



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 301**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

C12Q 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01964059 .8**

96 Fecha de presentación : **15.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1417330**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54

Título: **Medición de la actividad microbiológica en un medio opaco.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73

Titular/es: **Ondeo Nalco Company**
Ondeo Nalco Center
Naperville, Illinois 60563-1198, US

72

Inventor/es: **Banks, Rodney, H.;**
Casselman, Nancy, L.;
Chattoraj, Mita;
Davis, Ronald, V.;
Fehr, Michael, J.;
Ramesh, Sasireka, S. y
Workman, David, P.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 315 301 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medición de la actividad microbiológica en un medio opaco.

5 **Campo del invento**

Este invento pertenece al campo de la medición de actividad microbiológica en sistemas muy dispersivos. Específicamente, esta solicitud de patente pertenece al campo de la medición fluorescente de actividad microbiológica en medios opacos tales como lechadas y coloides y ciertos fluidos para el procesamiento de metales.

10 **Antecedentes del invento**

La contaminación microbiana en medios opacos tales como lechadas y coloides y ciertos fluidos para el procesamiento de metales es un problema significativo en muchas industrias. En la elaboración de papel, aditivos tales como una lechada de caolín, suspensiones de carbonato cálcico precipitado o disoluciones de almidón pueden contener grandes poblaciones microbianas que sirven como inóculo para la máquina para fabricar papel. Se exige a las compañías mineras que suministren aditivos tratados y conservados a industrias tales como las del papel y la cerámica, y dichas compañías también necesitan determinar la contaminación microbiana. Ciertos fluidos para el procesamiento de metales son también susceptibles de contaminación microbiológica.

El método convencional para controlar el crecimiento microbiano es mediante el uso de biocidas. Los biocidas son productos químicos que inhiben el crecimiento microbiano al destruir la pared celular o componentes celulares de microorganismos. Condiciones físicas tales como la temperatura y la radiación, o interacciones con productos químicos de tratamiento contenidos en un sistema, pueden ejercer un impacto negativo sobre la eficacia del biocida. Para compensar el efecto reducido, los biocidas pueden ser añadidos continua o intermitentemente según una base de “según se requiera”. Se fomenta el mínimo uso posible de biocidas ya que los biocidas son caros y tóxicos. De esta manera, para evitar residuos, se requiere una determinación y un análisis constantes de la lechada, el coloide o el fluido para el procesamiento de metales con objeto de determinar la cantidad apropiada de biocida para controlar el crecimiento microbiano.

La mayoría de las lechadas y los coloides y ciertos fluidos para el procesamiento de metales son opacos, lo que significa que no son transparentes al paso de la luz. Otro modo de describir los medios opacos es que son medios muy dispersivos de la luz. Para los fines de esta solicitud de patente, el término “opaco” se utiliza para referirse a cualquier medio que, cuando se coloca en una cubeta de 1 cm, en el camino de un haz de luz visible no absorbente, actúa reduciendo la intensidad de la luz en un 20% o más a causa de la dispersión.

Cuando los medios son opacos, no es posible saber qué hay dentro de ellos simplemente mirándolos. Esto significa que es imposible decir si hay contaminación microbiológica en una lechada opaca, un coloide opaco o un fluido opaco para el procesamiento de metales al mirar dichos medios. Por lo tanto, los medios ópticos conocidos convencionales para la detección de contaminación microbiológica (tales como mediciones de la densidad óptica y mediciones de ATP) no pueden proporcionar resultados para los medios opacos. Esto se debe a que la luz no puede atravesar la muestra, ya que la pérdida de luz resulta inversamente proporcional al grado de dispersión lumínica. Por lo tanto, se deben utilizar otros métodos para detectar la contaminación microbiana en un medio opaco.

En la actualidad, la contaminación microbiológica de las muestras de lechadas opacas, coloides opacos o fluidos opacos para el procesamiento de metales es típicamente determinada usando métodos estándares de “cuenta de placas”. A los métodos estándares de “cuenta de placas” se hace típicamente referencia como “siembra en placas” (*plating*). La siembra de muestras en placas requiere un personal especializado, un equipo y un período de incubación de 48 horas durante el cual los microbios de la lechada se pueden reproducir desenfrenadamente. El método concreto de cuenta de placas implica extraer una muestra, diluir la muestra y aplicar la muestra a la superficie de un medio de agar nutritivo. Después de una incubación durante un período de 24 a 48 horas, se comprueba la presencia de microorganismos en la muestra y, cuando es apropiado, se cuentan los organismos por medios manuales o televisivos.

Ciertas situaciones industriales requieren el uso de cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC; del inglés, *high pressure liquid chromatography*) para determinar si queda biocida residual en la muestra. La HPLC sólo puede medir concentraciones de biocidas, no actividades microbianas. La HPLC también exige un equipo caro y un personal especializado para las mediciones rutinarias. Puesto que la HPLC sólo permite medir biocidas residuales, no se pueden medir las cepas de organismos microbiológicos resistentes a biocidas que se estén desarrollando en los medios opacos.

Además del muestreo al azar, se dispone de otras técnicas de muestreo “*in situ*”, tales como el ensayo con tiras para inmersión (“*dip slide*”) y el de la adenosina trifosfato (ATP). Desafortunadamente, dichos ensayos no tienen uso práctico cuando se mide la contaminación microbiológica en un medio opaco puesto que los ensayos de ATP requieren una muestra transparente y, por lo tanto, no funcionan en un medio opaco, y las tiras para inmersión requieren de 24 a 48 horas para que se desarrollen los resultados del ensayo. De este modo, ningún ensayo es adecuado para la evaluación de la contaminación microbiológica *in situ*.

En las referencias siguientes se describen y reivindican métodos adicionales para determinar las poblaciones microbianas en diversos medios.

ES 2 315 301 T3

En la Patente de EE.UU. n° 5.206.151 se describe y reivindica un método para medir la concentración inhibitoria mínima de biocidas añadiendo diversas cantidades, tipos y combinaciones de biocidas a partes alícuotas de una muestra que contiene bacterias, añadiendo un colorante de oxidación-reducción tal como resazurina o violeta de tetrazolio y nutrientes, y determinando el cambio de color.

5

En la Patente de EE.UU. n° 5.413.916 se describe y reivindica un método para la determinación de la toxicidad para bacterias de una muestra ambiental mediante la adición de resazurina, glutaraldehído y bacterias a la muestra, y la medición de la absorbancia (a 603 nm) en comparación con la de un blanco.

10

En la Patente de EE.UU. n° 5.336.600 se describe y reivindica un método para la detección de microorganismos, que consiste en mezclar resorufina (o un derivado de resorufina que no incluye resazurina) y un medio nutriente y medir una disminución de la fluorescencia.

