real system.

Simulations were run in COMSOL multiphysics v.4.1 running on Linux OpenSuse on a SUN X2200 M2 workstation (64 Gb RAM at 2.2 GHz clock speed dual Quad Core AMD Opteron 2354).

2.3. Modeling procedure

The aim of this work is to aid in the design of a novel microrespirometer. To that purpose we limited the scope of the

Table 2
Parameters and values used in the models.

Parameter	Description	Value			Units	Source
		m. effects ^a	Reaction ^b	Electrical ^c		
Geometry						
h_1	Height of reaction chamber	50	50	50–100	mm	This work
h_2	Tightness of membrane	25–75–200	25	25	10^{-6} m	This work
h_3	Height of electrolyte channel	50	50	50–100–150	10^{-6} m	This work
L	Total length	0.13	0.05	0.05	m	This work
Mass transport						
v_{in}	Mean fluid velocity	40	4–8–12–16		10^{-4} m/s	This work
T	Temperature	293.2	293.2	293.2	K	This work
Sal	Salinity	5	5	5	kg/m ³	This work
Sat	Oxygen at saturation	0.5631	0.5631	0.5631	mole/m ³	[44]
$c_{0,O_2,chan}$	Initial concentration of O ₂ at channel	Sat	Sat	Sat	mole/m ³	This work
$c_{0,O_2,rc}$	Initial concentration of O ₂ at reaction chamber	0	0	0	mole/m ³	This work
$c_{0,BOD}$	Initial concentration of BOD at reaction chamber	–	30–300–3,000	300	g/m ³	This work
$D_{O_2,w}$	Diffusion coefficient of O ₂ in water	3.5×10^{-9}	3.5×10^{-9}	3.5×10^{-9}	m ² /s	[45]
$D_{O_2,m}$	Diffusion coefficient of O ₂ in the membrane	3.0 PDMS	3.0 PDMS	3.0 PDMS	m ² /s	[39,40]
$D_{BOD,w}$	Diffusion coefficient of BOD in water	0.015 PTFE	–	–	m ² /s	[36–38]
$D_{BOD,m}$	Diffusion coefficient of BOD in the membrane	–	1×10^{-9}	1×10^{-9}	m ² /s	This work
Reactions						
bact	Bacterial concentration	–	1×10^{15}	1×10^{15}	cells/m ³	This work
const _{bact}	Bacterial maximum respiration rate	–	1.04167×10^{-16}	1.04167×10^{-16}	mol O ₂ /s	[23]
k_1	Equation XX forward constant	–	1×10^5	1×10^5	1/s	This work
k_{-1}	Equation XX backward constant	–	5×10^2	5×10^2	1/s	This work
k_2	Equation XX forward constant	–	1.25×10^6	1.25×10^6	1/s	This work
Electrical model						
$c_{0,R}$	Initial concentration of R at channel	–	–	1×10^{-7}	mole/m ³	This work
n	Number of electrons in the reaction	–	–	1		This work
E_0	Standard potential	–	–	0	V	
$D_{R,w}$	Diffusion coefficient of R in water	–	–	3.5×10^{-9}	m ² /s	
k_s	Electronic transference constant	–	–	1	m/s	
α	Charge transference coefficient	–	–	0.5		
E_{eq}	Equilibrium potential, O/R	–	–	0.3926	V	
j_0	Exchange current density	–	–	2.373×10^{-5}	A/m ²	

^a Models on membrane effects.

^b Models with reaction.

^c Models with reactions and electrode.

simulation to existing materials and geometries that are amenable to fabrication using microfabrication and rapid prototyping techniques [35]. PTFE and silicone membranes have been considered, as they are both permeable to oxygen and can be found commercially in a wide range of thicknesses.

The first task was to compare the oxygen diffusion time across both membrane materials into the biomass chamber to find out how much can oxygen transport across the membrane limit the response time of the respirometer. Next, we introduced a respiration reaction in the biomass chamber and simulated different organic loadings. After this, we studied the effect of electrolyte flow-rate on reaction kinetics, as it modulates the concentration of oxygen available in the biomass chamber. Channel height was another design parameter because it affects reaction rates through available oxygen. Last, we studied the effect of the presence of an electrochemical oxygen sensor, and we found the fabrication of a miniaturized respirometric device for semi-continuous measurements feasible.

3. Results and discussion

3.1. Oxygen transport

One key requirement of any respirometric device is that oxygen supply does not limit the respiration rate of the biomass. In our system this means that oxygen transport across the membrane separating electrolyte and biomass chambers is sufficiently fast to prevent the onset of anaerobic conditions in the biomass chamber. In this section we analyze data from the bottom of the biomass

chamber because that is where the most limiting conditions may be found in a real system. Fig. 2 shows a side-view diagram of the system with the various model features. The points highlighted show the locations where the concentrations of the different species were studied.

Fig. 3 shows transient oxygen concentration profiles at different distances from the electrolyte inlet (the transient oxygen

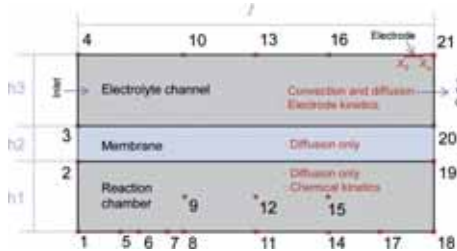


Fig. 2. Schematic side-view diagram of the device (x and y axes are not at same scale). The scheme shows the model subdomains and the physics applied on them. The sampling points for results figures are: concentration of organics at reaction chamber, points 2, 9, 12, 15 and 18; concentration of oxygen at reaction chamber, points 5, 6, 7 and 17; concentration of oxygen at electrolyte channel, points 4, 10, 13, 16 and 21. In gray, mean dimensions used at text are shown, L : total length (0.05 m for models with reaction, and 0.13 m for models of fluids only); h_1 : reaction chamber height; h_2 : membrane height; h_3 : electrolyte channel height. See text and tables for further details.

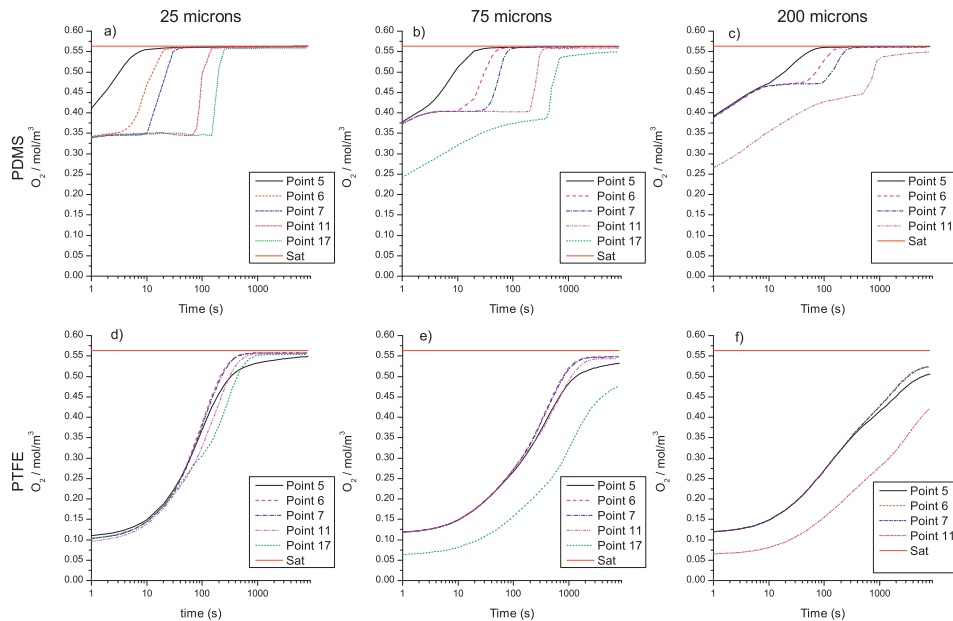


Fig. 3. Concentration of oxygen in mM, without reaction at points 5, 6, 7, and 11. Note that x-axis is a \log_{10} scale. (a)–(c): correspond to PDMS with a thickness of 25, 75 and 200 μm respectively. (d)–(f): correspond to PTFE with a thickness of 25, 75 and 200 μm respectively. The line “Sat” denotes the limit of oxygen content at saturation (0.563 mole/ m^3). See text for further details.

concentration surfaces corresponding to Figs. 5 and 8 are provided as movies in supplementary materials section). The figure shows simulated data for PTFE and PDMS, materials commonly found in fuel cells and gas sensors. We studied three different thicknesses: 25, 75 and 200 μm . In this case the heights of the electrolyte and biomass chamber have been set equal to 100 μm , and the electrolyte flows with a linear velocity of 1 mm/s. These are all values that can be typically found in microfluidic devices. The effect of flow and respiration rates will be addressed separately.

To model the two materials, we played with their reported oxygen permeabilities and membrane thickness. Fig. 3 shows that oxygen transport through PTFE is slower than through PDMS. This is already hinted by the values found in literature for PTFE at room temperature (25 °C), 1.2×10^{-11} to 2.8×10^{-10} m^2/s , while values for PDMS at 25 °C range from 5.4×10^{-10} to 3.55×10^{-9} m^2/s [36–41]. We used the mean values (excluding the extremes) in our simulations. Fig. 3 shows an interesting contrast between membrane materials.

The higher permeability, and the faster diffusion of oxygen, displayed by PDMS membranes bring about a fast drop in the oxygen concentration in the electrolyte channel until the biomass chamber fills up. Thus, the oxygen concentration profile advances at a similar velocity along the microchannel and inside the biomass chamber.

On the other hand, the lower oxygen diffusion rate across PTFE results in the biomass chamber gradually filling up more or less at the same rate everywhere, while oxygen is not significantly depleted anywhere in the electrolyte channel. In addition, the faster permeability in PDMS also affects this “filling” time. Fig. 3 shows that PDMS membranes not only reach the saturation level faster, but that the oxygen concentration in the biomass chamber is also significantly higher throughout the experiment.

The most obvious effect of increasing membrane thickness is the delay in diffusion time from the electrolyte channel into the biomass chamber. In fact, in the case of PTFE membranes, as membrane thickness increases, the oxygen concentration in the biomass chamber stops reaching the saturation level found in the electrolyte solution during the simulated time. PDMS membranes, on the other hand, see a response delay on increasing membrane thickness, but the oxygen supplied by the electrolyte eventually becomes fully available throughout the biomass chamber. In other words, as membrane thickness increases the amount of oxygen available to the biomass chamber decreases. PDMS-based respirometers may allow for shorter analysis times if the electrolyte flow rate increases, as more oxygen is made available more quickly. This can be particularly interesting when thicker membranes need to be used, or if a sample analyzed is rich in organic matter.

3.2. Respiration kinetics

In our model, the rate of respiration is a function of both oxygen and organic matter available, as we consider a constant bacterial concentration set at 10^9 cfu mL^{-1} , such as can be routinely found in stationary phase cultures, and higher concentrations may be accessible when dealing with immobilized or highly agglomerated bacteria [23]. The literature describes how the rate of organic matter degradation and, consequently, the rate of oxygen consumption, depend on the type and concentration of organic matter and on the type and growth (and so richness) of the microbial population [1,26,42], so modulating the biomass concentration should provide additional control over the respiration rate. On the other hand, too high a concentration of bacteria may be counterproductive,

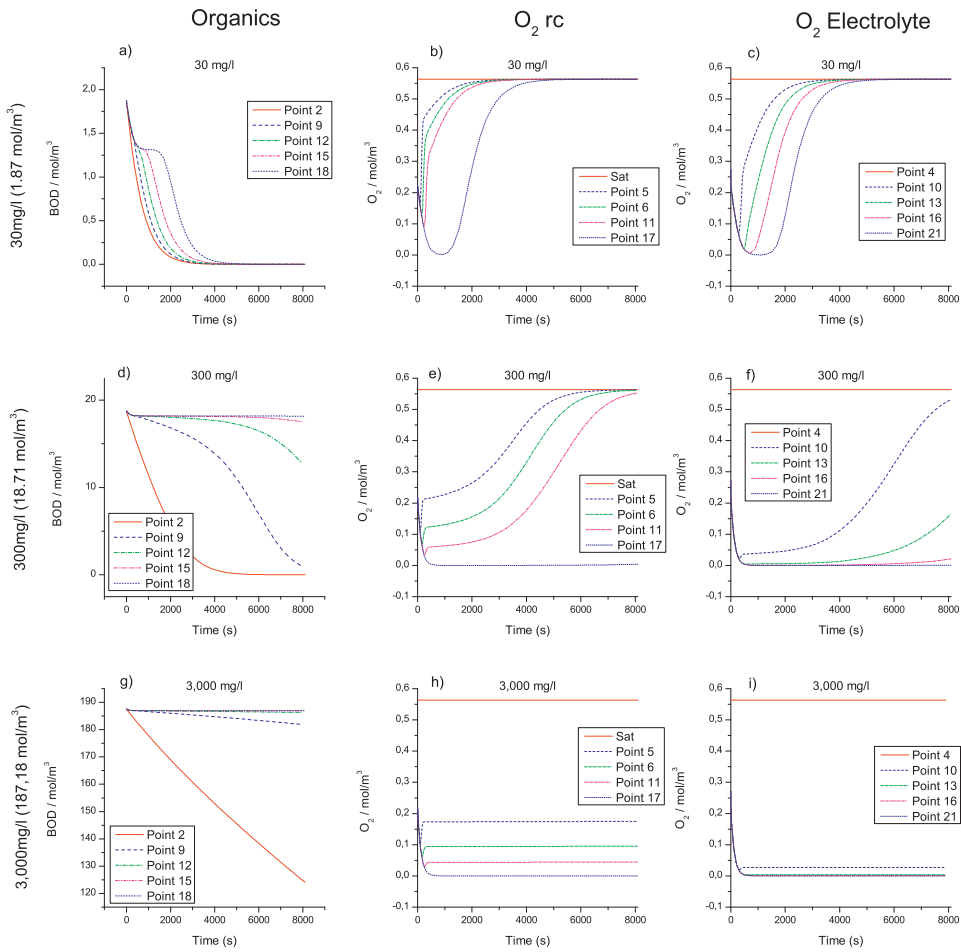


Fig. 4. Concentrations of organics and O_2 at models with reaction, rate x_1 . Concentrations of organics and O_2 at models with reaction. The figure shows results for 30, 300 and 3000 mg/l (1.87, 18.71 and 187.18 mole/m³ respectively) of BOD as initial loading of the device. (a), (d) and (g): concentration dynamics of BOD at reaction chamber; (b), (e) and (h): concentration dynamics of O_2 at reaction chamber; (c), (f) and (i): concentration dynamics of O_2 at electrolyte channel.

as oxygen may be turned into a limiting factor regardless of electrolyte flow rate and oxygen concentration in it.

Fig. 4 shows data for the consumption of organic matter at different initial concentrations of BOD of 30, 300 and 3000 mg/l and an electrolyte flow of $0.15 \mu\text{l min}^{-1}$. The same figure shows the corresponding oxygen concentrations in the biomass chamber (points 5, 6, 11 and 17 in Fig. 2) and in the electrolyte channel (points 4, 10, 13, 16 and 21 in Fig. 2).

The three initial concentrations chosen for the organic matter correspond to three usual loadings found in real situations: a wastewater treatment plant discharge (30 ppm), typical urban waste water (300 ppm), and agricultural or industrial waste-waters (3000 ppm).

Fig. 4 shows that in our simulations, it takes about an hour to digest the sample at 30 ppm organic matter when oxygen-saturated electrolyte flows at $0.15 \mu\text{l min}^{-1}$, an extremely low flow-rate even for microfluidic systems. In the other two cases, however, the sample is only partially digested after 2 h. This may seem discouraging at first, because we are seeking to determine the BOD level in the shortest possible time. However, the rate of the reaction may be speeded up by increasing the flow rate of the electrolyte supplying oxygen.

Respirometers do not monitor organic matter concentration, but the evolution of the dissolved oxygen concentration in the system. Fig. 4b, e and h shows that the oxygen concentration curves in the biomass chamber and in the electrolyte channel are very similar.

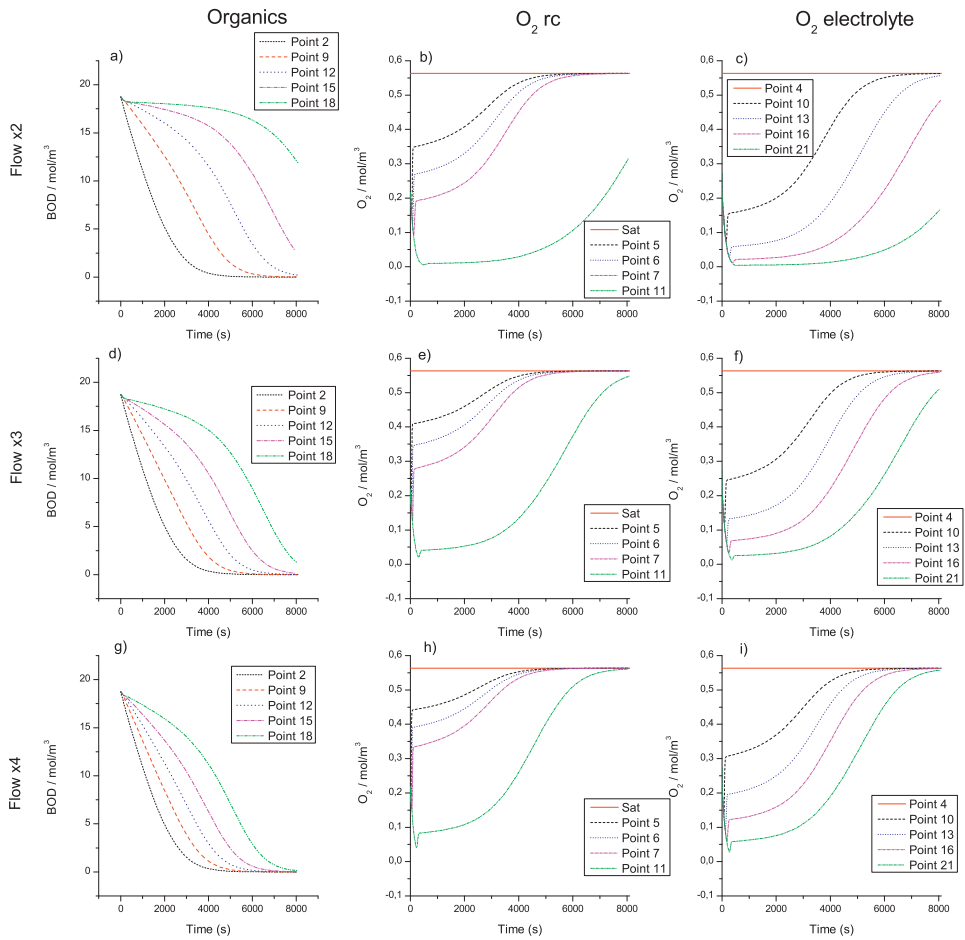


Fig. 5. Concentrations of organics and O_2 at models with reaction, flow rate of 0.3, 0.45 and $0.60 \mu\text{l min}^{-1}$. Concentrations of organics and O_2 at models with reaction. The figure shows results for 300 mg/l (18.71 mole/m^3) of BOD as initial loading of the device with flows of 0.3, 0.45 and $0.60 \mu\text{l min}^{-1}$. (a), (d) and (g): concentration dynamics of BOD at reaction chamber; (b), (e) and (h): concentration dynamics of O_2 at reaction chamber; (c), (f) and (i): concentration dynamics of O_2 at electrolyte channel. See text for further details.