15

En la Patente de EE.UU. n° 5.523.214 se describe y reivindica un método para la identificación de microbios utilizando azul de metileno y resazurina estabilizada con ferricianato potásico o sales de hierro mezcladas con ferrocianato potásico o wolframato sódico o amarillo de tartrazina o rojo reactivo 4 o compuestos similares. La patente reivindica un aumento sustancial de sensibilidad al utilizar esta mezcla en comparación con el uso del colorante solo.

20

En el Documento WO-A-01/49876 se describen métodos para determinar poblaciones microbianas de organismos plántonicos y sedentarios en sistemas acuosos industriales mediante la adición de un compuesto colorante fluorogénico.

25

En un experimento descrito en un artículo titulado “Resazurin reduction tests as an estimate of coliform and heterotrophic bacterial numbers in environmental samples”, Can. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49, 354, 1992, se evaluaron partes alícuotas de filtros de arena usando el método de reducción de la resazurina.

30

Un artículo titulado “Resazurin reduction as a function of respiratory burst in bovine neutrophils”, un artículo de Am. J. Vet. Res. 58, 601, 1997, describe una técnica para determinar fluorométricamente el punto final de la resazurina (resorufina) como una medida del estallido respiratorio.

35

En el artículo “Automation of the Resazurin Reduction Test using Fluorometry of Microtitration Trays”, de Ali-Vehmas, Louhi y Sandholm, J. Vet. Med. B38, 358-372 (1991), se describe la automatización del ensayo fluorescente de reducción de resazurina en resorufina para determinar los números bacterianos en leche y cultivos de caldo. La reducción de la resazurina (color azul) en resorufina (color rosa) y final y reversiblemente en dihidrorresorufina (incolora) es bien conocida en la técnica para determinar la contaminación microbiológica en la leche. Este método implica poner muestras contaminadas de leche en placas para microtitulación, añadir un medio nutriente y medir la fluorescencia correspondiente al pico de resorufina en intervalos de 5 minutos. Esta medición continua de la misma muestra hace que ésta sea una medición automatizada. La intensidad de la resorufina alcanza el máximo cuando el aumento de intensidad debido a la conversión de la resazurina es compensado por la disminución debida a la formación de la dihidrorresorufina no fluorescente. En este trabajo, la población de la muestra es significativamente aumentada mediante la adición de medio nutriente (que es una parte necesaria del método).

40

45

En la Patente de EE.UU. n° 6.060.318, titulada “Tracing of Process Additives in Industrial Ceramics Applications”, se reivindica un método fluorométrico para determinar la concentración de productos químicos en lechadas cerámicas y polvos que tienen una superficie externa. En esta patente, se utiliza un fluorómetro de estado sólido (en la configuración de fluorescencia superficial) para determinar la concentración de moléculas fluorescentes en lechadas cerámicas. Las aplicaciones para lechadas cerámicas incluyen la determinación de las dosificaciones de tratamiento, la medición de los tiempos de mezclamiento en recipientes para mezclamiento discontinuo, la determinación de la contaminación discontinua procedente de molinos de bolas y otros recipientes para mezclamiento, y la eficacia de la transferencia desde los molinos de bolas hasta los depósitos de mezclamiento.

50

Sería deseable tener un método alternativo, desarrollado para determinar el nivel de contaminación microbiológica en lechadas opacas, materiales coloidales opacos y fluidos opacos para el procesamiento de metales.

55

Sumario del invento

El aspecto primero del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

60

(a) obtener dos Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;

65

(b) añadir un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la segunda Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;

ES 2 315 301 T3

- (c) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado, teniendo dicho Colorante Fluorogénico y dicho Colorante Fluorogénico Reaccionado diferentes señales fluorescentes;
- (d) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (e) utilizar dichos medios de medición para medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;
- (f) calcular la RELACIÓN Útil, siendo la RELACIÓN Útil la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos; y
- (g) utilizar la RELACIÓN Útil para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

El aspecto segundo del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto primero del presente invento reivindicado, que comprende además:

- (h) utilizar dicha RELACIÓN Útil para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar al medio opaco; y
- (i) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

El aspecto tercero del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

- (A) separar tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (B) no añadir nada a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco, añadir un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la tercera Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;
- (F) calcular la RELACIÓN Útil, siendo la RELACIÓN Útil la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo; y
- (G) utilizar la RELACIÓN Útil para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

ES 2 315 301 T3

El aspecto cuarto del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto tercero del presente invento reivindicado, que comprende además:

- 5 (H) utilizar la RELACIÓN Útil de las operaciones (F) y (G) para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y
- (I) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

10 El aspecto quinto del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

- (a) obtener dos Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- 15 (b) añadir un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la segunda Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- 20 (c) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes durante un periodo de tiempo conocido como "Tiempo Cero", para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 25 (d) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 30 (e) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Colorante y en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado después del Tiempo Cero, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;
- 35 (f) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos;
- 40 (g) esperar durante un periodo de tiempo, denominado "Tiempo Futuro";
- (h) medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Colorante y en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante después del Tiempo Futuro a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 45 (i) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro la RELACIÓN, en el Tiempo Futuro, de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos;
- 50 (j) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y
- (k) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.
- 55

El aspecto sexto del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto quinto del presente invento reivindicado, que comprende además:

- 60 (l) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y
- (m) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

65

ES 2 315 301 T3

El aspecto séptimo del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

- 5
- (A) separar tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- 10
- (B) no añadir nada a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco, añadir un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico seguido de un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- 15
- (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes durante un periodo de tiempo conocido como “Tiempo Cero”, para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 20
- (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 25
- (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante después del Tiempo Cero a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado, para obtener las señales fluorescentes en el Tiempo Cero;
- 30
- (F) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo;
- (G) esperar durante un periodo de tiempo, denominado “Tiempo Futuro”;
- 35
- (H) utilizar dichos medios de medición para medir las señales fluorescentes después del Tiempo Futuro en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 40
- (I) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro la RELACIÓN, en el Tiempo Futuro, de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo;
- 45
- (J) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y
- (K) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.
- 50

El aspecto octavo del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto séptimo del presente invento reivindicado, que comprende además:

- 55
- (L) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y
- (M) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.
- 60

El aspecto noveno del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

- 65
- (A) obtener tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (B) añadir directamente un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, añadir un Nutriente y un Colorante Fluorogénico

ES 2 315 301 T3

a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico y un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;

- 5 (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes durante un periodo de tiempo conocido como “Tiempo Cero”, para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 10 (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante, dicha Parte Alícuota-Nutriente-Colorante y dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes en cada Parte Alícuota a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, respectivamente;
- 15 (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes después del Tiempo Cero en dicha Parte Alícuota-Colorante, dicha Parte Alícuota-Nutriente-Colorante y dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, para obtener las señales fluorescentes en el Tiempo Cero;
- 20 (F) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero que puede ser seleccionada del grupo que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Cero, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado en cuanto a interacciones con productos químicos con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico en cuanto a interacciones con productos químicos, la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Cero, y la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Cero;
- 25 (G) esperar durante un periodo de tiempo, denominado “Tiempo Futuro”, y medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante, dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante y dicha Parte Alícuota-Nutriente-Colorante a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado después del Tiempo Futuro;
- 30 (H) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro que es seleccionada del grupo que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Futuro, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado en cuanto a interacciones con productos químicos con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico en cuanto a interacciones con productos químicos, la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Futuro, y la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Futuro;
- 35 (I) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y
- 40 (J) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

50 El aspecto décimo del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto noveno del presente invento reivindicado, que comprende además:

- 55 (K) obtener una cuarta Parte Alícuota de material procedente del medio opaco;
- (L) no añadir nada a la cuarta Parte Alícuota, cuarta Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco;
- 60 (M) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, midiéndose las señales fluorescentes a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (N) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes después del Tiempo Cero en dicha Parte Alícuota-Blanco a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado, para obtener las señales fluorescentes en el Tiempo Cero;
- 65

ES 2 315 301 T3

- (O) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, RELACIÓN Útil que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Cero, teniendo en cuenta las interferencias de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta las interferencias de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico;
- (P) esperar durante un periodo de tiempo, denominado “Tiempo Futuro”, y medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado después del Tiempo Futuro;
- (Q) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Futuro, teniendo en cuenta la interferencia de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta la interferencia de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico;
- (R) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y
- (S) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

El aspecto undécimo del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto noveno o décimo del presente invento reivindicado, que comprende además:

utilizar dicha comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

Otros aspectos del presente invento reivindicado incluyen los procedimientos de los aspectos séptimo y décimo del presente invento reivindicado, caracterizados además porque las señales fluorescentes detectadas de la Parte Alícuota-Blanco en el Tiempo Cero se usan tanto para el Tiempo Cero como para el Tiempo Futuro.

Aún otros aspectos del presente invento reivindicado incluyen los procedimientos de los aspectos primero, tercero, quinto, séptimo, noveno y décimo del presente invento reivindicado, caracterizados además porque dicho Colorante Fluorogénico es resazurina.

Aún otros aspectos del presente invento reivindicado incluyen los procedimientos de los aspectos primero, séptimo, noveno y décimo del presente invento reivindicado, caracterizados además porque dicho medio para la medición de las señales fluorescentes es un fluorómetro de cara frontal.

Aspectos adicionales del presente invento incluyen los procedimientos de los aspectos quinto, séptimo, noveno y décimo del presente invento reivindicado, que comprenden además:

(l) repetir las operaciones (g) a (j); y

(m) representar gráficamente el valor de la RELACIÓN Útil frente al tiempo en que se calculó cada RELACIÓN Útil y utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

Opcionalmente, estos aspectos del invento se caracterizan además por comprender:

(n) utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

(o) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

En el aspecto noveno, la operación (e) anteriormente mencionada se refiere a la operación (k), la operación (m) a la operación (e), la operación (n) a la operación (m), y la operación (o) a la operación (n). En el aspecto décimo, la anteriormente mencionada operación (e) se refiere a la operación (t) y se lee “repetir las operaciones (p) a (s); y”, la operación (m) se refiere a la operación (u), la operación (n) a la operación (v), y la operación (o) a la operación (w).

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 muestra un gráfico de las señales fluorescentes (en cuentas por segundo) de resazurina y resorruфина en una lechada mineral en el Tiempo Cero y en el Tiempo Futuro. Los espectros mostrados en la Figura 1 se obtuvieron utilizando un fluorómetro SPEX™ asequible de Jobin Yvon Spex, 3880 Park Avenue, Edison, New Jersey 08820, EE.UU. El fluorómetro SPEX™ usa cuentas de fotones individuales, por lo que las lecturas se presentan en cuentas por segundo. En la Figura 1, el espectro en el Tiempo Cero se muestra como una línea continua, y el eje Y para el espectro en el Tiempo Cero es el eje Y secundario con unidades que van de 0 a 200.000 cuentas por segundo. En la Figura 1, el espectro en el Tiempo Futuro se muestra como una línea discontinua, y el eje Y para el espectro en el Tiempo Futuro es el eje Y primario con unidades que van de 0 a 2.000.000 de cuentas por segundo.

La Figura 2 muestra un fluorómetro de cara frontal (no reivindicado).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A lo largo de esta solicitud de patente, los términos siguientes tienen los significados indicados. Aldrich se refiere a Aldrich®, P.O. Box 355, Milwaukee, Wisconsin 53201, EE.UU., números de teléfono (414) 273-3850 y (900) 962-9591.

Un “coloide” es un líquido opaco que contiene partículas submicroscópicas que no sedimentan.

“Isótropo” se refiere al hecho de que, si un grupo es considerado una fuente puntual y se dirige luz de excitación al grupo, la luz fluorescente se emite igualmente por 2π estereorradianes, creando en realidad una esfera de 3 dimensiones. A causa de la distribución isótropa de la luz fluorescente, en la práctica, la recogida de la señal de luz fluorescente tiene normalmente lugar a 90° con respecto a la fuente de excitación (fotón) para minimizar que los fotones (luz) recogidos se atribuyan a la fuente de excitación (fotón). Esto también ayuda a minimizar la dispersión lumínica.

Nalco se refiere a ONDEO Nalco Company, ONDEO Nalco Center, 1601 W. Diehl Road, Naperville, Illinois 60563, EE.UU., (630) 305-1000.

“nm” significa nanómetros, que equivalen a 10^{-9} metros.

Una “lechada” es una suspensión opaca, normalmente acuosa, preparada al mezclar una sustancia insoluble, tal como cemento o arcilla, con suficiente agua u otro líquido que permite que la mezcla fluya viscosamente.

El aspecto primero del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

- (a) obtener dos Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (b) añadir un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la segunda Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- (c) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado, teniendo dicho Colorante Fluorogénico y dicho Colorante Fluorogénico Reaccionado diferentes señales fluorescentes;
- (d) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (e) utilizar dichos medios de medición para medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;
- (f) calcular la RELACIÓN Útil, siendo la RELACIÓN Útil la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos; y
- (g) utilizar la RELACIÓN Útil para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

ES 2 315 301 T3

El aspecto segundo del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto primero del presente invento reivindicado, que comprende además:

- 5 (h) utilizar dicha RELACIÓN Útil para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar al medio opaco; y
- (i) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

10 Inicialmente, se extrae una Parte Alícuota de material de un medio opaco. Para los fines de este invento, el medio opaco es seleccionado del grupo que consiste en específicas lechadas opacas, coloides opacos y fluidos opacos para el procesamiento de metales. Las lechadas y coloides adecuados para analizar de este modo incluyen lechadas y coloides utilizados en la industria. Las lechadas y coloides y fluidos para el procesamiento de metales específicos que
15 pueden ser analizados mediante el método del presente invento reivindicado incluyen los utilizados en la industria del procesamiento de minerales, los utilizados en la industria de la pulpa y el papel, los utilizados en la industria cerámica, los utilizados en la industria de revestimientos y cualesquier otras lechadas o coloides o fluidos para procesamiento de metales utilizados en un proceso industrial que no sea un proceso industrial de la industria de alimentos o bebidas.