In all cases, the oxygen concentration drops abruptly at the beginning of the measurement, but it gradually returns to the saturation value as the amount of organic matter in the biomass chamber disappears. Thus, by monitoring the oxygen concentration over time it is possible to estimate the biomass concentration, provided that we know the kinetics of the reaction. We will come back to this later on, as it is one of the main assumptions of the model, and is likely to become one of the main limitations of the physical system.

We would like to discuss another two important features shown by Figs. 4–6. First, the figures show again the importance of the membrane. These data were obtained from simulations where the membrane was $25 \mu\text{m}$ thick PDMS. In spite of this, oxygen concentration changes in the biomass chamber take time to be noticed in

the electrolyte channel. This effect was described in the previous section, and it is one of the factors controlling the response time of the respirometer. The second feature worth discussing is the low oxygen concentration that may be found in the biomass chamber, particularly at higher organic matter concentrations. This can have a particularly negative effect on the respirometer performance, as it may bring about a switch to anaerobic respiration. However, it can be prevented by increasing the electrolyte flow rate, which will increase the oxygen supply to the biomass chamber, or by diluting the sample. In these cases we prescribe the use of thinner PDMS membranes.

This is shown in Fig. 5(b, e and h), where the electrolyte flow-rate has been increased twice, 3 times, and 4 times, implying flows

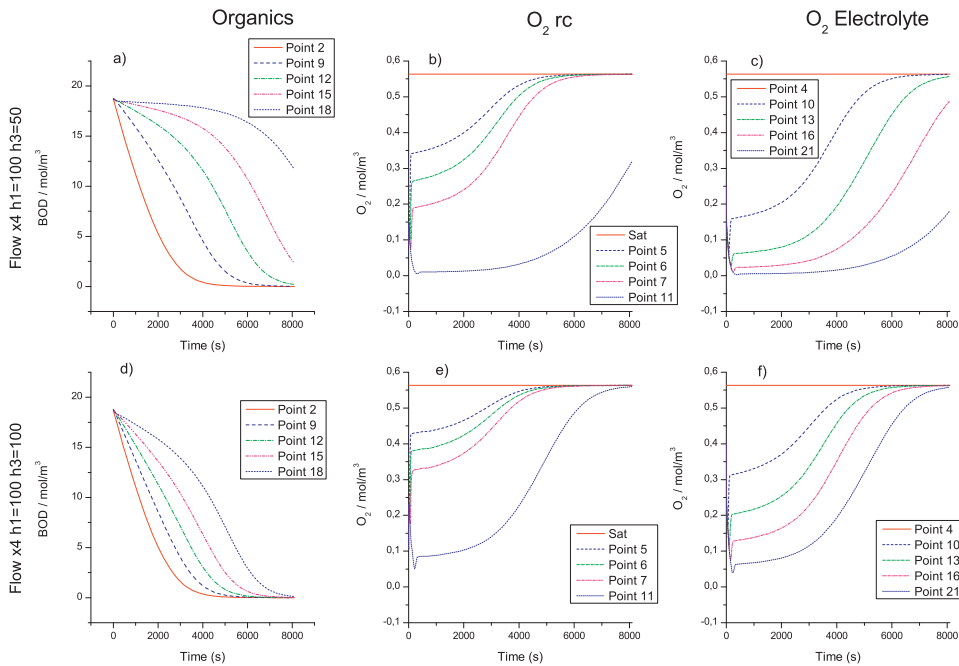


Fig. 6. Concentrations of organics and O_2 at models with reaction, with modified channels heights. Concentrations of organics and O_2 at models with reaction. The figure shows results for 300 mg/l (18.71 mole/m³) of BOD as initial loading of the device with flows of $0.60 \mu\text{l min}^{-1}$ and different h_1 and h_3 . (a) and (d): concentration dynamics of BOD at reaction chamber; (b) and (e): concentration dynamics of O_2 at reaction chamber; (c) and (f): concentration dynamics of O_2 at electrolyte channel. See text for further details.

of 0.3, 0.45 and $0.6 \mu\text{l min}^{-1}$ respectively, so that the amount of oxygen available does not drop below the threshold of anaerobic activity (Fig. 5h, point 17). Also, by increasing the oxygen concentration in the biomass chamber, increasing the electrolyte flow-rate also shortens the time to consume the organic matter present, and hence the analysis time. These results suggest that, by adjusting the electrolyte flow-rate and the channel length, it may be possible to ensure that there is enough oxygen in the biomass chamber to guarantee the reliability of the results. If the membrane is robust enough, we would recommend using higher flow rates (up to tens of $\mu\text{l min}^{-1}$) to ensure that oxygen is never rate limiting.

In addition to electrolyte flow-rate, we also studied the effect of channel geometry, as it will also have an impact on the amount of oxygen available, and hence in the response time of the respirometer. Fig. 6 presents data at an organics initial concentration of 300 mg/l, and different flow-rates and channel heights.

For Fig. 6 with $0.6 \mu\text{l min}^{-1}$ flow, subfigure a, $h_1 = 100$ and $h_3 = 50 \mu\text{m}$, shows a slowing pattern (compare with Fig. 5a) due to the reduced ratio between biomass chamber and electrolyte channel which implies a smaller amount of oxygen entering the system.

For $h_1 = 100$ and $h_3 = 100$, the results are very similar to those obtained at Fig. 5g. This shows only a slight delay in reaction due to the large distances in the system to be traveled by oxygen by diffusion, but overall shows that increasing from 50 to $100 \mu\text{m}$ both

channel and biomass chamber have no significant differences, and have similar device features.

3.3. Oxygen detection

The respirometer presented in this article monitors oxygen concentration changes in the electrolyte channel. For practical reasons, the sensor needs to be placed at the top end of the electrolyte channel, so that it does not affect the rate of the bacterial respiration. This is because since oxygen is monitored via its reduction current, which means that it is partially depleted by the working electrode. This consumption of oxygen by the electrode is normally not an issue in large-scale devices, but in this miniaturized device the effect is not negligible.

This is shown in Fig. 7, where a $75 \mu\text{m}$ -wide microband is placed near the inlet of a channel of heights ranging from 50 (a) up to 150 (c) μm . The figure shows how the presence of a working electrode affects the concentration of oxygen in the channel at a given flow-rate. The figure shows how as the channel size decreases, the effect of the working electrode becomes more significant, as it depletes between 20% and 60% of the oxygen passing through the channel. Because of this, it is obvious that the best place for such a sensor is at the end of the electrolyte channel, once the biomass has taken the oxygen it needs. Alternative ways to decrease the relative amount of oxygen consumed by the electrochemical sensor and to

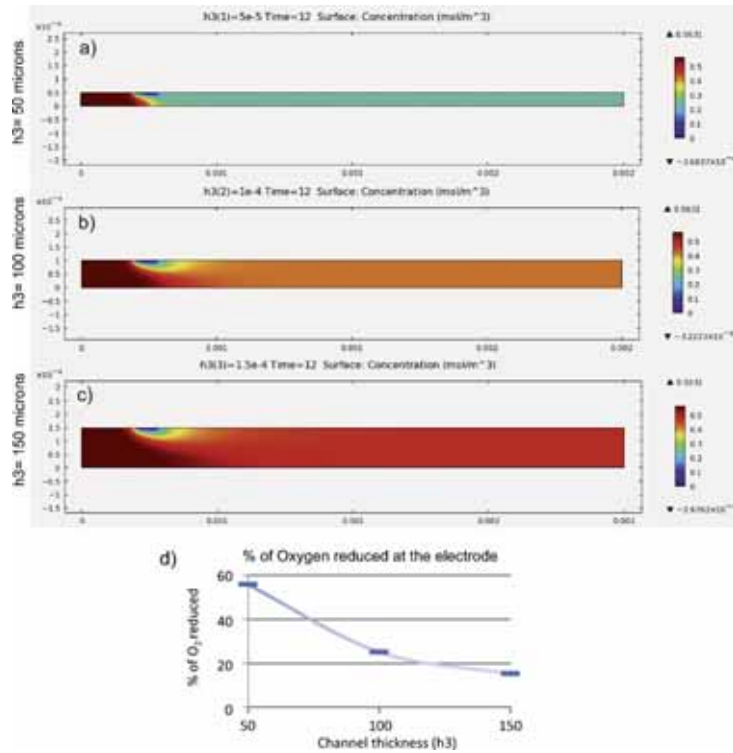


Fig. 7. Electrode oxygen consumption profiles without reaction. Profiles of oxygen reduction during the amperometry process. Electrode length of 75 μm. (a) Channel of 50 μm height (h_3), (b) channel of 100 μm height (h_3), (c) channel of 150 μm height (h_3), (d) percentage of the overall oxygen reduction during the amperometric analysis for cases (a)–(c).

increase the magnitude of the measured current, are to increase the electrolyte flow-rate [43].

Placing the sensor at the end of the electrolyte channel poses an additional advantage, as the biomass has had both more oxygen and more time available to react, and hence the oxygen concentration leaving the electrolyte channel is likely to be lower, which makes the rate of respiration easier to measure at low levels of organic matter.

The curves to be analyzed must fulfill two antagonistic key conditions: first, there needs to be a minimum concentration of oxygen throughout the experiment in order to prevent erroneous BOD readings. Second, the oxygen concentration drop should be sufficiently large for the data recorded by the sensor to be meaningful.

Oxygen reduction current signals will follow a typical Monod curve. First, the signal decayed due to oxygen consumption of by microbes and the delay of channel recovering the inlet concentration, which was controlled by electrolyte flow-rate and oxygen diffusion across the membrane. Next, a pseudo-equilibrium was established when the organic matter was present in excess and its degradation rate remained nearly constant at this maximum. Last, the oxygen concentration came back to the saturation level of

oxygen once the organic matter had been consumed by the biomass. The total amount of oxygen consumed by the biomass could be easily established integrating over time the difference between the saturation concentration, which was the oxygen concentration entering the system, and the concentration measured by the sensor, until the oxygen saturation level was recovered.

We last simulated the whole system, with the electrolyte flowing at $1.2 \mu\text{l min}^{-1}$, the biomass acting on a sample loaded with 300 ppm organic matter, and the oxygen sensor "switched on". The results are shown in Fig. 8, where in addition to the concentration profiles for organics, dissolved oxygen in the biomass chamber, and dissolved oxygen in the electrolyte channel, we also show the theoretical current that the sensor will read when placed at the end of the electrolyte channel. As the figure shows, the current transient followed the evolution of the oxygen concentration during the reaction. Fig. 8d predicts the current magnitude to range from a maximum value of 260 nA at oxygen saturation, down to about 20 nA when the oxygen concentration is at its expected minimum. These current values can be easily measured using a conventional potentiostat, so the construction of a system using the size specifications given here should be feasible.

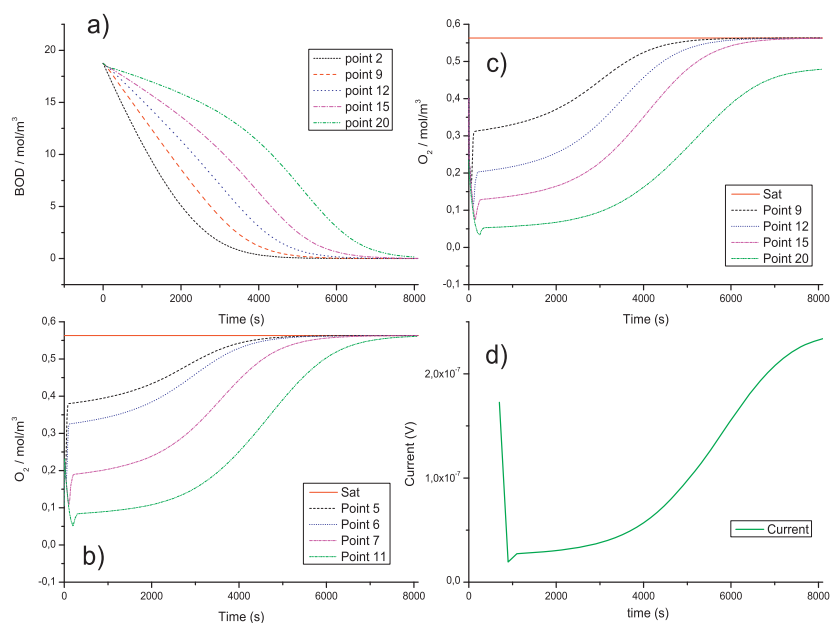


Fig. 8. Concentrations of BOD and O₂ at models with reaction and electrochemical measurement. The figure shows results for 300 mg/l (18.71 mole/m³) of BOD as initial loading of the device with flow of 0.60 μl min⁻¹ and with $h_1 = 100 \mu\text{m}$ and $h_2 = 100 \mu\text{m}$. (a) Concentration dynamics of organics at reaction chamber; (b) concentration dynamics of O₂ at reaction chamber; (c) concentration dynamics of O₂ at electrolyte channel; (d) output current calculated by the model. See text for further details.

4. Conclusions

We have designed a new concept respirometer for semi-continuous measurements of organic matter content in water samples using finite element simulations. In this system, the sample and the biomass are in a chamber on the other side of the membrane. In the presence of organic matter, the bacterial population uses oxygen as final electron acceptor, which transport rate across the membrane is key. Oxygen transport to the biomass chamber needs to be fast to prevent the onset of anaerobic respiration and also to allow a rapid decomposition, and hence the estimation of the BOD content in the sample. The oxygen transport properties of PDMS make it a more suitable material than PTFE for the construction of respirometers when high organic loadings need to be analyzed, as thicker membranes may be used. In any case, oxygen supply may be controlled through the electrolyte flow-rate, which may in turn be used in the estimation of the BOD or of kinetic parameters related to the respiration.

The simulations presented here have yielded semi-quantitative answers before the physical device is constructed, such as (i) optimum thickness and diffusivity across membranes, (ii) effect of system geometry and flow velocities and, (iii) optimum sensor configuration. This information is extremely valuable for prototyping purposes, saving time and money, and helping to define the limits and main bottlenecks that can be expected to be found during subsequent implementation work.

Although this approach seems to allow for respiration monitoring, a real system will require the parallel use of several units such as the one described here, in order to know (i) the sensor reading of the sample in the absence of microbial population as a blank

control, (ii) the basal respiration rate of the microbial population in the absence of sample or other organic matter, and (iii) the respiration rate of the microbial population in the presence of a solution containing a known amount of organic matter, such as glucose or acetate, acting as an overall control. Additionally a study of correlation between this device results and other conventional techniques such as BOD₅ and COD must be done, to relate the results to the well-established analytical methods.

Acknowledgements

The authors acknowledge funding through projects Microresp (PET2008-0165-01), MEDRA (TSI020100-2011-187), Bactotox (CTQ2009-14390-C02-01 and CTQ2009-14390-C02-02) and TRAGUA (CSD2006-00044). In addition, Albert Torrents is funded by a FPU scholarship (AP2008-03848). We also thank Neus Godino for her help and advice in the modeling process

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.014>.

References

- [1] J. Liu, B. Mattiasson, Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *Water Res.* 36 (2002) 3786–3802.
- [2] T.H.Y. Tebbutt, *Principles of Water Quality control*, 5th ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 2002.
- [3] I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda, S. Suzuki, Microbial electrode BOD sensors, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 659–672 (vintage article).

- [4] C.W. Hickey, J.W. Nagels, Modifications to electrolytic respirometer systems for precise determination of BOD exertion kinetics in receiving waters, *Water Res.* 19 (1985) 463–470.
- [5] O.N. Ponomareva, V.A. Arlyapov, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov, Microbial biosensors for detection of biological oxygen demand (a review), *Appl. Biochem. Microbiol.* 47 (2011) 1–11.
- [6] S. Velling, A. Mashirin, K. Hellat, T. Tenno, Non-steady response of BOD biosensor for the determination of biochemical oxygen demand in wastewater, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 95–100.
- [7] C. Liu, C. Ma, D. Yu, J. Jia, B. Zhang, S. Dong, Immobilized multi-species based biosensor for rapid biochemical oxygen demand measurement, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2074–2079.
- [8] C.S. Oliveira, A. Ordaz, E.C. Ferreira, M. Alves, F. Thalasso, In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities, *Biochem. Eng. J.* 58–59 (2011) 12–19.
- [9] C. Yi, Q. Zhang, C.-W. Li, J. Yang, J. Zhao, M. Yang, Optical and electrochemical detection techniques for cell-based microfluidic systems, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1259–1268.
- [10] J. Wang, Y. Zhang, Y. Wang, R. Xu, Z. Sun, Z. Jie, An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1705–1709.
- [11] M.C. Bonetto, N. Sacco, A. Hilding Ohlsson, E. Cortón, Assessing the effect of oxygen and microbial inhibitors to optimize ferricyanide-mediated BOD assay, *Talanta* 85 (2011) 455–462.
- [12] N. Pasco, K. Baronian, C. Jeffries, J. Webber, J. Hay, MICREDOX – development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilised *Proteus vulgaris* biocomponent, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 524–532.
- [13] L. Nyholm, Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications, *Analyst* 130 (2005) 599–605.
- [14] T. Das, S. Chakraborty, Biomicrofluidics: recent trends and future challenges, *Sadhana-Academy Proc. Eng. Sci.* 34 (2009) 573–590.
- [15] C. Yi, C. Li, S. Ji, M. Yang, Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells, *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 1–23.
- [16] O. Ordeig, F.J. del Campo, F.J. Muñoz, C.E. Banks, R.G. Compton, Electroanalysis utilising amperometric microdisc electrode arrays, *Electroanalysis* 19 (2007) 1973–1986.
- [17] N. Godino, F.J. del Campo, F.J. Muñoz-Pascual, M. Fougat-Hansen, J.P. Kutter, D. Snakenborg, Integration of a zero dead-volume PDMS rotary switch valve in a miniaturised (bio)electroanalytical system, *Lab Chip* 10 (2010) 1841–1847.
- [18] M. Mir, A. Homs, J. Samitier, Integrated electrochemical DNA biosensors for lab-on-a-chip devices, *Electrophoresis* 30 (2009) 3386–3397.
- [19] J.P. Esquivel, M. Castellarnau, T. Senn, B. Löchel, J. Samitier, N. Sabaté, Fuel cell-powered microfluidic platform for lab-on-a-chip applications, *Lab Chip* 12 (2012) 74–79.
- [20] M. Anjum, H. Shekhar, S.H. Hyun, S. Hong, H.J. Cho, A disposable BOD microsensor using a polymer substrate, *Proc. IEEE Sens.* 3 (2004) 1202–1205.
- [21] H.J. Cho, S. Halakatti, A. Mehta, Portable water quality monitoring system, US Patent US7666285B1 (2010), p. 18.
- [22] H. Suzuki, Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring, *Mater. Sci. Eng. C* 12 (2000) 55–61.
- [23] N. Godino, D. Dvila, N. Vigus, O. Ordeig, F.J. del Campo, J. Mas, F.X. Muñoz, Measuring acute toxicity using a solid-state microrespirometer, *Sens. Actuators B: Chem.* 135 (2008) 13–20.
- [24] J. Leddy, A.J. Bard, J.T. Maloy, J.M. Saveánt, Kinetics of film-coated electrodes: effect of a finite mass transfer rate of substrate across the film-solution interface at steady state, *J. Electroanal. Chem.* 187 (1985) 225–227.
- [25] H. Spanjers, P.A. Vanrolleghem, G. Olsson, P.L. Dold, Respirometry in control of the activated sludge process: principles, in: IAWQ (Ed.), Scientific and Technical Reports, International Association on Water Quality, London, 1998, p. 48.
- [26] H. Spanjers, P.A. Vanrolleghem, G. Olsson, P.L. Dold, Respirometry in control of the activated sludge process, *Water Sci. Technol.* 34 (1996) 117–126.
- [27] M.Y. Yang, An autocatalytic model for the kinetics of bod test, *Water Res.* 24 (1990) 1091–1095.
- [28] T. Yasukawa, K. Goto, F. Mizutani, Determination of the apparent Michaelis constant of glucose oxidase immobilized on a microelectrode with respect to oxygen, *Electroanalysis* (2010).
- [29] N. Basant, S. Gupta, A. Malik, K.P. Singh, Linear and nonlinear modeling for simultaneous prediction of dissolved oxygen and biochemical oxygen demand of the surface water – a case study, *Chemomet. Intellig. Lab. Syst.* 104 (2010) 172–180.
- [30] A. Lavacchi, U. Bardi, C. Borri, S. Caporali, A. Fossati, I. Perissi, Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics®, *J. Appl. Electrochem.* 39 (2009) 2159–2163.
- [31] D.B. Sepa, M.V. Vojnovic, A. Damjanovic, Reaction intermediates as a controlling factor in the kinetics and mechanism of oxygen reduction at platinum-electrodes, *Electrochim. Acta* 26 (1981) 781–793.
- [32] I.J. Cutress, E.J.F. Dickinson, R.G. Compton, Analysis of commercial general engineering finite element software in electrochemical simulations, *J. Electroanal. Chem.* 638 (2010) 76–83.
- [33] R.G. Compton, A.C. Fisher, P.J. Wellington, P.J. Dobson, P.A. Leigh, Hydrodynamic voltammetry with microelectrodes – channel microband electrodes – theory and experiment, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 10410.
- [34] W.B.J. Zimmerman, Multiphysics modelling with finite element methods (2006).
- [35] M. Madou, Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology, CRC Press, Boca Raton, 2011.
- [36] M.C. Clochard, T. Berthelot, C. Baudin, N. Betz, E. Balanzat, G. Gbel, A. Morin, Ion track grafting: a way of producing low-cost and highly proton conductive membranes for fuel cell applications, *J. Power Sources* 195 (2010) 223–231.
- [37] N.T.S. Evans, T.H. Quinton, Permeability and diffusion coefficient of oxygen in membranes for oxygen electrodes, *Respir. Physiol.* 35 (1978) 89–99.
- [38] T. Lehtinen, G. Sundholm, S. Holmberg, F. Sundholm, P. Bjornbom, M. Bursell, Electrochemical characterization of PVDF-based proton conducting membranes for fuel cells, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 1881–1890.
- [39] S. Chowdhury, J. Dodson, V.R. Beheteabotla, R. Sen, Measurement of diffusion and permeation coefficients of oxygen in polymers based on luminescence quenching, in: AIChE 2007 Annual Meeting, 2007.
- [40] M.E. Cox, B. Dunn, Oxygen diffusion in poly(dimethyl siloxane) using fluorescence quenching. I. Measurement technique and analysis, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 24 (1986) 621–636.
- [41] N. Godino, D. Dvila, N. Vigus, O. Ordeig, F.J. del Campo, J. Mas, F.X. Muñoz, Measuring acute toxicity using a solid-state microrespirometer, *Sens. Actuators B: Chem.* 135 (2008) 13–20.
- [42] J. Kappeler, W. Gujer, Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling, *Water Sci. Technol.* 26 (1992) 125–139.
- [43] J.A. Cooper, R.G. Compton, Channel electrodes – a review, *Electroanalysis* 10 (1998) 141–155.
- [44] U.S.G. Survey, WATER QUALITY – new tables of dissolved oxygen saturation values, 2011.
- [45] CRC, Handbook of Chemistry and Physics, 92nd ed., National Institute of Standards and Technology, 2011.