20 Las lechadas opacas y los coloides opacos utilizados en la industria mineral incluyen lechadas de minerales de arcilla (caolín), lechadas de sulfato cálcico, lechadas de carbonato cálcico, lechadas de finos de carbón y lechadas de minerales procedentes de operaciones mineras sobre metales (tales como cobre, oro, molibdeno, hierro, aluminio y níquel).

25 Las lechadas opacas y coloides opacos utilizados en la industria de la pulpa y el papel incluyen disoluciones de polímeros, lechadas de almidón (también conocidas como “disoluciones” de almidón) y lechadas de minerales, tales como lechadas de caolín y suspensiones de carbonato cálcico precipitado.

30 En el procesamiento de productos cerámicos, las lechadas opacas incluyen lechadas de minerales tales como sistemas basados en arcilla y disoluciones de óxidos metálicos y de ciertos polímeros.

35 Los fluidos para el procesamiento de metales son mezclas químicas utilizadas para reducir la fricción y el calor en el punto de contacto entre una pieza a trabajar y una herramienta de trabajo. Además, los fluidos para el procesamiento de metales proporcionan una protección a la herramienta de trabajo frente al desgaste, así como protección a las máquinas y las piezas a trabajar frente a la corrosión. Son además formulados para que tengan otras propiedades deseables que dependen de la aplicación, incluyendo, pero sin limitarse a: resistencia a las incrustaciones microbiológicas, propiedades antiespumantes y bajo empañamiento. En funcionamiento, los fluidos para procesamiento de metales son sistemas muy dispersivos a causa de la contaminación por otros fluidos o son diseñados para que sean emulsiones de aceite en agua muy dispersivas.

40 El método del presente invento reivindicado debería ser aplicable a todos los fluidos extensibles con agua para el procesamiento de metales, es decir, fluidos oleosos sintéticos, semisintéticos y solubles para el procesamiento de metales. Todos estos fluidos pueden estar expuestos a contaminación microbiológica, y a menudo lo están.

45 Se añade un compuesto Colorante Fluorogénico a la Parte Alícuota que se va a ensayar y controlar.

50 La respuesta medida del Colorante Fluorogénico será la suma total de la respuesta de los organismos microbiológicos y de los productos químicos (como se esboza en la página 50) en la Parte Alícuota que contiene el Colorante Fluorogénico. Cuando se utiliza un muestreo de Partes Alícuotas, es posible, aunque no necesario, tomar Partes Alícuotas de varias zonas diferentes de la lechada o el coloide con objeto de obtener la actividad media de los organismos microbiológicos del sistema.

55 El compuesto Colorante Fluorogénico añadido a la Parte Alícuota debe ser una molécula que experimente un cambio sustancial en su señal fluorescente tras la interacción con una amplia población de organismos microbiológicos. Por lo tanto, los Colorantes Fluorogénicos adecuados para uso en el presente procedimiento reivindicado deben tener una señal fluorescente detectable antes de su reacción con los microorganismos y deben tener también una señal fluorescente diferente una vez que han reaccionado con los microorganismos.

Los Colorantes Fluorogénicos adecuados incluyen, pero no se limitan a:

60 éster acético del ácido pirano-3,6,8-trisulfónico:

diacetato de carboxifluoresceína;

65 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-ona-7-ilo), D-glucurónido;

9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-ona-7-ilo);

ES 2 315 301 T3

resorrufina- β -D-galactopiranosido;

fluoresceína-di- β -D-galactopiranosido;

5 fluoresceína-di- β -D-glucurónido;

resorrufina- β -D-glucurónido;

difosfato de fluoresceína;

10

10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazín-3-ona (en adelante “resazurina”);

sal sódica del 10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazín-3-ona (en adelante “sal sódica de resazurina”);

15

azul de metileno;

fosfato de piranina;

ácido pireno-3,6-8-trisulfónico-1-fosfato;

20

y sales de los mismos.

El Colorante Fluorogénico preferido es la resazurina.

25

Todos estos Colorantes Fluorogénicos son comercialmente asequibles (por ejemplo, la resazurina es asequible de Aldrich como sal sódica de resazurina) o, como es el caso del fosfato de piranina, pueden ser sintetizados usando procedimientos descritos en la bibliografía.

30

Una vez que se ha añadido el Colorante Fluorogénico a la Parte Alícuota, la Parte Alícuota es opcionalmente agitada para mezclar a fondo el Colorante con la Parte Alícuota.

Típicamente, el medio opaco, sea una lechada, un coloide o un fluido para el procesamiento de metales, contiene algún tipo de organismo microbiológico. En cualquier lechada, coloide o fluido para procesamiento de metales usado en un proceso industrial, se espera que haya colonias de organismos microbiológicos en diferentes zonas. El nivel de actividad microbiana en cada una de estas lechadas o coloides es una función de diferentes factores, incluyendo la población inicial de organismos microbiológicos, la aireación, la temperatura, el flujo de agua, la presencia de nutrientes microbianos y la eliminación de residuos microbianos.

35

Con objeto de permitir que pase el tiempo suficiente para que el Colorante Fluorogénico reaccione con los microorganismos presentes, tras la adición del Colorante Fluorogénico se recomienda esperar al menos aproximadamente 1 minuto, preferiblemente al menos aproximadamente 5 minutos, más preferiblemente esperar al menos aproximadamente 240 minutos y muy preferiblemente esperar al menos aproximadamente 480 minutos, antes de usar el fluorómetro para medir las señales fluorométricas. En el método de los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto del invento, sólo se realiza una medición de señales fluorescentes. De esta manera, para esos aspectos de este invento, este periodo de tiempo es el único periodo de tiempo para la medición.

40

45

En los aspectos quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo del presente invento reivindicado, el periodo de tiempo antes de las primeras mediciones de la señal fluorescente es ese periodo de tiempo al que se hace referencia como “Tiempo Cero”. El Tiempo Cero es al menos aproximadamente 1 minuto, preferiblemente al menos aproximadamente 5 minutos, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 minutos y muy preferiblemente al menos aproximadamente 30 minutos, tras la adición del Colorante Fluorogénico, antes de usar el fluorómetro para medir las señales fluorométricas.

50

En los aspectos quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo del invento, el Tiempo Futuro es el tiempo al menos aproximadamente 4 horas después del Tiempo Cero y preferiblemente es el tiempo al menos aproximadamente 6 horas después del Tiempo Cero, y, más preferiblemente, el Tiempo Futuro es al menos aproximadamente 8 horas después del Tiempo Cero.

55

El Colorante Fluorogénico debe ser añadido a la Parte Alícuota en una cantidad eficaz tal que permita la determinación de la actividad microbiana. Una cantidad eficaz de Colorante Fluorogénico es entre aproximadamente 0,5 ppm y aproximadamente 200 ppm, preferiblemente entre aproximadamente 1 ppm y aproximadamente 50 ppm y muy preferiblemente entre aproximadamente 10 ppm y aproximadamente 30 ppm, y la cantidad más preferible de Colorante Fluorogénico añadido es aproximadamente 25 ppm. Cuando se añade la forma salina del Colorante, tal como la sal sódica de resazurina, al sistema acuoso industrial, el cálculo de ppm se basa en la cantidad activa del Colorante Fluorogénico presente.

60

65

ES 2 315 301 T3

Por supuesto, la cantidad de Colorante Fluorogénico usado puede ser superior a estas cantidades preferidas. Se cree, sin pretender quedar vinculado por ello, que cantidades superiores a 200 ppm representarán un desperdicio de Colorante Fluorogénico sin que proporcionen un beneficio conmensurable a la medición de la actividad microbiana. Factores adicionales que influyen en la adición de colorante al sistema incluyen el tipo de colorante y el tipo de los fluidos contenidos en la lechada, coloide o fluido para procesamiento de metales.

El fluorómetro puede ser usado para medir las señales fluorescentes tanto del Colorante Fluorogénico como del Colorante Fluorogénico Reaccionado.

Los fluorómetros comercialmente asequibles incluyen los asequibles de Nalco, incluyendo, pero sin limitarse a, el fluorómetro TRASAR 700 con la posición de la cubeta de muestras modificada para que se lea usando una técnica para medición de fluorescencia con “ángulo rasante”, útil para medios opacos tales como lechadas, coloides y fluidos para el procesamiento de metales.

Para llevar a cabo mediciones de fluorescencia en muestras opacas se puede usar un fluorómetro SPEXTM asequible de Jobin Yvon SPEX, 3880 Park Avenue, Edison, New Jersey 08820, EE.UU., provisto de:

- (1) un soporte para muestras sólidas que permite la recogida de fluorescencia procedente de la cara frontal de la célula, o
- (2) un cable de fibra óptica bifurcado que permite que luz de la longitud de onda deseada incida sobre la muestra y permite la recogida de la emisión y la transmisión de vuelta al sistema de detección.

Otro tipo de fluorómetro adecuado para uso en el método del presente invento reivindicado es descrito y reivindicado en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° de serie 09/893831, titulada “Mirror Fluorometer”, presentada el 28 de junio de 2001, Registro Legal número 7590.

Otro tipo de fluorómetro adecuado para uso en el método del presente invento reivindicado es conocido como fluorómetro de cara frontal. En la Figura 2 se ilustra un fluorómetro de cara frontal. En relación con la Figura 2, el fluorómetro 100 de cara frontal utiliza una fuente lumínica 10 que proyecta luz emitida 8 a través de una lente primera 12, un filtro 14 de excitación y una lente segunda 16. La lente primera 12 es una lente esférica. La lente segunda 16 podría ser una lente esférica o una lente plano-convexa (PCX). De la lente segunda 16 emerge, como luz 78 de excitación, luz de una frecuencia seleccionada. La luz 78 de excitación entra en el brazo primero 18 de un cable 20 de fibra óptica trifurcado y, desde allí, en el tubo 90 de muestras que contiene la Parte Alícuota 92. La Parte Alícuota 92 contiene una Parte Alícuota de una lechada opaca, un coloide opaco o un fluido opaco para procesamiento de metales al que se ha añadido un Colorante Fluorogénico y, opcionalmente, un Inhibidor Metabólico y un Nutriente opcional. Alternativamente, puede que la Parte Alícuota 92 no contenga Colorante Fluorogénico, ni Inhibidor Metabólico ni Nutriente. En ese caso, a la Parte Alícuota 92 se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco.

Preferiblemente, el Colorante Fluorogénico es elegido de modo que una longitud de onda de la luz de excitación sea capaz de excitar tanto al Colorante Fluorogénico como al Colorante Fluorogénico Reaccionado. Preferiblemente, el Colorante Fluorogénico es resazurina, que es excitada por una luz de excitación con una longitud de onda de 550 nm. Tanto la resazurina (Colorante Fluorogénico) como la resorufina (Colorante Fluorogénico Reaccionado) son excitadas por luz de excitación con una longitud de onda de 550 nm al usar un fluorómetro SPEXTM. Los fluoróforos de la Parte Alícuota 92 envían de vuelta luz emitida 82 a través del brazo segundo 22 y el brazo tercero 24 del cable 20 de fibra óptica trifurcado.

La luz emitida 82 se propaga a través de la lente PCX primera 32, el filtro primero 52 de emisión y la lente PCX segunda 34 y emerge de la lente PCX segunda 34 como una señal fluorescente emitida primera 83. La señal fluorescente emitida primera 83 es luz fluorescente emitida con una longitud de onda específica. El modo en que se obtiene luz de longitud de onda deseada para la señal fluorescente emitida primera 83 es determinando primero qué longitud de onda de luz fluorescente ha de ser detectada (como señal fluorescente emitida primera 83) para llevar a cabo el método del presente invento reivindicado, y seleccionando luego la lente PCX 32, el filtro primero 52 de emisión y la lente PCX segunda 34 para que, de la lente PCX segunda 34, emerja luz de longitud de onda deseada para la señal fluorescente emitida primera 83. La señal fluorescente emitida primera 83 entra en el fotodiodo primero 36. Se utiliza un amplificador opcional primero 38 para amplificar la señal fluorescente emitida primera 83 de modo que la señal sea más detectable.

La luz emitida 82 se propaga a través del brazo tercero 24 del cable 20 de fibra óptica trifurcado, a través de la lente PCX tercera 42, el filtro segundo 44 de emisión y la lente PCX cuarta 46 y emerge de la lente PCX cuarta 46 como una señal fluorescente emitida segunda 85. La señal fluorescente emitida segunda 85 es luz fluorescente con una longitud de onda específica. El modo en que se obtiene la longitud de onda deseada de la señal fluorescente emitida segunda 85 es determinando primero qué longitud de onda de luz fluorescente ha de ser detectada (como señal fluorescente emitida segunda 85) para llevar a cabo el método del presente invento reivindicado, y seleccionando luego la lente PCX tercera 42, el filtro segundo 44 de emisión y la lente PCX cuarta 46 para que, de la lente PCX cuarta 46, emerja luz de longitud de onda deseada para la señal fluorescente emitida segunda 85. La señal fluorescente emitida segunda 85 entra en el fotodiodo segundo 48. Se utiliza un amplificador opcional segundo 58 para amplificar la señal fluorescente emitida segunda 85 de modo que la señal sea más detectable.