Modeling and Design of a Microfluidic Respirometer for Continuous Amperometric Short Time Biochemical Oxygen Demand (BOD_{st}) Analysis

Albert Torrents^a, Jordi Mas^b, Francesc Xavier Muñoz^a, Francisco Javier del Campo^{a*}

^a Institut de Microelectrònica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC)

^b Universitat Autònoma de Barcelona Departament de Genètica i Microbiologia

* Campus Universitat Autònoma de Barcelona s/n Cerdanyola del Vallès (Barcelona, Spain).
javier.delcampo@csic.es

Abstract: This paper presents the design of a miniaturized electrochemical respirometer to monitor organic content in water samples semi-continuously, in contrast to current Biochemical Oxygen Demand, BOD, methods. We demonstrate the use of finite element method simulations as design tool for a novel concept microfluidic respirometer. The device is based on a flow cell separated by a thin membrane from a bioreactor. Simulations show that once membrane material and thickness are chosen, oxygen supply rate still provides sufficient flexibility to allow the measurement of samples spanning a very wide range of organic matter concentrations. The design presented here uses an electrochemical oxygen sensor, and the whole system is amenable to fabrication using standard microfabrication and rapid prototyping techniques.

Keywords: Modeling, BOD biosensor, Respirometry, Electrochemistry, Microfluidics, Finite Element Method.

1. Introduction

This work focuses on the design of a novel miniaturized system for the continuous determination of BOD_{st} (short-time Biological Oxygen Demand) in aqueous samples. The determination of BOD consists on the oxidation of organic matter by living organisms. After an adaptation time the amount of oxygen consumed over a typical period of 5 days is determined. This long analysis time makes BOD₅ expensive and unsuitable for process control, and opens a window of opportunity to rapid methods [1]. Perhaps the first example of a rapid BOD sensor was presented in 1977 [2]. Karube et al. Karube's method was reportedly able to provide close BOD estimates within 1 hour.

The evolution of so-called rapid BOD methods has been recently reviewed by Ponomareva et al. [3]. This work describes the design of a miniaturized respirometer that combines some of the advantages of biofilm biosensors and bioreactor BOD sensors, aiming to provide BOD information within a few hours. This is possible thanks to miniaturization and microfluidics.

1.1 Device description

Broadly, our concept consists in a flow cell where two media separated by an oxygen permeable membrane run together, and different oxygen sensors placed before and after the membrane measure oxygen supply and consumption. An oxygen-saturated electrolyte flows through one of the channels, in which an oxygen sensor is placed downstream. The second channel is filled with a mixture of biomass and the sample to be analyzed. This biomass/sample mixture remains stagnant during the measurement, while a thin oxygen membrane allows the diffusion of oxygen from the electrolyte channel to it.

Electrolyte flow rate and membrane thickness control the transport of oxygen to the biomass chamber, where it is consumed. The electrolyte flowing in is saturated with oxygen. As the electrolyte flows through the channel, oxygen diffuses across a thin membrane towards the biomass chamber where it is consumed by the biomass in the presence of organic matter. This drop in oxygen concentration inside the electrolyte channel is measured amperometrically at the end of the channel, which provides direct information on the respiration rate of the biomass and tells whether the electrolyte flow rate is adequate

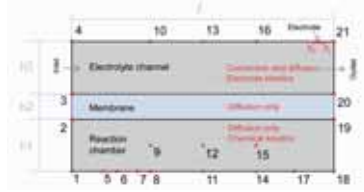


Figure 1: Schematic side-view diagram of the device (x and y axis are not at same scale). The scheme shows main subdomains and the physics applied at each subdomain. L: total length; h_1 : reaction chamber height; h_2 : membrane height; h_3 : Electrolyte channel height. See text and tables for further details.

2. Use of COMSOL Multiphysics

Figure 1 depicts a schematic draw of the subdomains, boundaries and modules used to solve the present model. Numbers in figures correspond to numbers specified in graphics.

2.1 Mathematical model

The respirometer model accounts for three fundamental phenomena, which are mass transport, respiration kinetics and electrode kinetics.

a) Mass transport

The modes of mass transport operating in our system are diffusion in the two chambers and the membrane, and convection by laminar flow in the electrolyte channel.

The laminar flow in the electrolyte channel is described by the Navier-Stokes equations for an incompressible Newtonian fluid:

$$\rho(u\bar{\nabla})u - \eta\nabla^2u + \nabla p = 0 \quad (2)$$

$$\nabla \cdot u = 0$$

Where ρ and η are the density and kinematic viscosity of the fluid, u is the velocity vector and p is pressure.

In addition, mass transport of dissolved species in the two chambers and in the membrane is described by:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -D_i\nabla^2C_i + u\bar{\nabla}C_i \quad (3)$$

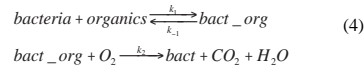
Where C_i and D_i are the concentration and diffusion coefficient of species i .

An additional reaction term, $-r_i$, needs to be added to the mass transport equation in the biomass chamber, to account for the consumption of oxygen and organics. This term is described in detail in the following section.

Transport of oxygen across the membrane is modeled using the approach described in previously published works. [4,5]

b) Respiration kinetics

Oxygen is consumed by bacteria as they metabolize aerobically the organic matter present in the sample. We are assuming that the medium can be considered homogeneous –no suspended solids– and a Michaelis-Menten-like mechanism where the bacteria first reach an equilibrium with the organic matter present and then take up oxygen to decompose that matter into CO_2 and water:



Where $bact$ is the number of microbial cells without reduced organic matter in their cytosol, $organics$ is the amount of organic matter as function of the oxygen required to be degraded, $bact_org$ represents the microbial cells with reduced organic matter in its cytosol and k_1 and k_{-1} are the forward and backward reaction kinetic rates respectively. k_2 is the kinetic rate for respiration, treated as an irreversible process, and O_2 is the amount of oxygen present, CO_2 and H_2O are the final products of the reaction.

Although this is oversimplifying what really goes on in the process, it suffices for the purpose of our model, which is the design of a microsystem.

Applying the steady-state approximation to the above mechanism yields the following rate equations for oxygen and organics:

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{-k_1k_2Bact_0 \cdot Organics \cdot O_2}{k_{-1} + k_2O_2 + k_1Organics} \quad (5)$$

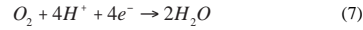
And

$$\frac{dOrganics}{dt} = Bact_0 \cdot Organics \left\{ \frac{[k_1(kOrganics + k_{-1})]}{k_{-1} + k_2O_2 + k_1Organics} - k_1 \right\} \quad (6)$$

Where: $Bact_0$ is the initial concentration of bacteria.

c) Electrode kinetics

The last part in our model is the electrochemical detection of oxygen at an electrode. The overall reaction is:



While equation 3 above describes mass transport of oxygen to the electrode, electron transfer is described by the Butler-Volmer equation and the current is calculated as:

$$I = nFD_{O_2} w \int_0^{x_e} \frac{\partial O_2}{\partial y} \Big|_{y=0} dx \quad (8)$$

Where w represents electrode width, and x_e electrode length, respectively. F is the Faraday constant, and D_{O_2} and n are the diffusion coefficient of oxygen and the number of electrons involved in the process.

Table 1 summarizes the values used for the different constants used in the simulations, and Table 2 summarizes the boundary conditions.

We followed a step-by-step approach to the simulation of this respirometer so that the main physical phenomena could be studied in isolation. First we looked at how oxygen crosses the membrane in an “infinitely” long respirometer. Next, we considered the consumption of oxygen at the biomass chamber and, last, we studied the best placement for the electrochemical oxygen sensor.

2.2 Meshing and accuracy

Meshing is crucial to Finite Element Methods (FEM) as it controls the accuracy of the results. [6] We are aware of the limitations of the method and have taken the steps to achieve results that are accurate to between 1% and 0.5% unless otherwise stated. Simulated currents were compared with those predicted by the Levich expression [7] for a microband inside a single microchannel.

In general, three model features forced us to work with a greater number of nodes, which increased the number of degrees of freedom in the simulations and the calculation requirements. The first was that the ratio between magnitudes in the x and y directions was about three orders of magnitude ($l=13$ cm versus $125 < h < 300$ μ m),

which means that to avoid the propagation of significant errors along the simulation domains we needed to work with very fine elements over an extensive domain. Another important factor was the need to minimize the sources of error in the calculation of oxygen fluxes across the membrane domain, where particularly fine meshes were used. The third region where a fine mesh was mandatory was at the electrode-solution boundary, where a strong oxygen concentration gradient exists and the flux of oxygen towards the electrode needs to be calculated with high accuracy. Taking the previous considerations into account, meshes ranging from 14×10^6 to over 45×10^7 triangular elements, with a minimum element quality ranging from 0.78 to 0.84, and an average mesh quality ranging from 0.98 to 0.99 were used in the different models. [8]

Last, simulations were run in COMSOL multiphysics v.4.1 running on Linux OpenSuse on a SUN X2200 M2 workstation (64 Gb RAM at 2,2 GHz clock speed dual Quad Core AMD Opteron 2354).

2.3 Modeling and procedure

To solve the problem under study, we first have solved the laminar flow of the electrolyte channel using a stationary approach. We have used a direct MUMPS solver with a relative tolerance of $1 \cdot 10^{-5}$.

Then we have introduced the results of this stationary solution as input solution for the time dependent solver. Here a MUMPS solver with an absolute tolerance of $1 \cdot 10^{-7}$, time stepping using BDF method with maximum order 3 has been used to solve the mass transport and oxygen reaction in the electrolyte channel, membrane and reaction chamber subdomains.

The electrode response has been directly calculated at the electrode boundary and an integration considering the z axis has been established to calculate the overall current generated in the electrode.

3. Results and discussion

3.1 Oxygen transport

One key requirement of any respirometric device is that oxygen supply does not limit the respiration rate of the biomass. In our system this means that oxygen transport across the membrane separating electrolyte and biomass

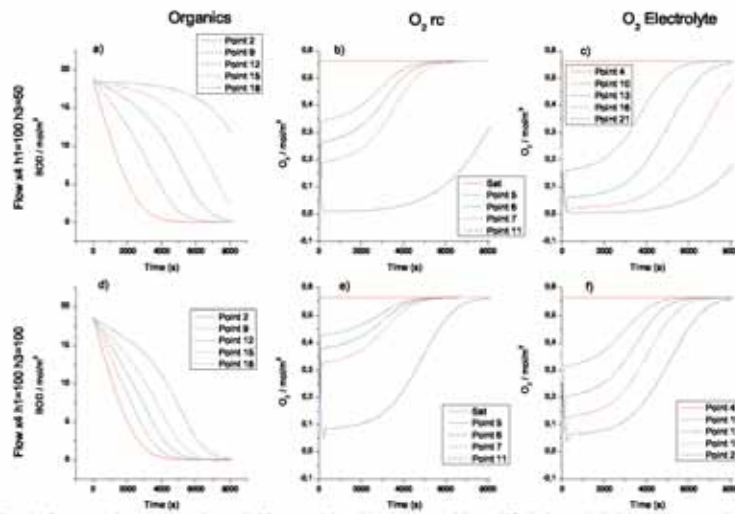


Fig. 2. Concentrations of organics and O₂ at models with reaction, with modified channels heights. Concentrations of organics and O₂ at models with reaction. The figure shows results for 300 mg/l (18,71 mole/m³) of BOD as initial loading of the device with flows of 0.60 l min⁻¹ and different h1 and h3, (a) and (d): concentration dynamics of BOD at reaction chamber; (b) and (e): concentration dynamics of O₂ at reaction chamber; (c) and (f): concentration dynamics of O₂ at electrolyte channel. See text for further details.

chambers is sufficiently fast to prevent the onset of anaerobic conditions in the biomass chamber. In this section we analyze data from the bottom of the biomass chamber because, as it is farthest from the membrane, it is where more limiting conditions may be found in a real system. Figure 1 shows a side-view diagram of the system where the various model features. The points highlighted show the locations where the concentrations of the different species were studied.

We studied three different thicknesses: 25, 75 and 200 microns. In this case the heights of the electrolyte and biomass chamber have been set equal to 100 microns, and the electrolyte flows with a linear velocity of 1 mm/s. These are all values that can be typically found in microfluidic devices. The effect of flow and respiration rates will be addressed separately.

To model the two materials, we played with their reported oxygen permeabilities and membrane thickness.

The higher permeability and the faster diffusion of oxygen displayed by PDMS membranes, brings about a fast drop in the oxygen concentration in the electrolyte channel until the biomass chamber fills up. Thus, the oxygen concentration profile advances at a similar velocity along the microchannel and inside the biomass chamber.

On the other hand, the lower oxygen diffusion rate across PTFE results in the biomass chamber gradually filling up more or less at the same rate everywhere, while oxygen is not significantly depleted anywhere in the electrolyte channel. In terms of membrane thickness, a set of three thicknesses that are either commercially available, have been chosen for the simulations: 25, 75 and 200 μm . The most obvious effect of increasing membrane thickness is the delay in diffusion time from the electrolyte channel into the biomass chamber. In fact, in the case of PTFE membranes, as membrane thickness increases beyond a certain limit, the oxygen concentration in the biomass chamber does not

reach the saturation level found in the electrolyte solution during the simulated time. PDMS membranes, on the other hand, see a response delay on increasing membrane thickness, but the oxygen supplied by the electrolyte eventually becomes fully available throughout the biomass chamber. In the next section, we study the behavior of this microrespirometric device when the biomass chamber contains a microbial population in contact with samples of different organic matter concentrations.

3.2 Respiration kinetics

In our model, the rate of respiration is a function of both oxygen and organic matter concentration available, as we consider a constant bacterial concentration set at 10^9 cfu mL⁻¹, and higher concentrations may be accessible when dealing with immobilized or highly agglomerated bacteria. The literature describes how the rate of organic matter degradation and, consequently, the rate of oxygen consumption, depend on the type and concentration of organic matter and on the type and growth (and so richness) of the microbial population, [1, 9, 10] so modulating the biomass concentration should provide some additional control over the respiration rate. On the other hand, having too high a concentration of bacteria may be counterproductive, as oxygen may be turned into a limiting factor regardless of electrolyte flow rate and oxygen concentration in it.

The three initial concentrations chosen for the organic matter correspond to three usual loadings found in real situations; a wastewater treatment plant discharge (30 ppm), typical urban waste water (300 ppm) and levels of 3000 ppm may be found in agricultural or industrial wastewaters.

In all cases, the oxygen concentration drops abruptly at the beginning of the measurement, but it gradually returns to the saturation value as the amount of organic matter in the biomass chamber disappears. Thus, by monitoring the oxygen concentration over time it is possible to estimate the biomass concentration, provided that we know the kinetics of the reaction. We will come back to this later on, as it is one of the main assumptions of the model, and is likely to become one of the main limitations of the physical system.

By increasing the oxygen concentration in the biomass chamber, increasing the electrolyte flow-rate also shortens the time to consume the organic matter present, and hence the analysis time. These results suggest that, by adjusting the electrolyte flow-rate and the channel length, it may be possible to ensure that there is enough oxygen in the biomass chamber to guarantee the reliability of the results. If the membrane is robust enough, we would recommend using higher flow rates (up to tens of μLmin^{-1}) to ensure that oxygen is never rate limiting.

In addition to electrolyte flow-rate, we also studied the effect of channel geometry, as it will also have an impact on the amount of oxygen available, and hence in the response time of the respirometer. Figure 2 presents data at an organics initial concentration of 300 mg/l, and a flow-rate of $0.6 \mu\text{Lmin}^{-1}$ for $h_3 = 50$ microns and $1.2 \mu\text{Lmin}^{-1}$ for $h_3 = 100$ microns, but with a) $h_1 = 100$ microns and $h_2 = 50$ microns, and b) $h_1 = 100$ microns and $h_2 = 100$ microns.

Channel sizes 100 microns and greater might allow the use of less stringent filtering steps and of bigger organisms, such as yeasts.

3.3 Oxygen detection

The respirometer presented in this article monitors oxygen concentration changes in the electrolyte channel. For practical reasons, the sensor needs to be placed at the top end of the electrolyte channel, so that it does not affect the rate of the bacterial respiration. This is because since oxygen is monitored via its reduction current, which means that it is partially depleted by the working electrode. This consumption of oxygen by the electrode is normally not an issue in large-scale devices, but in this miniaturized device the effect is not negligible.