ES 2 315 301 T3

La fuente lumínica 10 puede ser un diodo emisor de luz (LED; del inglés, light emitting diode) o un láser o una lámpara basada en filamento o una lámpara de flash. La fuente lumínica 10 es preferiblemente un diodo emisor de luz. Los diodos emisores de luz adecuados (LED verde; emite luz a 525 nm, pieza nº NSPG-500S) son asequibles de Nichia America Corporation, 3775 Hempland Road, Mountville, Pennsylvania 17554, EE.UU., (717) 285-2323.

Las lentes PCX (pieza nº L45-437) y las lentes esféricas son asequibles de Edmund Industrial Optics, 101 East Gloucester Pike, Barrington, New Jersey 08007, EE.UU., (800) 363-1992.

Los amplificadores (pieza nº AFC 2101) son preferiblemente integradores de corriente doble de Burr-Brown, 6730 S. Tucson Blvd., Tucson, Arizona 85706, EE.UU., (520) 746-1111.

El fotodiodo (pieza nº S2386-5K) es asequible de Hamamatsu, 360 Foothill Road, Bridgewater, New Jersey 08807, EE.UU., (908) 231-0960.

El filtro de excitación (pieza nº 535DF35) y los filtros de emisión (pieza nº 635DF55) son asequibles de Omega Optical, P.O. Box 573, Brattleboro, Vermont 05302, EE.UU., (802) 254-2690.

El cable de fibra óptica trifurcado es asequible de Dolan-Jenner Industries, 678 Andover Street, Lawrence, Massachusetts 01843, EE.UU., (978) 681-8000.

El fluorómetro preferido para uso en el método del presente invento reivindicado es el fluorómetro de cara frontal.

La medición de la señal fluorescente tanto del Colorante Fluorogénico como del Colorante Fluorogénico Reaccionado es un procedimiento conocido para cualquier experto en la técnica de la fluorometría. Utilizar cualquiera de los fluorómetros anteriormente descritos para detectar la señal fluorescente de un Colorante Fluorogénico y un Colorante Fluorogénico Reaccionado significa que el fluorómetro debe ser capaz de proporcionar luz de excitación con la longitud de onda requerida y debe ser también capaz de detectar la luz emitida con la longitud de onda requerida. Como se afirmó previamente, tanto la resazurina (Colorante Fluorogénico) como la resorrufina (Colorante Fluorogénico Reaccionado) son excitadas al utilizar luz con una longitud de onda de aproximadamente 532 nm a aproximadamente 550 nm, y las señales fluorescentes de emisión de cada compuesto son detectadas y medidas a 583 nm y 634 nm (que corresponden a la resorrufina y la resazurina, respectivamente).

Una de las razones de que la resazurina sea el Colorante Fluorogénico preferido es que tanto la resazurina (Colorante Fluorogénico) como la resorrufina (Colorante Fluorogénico Reaccionado) son excitadas por luz de la misma longitud de onda. Por supuesto, es posible llevar a cabo el presente método reivindicado utilizando un Colorante Fluorogénico que sea excitado por luz de una longitud de onda diferente a la de la luz utilizada para excitar el Colorante Fluorogénico Reaccionado. En el caso de fluorómetros que son capaces de emitir luz a una única longitud de onda y/o de detectar una única señal fluorescente a la longitud de onda de la luz emitida, se debe utilizar más de un fluorómetro, usándose un fluorómetro para detectar la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico y usándose el otro para detectar la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado.

En el aspecto primero del presente invento reivindicado, la RELACIÓN Útil de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, se representa del modo siguiente:

$$\text{RELACIÓN Útil} = \frac{\text{señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado}}{\text{señal fluorescente del Colorante Fluorogénico}}$$

en la que ambas señales están ajustadas en cuanto a interacciones con productos químicos.

Al tomar la relación de Colorante Fluorogénico Reaccionado a Colorante Fluorogénico, la pérdida de señal debida a la dispersión de la luz queda excluida porque la cantidad de pérdida lumínica es proporcional a la opacidad de la Parte Alícuota.

La RELACIÓN Útil es un número sin unidades. La RELACIÓN Útil puede ser calculada manualmente o con una calculadora o con un programa informático. En la práctica, la RELACIÓN Útil puede ser calculada utilizando un programa informático apropiado de modo que se pueda obtener continuamente un registro de la RELACIÓN Útil en intervalos establecidos. Luego se puede utilizar el valor absoluto de la RELACIÓN Útil (los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto del invento) o la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil (los aspectos quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo del invento) para determinar el nivel de actividad microbiológica en el medio opaco.

Se pueden escribir programas informáticos que calculen automáticamente la RELACIÓN Útil. Una persona con experiencia normal en la técnica de escritura de programas informáticos sabría cómo escribir un programa informático que calculara automáticamente la RELACIÓN Útil.

ES 2 315 301 T3

Al margen de cómo se calcule la RELACIÓN Útil, a partir de componentes comercialmente asequibles se puede crear un sistema operativo que puede ser programado para que procese la RELACIÓN Útil. Este sistema operativo puede utilizar la RELACIÓN Útil para actuar sobre los controles que añaden físicamente biocida al medio opaco. El medio informático del sistema operativo puede ser cualquier ordenador digital, tal como, pero sin limitarse a, un Controlador Lógico Programable (PLC del inglés, programmable logic controller), un ordenador personal u otro dispositivo informático. El dispositivo alimentador de biocida puede ser un sencillo recipiente que contenga un biocida licuado, y una bomba. Preferiblemente, la bomba es capaz de suministrar una cantidad medida de biocida a la lechada o el coloide y puede ser activada manualmente, o por medio de una señal procedente del dispositivo informático, para que suministre dicha cantidad medida.

En cuanto a la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil, se sabe que, en ausencia de biocida, si aumenta la RELACIÓN Útil está entonces aumentando el nivel de actividad microbiológica.

Cuando el método del presente invento reivindicado se lleva a cabo en presencia de biocidas, han de hacerse ciertos ajustes. La gente que tiene experiencia normal en la técnica sabe qué biocidas se utilizan en los medios opacos. Los biocidas añadidos en respuesta a unos niveles inaceptables de actividad microbiana incluyen biocidas oxidantes y no oxidantes.