This is shown in Figure 3, where a 75 micron-wide microband is placed near the inlet of a channel of heights ranging from 50 (a) up to 150 (c) microns. The figure shows how the presence of a working electrode affects the concentration of oxygen in the channel at a given flow-rate. The figure 3 shows how as the biomass has taken the oxygen it needs. An alternative way to decrease the relative amount of oxygen consumed by the electrochemical sensor and to increase the magnitude of the measured current, is to increase the electrolyte flow-rate. [11]

channel

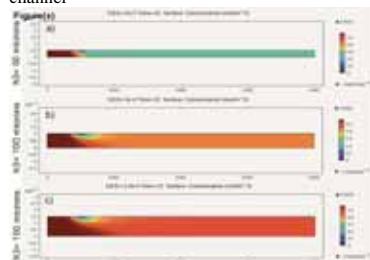


Figure 3. Electrode oxygen consumption profiles without reaction. Profiles of oxygen reduction during the amperometry process. Electrode length of 75 μm . (a) Channel of 50 μm height (h3), (b) channel of 100 μm height (h3), (c) channel of 150 μm height (h3).

Placing the sensor at the end of the electrolyte channel poses an additional advantage, as the biomass has had both more oxygen and more time available to react, and hence the oxygen concentration leaving the electrolyte channel is likely to be lower, which makes the rate of respiration easier to measure at low levels of organic matter. The curves to be analyzed must fulfill two key conditions: first, there needs to be a minimum concentration of oxygen throughout the experiment in order to prevent erroneous BOD readings. Second, the oxygen concentration drop should be sufficiently large for the data recorded by the sensor to be meaningful.

Oxygen reduction current signals will follow a typical Monod curve. First, the signal decays due to oxygen consumption of by microbes and the delay of channel recovering the inlet concentration, which is controlled by electrolyte flow-rate and oxygen diffusion across the membrane. Next, a pseudo-equilibrium establishes when the organic matter is present in excess and its degradation rate is kept more or less constant at this maximum. Last, the oxygen concentration comes back to the saturation level of oxygen once the organic matter has been consumed by the biomass. The total amount of oxygen consumed by the biomass can be easily established integrating over time the difference between the saturation concentration, which is the oxygen concentration entering the system, and the concentration measured by the sensor, until the oxygen saturation level is recovered.

This model predicts the current magnitude to range from a maximum value of 260 nA at oxygen saturation, down to about 20 nA when the oxygen concentration is at its expected minimum. These current values can be easily measured using a conventional potentiostat, so the construction of a system using the size specifications given here should be feasible.

4. Conclusions

We have designed a new concept respirometer for semi-continuous measurements of organic matter content in water samples using finite element simulations. In this system, the sample and the biomass are in a chamber on the other side of the membrane. In the presence of organic matter, the bacterial population uses oxygen as final electron acceptor, which transport rate across the membrane is key.

Oxygen transport to the biomass chamber needs to be fast to prevent the onset of anaerobic respiration and also to allow a rapid decomposition, and hence the estimation of the BOD content in the sample. The oxygen transport properties of PDMS make it a more suitable material than PTFE for the construction of respirometers when high organic loadings need to be analyzed, as thicker membranes may be used. In any case, oxygen supply may be controlled through the electrolyte flow-rate, which may in turn be used in the estimation of the BOD or of kinetic parameters related to the respiration.

The simulations presented here have yielded semi-quantitative answers before the physical device is constructed, such as (i) optimum thickness and diffusivity across membranes, (ii) effect of system geometry and flow velocities and, (iii) optimum sensor configuration. This information is extremely valuable for prototyping purposes, saving time and money, and helping to define the limits and main bottlenecks that can be expected to be found during subsequent implementation work.

Although this approach seems to allow for respiration monitoring, a real system will require the parallel use of several units such as the one described here, in order to know (i) the sensor reading of the sample in the absence of microbial population as a blank control, (ii) the basal respiration rate of the microbial population in the absence of sample or other organic matter, and

(iii) the respiration rate of the microbial population in the presence of a solution containing a known amount of organic matter, such as glucose or acetate, acting as an overall control. Additionally a study of correlation between this device results and other conventional techniques such as BOD₅ and COD must be done, to relate the results to the well-established analytical methods. Work is currently in progress to develop such a miniaturized system, which will be the subject of a separate publication.

5. References

A more exhaustive description of this work can be found at reference: Torrents et al. *Bichemical Engineering Journal* 66 (2012) 27-37

[1] J. Liu, B. Mattiasson, Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *Water Res.* 36 (2002) 3786–3802.
 [2] I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda, S. Suzuki, Microbial electrode BOD sensors, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 659–672 (vintage article).
 [3] O.N. Ponomareva, V.A. Arlyapov, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov, Microbial biosensors for detection of biological oxygen demand (a review), *Appl. Biochem. Microbiol.* 47 (2011) 1–11.
 [4] N. Godino, D. Dvila, N. Vigus, O. Ordeig, F.J. del Campo, J. Mas, F.X. Muoz, Measuring acute toxicity using a solid-state microrespirometer, *Sens. Actuators B:Chem.* 135 (2008) 13–20.
 [5] J. Leddy, A.J. Bard, J.T. Maloy, J.M. Saveánt, Kinetics of film-coated electrodes: effect of a finite mass transfer rate of substrate across the film-solution

interface at steady state, *J. Electroanal. Chem.* 187 (1985) 225–227.

[6] I.J. Cutress, E.J.F. Dickinson, R.G. Compton, Analysis of commercial general engineering finite element software in electrochemical simulations, *J. Electroanal. Chem.* 638 (2010) 76–83.
 [7] R.G. Compton, A.C. Fisher, P.J. Wellington, P.J. Dobson, P.A. Leigh, Hydrodynamic voltammetry with microelectrodes – channel microband electrodes – theory and experiment, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 10410.
 [8] W.B.J. Zimmerman, Multiphysics modelling with finite element methods (2006).
 [9] H. Spanjers, P.A. Vanrolleghem, G. Olsson, P.L. Dold, Respirometry in control of the activated sludge process, *Water Sci. Technol.* 34 (1996) 117–126.
 [10] J. Kappeler, W. Gujer, Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling, *Water Sci. Technol.* 26 (1992) 125–139.
 [11] J.A. Cooper, R.G. Compton, Channel electrodes – a review, *Electroanalysis* 10 (1998) 141–155.

6. Acknowledgements

The authors acknowledge funding through projects Microresp (PET2008-0165-01), MEDRA (TSI020100-2011-187), Bactotox (CTQ2009-14390-C02-01 and CTQ2009-14390-C02-02) and TRAGUA (CSD2006-00044). In addition, Albert Torrents is funded by a FPU scholarship (AP2008-03848).

7. Appendix

Table 1
Model boundary conditions

Fluid flow	Equations	Boundary
	$u = u(x, t)$	$x = 0, y_1 < y < y_2$
	$u = 0(t)$	$x = x(L, y_1, y_2, t) = 0$
	$p = 0$	$x = 1, y_1 < y < y_2$
Species transport	$\partial t = 0, t = 0$	$x = 0, y_1 < y < y_2$
	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = 0$	$x = x(L, y_1, y_2)$
	$\frac{\partial c_i}{\partial y} = 0$	$x = 0, y_1 < y < y_2$
	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = 0$	$x = 1, y_1 < y < y_2$
	$\frac{\partial c_i}{\partial y} = 0$	$x = x(L, y_1, y_2)$
Electrode kinetics	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = \frac{D_i}{\delta} \left[\frac{\partial c_i}{\partial x} \right]_{x=0} = \lambda_i [O_2]^{m_i} - \lambda_i [O_2]^{n_i}$	$\partial x = x(L, y_1, y_2)$
	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = \frac{D_i}{\delta} \left[\frac{\partial c_i}{\partial x} \right]_{x=0} = \lambda_i [O_2]^{m_i} - \lambda_i [O_2]^{n_i}$	$\partial x = x(L, y_1, y_2)$
	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = \frac{D_i}{\delta} \left[\frac{\partial c_i}{\partial x} \right]_{x=0} = \lambda_i [O_2]^{m_i} - \lambda_i [O_2]^{n_i}$	$\partial x = x(L, y_1, y_2)$
	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = \frac{D_i}{\delta} \left[\frac{\partial c_i}{\partial x} \right]_{x=0} = \lambda_i [O_2]^{m_i} - \lambda_i [O_2]^{n_i}$	$\partial x = x(L, y_1, y_2)$
	$\frac{\partial c_i}{\partial x} = \frac{D_i}{\delta} \left[\frac{\partial c_i}{\partial x} \right]_{x=0} = \lambda_i [O_2]^{m_i} - \lambda_i [O_2]^{n_i}$	$\partial x = x(L, y_1, y_2)$

Table 2
Parameters and values used in the models

Parameter	Description	Value			Units	Source
		in effects ^a	Reaction ^b	Electrical ^c		
Geometry						
h_1	Height of reaction chamber	50	50	50-100	mm	This work
h_2	Tightness of membrane	25-75-200	25	25	10^{-4} m	This work
h_3	Height of electrolyte channel	50	50	50-100-150	10^{-4} m	This work
l	Total length	0.13	0.05	0.05	m	This work
Mass transport						
u_0	Mean fluid velocity	40	4.8-12-16	-	10^{-4} m/s	This work
T	Temperature	293.2	293.2	293.2	K	This work
Sat	Salinity	5	5	5	kg/m ³	This work
Sat	Oxygen at saturation	0.5631	0.5631	0.5631	mole/m ³	[44]
$c_{O_2,chan}$	Initial concentration of O ₂ at channel	Sat	Sat	Sat	mole/m ³	This work
$c_{O_2,rc}$	Initial concentration of O ₂ at reaction chamber	0	0	0	mole/m ³	This work
$c_{O_2,BOD}$	Initial concentration of BOD at reaction chamber	-	30-300-2,000	300	g/m ³	This work
$D_{O_2,w}$	Diffusion coefficient of O ₂ in water	2.5×10^{-9}	2.5×10^{-9}	2.5×10^{-9}	m ² /s	[45]
$D_{O_2,m}$	Diffusion coefficient of O ₂ in the membrane	3.0 PDM5	3.0 PDM5	3.0 PDM5	m ² /s	[10, 40]
$D_{BOD,w}$	Diffusion coefficient of BOD in water	0.015 PTE	-	-	m ² /s	[10, 31]
$D_{BOD,m}$	Diffusion coefficient of BOD in the membrane	-	1×10^{-9}	1×10^{-9}	m ² /s	This work
$D_{O_2,m}$	Diffusion coefficient of O ₂ in the membrane	-	0	0	m ² /s	This work
Reactions						
$bact$	Bacterial concentration	-	1×10^{11}	1×10^{11}	cells/ml	This work
$cmrh_{max}$	Bacterial maximum respiration rate	-	1.04167×10^{-11}	1.04167×10^{-11}	mol O ₂ /s	[77]
k_1	Equation XX forward constant	-	1×10^7	1×10^7	1/s	This work
k_{-1}	Equation XX backward constant	-	5×10^7	5×10^7	1/s	This work
k_2	Equation XX forward constant	-	1.25×10^6	1.25×10^6	1/s	This work
Electrical model						
$c_{0,K}$	Initial concentration of K at channel	-	-	1×10^{-7}	mole/m ³	This work
n	Number of electrons in the reaction	-	-	1	-	This work
E_0	Standard potential	-	-	0	V	-
$D_{K,w}$	Diffusion coefficient of K in water	-	-	2.5×10^{-9}	m ² /s	-
k_0	Electronic transference constant	-	-	1	m/s	-
α	Charge transference coefficient	-	-	0.5	-	-
E_{eq}	Equilibrium potential, 0.8	-	-	0.3026	V	-
j_0	Exchange current density	-	-	2.373×10^{-4}	A/m ²	-

^a Models on membrane effects.

^b Models with reactions.

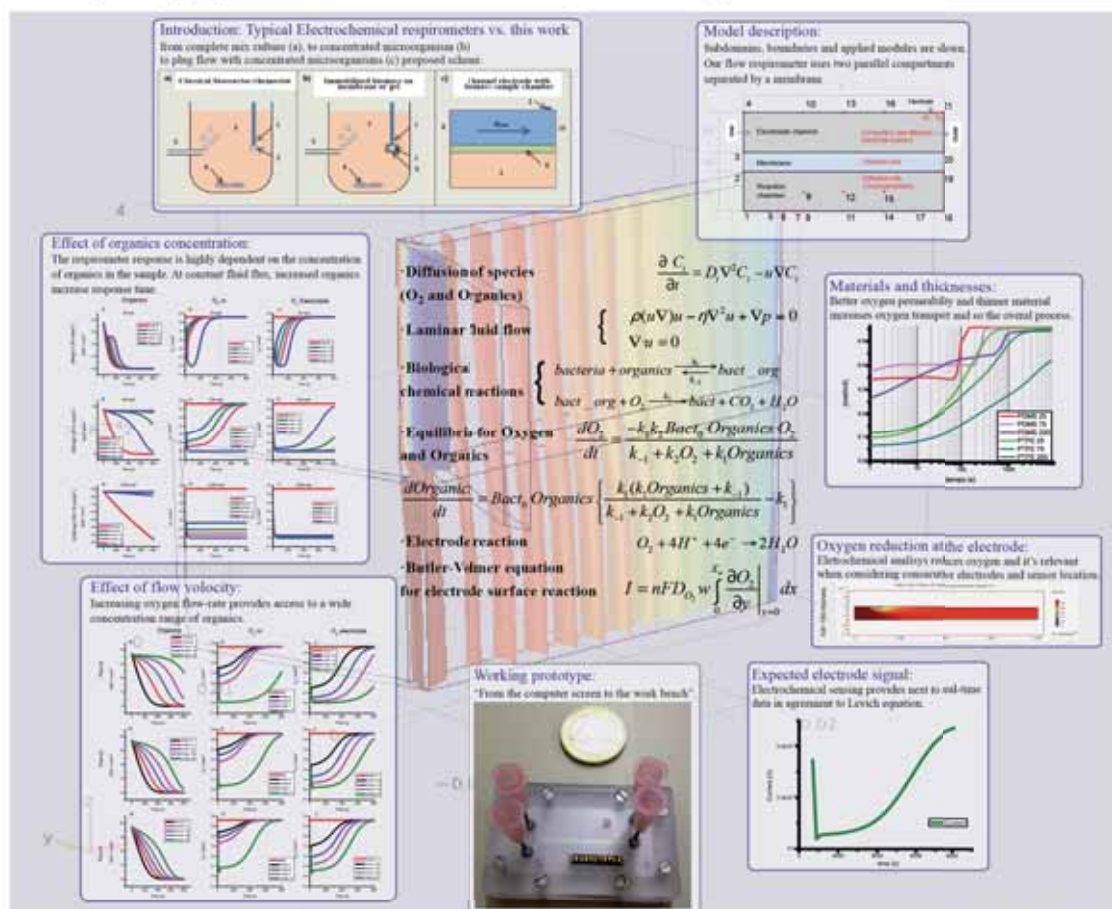
^c Models with reactions and electrode.

DESIGN OF A MICROFLUIDIC RESPIROMETER FOR SEMI-CONTINUOUS AMPEROMETRIC SHORT TIME BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND (BOD_{ST}) ANALYSIS

Albert Torrents^a, Jordi Mas^b, Francesc Xavier Muñoz^a, Francisco Javier del Campo^{a*}

^a Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Campus Universidad Autónoma de Barcelona – Bellaterra, Barcelona, Spain.
^b Universidad Autónoma de Barcelona Departamento de Genética i Microbiologia, Campus Universidad Autónoma de Barcelona – Bellaterra, Barcelona, Spain.
 * Corresponding author: javier.delcampo@csic.es

- This work presents the design of a miniaturized electrochemical respirometer to monitor organic content in water samples semi-continuously, in contrast to current Biochemical Oxygen Demand, BOD, methods.
- We demonstrate the use of finite element method simulations as design tool for a novel concept microfluidic respirometer. The device is based on a flow cell separated by a thin membrane from a bioreactor.
- Simulations aided in the choice of membrane materials and thicknesses so that oxygen supply rate still provides sufficient flexibility to allow the measurement of samples spanning a very wide range of organic matter concentrations.
- The design presented here uses an electrochemical oxygen sensor, and the whole system is amenable to fabrication using standard microfabrication and rapid prototyping techniques.
- Following simulation results, the system can provide a good estimate of organic content in samples in about 1 hour of running in contrast to current BOD methods that need 5 days for results.
- The system targets process control in waste-water treatment and food technology.



Simulations build using COMSOL Multiphysics.

This work has been funded by the MEDRA project (TS1-021090-2011-187)



ANNEX 2: PATENT DEL SENSOR DE LA DBO

En aquest annex, es presenta la patent obtinguda amb el desenvolupament del dispositiu de mesura ràpida de la DBO.

Aquesta patent no es refereix tant al dispositiu en si dissenyat, com a aspectes del procés de fabricació i a un enfocament més global de d'anàlisi electroquímica, on es reivindica entre altres coses el disseny proposat que permet separar l'elèctrode sensor i l'electròlit de suport de la zona de mostra, fet que hauria de revertir en una millora de la sensibilitat del sensor.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201231642	
Fecha de recepción:	25 octubre 2012, 11:23 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	294	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) - 90%	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	CELDA DE FLUJO, CARCASA PARA ALOJAR LA CELDA DE FLUJO Y USOS DE LA CELDA Y CARCASA.	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (11 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Resumen.pdf (1 p.) Dibujos.pdf (7 p.) OLF-ARCHIVE.zip POWATT.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	25 octubre 2012, 11:23 (CEST)	
Codificación del envío:	2B:D9:2D:47:DD:C6:C9:E4:AB:B6:A4:A8:DE:D4:1C:72:C9:D8:B6:72	

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPANOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) - 90% España ES Q2818002D SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX:	UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA - 10% España ES Q0818002H Campus Universitat Autònoma Barcelona, Edifi A - 08193 CERDANYOLA DEL VALLES BARCELONA 08 Barcelona 08193 España ES

PERSONA DE CONTACTO:		
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	TORRENTS SALLENT ALBERT España ES
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	DEL CAMPO GARCÍA FRANCISCO JAVIER España ES
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	BALDRICH RUBIO EVA España ES
(7-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	SABATÉ VIZCARRA MARÍA NEUS España ES
(7-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	MAS GORDI JORDI España ES
(8) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		CELDA DE FLUJO, CARCASA PARA ALOJAR LA CELDA DE FLUJO Y USOS DE LA CELDA Y CARCASA.
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:		

	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: UNGRIA LOPEZ NOMBRE: JAVIER CÓDIGO DE AGENTE: 0392/1 NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: AVDA. RAMON Y CAJAL, 78 LOCALIDAD: MADRID PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28043 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: oepm@ungria.es NÚMERO DE PODER: 201101882-1º TITULAR	
(17) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 11 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 19 DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 10 RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de figura(s): 1 ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: ARCHIVO PARA LA BÚSQUEDA DE LS: <input type="checkbox"/> OTROS (Aparecerán detallados): <input type="checkbox"/>	
(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(19) NOTAS:		
(20) FIRMA:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N MADRID 25 Octubre 2012

RESUMEN

- Celda de flujo que comprende al menos un canal a través del cual circulan fluido, láminas apiladas donde alguna de las láminas tiene una ranura longitudinal pasante que define los canales de la celda, siendo las ranuras de las láminas independientes y parcialmente coincidentes entre ellas. Comprende además orificios de entrada y salida de los fluidos en las láminas, estando situados los orificios en correspondencia con los extremos de las ranuras, elementos pasivos integrados en la cara interna de una lámina, cara interna que actúa como pared de uno de los canales y un electrodo auxiliar situado en el interior de uno de los canales. Dispone también de una membrana permeable entre las ranuras para el intercambio de sustancias entre los fluidos de los canales.
- 5
- 10

DESCRIPCIÓN

Celda de flujo, carcasa para alojar la celda de flujo y usos de la celda y carcasa.