Los biocidas oxidantes incluyen, pero no se limitan a:

BCDMH (92,5%, 93,5%, 98%), que es 1,3-dicloro-5,5-dimetilhidantoína o 1-bromo-3-cloro-5,5-dimetilhidantoína (Registro del CAS nº 16079-88-2), o una mezcla de los mismos;

lejías, incluyendo lejías estabilizadas;

bromo, incluyendo bromo estabilizado;

hipoclorito cálcico (Registro del CAS nº 7778-54-3), "Cal Hypo" (68%);

cloro, incluyendo cloro estabilizado (8,34%);

H₂O₂/PAA (21,7%/5,1%), que es peróxido de hidrógeno (Registro del CAS nº 7722-84-1/ácido peracético (Registro del CAS nº 79-21-0);

hipobromito;

ácido hipobromoso;

yodo;

organobromos;

NaBr (42,8%, 43%, 46%), que es bromuro sódico;

NaOCl (10%, 12,5%), que es hipoclorito sódico (Registro del CAS nº 7681-52-9);

y mezclas de los mismos.

Los biocidas no oxidantes incluyen, pero no se limitan a:

adamantano, que es cloruro de 1-(3-cloroalil)-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantano (Registro del CAS nº 4080-31-3) al 67,5% en peso;

ADBAC quat [10%, 40% (Registro del CAS nº 68391-0-5), 80%], que es cloruro de alquil-dimetil-bencilamonio, también conocido como "quat";

ADBAC quat (15%)/TBTO (óxido de tributilestaño; 5%);

ADBAC (12,5%)/TBTO (2,5%), que es ADBAC quat/óxido de bis(tributilestaño) (Registro del CAS nº 56-35-9);

Bronopol es 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol (Registro del CAS nº 52-51-7) al 10% en peso;

carbamatos (30%), de fórmula T₂NCO₂H en que T₂ es un grupo alquilo C₁-C₁₀;

sulfato de cobre (80%);

DBNPA (20%, 40%), que es 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida (Registro del CAS nº 10222-01-2);

ES 2 315 301 T3

DDAC quat (50%), que es cloruro de didecil-dimetilamonio quat;

DPEEDBAC quat (1%), que es {2-[2-p-(diisobutil)fenoxi]etoxi}etil dimetil, dimetilbencilo;

glutaraldehído (15%, 45%) (Registro del CAS n° 111-30-8);

glutaraldehído (14%)/ADBAC quat (2,5%);

HHTHT, que es hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietil)-5-triazina (78,5%);

isotiazolonas (1,5%, 5,6%), que son una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona (Registro del CAS n° 26172-55-4) y 2-metil-4-isotiazolina-3-ona (Registro del CAS n° 2682-20-4);

MBT (10%), que es bisticianato de metileno (Registro del CAS n° 6317-18-6) al 10-20% en peso y fenol etoxilado (Registro del CAS n° 41928-09-0) al 5-10% en peso;

polyquat (20%, 60%), un compuesto cuaternario polímero; poliaminas y sales de las mismas - compuestos amínicos polímeros;

terbutilazina (4%, 44,7%), que es 2-(terc-butilamino)-4-cloro-6-etilamino-5-triazina (Registro del CAS n° 5915-41-3);

tiona, que es 3,5-dimetil-1,3,5,2H-tetrahidrotiadiazina-2-tiona (Registro del CAS n° 533-74-4) al 24% en peso e hidróxido sódico (Registro del CAS n° 1310-73-2) al 1-5% en peso;

TMTT (24%), disulfuro de tetrametiltiuram;

y mezclas de los mismos.

Se puede usar cualquier combinación de los anteriores biocidas. También se pueden utilizar biocidas adicionales. Estos biocidas adicionales incluirían los conocidos por una persona que tiene una experiencia normal en el campo de los biocidas. La única restricción en cuanto a la elección del biocida es que, si el biocida reacciona con el Colorante Fluorogénico más rápido que reacciona con (destruye) los microbios, es entonces inaceptable.

Se ha hallado que todos los Colorantes Fluorogénicos adecuados para uso en el presente invento reivindicado son susceptibles de una degradación (también conocida como “sofocación”) de grado variable en presencia de biocidas oxidantes. Cuando el método del presente invento reivindicado se utiliza en un medio opaco en que están presentes estos biocidas oxidantes, es importante extraer la(s) Parte(s) Alícuota(s) del medio opaco en un punto que esté lo más lejos posible del punto donde se añade el biocida oxidante a la lechada, el coloide o el fluido para procesamiento de metales.

En presencia de biocidas oxidantes, el método del presente invento reivindicado debe tener en cuenta este fenómeno de sofocación, no considerando las señales fluorescentes a no ser que se cuantifiquen por encima de un cierto nivel mínimo de “ruido”. Este nivel mínimo de “ruido” puede ser determinado con una certeza razonable para cada lechada, coloide y fluido para procesamiento de metales cuando el método del presente invento reivindicado puede ser llevado a la práctica por una persona con experiencia normal en el campo de la fluorometría.

Incluso sin la presencia de biocida oxidante, es necesario desechar las señales fluorescentes que no estén por encima de un “nivel mínimo de ruido” para el sistema. Este “nivel mínimo de ruido” será diferente para cada medio opaco. Una persona con experiencia normal en el campo de la fluorometría puede determinar el “nivel mínimo de ruido” para cada medio opaco.

Este fenómeno de sofocación puede ser también observado con biocidas no oxidantes, sustancias químicas reductoras (tales como sulfitos) y pHs ácidos porque cada uno de estos compuestos/fenómenos reacciona para reducir la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico. Esta sofocación de la señal del Colorante Fluorogénico es tenida en cuenta al utilizar un Inhibidor Metabólico así como un Colorante Fluorogénico en una Parte Alícuota. La utilización de un Inhibidor Metabólico en una Parte Alícuota para suprimir la reducción microbiológica del Colorante Fluorogénico permite la diferenciación de las reducciones químicas y biológicas de los Colorantes Fluorogénicos. De esta manera, es posible determinar la cantidad de reducción atribuible a la actividad microbiológica y separarla de la cantidad de reducción atribuible a una reducción química.

La Parte Alícuota, a la que se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, sólo mostrará el cambio de señal fluorescente del Colorante Fluorogénico atribuido a interacciones con productos químicos ya que el Inhibidor Metabólico detiene la actividad microbiológica, lo que significa que la actividad microbiológica no puede afectar al Colorante Fluorogénico.

Al calcular la RELACIÓN Útil en vez de medir simplemente un valor absoluto de señales fluorescentes, se obtiene una información que (1) es independiente de la concentración de Colorante Fluorogénico y (2) es más sensible a la

ES 2 315 301 T3

actividad microbiana. La sensibilidad se debe al hecho de que los organismos microbiológicos convierten el Colorante Fluorogénico en Colorante Fluorogénico Reaccionado, debiéndose el aumento de la RELACIÓN Útil tanto a la disminución de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico como al aumento de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado. La RELACIÓN Útil también es necesaria a causa de las diferencias en la dispersión y la fluorescencia de fondo de las diferentes muestras de lechadas, lo que, en caso de no usar dicha RELACIÓN, introduciría errores en las mediciones de valores absolutos.