5 **Objeto de la invención**

Se describe una celda de flujo miniaturizada, fabricada íntegramente en materiales poliméricos laminados y con microelectrodos integrados para la realización de medidas electroquímicas. También se describe la carcasa que permite comunicar la celda con la instrumentación de control necesaria para su correcto uso.

10 Aunque la aplicación para la que se ha desarrollado es la medida de la actividad respiratoria de una población microbiana, este sistema puede tener aplicación en muchos otros ámbitos donde (i) sea necesaria la realización de medidas electroquímicas en casos donde la muestra sea escasa, (ii) cuando la matriz de la muestra sea compleja y haya riesgos de pasivar los electrodos de medida, o bien (iii) cuando sea necesaria la separación de la muestra del medio de medida. Por último, la construcción de la celda

15 aquí descrita también puede emplearse para la integración de electrodos de referencia en sistemas de medida en flujo.

Los principales sectores de la técnica en los que la presente invención es aplicable son el químico, el alimentario, el diagnóstico, y el medioambiental.

20

Principalmente se ha previsto para su aplicación en el control de plantas depuradoras de aguas, aunque la aplicación también será de interés en casos en los que interese determinar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO).

25 La invención objeto de esta memoria tiene particular relevancia dentro del ámbito del electroanálisis. La invención puede tener alcance principalmente en entornos donde se utilicen técnicas voltamperométricas, como la voltametría cíclica o la amperometría, aunque también puede aplicarse para la realización de medidas amperométricas o técnicas de medida ópticas. Puede emplearse en sectores tan dispares como el control de aguas, el diagnóstico clínico, o seguridad alimentaria donde sea necesaria la determinación

30 de metales pesados o de parámetros electroactivos de interés analítico de forma directa, pero también podría servir para realizar medidas indirectas. También puede emplearse como base para la construcción de nuevos biosensores en flujo (de muestra) continuo.

35 **Antecedentes de la invención**

La miniaturización de sistemas electroquímicos es un campo en rápida expansión. Además de las ventajas inherentes de ahorro de espacio y recursos debido a la miniaturización misma, algunos sistemas electroquímicos miniaturizados ofrecen otras ventajas tales como el aprovechamiento de las condiciones de flujo laminar originadas por la microfluidica, como son el comportamiento laminar del fluido o el no

40 requerimiento de agitación debido a que por su reducido tamaño la difusión química permite un rápido y homogéneo mezclado de los componentes en el seno del fluido.

En este sentido, cabe destacar los trabajos patentados por Brewer et al. (US2003/0186426 A1), donde se utiliza la microfluidica para poner en contacto diversos fluidos sin necesidad de disponer de membranas entre ellos. En estos sistemas, la mezcla entre disoluciones se produce mediante la difusión de los

45 componentes de unas y otras disoluciones en contacto, pero no hay mezcla macroscópica de los fluidos en contacto.

Dentro del estado de la técnica de la presente invención se han diferenciado 2 campos principalmente. Dichos campos son los siguientes: sistemas de medida en flujo (electroquímica y óptica) y sistemas que

50 incluyan agentes biológicos como parte integral del proceso de medida (BioMEMS):

- Sistemas de medida en flujo (electroquímica y óptica):

55 El objeto de la presente solicitud se centra en el ámbito conocido como "electrodos de canal", que forman parte de la familia de técnicas electroquímicas conocidas como "hidrodinámicas". Los "electrodos de canal" engloban todo tipo de sistemas en los que uno o varios electrodos, o microelectrodos, están ubicados dentro de un canal por el que circula una disolución (Cooper, J. A., et al., Electroanalysis 1998, 10, 141-155). La sección del canal suele ser circular, cuadrada o rectangular. La ventaja de este tipo de

60 sistemas radica en la posibilidad de establecer un flujo laminar en el líquido que mejora el transporte de materia al electrodo, aumentando de este modo la sensibilidad y la señal de los electrodos dispuestos en el canal. Además, la presencia de un flujo laminar permite predecir el perfil de velocidades del líquido en la superficie del canal, donde se encuentran los electrodos. En esas condiciones, si los electrodos se encuentran polarizados a un potencial tal que se produzca la oxidación o la reducción de especies disueltas, el gradiente de concentración y la capa de difusión resultantes serán independientes del tiempo, y el resultado será la medida de corrientes estacionarias proporcionales a la concentración del analito que se desee medir. Estas corrientes son muy estables y reproducibles.

65

La mayoría de los sistemas electroquímicos para medidas en continuo o en flujo consisten en electrodos con forma de banda ubicados en la pared de un canal de sección cuadrada o rectangular. Estos sistemas suelen estar fabricados de forma híbrida. En muchos de ellos, los electrodos están fabricados a partir de láminas delgadas de metal, en la mayoría de los casos oro o platino, que son fijadas mediante adhesivos o resinas a un sustrato aislante que puede ser de plástico o vidrio. Otra posibilidad es la fabricación de los electrodos mediante técnicas de microfabricación estándar sobre sustratos de silicio, cuarzo, u otros materiales. La celda de flujo se completa fijando sobre este conjunto formado por los electrodos y su sustrato, el resto del canal. Para evitar la aparición de fugas de líquido entre las dos piezas, se suelen utilizar sellantes o bien juntas elásticas. Otra posibilidad existente es que el canal esté fabricado en un material elástico, como el polidimetilsiloxano, PDMS, de manera que la misma pieza cumple las funciones de canal y de junta. Estos sistemas suelen ser de tipo casero y, por lo general bastante voluminosos. También se han encontrado en el estado de la técnica sistemas fabricados mediante técnicas de prototipaje rápido, como el uso de impresoras 3D.

Más recientemente, han aparecido sistemas electroquímicos para medidas en flujo realizados sobre sistemas poliméricos laminados, aunque ninguno con el nivel de sofisticación del sistema objeto de la presente solicitud. En 2009, Illa et al. describieron una celda de flujo fabricada en un polímero cicloolefínico (COP) que presentaba microelectrodos de oro, para medidas en flujo. En ese trabajo, la celda de flujo constaba de dos partes. Por un lado, los electrodos se definieron mediante un proceso de fotolitografía sobre una lámina de COP, mientras que el canal se fabricó mediante la técnica de "hot embossing" a partir de un máster de silicio y láminas de COP. Las dos tapas que conformaban el sistema se soldaron covalentemente en un proceso de prensado térmico (Illa, X., et al., Lab on a Chip 2010, 10, 1254-1261), y el sistema presentaba la ventaja, gracias al material empleado, de poder realizar medidas en medios orgánicos. Recientemente, se ha desarrollado un sistema de flujo también íntegramente basado en el uso de láminas de COP, aunque la soldadura se lleva a cabo mediante el tratamiento del COP con vapores de ciclohexano (Del Campo, F. J. et al., Electrophoresis 2012, 33, 1-8, doi: 10.1002/elps.201200225).

Por otro lado, el uso de materiales autoadhesivos para la realización de sistemas fluidicos también está descrito en la bibliografía, (Vasily N. Goral en la revista Lab on a Chip), donde se describe la fabricación de dispositivos microfluidicos utilizando técnicas de prototipaje rápido como las descritas en la presente invención. En ese trabajo se describe la realización de un sistema sencillo basado en tres capas de material (dos tapas y un nivel autoadhesivo en el que están dispuestos los microcanales), y otro más complejo en el que se demuestra la posibilidad de desarrollar dispositivos microfluidicos tridimensionales por los que el líquido puede hacerse fluir tanto vertical como horizontalmente. Sin embargo, ninguno de los dispositivos encontrados hasta la fecha demuestran o sugieren la posibilidad de realizar extracciones de sustancias de un líquido a otro mediante el uso de membranas. Cabe destacar que en el estado de la técnica encontrado en el que se utilizan materiales laminados no se mencionan explícitamente los métodos ni las técnicas seguidas para el correcto alineamiento de los distintos niveles de material utilizados.

Existen celdas de flujo duales en las que dos canales se separan por una membrana. Por ejemplo, sistemas en los que se presenta una celda de doble canal que separa un líquido de un gas (Lawrence, N. S. et al., Sensors Actuators B: Chem. 2000, 69, 189-192). Otro ejemplo lo constituyen las celdas empleadas para diálisis, o para el desalado de aguas y la recuperación de iones de efluentes industriales. En estos sistemas se pueden separar varias disoluciones mediante membranas selectivamente permeables a iones. Estas membranas semipermeables permiten el paso selectivo de aniones o cationes, y pueden ser además monovalentes (iones de carga +1 ó -1) o polivalentes (iones de carga superior a +1 ó inferior a -1). También es posible emplear membranas sin selectividad por la carga de las especies que las atraviesan, como podría ser el caso de las membranas de diálisis o de membranas permeables a gases. Sin embargo, dadas sus áreas de aplicación, hasta la fecha las celdas de flujo con membranas son relativamente grandes y voluminosas, con el fin de aumentar el rendimiento de los procesos en cuestión. En el caso de la presente invención, la celda dual que se propone se caracteriza precisamente por su carácter miniaturizado. Esta celda es plana, transparente, y flexible. Además, gracias a los materiales y a la técnica de montaje, es posible acoplar sensores u otros elementos de distintos tamaños, como electrodos, elementos de microprocesado, pantallas planas y, en general, cualquier dispositivo o componente con una superficie plana o adhesiva.

- Sistemas que incluyan agentes biológicos como parte integral del proceso de medida (BioMEMS):

Es una tendencia que cobra cada vez mayor relevancia la integración de sistemas que integren los microprocesos con elementos biológicos. Estos pueden ser de muy diversa naturaleza, como es el caso de anticuerpos para la fijación de compuestos altamente específicos o el seguimiento de muestras (por ejemplo células madre o tejidos) o poblaciones biológicas.

Puede ser buen ejemplo de ello las diferentes técnicas de medida de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO). Este análisis, ampliamente utilizado en el control de calidad del tratamiento de aguas residuales, protección ambiental y control de procesos, se basa en la medida del consumo de oxígeno de una muestra puesta en contacto con una población microbiana.

5

Son por tanto sistemas que se basan en la reacción y crecimiento de una población biológica expuesta a una situación determinada. Habitualmente estos sistemas presentan dos grandes retos ante los cuales se han propuesto diferentes soluciones:

10 - Incremento de la densidad de microorganismos: Puesto que el análisis se basa en medidas más o menos directas del metabolismo, una mayor concentración de organismos permiten obtener medidas más rápidas (en otras palabras, incrementar la población en un factor de diez en una medida de la DBO, incrementará la respiración y consiguientemente el consumo de oxígeno en la misma medida, dando como resultado una reducción del tiempo de análisis en magnitud equivalente).

15

- Conocimiento de la densidad de microorganismos activos presentes o biomasa: Otra consecuencia, estrechamente relacionada con lo comentado en el punto anterior, es que debido a los procesos dinámicos que determinan el crecimiento y consiguientemente la concentración o densidad de agentes biológicos en el sistema de medida resulta difícil conocer con precisión esta biomasa lo cual es un factor clave para conocer la validez de los resultados obtenidos.

20

Formas en el estado de la técnica de abordar los problemas comentados:

25 • Medida clásica de la DBO: A fin de obtener resultados reproducibles, el protocolo estándar de la analítica de la DBO establece que se debe dar a la muestra un periodo de "aclimatación" a fin de que se desarrollen las poblaciones de microorganismos presentes con la idea que lleguen a sus máximos de población antes de empezar las medidas.

30 • Predeterminación de especies presentes: Otro enfoque tradicional que se utiliza conjuntamente a lo descrito anteriormente, es el añadido de poblaciones de microorganismos de especies predeterminadas, con el fin de incrementar la similitud entre diferentes análisis y mejorar la reproducibilidad de la medida.

35 • Sistema de medida rápida de la DBO: Estos métodos han intentado tener en cuenta los limitantes comentados en los dos puntos anteriores desde diferentes enfoques como son la introducción de la muestra en un cultivo rico de microorganismos, lo que permite tanto conocer las especies biológicas principales presentes como asegurar que están en su máximo de densidad para unas condiciones dadas, como es el caso de la medida por electrodo tipo Clark clásico. O incluso colocando en la proximidad del electrodo un "stack" o "sándwich" pre-elaborado de bacterias en una matriz de material polimérico o entre membranas. Con esto se consigue tener un mayor control de las especies biológicas presentes así como reducir el tiempo de análisis, puesto que en estas condiciones artificiales se puede incrementar la densidad de agentes biológicos, acelerando el ritmo de respiración y en consecuencia el proceso.

40

La determinación de la Demanda Bioquímica de oxígeno (BOD) en muestras de agua consiste en la medida de la oxidación de la materia orgánica llevada a cabo por organismos vivos (bacterias, levaduras y hongos) en unas condiciones bien definidas y por un tiempo determinado (Spanjers, H. et al, Respirometry in control of the activated sludge process: Principles, International Association on Water Quality, London 1998).

45

Un análisis típico de la DBO implica la colocación de la muestra en un reactor biológico sellado a gases y en oscuridad, el cual es inoculado con una población microbiana, nutrientes limitantes y un exceso de oxígeno. Pasado un tiempo de adaptación, se determina el oxígeno consumido durante un periodo determinado (típicamente de 5 días o DBO5). Esto permite relacionar el oxígeno consumido con la carga orgánica presente al inicio del experimento, asumiendo que en todo momento ha habido oxígeno disponible y la degradación de la materia orgánica se ha realizado con metabolismo aeróbico.

50

La extensión en el tiempo de este análisis lo hace oneroso y poco adecuado para procesos de control que requieren respuestas lo más rápidas posibles (por ejemplo en la gestión de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), o en el seguimiento de un vertido en el medio), lo que abre una ventana de oportunidad para el desarrollo de métodos más rápidos.

55

Alternativamente se ha utilizado tradicionalmente el análisis de la DQO (Demanda Química de Oxígeno), en el cual la población microbiana se sustituye por un agente químico fuertemente oxidante (por ejemplo permanganato potásico o productos similares), proceso que permite reducir el tiempo de análisis a unas pocas horas. El principal inconveniente de la determinación de materia orgánica mediante la DQO es que al eliminar la parte biológica del experimento se pierde información capital del análisis en comparación a la DBO, puesto que la muestra puede por ejemplo contener materiales tóxicos para los agentes biológicos que de esta forma no se detectarían o la muestra pueda contener compuestos recalcitrantes o de lenta

60

65

degradación que también quedarían ocultos en este tipo de análisis.

5 Es por ello que habitualmente en medidas de control administrativo se requiere la realización de ambos análisis a fin de poder comparar los resultados y conocer mejor la naturaleza y estado de la muestra (por ejemplo en el seguimiento de vertidos de una EDAR).

10 El primer sensor rápido de la DBO fue presentado por Karube et al. en el año 1977 y refinado posteriormente en 1993 (Hyun, C. K. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 41, 1107-1111). Aquel dispositivo se basaba en inmovilizar una población microbiana en una membrana de colágeno emplazada en contacto con un electrodo para la detección de oxígeno. El método de Karube se mostró capaz de proporcionar una buena estimación de la DBO en el plazo de una hora. Desde entonces, se han llevado a cabo diferentes aproximaciones a fin de intentar reducir tanto el tiempo de análisis como el tamaño físico de la instrumentación necesaria. Los llamados "métodos rápidos de DBO" (Ponomareva et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011, 47, 1-11) se pueden clasificar en función de (i) la relación entre la población microbiana y la muestra, y de (ii) si la población microbiana comprende un solo tipo de organismo o una mezcla de diferentes especies.

15 Conforme a estos criterios, la mayoría de los métodos se basan en la inmovilización de una población bacteriana mixta en la proximidad de un sensor de oxígeno que puede funcionar tanto por medida electroquímica como, más recientemente, óptica.

20 Otros sistemas se basan en el uso de bioreactores en los que la muestra a analizar y la biomasa microbiana se mezclan, y se introduce un sensor de oxígeno a fin de seguir la concentración de oxígeno en el tiempo (Wang, J. et al., *Biosens. Bioelectron.* 2010, 25, 1705-1709). En ambas aproximaciones se requiere un aporte suficiente de oxígeno tal que el sensor pueda medir una señal máxima en ausencia de respiración o degradación por parte de los microorganismos.

25 Los sistemas de biomasa inmovilizada permiten medidas más rápidas debido a la mayor concentración de microorganismos respecto a la alcanzada en un bioreactor o quimiostato, pero son menos reproducibles y requieren el calibrado individual de la membrana o biofilm construido. Por otro lado, los sistemas operados en un bioreactor son más estables y fiables, pero más voluminosos que los de tipo biosensor y consiguientemente, menos adecuados para medidas de campo.

30 En la actualidad son conocidos pocos sistemas miniaturizados para la medida de la DBO. El sistema más destacable es el realizado por Cho (US 7666285B1), que utiliza materiales poliméricos para dar lugar a un dispositivo desechable. Este dispositivo presenta dos cámaras gemelas con sendos detectores electroquímicos de oxígeno. Los electrodos se hallan protegidos mediante una membrana de silicona, y uno de ellos además se modificó con un gel de agar que contenía la levadura conocida como *Trichosporon Cutaneum*. El funcionamiento de ese sistema difiere del presentado aquí en que mientras el sistema de Cho podría considerarse un biosensor, el aquí descrito es un bioreactor miniaturizado. Además, en el caso del sistema de Cho, las dos cámaras son realmente independientes mientras que en el sistema que se presenta aquí, las dos cámaras están en contacto a través de una membrana.

45 Descripción de la invención

50 La presente invención describe una celda de flujo planar y flexible compuesta de varias capas de material, incluyendo elementos sensores, quedando dichas capas perfectamente alineadas entre sí. También se describe la carcasa que contendrá la celda de flujo y que servirá de interfaz entre ésta y la instrumentación de control necesaria disponiendo la mencionada carcasa de todos los elementos necesarios para conectar, tanto eléctrica como fluidicamente la celda con la instrumentación de control. También se han descrito diversos usos tanto de la celda como de la carcasa.

55 Así, un primer objeto de la presente invención se refiere a una celda de flujo que comprende al menos un canal discurriendo a través de cada uno de ellos al menos un fluido. Dicha celda comprende al menos:

60 - una pluralidad de láminas apiladas. Las láminas al menos comprenden una lámina superior, una lámina inferior y al menos dos láminas intermedias. A su vez, cada una de las láminas intermedias presenta una ranura longitudinal pasante que define los canales de la celda. Dichas ranuras de las láminas intermedias son independientes y parcialmente coincidentes entre ellas de manera que el fluido circula por ambas ranuras desde el punto por donde entra dicho fluido en la celda hasta el punto por el que sale. La invención puede ampliarse para incorporar tantas láminas intermedias apiladas como se desee;

65 - un orificio pasante de entrada del fluido y un orificio pasante de salida del fluido en cada lámina intermedia y las láminas situadas sobre ella. Los orificios se sitúan respectivamente y en correspondencia con los extremos de las ranuras pasantes;

- al menos un elemento pasivo integrado en la cara interna de una lámina seleccionada entre la lámina superior, la lámina inferior y una combinación de ambas. Dicha cara interna actúa como pared de uno de los canales. La estructura del elemento pasivo es tal que permite el paso de al menos dos fluidos

- diferentes. El elemento pasivo al menos comprende un electrodo de trabajo; y,
- un electrodo auxiliar situado en el interior de uno de los canales.
- 5 En una realización particular de la presente invención, la celda de flujo comprende una membrana permeable dispuesta entre cada dos láminas intermedias, definiendo así diferentes canales para cada una de las ranuras de las láminas intermedias que separa. Dicha membrana permitirá, en función de su naturaleza, el intercambio de diversas sustancias entre los fluidos de cada uno de los canales. En función de la cantidad de láminas intermedias apiladas y de membranas que las separen, se conseguirá obtener celdas de flujo multicanal con un número variable de canales independientes. El hecho de disponer de
- 10 varios canales, que corren paralelos, permite la manipulación de varios fluidos diferentes. El número de fluidos que se podría llegar a manipular es variable dependiendo de la aplicación y del número de canales independientes que se apilen.
- 15 A modo general y sin que ello suponga una restricción, el que se empleen sistemas que contengan membranas o no dependerá de la naturaleza del fluido que vaya a circular por los canales. Si por dichos canales circula una muestra que por ejemplo pueda contener materia orgánica u otros compuestos que puedan perjudicar el buen funcionamiento del sistema de medida (elemento pasivo con electrodos) se empleará dicha membrana que actuará como filtro, dejando pasar únicamente aquellos compuestos que se deseen medir, mientras que si los fluidos no presentan componentes que puedan afectar al sistema de
- 20 medida no se hará necesario la inclusión de dichas membranas.
- 25 En otra realización preferente de la presente invención, el elemento pasivo comprende al menos un sensor de medida. Y más preferentemente, el sensor de medida comprende un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo. Preferentemente se ha previsto que los electrodos se hayan fabricado utilizando una técnica de evaporación por haz de electrones combinada con fotolitografía y un grabado húmedo del metal sobrante, sin embargo, los electrodos también pueden fabricarse mediante otras técnicas de depósito de capas finas, como la pulverización catódica (sputtering), o el depósito de vapor químico (Chemical Vapour Deposition). En cuanto a la definición de las estructuras que conformarán dichos electrodos, preferentemente se ha previsto el uso de la técnica de fotolitografía y grabado, aunque
- 30 también es posible realizarlos mediante fotolitografía y lift-off, y mediante depósito a través de máscaras o stencils. Además, los electrodos también se podrían fabricar mediante técnicas de impresión y mediante técnicas serigráficas. El sustrato que contiene los elementos sensores, que en esta realización particular son electrodos, sirve de base sobre la que se construye la celda de flujo mediante el apilamiento de las distintas capas, es decir hace de lámina inferior sobre la que se apilan el resto de láminas y
- 35 membranas que conforman la celda.
- 40 En otra realización preferente de la presente invención, las láminas y membranas se fijan entre sí mediante medios adhesivos. Dicha celda está construida alternando láminas de materiales plásticos. Se combinan capas de materiales adhesivos con otros no adhesivos, lo cual confiere una enorme facilidad de montaje y flexibilidad funcional al conjunto. Al emplear capas autoadhesivas se consigue sellar e impermeabilizar de manera muy eficaz el canal, y se prescinde del uso de disolventes y de altas temperaturas en la fase de montaje típicas en otros dispositivos de tipo "lab-on-a-chip".
- 45 En otra realización preferente de la presente invención, la celda comprende unos accesos fluidicos, entendiéndose por accesos fluidicos las conexiones de la carcasa con la celda a través de los se introducen y se sacan los diferentes fluidos, a la entrada y salida de cada uno de los canales, donde el acceso fluidoico de salida del canal donde se sitúa el elemento pasivo es de metal actuando como electrodo auxiliar.
- 50 En otra realización preferente de la presente invención, el acceso fluidoico de entrada del canal donde se sitúa el elemento pasivo es de metal actuando como electrodo de referencia.
- 55 En otra realización preferente de la presente invención, los electrodos se disponen de manera que el fluido circula por el electrodo de referencia, el de trabajo y finalmente por el auxiliar. La mayoría de las medidas voltamperométricas requieren el uso de tres electrodos: un electrodo de referencia, el electrodo de trabajo o sensor, y un electrodo auxiliar que cierra el circuito. La corriente circula entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, mientras que el electrodo de referencia sirve sólo para poder controlar el potencial de polarización del electrodo de trabajo. Habitualmente se integran los tres electrodos en el mismo elemento pasivo (también llamado chip a lo largo del documento). Sin embargo, la presente invención contempla la integración sólo de los electrodos de referencia y de trabajo en el chip, y la colocación del electrodo auxiliar fuera de éste, colocado tras los electrodos de referencia y de trabajo. Es decir, la disolución fluye de manera que primero se encuentra con el electrodo de referencia, luego encuentra el de trabajo y, por último, el electrodo auxiliar. Esto es así para evitar que los procesos que tengan lugar en el electrodo auxiliar puedan interferir con los otros electrodos.
- 60
- 65 Al separar el electrodo auxiliar de los electrodos de referencia y de trabajo, poniéndolo fuera del chip pero en el camino de los fluidos circulantes, conseguimos que el sistema resulte más robusto y que los

electrodos de trabajo del chip vivan más tiempo. El motivo de esto es que la corriente eléctrica proporcional a la concentración del analito que se desea medir pasa tanto por el electrodo de trabajo como por el electrodo auxiliar. Dado que el potencial del electrodo de trabajo está controlado por el potencióstato gracias al electrodo de referencia, no es posible controlar el potencial del electrodo auxiliar, que queda flotante. El potencial del electrodo auxiliar será el que el sistema necesite para poder suministrar la corriente que pasa por el electrodo de trabajo. Al trabajar en un microcanal, la resistencia del medio es mucho mayor que en un sistema abierto. Esto tiene como consecuencia que, de acuerdo a la ley de Ohm, el potencial del electrodo auxiliar aumente muy rápidamente. El fenómeno conocido como caída óhmica es el resultado de este fenómeno cuando tiene lugar entre el electrodo de referencia y el de trabajo. Cuando el electrodo de trabajo registra un proceso de reducción (los electrones circulan del electrodo a las especies disueltas en el medio), en el electrodo auxiliar se debe dar un proceso de oxidación. Cuando se emplean electrodos de oro, éstos se corroen a potenciales por encima de 0.7V, lo cual acorta enormemente su tiempo de vida útil, y consecuentemente también el del dispositivo entero. Este problema se ha resuelto utilizando un canal metálico a la salida del chip que sirve tanto para llevar el líquido que pasa por la celda de flujo, como para actuar de electrodo auxiliar. La mayor superficie y cantidad de material disponible hacen que los sensores integrados en el chip puedan funcionar durante mucho más tiempo.

En otra realización preferente de la presente invención, el tamaño de la lámina inferior donde se integra el elemento sensor y que actúa como pared de uno de los canales es de mayor tamaño que el resto de láminas y membranas permitiendo la integración de elementos adicionales en la lámina inferior. Esta característica técnica es extremadamente importante, ya que permite la integración de diversos elementos en un mismo dispositivo plano. También, permite reducir significativamente los costes de fabricación de los electrodos, ya que se aprovecha mucho mejor la superficie del material en el que se crearán. Es una realización particular de la invención, la lámina inferior que conforma la base de uno de los canales es también el sustrato sobre el que se disponen una serie de microelectrodos que actúan como elementos sensores. Estos microelectrodos pueden tener función de actuadores por ejemplo utilizándolos como resistencia para calentar la muestra a la temperatura deseada estando únicamente limitada su funcionalidad por la integridad estructural de la lámina sobre la que se sitúan. No obstante, también se ha previsto que estos elementos sensores puedan ir instalados en otras capas del sistema, por ejemplo en la lámina superior, siendo estos elementos de medida o actuadores. Por ejemplo, los electrodos podrían servir para llevar a cabo procesos de electrólisis en lugar de utilizarlos para detección como sensores o biosensores. Algunos ejemplos de los elementos adicionales que puede integrar la lámina inferior son calentadores, sensores de temperatura, LEDs u otras fuentes de luz y diodos u otros sensores ópticos.

En otra realización preferente de la presente invención, las láminas y las membranas comprenden orificios o muescas de guiado para su correcto apilamiento. Para que las distintas láminas que conforman el sistema puedan alinearse, se utiliza un sistema basado en "pines" de centraje. Se ha previsto una carcasa en la que se monta la celda que contienen varios de estos pines tanto en la base como en la tapa de dicha carcasa de forma que quedan intercalados pines "positivos" y "negativos", esto permite el alineamiento de dos o más láminas y membranas delgadas, flexibles y, en según qué caso, que incluyan materiales adhesivos, permitiendo un fácil montaje incluso usando membranas de tamaño reducido. Las distintas láminas que conforman la celda contienen orificios hechos a medida para encajar en esta carcasa a través de los "pines" y que permiten su correcto alineamiento. La carcasa también puede estar diseñada de manera que permita alojar en su estructura una serie de pasadores de guiado o centraje u otras estructuras sólidas que faciliten el alineamiento de las capas de la celda entre sí y con la propia carcasa.

En otra realización preferente de la presente invención, la celda comprende al menos una resistencia para el calentamiento de fluidos, estando situada dicha resistencia en el interior de al menos uno de los canales.

En otra realización preferente de la presente invención, la celda comprende sensores térmicos para la medida de temperatura situados en el interior de al menos uno de los canales. También se ha previsto acoplar a la celda de flujo otros componentes discretos fabricados con técnicas similares a la empleada en la fabricación de la celda de flujo, de manera que puedan construirse dispositivos más complejos que puedan aprovechar la capacidad de este sistema para gestionar varios líquidos de forma independiente.

En otra realización preferente de la presente invención, la celda dispone de medios de generación de potencia que alimentan al elemento pasivo. Estos medios podrían ser por ejemplo una batería plana o una pila de combustible.

En otra realización preferente de la presente invención, la celda comprende una pantalla que muestra unos parámetros capturados por los elementos sensores del elemento pasivo. Esta pantalla podría estar formada por LEDs planos integrados en el sistema. Además de esto, también se podría integrar en la celda un elemento con capacidad de procesar las señales eléctricas obtenidas de los sensores.

En otra realización preferente de la presente invención, las láminas que conforman la celda son de material polimérico y más preferentemente se ha previsto que al menos una de las láminas sea de material polimérico transparente permitiendo la observación directa del interior de los canales. Esta observación al tratarse una celda miniaturizada se realizará mediante microscopios.

5

Un segundo objeto de la presente invención es una carcasa para alojar la celda de flujo multicanal descrita anteriormente. Dicha carcasa, actúa de interfaz física entre la celda y una instrumentación externa de medida a la que se conecta. Así la carcasa comprende:

10

- conectores fluidicos de la celda con la instrumentación externa de medida y de la celda con los accesos fluidicos de entrada y salida de la celda a través de los que circulan los fluidos;
- conexiones eléctricas con la celda compuestas por conexiones con cada uno de los elementos de medida integrados en la celda; y,
- una pluralidad de pasadores de guiado o centraje que se introducen en los orificios de guiado de las láminas y las membranas de la celda para el correcto apilamiento de las mismas.

15

Esta carcasa estará preferentemente fabricada en plástico resistente y transparente para facilitar la observación de la celda y de las reacciones entre los fluidos que se puedan producir en su interior. Se ha previsto su fabricación mediante mecanizado de metacrilato o policarbonato, aunque también podría realizarse en masa mediante técnicas de inyección.

20

Un tercer objeto de la presente invención es el uso de la celda descrita anteriormente. Entre otros usos se han previsto los siguientes: la fabricación de microreactores, la fabricación de celdas de combustible, la fabricación de sistemas para el estudio de la cinética de las reacciones químicas, la medida de la demanda bioquímica de oxígeno de un población bacteriana y la medida de actividad biológica de una muestra.

25

Un cuarto objeto de la presente invención es el uso de la carcasa que a su vez contiene la celda descrita anteriormente. Entre otros usos se han previsto los siguientes: la fabricación de microreactores, la fabricación de celdas de combustible, la fabricación de sistemas para el estudio de la cinética de las reacciones químicas, la medida de la demanda bioquímica de oxígeno de un población bacteriana y la medida de actividad biológica de una muestra.

30

Se describen a continuación algunas de las ventajas del uso de la celda y carcasa objeto de la presente invención para la medida de actividad biológica de una muestra y más concretamente para la medida de poblaciones sobre-concentradas de microorganismos en un micro-reactor fabricado mediante la celda y carcasa aquí descritas.

35

A fin de controlar la cantidad de microorganismos presentes, de una sola especie o de consorcios de varias especies, en un nivel de actividad adecuado a la medida, se procede mediante el crecimiento en un sistema estándar de quimiostato, en el que según condiciones de cultivo o mediante medida de absorbancia óptica o cultivo, se puede conocer la concentración de microorganismos así como su estado de actividad biológica. Estos, se concentrarán mediante técnicas estándares (como centrifugado o proceso equivalente) hasta una densidad de entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{13}$ cfu/ml según lo adecuado a cada analítica particular, re-suspendiéndose en un volumen conocido de muestra hasta lograr la sobrepoblación microbiana deseada para cada proceso.

40

45

Trabajar con sobre-concentraciones microbianas permite varios efectos deseables y originales para el conjunto de dispositivo-método de análisis, como son:

50

- Reducción del tiempo de análisis: puesto que a mayor número de organismos, mayor capacidad metabólica o de reacción según el análisis y menor tiempo de análisis para alcanzar resultados equivalentes.
- Reduce la incertidumbre en el número de organismos presentes en el micro-bioreactor, así como de su estado de actividad, lo que incrementa la reproducibilidad del análisis y consiguientemente la calidad del resultado obtenido.
- Limita la posibilidad de reproducción/división binaria de los organismos presentes, puesto que la sobre-concentración es un factor inhibitor de estos procesos. Este hecho incrementa también la reproducibilidad del experimento de igual manera que lo expuesto en el punto anterior.

55

60

Se describen a continuación algunas de las ventajas del uso de la celda y carcasa objeto de la presente invención para la medida de actividad biológica de una muestra y más concretamente para la medida de poblaciones sobre-concentradas de microorganismos en un micro-reactor fabricado a partir de preparados liofilizados de microorganismos activables mediante la celda y carcasa aquí descritas.

65

El uso aquí descrito permite trabajar con microorganismos sobre-concentrados provenientes de procesos de desecación o liofilizados, permitiendo que estas poblaciones y/o consorcios (inciso: con población nos referimos a una sola especie, mientras que los consorcios son conjuntos preseleccionados de varias

especies, sean estas eubacterianas, archeobacterianas o eucariotas de tamaño microscópico) se conserven durante largo tiempo en forma aletargada, con bajos requerimientos para su óptima conservación.

5 Estas poblaciones y/o consorcios microbianos se pueden reactivar mediante hidratación en el tiempo inmediatamente anterior a proceder con el análisis.

Este proceso, permite asimismo, el trabajo y la utilización del dispositivo de análisis fuera de las condiciones de laboratorio y consiguiente que sea un dispositivo apto para trabajo de campo o "on-site".
10 También es destacable que permite comercializar un kit de análisis que incluya el dispositivo y los microorganismos liofilizados, que se puede conservar estable durante largo tiempo hasta su utilización.

Por último se describen algunas de las ventajas del uso de la celda y carcasa objeto de la presente invención para el calibrado de los microorganismos presentes y activos en el micro-bioreactor.
15

Se describe un proceso mediante el cual se puede calibrar el estado de actividad global (e indirectamente la concentración bacteriana efectiva) del dispositivo. Idealmente este se realizaría mediante duplicados del dispositivo a la vez que se toman medidas con el principal o bien integrando diferentes sistemas analíticos en paralelo en un solo dispositivo.
20

Para tal calibrado se dispone la población sobreconcentrada (provenga esta de centrifugación de células activas o de liofilizados) con una muestra preparada de contenido conocido (en el ejemplo un compuesto degradable aeróbicamente como pueda ser glucosa o similar). Haciendo el análisis de esta forma permite corregir la concentración realmente activa presente en el dispositivo en uso, en contraste con las calibraciones hechas bajo condiciones de máximo control en laboratorio microbiológico.
25

Descripción de las figuras

30 Figura 1.- Muestra una vista en explosión de un ejemplo de realización de una celda multicanal en la que se han apilado 4 láminas y una membrana intermedia formando 2 canales por lo que circularan sendos fluidos.

Figura 2.- Muestra diferentes vistas de un mismo ejemplo de realización de la carcasa objeto de la presente invención. Concretamente la figura 2a muestra una vista en explosión del soporte y la base de la carcasa y la figura 2b muestra una vista en planta de las caras inferiores del soporte y la base de la carcasa respectivamente.
35

Figura 3.- Muestra diferentes vistas del ejemplo de realización de la carcasa mostrado en la figura 2. Concretamente la figura 3a muestra una vista en explosión del soporte y la base de la carcasa con las líneas ocultas punteadas y la figura 3b muestra una vista en planta de las caras superiores del soporte y la base de la carcasa respectivamente.
40

Figura 4.- Muestra el funcionamiento de un sensor para la medida de la DBO basado en el ejemplo de realización descrito en las figuras 1 a 3.
45

Figura 5.- Muestra el funcionamiento de un sensor para la detección de sustancias extraídas de una muestra basado en el ejemplo de realización descrito en las figuras 1 a 3.

Figura 6.- Muestra una vista en explosión de un ejemplo de realización de la celda multicanal en la que se han apilado 5 láminas y 2 membranas intermedia formando 3 canales por lo que circularan diversos fluidos.
50

Figura 7.- Muestra el funcionamiento de un sensor para la medida de actividad biológica o microbiológica de una muestra basado en el ejemplo de realización descrito en la figura 6.
55

Figura 8.- Muestra una vista en planta de las láminas y elementos que conforman un ejemplo de realización de una celda de flujo con un único canal.

Ejemplos

60

Ejemplo 1- Sensor miniaturizado para la medida de la demanda bioquímica de oxígeno.

La figura 1 muestra una vista esquemática de una realización particular de una celda multicanal objeto de la presente invención. Concretamente se ha previsto el uso de esta celda como sensor DBO. Dicha celda consta de una lámina inferior (1), que incluye unos electrodos (6) grabados por litografía junto con la circuitería y áreas de conexión eléctrica al exterior y los orificios de guiado o de alineamiento (7), una primera lámina intermedia (2) de doble cara adhesiva con el canal de electrolito (9) y agujeros de paso de
65

5 agua (8,10) situados en los extremos del canal (9) y orificios de alineamiento (7). Además consta de una membrana (3) de difusión de oxígeno con orificios de paso de agua (8, 10) que se corresponden con los orificios de paso de agua de la lámina (2) y orificios de alineamiento (7) y de una segunda lámina intermedia (4) de doble cara adhesiva con el canal de muestra (13), orificios de paso de agua (11,12) situados en los extremos del canal de muestra (13), orificios de paso de agua (8,10) en correspondencia con los orificios de paso de agua de la membrana (3) y de la primera lámina intermedia (2) y orificios de alineamiento (7). Los canales (9,13) presentan unas dimensiones de 50 a 1000 micras de ancho y de 50 a 500 micras de grosor. Finalmente dispone de una lámina superior (5) de cierre, que incluye los orificios de alineamiento (7) y orificios de paso de agua (11,12) en correspondencia con los orificios de paso de agua del canal de muestra (13) y orificios de paso de agua (8,10) en correspondencia con los orificios de paso de agua del canal de electrolito (9). Nótese que todos los orificios de alineamiento y los de paso de agua de cada canal son coincidentes en todas las láminas y membranas que conforman la celda multicanal.

10
15 Para la fabricación de los electrodos sobre la lámina inferior (1), en un ejemplo particular de realización, se realizó una metalización en evaporadora por haz de electrones de una capa de 10nm de cromo y 100 nm de oro sobre una oblea de Zeonor. A continuación, se depositó una capa de fotoresina positiva que se expuso a una radiación ultravioleta a través de una máscara de campo claro en la que estaban definidos los microelectrodos que conformarían los sensores.

20 Una vez realizada la exposición, la oblea se sumerge en líquido revelador de manera que se elimine la resina de las zonas anteriormente expuestas. Tras eliminar los restos de líquido revelador y secar la oblea, se procede al grabado de la capa metálica en un baño húmedo. En primer lugar se ataca la capa de oro en una disolución de yodo/yoduro. Una vez grabado el oro, se procede al grabado de la capa de cromo en una disolución de cerio. Tras esto, se procede al decapado de la resina de las zonas en las que han quedado definidos los microelectrodos y sus contactos (6). A continuación se procede a cortar la oblea en lo que son las láminas inferiores (1) de la celda.

30 Las figuras 2 y 3 describen un ejemplo de realización de la carcasa en la que se monta la celda de flujo multicanal comprendiendo dicha carcasa una base (14) y una tapa (15). Para el montaje de la celda sobre la base (14) de la carcasa, se coloca en primer lugar la lámina inferior (1) en el cajeadado (21) de la cara interna de dicha base (14) de manera que se hacen pasar los pasadores de guiado o alineamiento (16) de la base (14) a través de los correspondientes orificios de alineamiento (7) de la lámina (1). Posteriormente se coloca la primera lámina intermedia (2), habiendo retirado previamente la lámina protectora de la cara inferior del adhesivo, en la cara interna de la tapa (15). Al juntar la tapa (15) y la base (14) de la carcasa las dos láminas (1,2) quedan adheridas y alineadas. Los pasadores de alineamiento (18) de la tapa (15) se encajan en unos cajeados (17) de la base (14) y de igual manera, los pasadores (16) de la base (14) se encajan en unos cajeados (19) de la tapa (15) lo que asegura el correcto alineamiento de tapa (15) y base (14). El mismo proceso se utiliza para incluir respectivamente la membrana (3) de difusión de oxígeno, la segunda lámina intermedia (4) y la lámina superior (5). Una vez realizada la unión de las diferentes láminas y membranas que conforman la celda multicanal, se utiliza la propia carcasa utilizada para el alineamiento para sostener la celda en su emplazamiento adecuado y se ajusta a presión mediante tornillos que se introducen por los respectivos orificios (20) situados en el borde perimetral de la base (14) y la tapa (15) a fin de obtener una unión estanca en los puntos de entrada y salida de fluidos mediante juntas tóricas sin llegar a deformar y entorpecer el paso de líquido por los canales debido a una excesiva presión. La tapa (15) dispone de un cajetín (22) para conectar los contactos de los electrodos (6) de la celda con la carcasa. Dicho cajetín (22) dispone además de conexiones eléctricas hacia el exterior de la carcasa para conectarlo a un potencióstato. También dispone la tapa (15) de las conexiones fluidicas correspondientes, que en este caso serán 4, para la entrada y salida de los fluidos a los canales de la celda de manera que se definirán 2 conexiones fluidicas de entrada (23,24) estando dichas conexiones situadas en correspondencia con los orificios de paso de agua (11,8) de la celda respectivamente y dos conexiones de salida (25,26) estando dichas conexiones situadas en correspondencia con los orificios de paso de agua (12,10) de la celda respectivamente. La entrada de muestra se realizaría por la conexión fluidica (23) saliendo por la conexión fluidica (25) mientras que la entrada del electrolito saturado de oxígeno se realizaría por la conexión fluidica (24) saliendo por la conexión fluidica (26). Es en esta conexión fluidica (26) donde se conectaría parte de una tubería metálica que actuaría como electrodo de referencia.

45
50
55 La carcasa lleva integradas las juntas adecuadas para la conexión del sistema fluidico de entradas y salidas de muestra y electrolito saturado de oxígeno, así como el conector eléctrico que permite la conexión de los electrodos auxiliares y de trabajo a un potencióstato con el que se realizará la medida electroquímica. El electrodo auxiliar se conecta a un tubo metálico de pequeña sección, por el que sale el flujo de la disolución salina.

60
65 La figura 4 muestra esquemáticamente el funcionamiento de este ejemplo de realización. La figura muestra una sección longitudinal de los dos canales (9,13) separados por la membrana (3) de difusión de oxígeno (permite el paso de oxígeno del canal de electrolito al canal de muestra y el paso de dióxido de carbono del canal de muestra al de electrolito). En el canal de electrolito (9) entra (27) y sale (28) un

electrolito saturado de oxígeno disuelto en agua. El oxígeno puede difundir a través de la membrana (3) y es detectado en el electrodo de trabajo (6). En el canal de muestra (13) se encuentra, en suspensión, una población microbiana (29) capaz de metabolizar la materia orgánica (MO) de una muestra a analizar. Durante el consumo ($MO + O_2 = CO_2$) de esta materia orgánica, las bacterias, hongos o levaduras (29) consumen también el oxígeno que reciben a través de la membrana (3) y generan dióxido de carbono que se difunde por la membrana (3) hasta el canal de electrolito (9), y el sensor (6) detecta los cambios de concentración de oxígeno en el medio en el que se encuentra.

Ejemplo 2- Detección de sustancias extraídas de la muestra.

Es otra aplicación particular la adaptación del sistema anteriormente descrito al análisis de muestras que por su tamaño no puedan difundir fácilmente a través de una lámina polimérica. Es frecuente encontrar problemas en las medidas electroquímicas de muestras orgánicas "sucias" o complejas debido principalmente a la pasivación de la superficie de los electrodos debido a la adhesión de moléculas orgánicas a la superficie del mismo. Con el sistema aquí propuesto se limita este efecto y se permite el análisis de sustancias cuya detección se vea dificultada por encontrarse en una muestra de matriz compleja. Dos ejemplos son el análisis de cultivos bacterianos o celulares vivos sin alteración de los mismos, o la detección de alcohol u otras sustancias en muestras de vino o cerveza.

La figura 5 muestra el funcionamiento de la celda y carcasa descritas en las figuras 1 a 3 para el caso de detección de sustancias extraídas de una muestra. Así, en este ejemplo de realización, la membrana (3) de difusión de oxígeno se sustituye por una membrana de diálisis donde la discriminación de paso se realiza por tamaño de poro y no por capacidad de difusión dentro de un material polimérico. En el caso particular descrito se plantea la utilización de una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 1000 Daltons que permite el paso de metabolitos y proteínas de pequeño tamaño. Al canal de electrolito (9) entra (31) y sale (32) el electrolito disuelto en agua y al canal de muestra (13) entra IPTG (β -D-1-thiogalactopyranoside) y PAPG (4-aminophenyl β -D-galactopyranoside) disueltos en agua. En el canal de muestra (13) se sitúa una población de Enterobacteria (30) en la cual el IPTG se une al operon Lac-Z, activando la síntesis del enzima β -galactosa (B-Gal) que degrada el lactato de manera que la enzima B-Gal se une al PAPG como sustrato, degradándolo a PAP. La membrana (3) permite el paso de PAP (4-aminophenol) desde el canal de muestra (13) al canal de electrolito (9). El electrodo (33) para detección de PAP se sitúa en el interior del canal de electrolito (9).

Con la realización aquí descrita se consigue respecto al estado de la técnica una mejor conservación de la superficie de los electrodos por el control de la materia orgánica que permite al sistema la posibilidad de análisis de muestras de composición compleja con o sin un mínimo tratamiento previo, por ejemplo de muestras sanguíneas donde plaquetas, glóbulos rojos u otros componentes pueden dificultar el análisis y además permite el trabajo con muestras biológicas vivas, sean estas bacterianas o de cultivos celulares ya que se pueden analizar con una mínima alteración de las muestras.

Ejemplo 3- Medida de actividad biológica o microbiológica de una muestra (sistema de 3 canales).

Es otra aplicación particular del sistema propuesto la construcción de sistemas analíticos que requieran de mayor complejidad en el análisis. Un caso particular es un sistema que permita el uso de más de dos canales. En este caso, la construcción de la celda fluidica contiene los mismos pasos descritos en el ejemplo 1, más los necesarios para la construcción de un tercer canal.

Tal como muestra la figura 6, la celda consta de una lámina inferior (33), que incluye los electrodos (34) de oro grabados por litografía. Todas las láminas y membranas constan de los orificios de guiado o alineamiento (35) coincidentes para su correcto apilamiento. Sobre ésta se coloca una primera lámina intermedia (36) de doble cara adhesiva con el canal electrolito (37) y agujeros de paso de agua (38,39), una primera membrana (40) de selección por tamaño tipo diálisis con exclusión de moléculas superiores a los 1000 Daltons, con agujeros de paso de agua (41,42) en correspondencia con los agujeros (38,39) que también estarán presentes en el resto de láminas y membranas colocadas por encima. Posteriormente se coloca una segunda lámina intermedia (43) de doble cara adhesiva con el canal de muestra (44) y agujeros de paso de agua (45,46) en los extremos del canal (44). Por encima se apila una segunda membrana (47) de selección por tamaño tipo diálisis con exclusión de moléculas superiores a los 1000 Daltons, con agujeros de paso de agua (48,49) en correspondencia con los agujeros (45,46) que también estarán presentes en el resto de láminas colocadas por encima. Luego se sitúa una tercera lámina intermedia (50) de doble cara adhesiva con el canal de solución salina (51) y agujeros de paso de agua (52,53) en los extremos del canal (51). Finalmente se apila una lámina superior (54) y agujeros de paso de agua (55,56) en correspondencia con los agujeros (52,53). Los electrodos (34) están nuevamente grabados sobre Zeonor de cromo (20nm Cr) y oro (100nm Au), circuitería y áreas de conexión eléctrica al conector y el canal de la solución salina es de 50 a 1000 micras de ancho y de 100 a 500 micras de grosor.

La solución salina saturada de oxígeno entra al canal electrolito (37) por el orificio (38,41) y sale por el

orificio (38,42). La muestra entra al canal de muestra (42) por el orificio (45,48) y sale por el orificio (46,49) y la solución rica en nutrientes, IPTG y PAPG entra al canal de solución salina (51) por el orificio (52,55) y sale por el orificio (53,56).

- 5 La figura 7 muestra el funcionamiento de la celda descrita en la figura 6 para la medida de actividad biológica o microbiológica de una muestra. Con esta aplicación se obtienen tres canales superpuestos separados por membranas con diferentes propiedades. Una utilización particular de este ejemplo de realización permite reproducir los análisis de actividad biológica o microbiológica de una muestra conocidos en el estado de la técnica. En el presente caso, el canal intermedio (44) se utiliza como cámara de cultivo en vivo de la muestra biológica y el inferior (37) se utiliza como canal de medida electroquímica, de forma similar a lo descrito para la ejemplo 1, mientras que el canal intermedio (44) se utiliza como alimentador de la cámara de cultivo bacteriana, mediante este canal se puede entonces aportar al cultivo tanto nutrientes para mantener su crecimiento como otros elementos requeridos para el análisis.
- 10
- 15 Los tres canales (37,44,51) están separados por dos membranas (40,47). Por el canal inferior (51) circula una solución rica en nutrientes que contiene además el factor de crecimiento IPTG y el sustrato enzimático PAPG. Esta solución entra por un extremo (55) y sale por el opuesto (56). Dichos nutrientes difunden a través de la primera membrana (47), membrana de separación por poros tipo diálisis para moléculas menores a 1000 Daltons (transporte de nutrientes, IPTG y PAPG por diferencia de concentración), hacia el canal intermedio (44), en el que se ha introducido la muestra (57) en la que se pretende analizar la actividad microbiana o la presencia de enterobacterias. Las bacterias presentes en la muestra crecen gracias a los nutrientes que reciben a través de la membrana inferior (47). Gracias al IPTG (análogo de la lactosa) se activa el operon lac de bacterias fermentadoras de lactosa como es el caso de *E. coli* (Enterobacteriaceae) junto al sustrato para la reacción enzimática PAPG (4-aminophenyl β -D-galactopyranoside). Así, el factor IPTG activa la síntesis de β -galactosidasa que utiliza el sustrato PAPG dando como producto p-aminofenol (PAP). El p-aminofenol, a su vez, es capaz de difundir a través de la membrana superior (40), membrana de separación por poros tipo diálisis para moléculas menores a 1000 Daltons (salida de PAP por diferencia de concentración), para alcanzar el canal superior (37). En el canal superior (37) se introduce (41) una solución salina que permite trabajar a un electrodo de trabajo (34). La presencia de p-aminofenol puede detectarse electroquímicamente, ya que se oxida fácilmente a potenciales entre 0.35 y 0.45V vs. Ag/AgCl (Anilina + H₂O) antes de abandonar el canal (42).
- 20
- 25
- 30

Ejemplo 4- Conducciones fluidicas a través de interfaces entre chips diferentes.

- 35 En esta realización se demuestra la posibilidad de combinar chips de distintos tamaños en un mismo microsistema con canales fluidicos. El caso más sencillo presenta un único canal por el que circula un fluido sobre una serie de electrodos fabricados en un chip de pequeño tamaño. La ventaja de este montaje es que es posible fabricar los electrodos o elementos pasivos cualesquiera de forma independiente, aprovechando al máximo tanto el material disponible como el proceso de depósito de los electrodos. Es decir, mediante esta técnica se pueden reducir los costes unitarios de fabricación de las partes con elementos metálicos.
- 40

La figura 8 muestra las distintas partes de que se compone un sistema así. La celda con la fluidica y los electrodos integrados se compone de 5 partes. La lámina inferior (57) que presenta los orificios de centrado (58) y un zócalo (59) para alojar el elemento pasivo (60) con los electrodos sensores (61). El siguiente nivel lo compone una lámina (62) de material adhesivo por las dos caras que presenta los motivos de alineamiento, la entrada para el fluido (63) y la salida (64), un canal discontinuo (65) tal que se salvan los bordes del elemento pasivo (60) con los electrodos. La lámina (66) inmediatamente superior consiste en una lámina que no necesita ser adhesiva por las dos caras y que presenta los orificios de alineamiento, la entrada (63) y la salida fluidica (64) y un canal discontinuo (67) tal que los extremos de este canal se solapan con el canal discontinuo (65) de la lámina inferior. El último nivel del chip es una lámina (68) que puede o no ser adhesiva y que presenta los orificios de alineamiento y las entradas y salidas fluidicas (63,64).

45

50

55

REIVINDICACIONES

- 1.- Celda de flujo que comprende al menos un canal a través del cual discurre al menos un fluido, caracterizada porque comprende:
- 5 - una pluralidad de láminas apiladas compuesta de una lámina superior, una lámina inferior y al menos dos láminas intermedias, comprendiendo cada una de las láminas intermedias una ranura longitudinal pasante que define cada uno de los canales de la celda y siendo las ranuras de las láminas intermedias independientes y parcialmente coincidentes entre ellas;
- 10 - un orificio pasante de entrada del fluido y un orificio pasante de salida del fluido en cada lámina intermedia y las láminas apiladas sobre ella, estando situados los orificios respectivamente y en correspondencia con los extremos de las ranuras pasantes;
- 15 - al menos un elemento pasivo integrado en la cara interna de una lámina seleccionada entre la lámina superior, la lámina inferior y una combinación de ambas, cara interna que actúa como pared de uno de los canales; y,
- 20 - un electrodo auxiliar situado en el interior de uno de los canales.
- 2.- Celda de flujo, según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende una membrana permeable dispuesta entre cada dos láminas intermedias para el intercambio de sustancias entre los fluidos de cada uno de los canales.
- 3.- Celda de flujo multicanal, según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque el elemento pasivo es al menos un sensor de medida.
- 4.- Celda de flujo multicanal, según la reivindicación 3, caracterizada porque el sensor de medida comprende un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo.
- 5.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque las láminas y membranas se fijan entre sí mediante medios adhesivos.
- 6.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende unos accesos fluidico a la entrada y salida de cada uno de los canales donde el acceso fluidico de salida del canal donde se sitúa el elemento pasivo es de metal actuando como electrodo auxiliar.
- 7.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el acceso fluidico de entrada del canal donde se sitúa el elemento pasivo es de metal actuando como electrodo de referencia.
- 8.- Celda de flujo multicanal, según la reivindicación 7, caracterizada porque los electrodos se disponen de manera que el fluido circula por el electrodo de referencia, el de trabajo y por último por el auxiliar.
- 9.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el tamaño de la lámina inferior donde se integra el elemento sensor y que actúa como pared del canal no es del mismo tamaño que el resto de láminas y membranas permitiendo la integración de elementos adicionales en la lámina inferior.
- 10.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque las láminas y las membranas comprenden orificios de guiado para su correcto apilamiento.
- 11.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende una resistencia para el calentamiento de muestras situada en el interior de al menos uno de los canales.
- 12.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende sensores térmicos para la medida de temperatura situados en el interior de al menos uno de los canales.
- 13.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende medios de generación de potencia que alimentan al elemento sensor.
- 14.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende una pantalla que muestra unos parámetros capturados por los elementos sensores del elemento pasivo.
- 15.- Celda de flujo multicanal, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque las láminas son de material polimérico.

- 16.- Celda de flujo multicanal, según la reivindicación 15, caracterizada porque al menos una de las láminas es de material polimérico transparente permitiendo la observación directa del interior de los canales.
- 5 17.- Carcasa para alojar la celda de flujo multicanal descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que actúa de interfaz física entre la celda y una instrumentación externa de medida, caracterizada porque comprende:
- conectores fluidicos de la celda con la instrumentación externa de medida y de la celda con los accesos fluidicos de entrada y salida de la celda a través de los que circulan los fluidos;
- 10 - conexiones eléctricas con la celda compuestas por conexiones con cada uno de los elementos de medida integrados en la celda; y,
- una pluralidad de pasadores de guiado que se introducen en los orificios de guiado de las láminas y las membranas de la celda para el correcto apilamiento de las mismas.
- 15 18.- Uso de la celda descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para un proceso seleccionado entre la fabricación de microreactores, la fabricación de celdas de combustible, la fabricación de sistemas para el estudio de la cinética de las reacciones químicas, la medida de la demanda bioquímica de oxígeno de un población bacteriana y la medida de actividad biológica de una muestra, o una combinación de las mismas.
- 20 19.- Uso de la carcasa descrita en la reivindicación 17 para un proceso seleccionado entre la fabricación de microreactores, la fabricación de celdas de combustible, la fabricación de sistemas para el estudio de la cinética de las reacciones químicas, la medida de la demanda bioquímica de oxígeno de un población bacteriana y la medida de actividad biológica de una muestra.
- 25

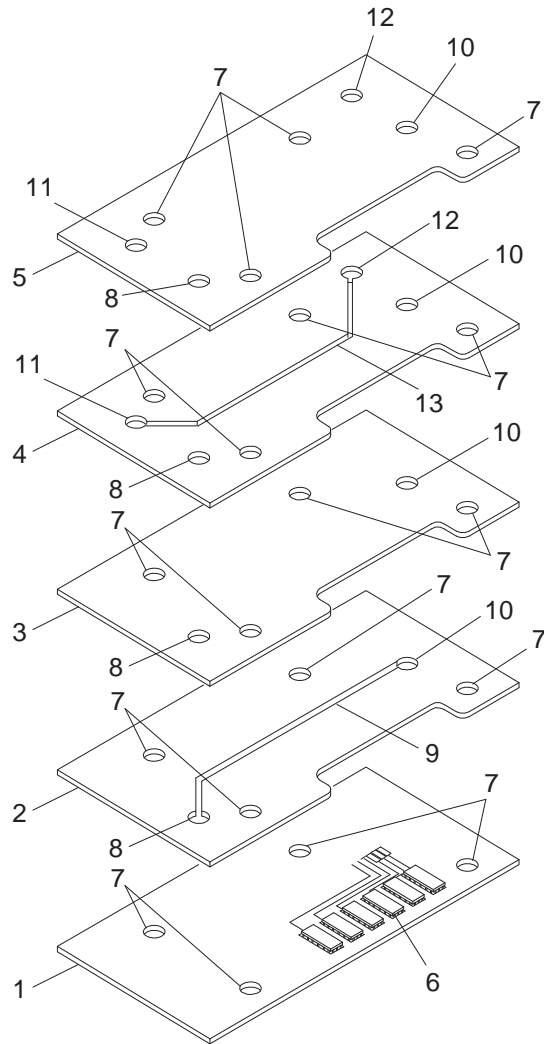


FIG. 1

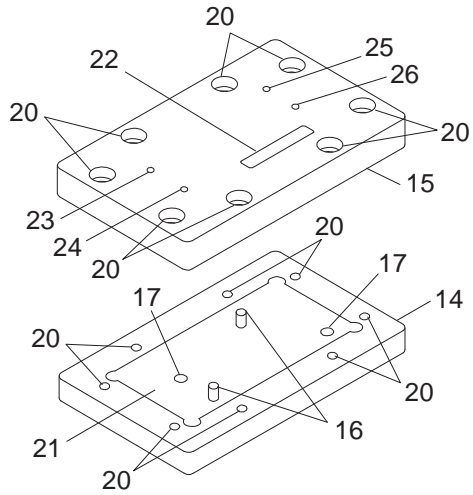


FIG. 2a

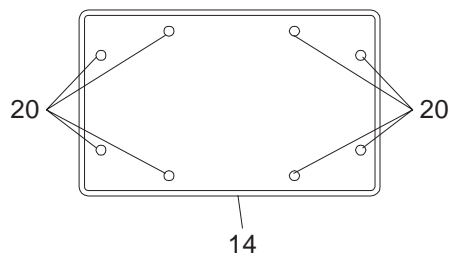
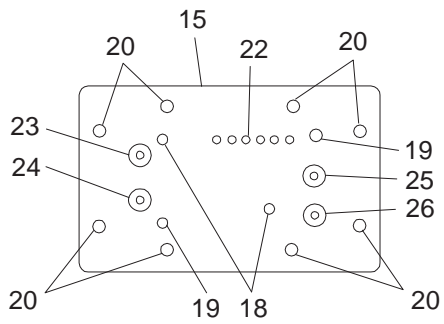


FIG. 2b

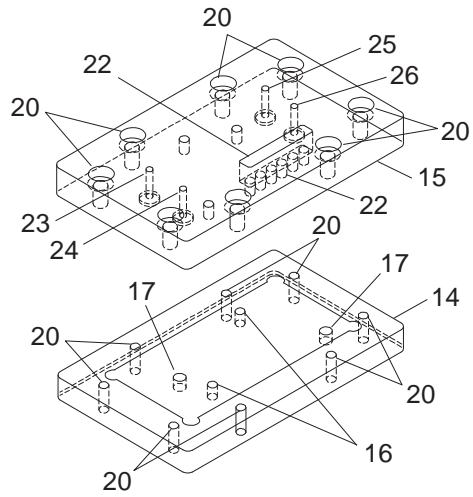


FIG. 3a

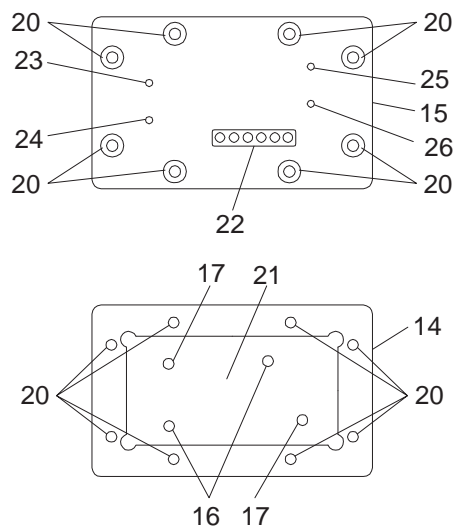
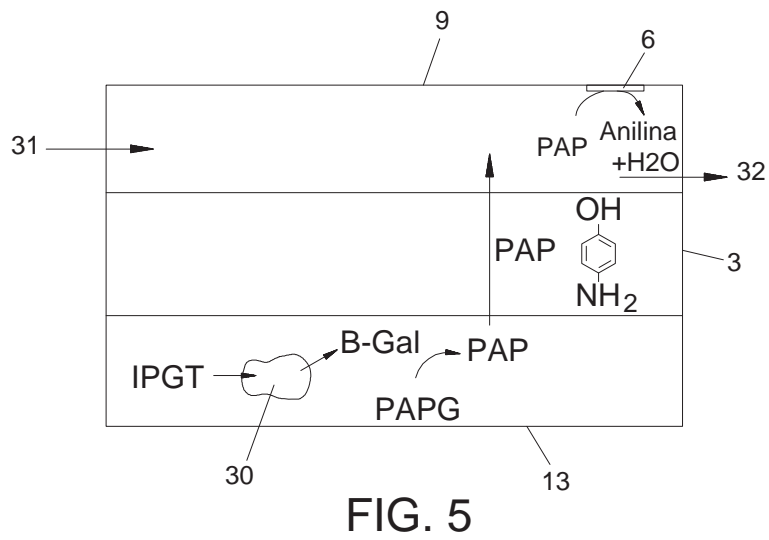
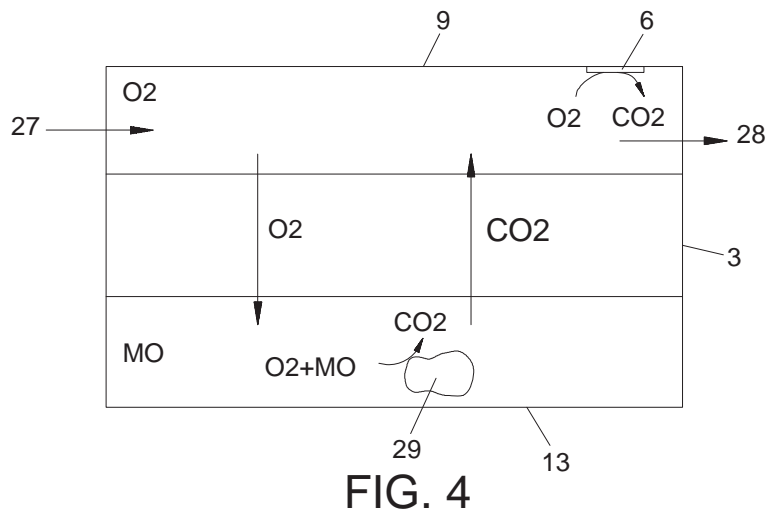


FIG. 3b



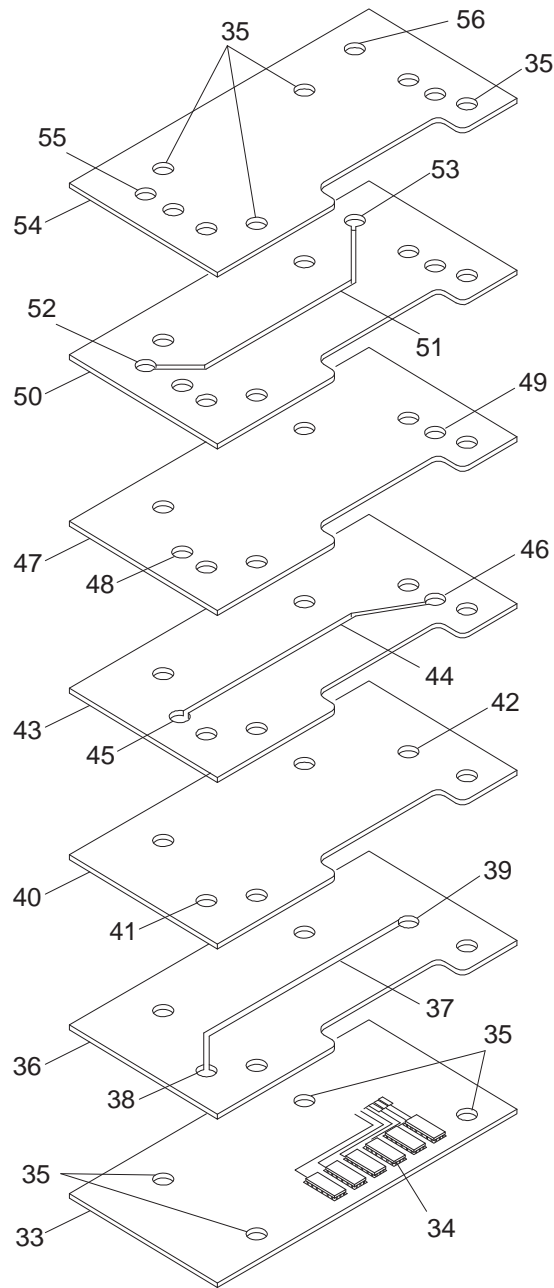


FIG. 6

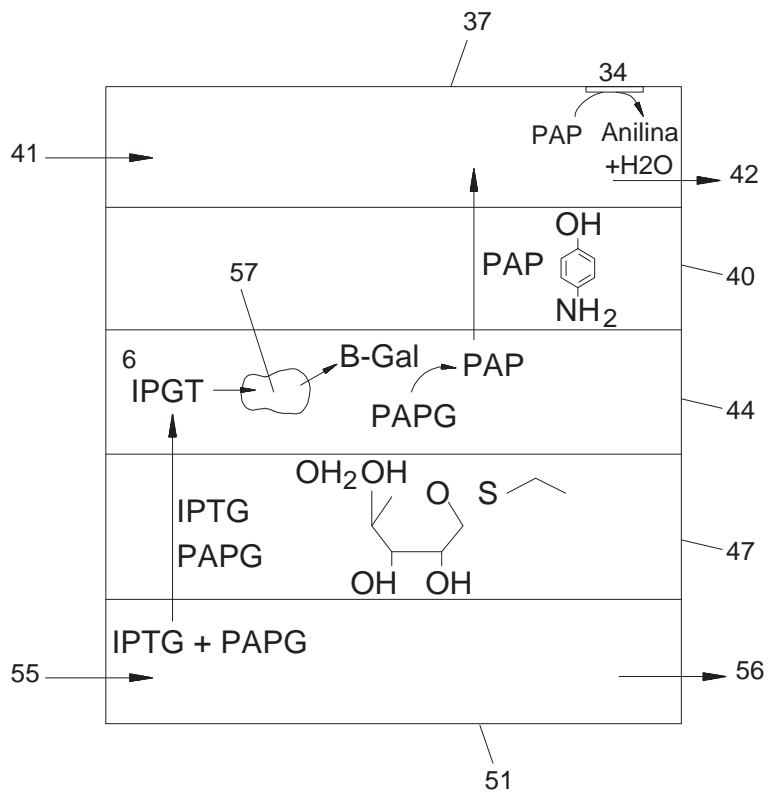


FIG. 7

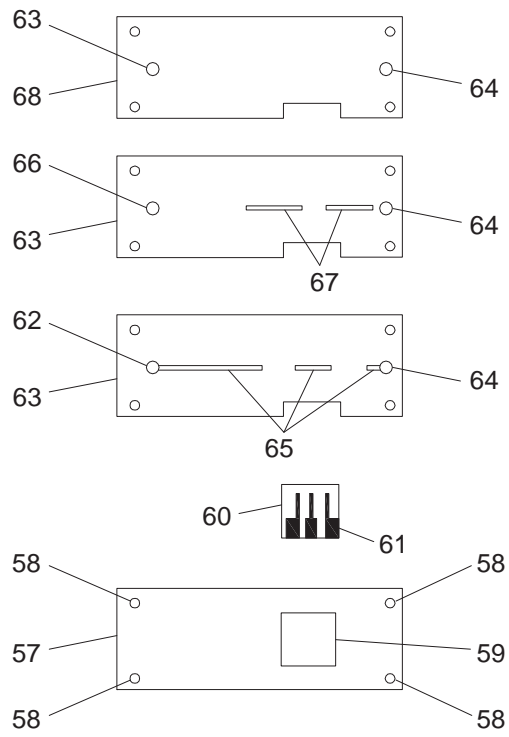


FIG. 8

ANNEX 3: *HOLDER MICROSCOPI*

Finalment, presentem un desenvolupament indirectament relacionat. Durant el temps de la tesi, hem col·laborat amb altres projectes del grup de recerca. Un d'ells ha estat per exemple el projecte HidroBioNets de la UE.

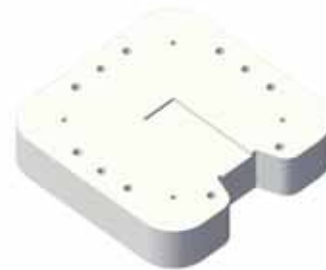
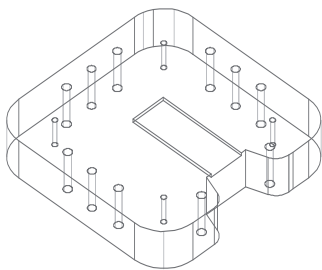
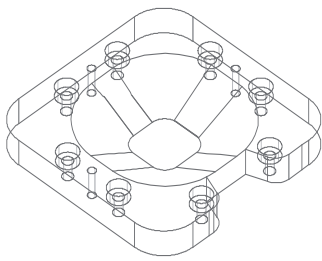
En aquest el treball del grup de bio-MEMS de l'IMB-CNM se centrava en desenvolupar sensors electroquímics que poguessin monitorar el creixement de biofilms bacterians en conduccions de plantes de dessalació per osmosi inversa, a fi i efecte d'optimitzar els tractaments de manteniment del sistema i de minimitzar l'ús de compostos biocides que són incompatibles amb el subministrament d'aigua potable.

A part de dissenyar i fabricar les carcasses adaptades als elèctrodes sensors que es van utilitzar en el projecte, va quedar reflectit també l'interès de poder observar directament i sense alterar la mostra, els elèctrodes sensors durant la mesura elecquímica. Això era, en aquest cas, especialment rellevant per poder caracteritzar els elèctrodes (per exemple, comparant el senyal obtingut sota diferents percentatges d'ocupació per biofilms de la superfície de l'elèctrode), així com per observar si hi havia efecte de la mesura bioquímica en les poblacions bacterianes presents en el dispositiu.

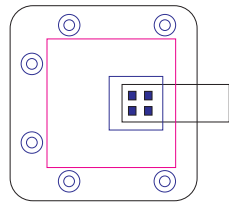
A fi de poder observar directament l'elèctrode en funcionament, es va dissenyar una carcassa que pogués contenir el conjunt d'elèctrodes, les connexions elèctriques i les connexions hidràuliques del dispositiu, però que a la vegada tingués un disseny que permetés de funcionar sota l'observació directa al microscopi.

A continuació es presenten el disseny definitivament adoptat, així com les imatges del dispositiu fabricat.

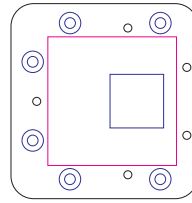
Carcassa: model 3D per fabricar el dispositiu



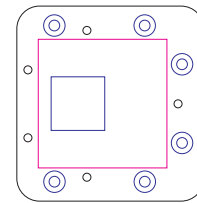
Membranes:



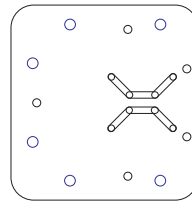
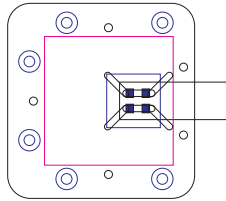
Tapa



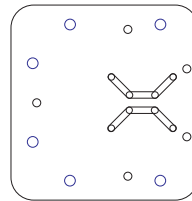
Tapa voltejada



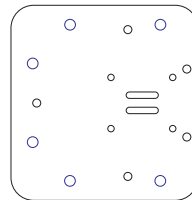
Memb 3



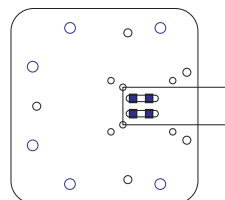
Memb 2



Memb 1



Base



Comentaris:
Metacrilat 6mm
Rosca: passant 2mm, cap 4mm, roscant 1,6mm
Aliniadors 1,5mm
Silicona capes de 300 um
Forats 1,2mm, fins a 3mm del material
Tub lateral (segons prof broca... 1,2 ideal
extended reach)
Connector luer 2,7mm diam.

Foto d'un prototip inicial (a) i membrana de conformació de canals amb PSA (b):

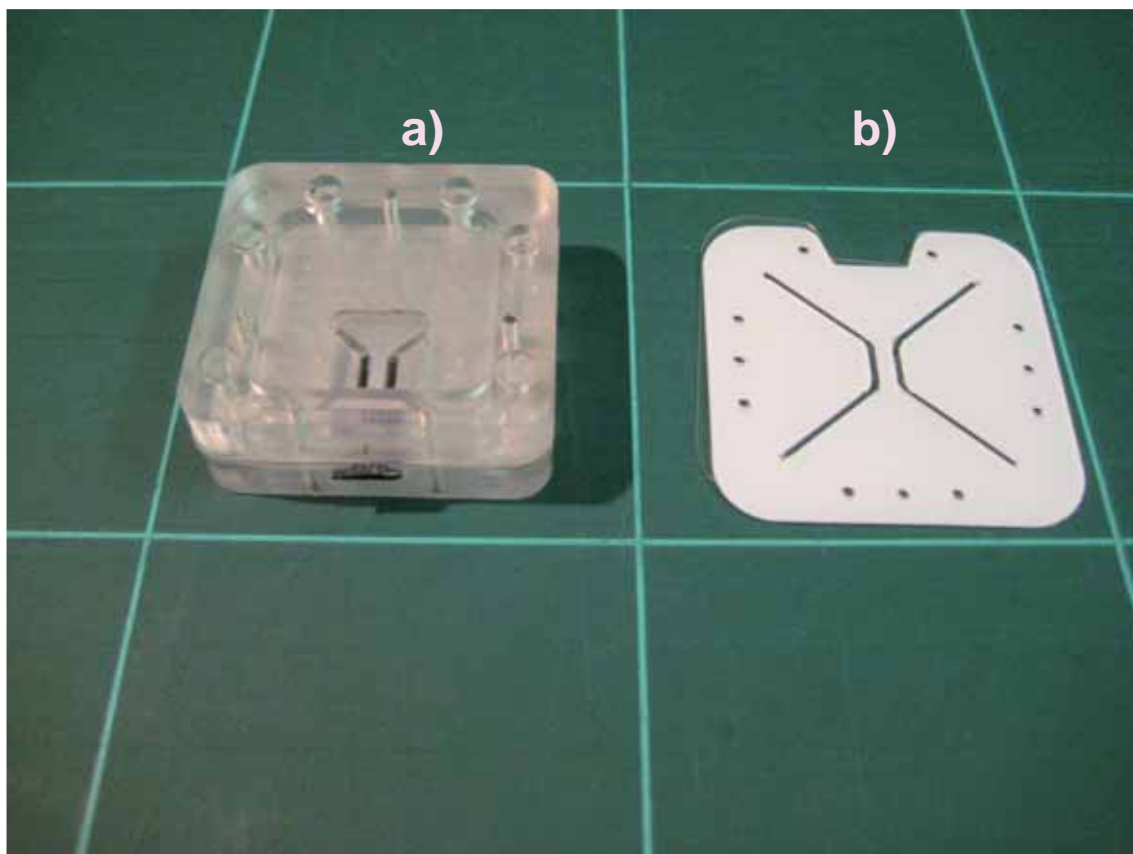


Foto del dispositiu final