Los organismos microbiológicos comúnmente hallados en una lechada, coloide o fluido para procesamiento de metales, que hasta ahora han sido detectables por, y sensibles a, los métodos de detección del presente procedimiento incluyen, pero no se limitan a, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Sphaerotilus* y *Haltscomenobacter*. Como se mencionó previamente, esta lista no es exhaustiva, y se advierte que otras bacterias y/o microorganismos pueden ser detectables mediante el procedimiento en que se utiliza dicho aparato.

El aspecto tercero del presente invento reivindicado es un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, caracterizado por comprender:

- (A) separar tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (B) no añadir nada a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco, añadir un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la tercera Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;
- (F) calcular la RELACIÓN Útil, siendo la RELACIÓN Útil la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo; y
- (G) utilizar la RELACIÓN Útil para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

El aspecto cuarto del presente invento reivindicado es el procedimiento del aspecto tercero del presente invento reivindicado, que comprende además:

- (H) utilizar la RELACIÓN Útil de las operaciones (F) y (G) para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y
- (I) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

En estos aspectos tercero y cuarto, se toma una tercera Parte Alícuota de medio opaco para análisis. A esta Parte Alícuota se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco. No se añade Colorante Fluorogénico a la Parte Alícuota-Blanco. Se usa un fluorómetro para medir las señales fluorescentes a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco. Antes del cálculo de la RELACIÓN Útil, las señales fluorescentes a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco son restadas de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Colorante. El uso de la Parte Alícuota-Blanco tiene en cuenta la fluorescencia de fondo que existe en el medio opaco a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado, antes de la adición del Colorante Fluorogénico.

ES 2 315 301 T3

Adviértase que, en los aspectos séptimo, octavo y décimo del presente invento reivindicado, se especifica que las señales fluorescentes de la Parte Alícuota-Blanco se miden tanto en el Tiempo Cero como en el Tiempo Futuro. En la práctica, no siempre se necesita realizar otra medición de las señales fluorescentes de la Parte Alícuota-Blanco en el Tiempo Futuro; en vez de ello, las señales fluorescentes de la Parte Alícuota-Blanco en el Tiempo Cero se utilizan tanto en los cálculos de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero como en los cálculos de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro.

De acuerdo con los diversos aspectos del presente invento reivindicado, se extrae una Parte Alícuota de medio opaco a la que se añade un Inhibidor Metabólico, lo que va seguido de la adición del Colorante Fluorogénico. A esta Parte Alícuota se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante.

Los Inhibidores Metabólicos adecuados son seleccionados del grupo que consiste en fenoles halogenados que incluyen, pero no se limitan a, pentaclorofenol e isómeros de cresol. El Inhibidor Metabólico preferido es una disolución de pentaclorofenol en dipropilenglicol-metil-éter. La cantidad de Inhibidor Metabólico añadido a la Parte Alícuota es de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 20.000 ppm, preferiblemente de aproximadamente 1000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, y muy preferiblemente es aproximadamente 5000 ppm.

Como se mencionó previamente, las señales fluorescentes de la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante son aquellas señales que muestran la interacción del Colorante Fluorogénico con productos químicos en el medio opaco, al margen de la interacción del Colorante Fluorogénico con organismos microbiológicos en el medio opaco. Si es necesario o deseable, la señal de la Parte Alícuota-Blanco es restada de la señal de la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante y es también restada de la Parte Alícuota-Colorante para obtener las señales fluorescentes cuando las señales fluorescentes se han modificado para tener en cuenta las interacciones con productos químicos y la fluorescencia de fondo.

De este modo, las RELACIONES Útiles calculadas en los aspectos tercero y cuarto del invento pueden tener en cuenta la fluorescencia de fondo y la interferencia de productos químicos.

Los métodos de los aspectos quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo del presente invento reivindicado requieren que se realicen un par de mediciones. El primer grupo de mediciones se realiza en el Tiempo Cero y el segundo grupo de mediciones se realiza en el Tiempo Futuro. Luego se comparan las RELACIONES Útiles en el Tiempo Futuro y en el Tiempo Cero para determinar la actividad microbiológica en la muestra.

Es posible una modificación de los métodos de los aspectos quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo del presente invento reivindicado. En esta modificación, las mediciones de las señales fluorescentes en las respectivas Partes Alícuotas se realizan en el Tiempo Cero y en múltiples tiempos futuros. Las RELACIONES Útiles calculadas son luego gráficamente representadas frente al tiempo en que se realizó cada medición utilizada en el cálculo de la RELACIÓN Útil. La velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con respecto al tiempo se utiliza para determinar y controlar el grado de contaminación microbiológica en el medio opaco.

Se ha de entender que, para los fines de esta solicitud de patente, el uso de la expresión “representado gráficamente” o “representación gráfica” se refiere a cualquier método aceptable para determinar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con respecto al tiempo y no significa que se necesite realizar una representación física concreta de la información. Por supuesto, la representación gráfica concreta es un medio aceptable para determinar la velocidad de cambio; sin embargo, otros medios aceptables consisten en utilizar técnicas de cálculo manuales o automáticas con que los datos pueden ser presentados gráficamente o en tablas o en alguna clase de conjunto que indique la relación entre la RELACIÓN Útil y el tiempo, y la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo. Además, también es aceptable que la representación gráfica se refiera a determinar simplemente la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo sin que se registren operaciones intermedias concretas.

Al medir las señales fluorescentes en el Tiempo Futuro, es bastante posible que pueda haber ocurrido cierta sedimentación del contenido de cada Parte Alícuota. Esta sedimentación es normal. Antes de realizar las mediciones en el Tiempo Futuro, se recomienda agitar cada Parte Alícuota para redistribuir el contenido de la Parte Alícuota por toda la Parte Alícuota.

En los aspectos noveno y décimo del presente invento reivindicado, se extrae una Parte Alícuota del medio opaco a la que se añade primero un Nutriente seguido de un Colorante Fluorogénico. A esta Parte Alícuota se hace entonces referencia como Parte Alícuota-Nutriente-Colorante. Al medir la señal fluorescente de la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, es posible medir la actividad microbiológica TOTAL a través de su efecto sobre el Colorante Fluorogénico. La actividad microbiológica TOTAL es una combinación de la actividad microbiológica activa y la actividad microbiológica inactiva. La actividad microbiológica activa es la actividad atribuida a los microorganismos en un estado activo. La actividad microbiológica inactiva es la actividad atribuida a los microorganismos que están en un estado inactivo o de reposo. La actividad microbiológica inactiva se mide mediante el Nutriente añadido a la Parte Alícuota. El Nutriente actúa como una fuente alimenticia para los microorganismos inactivos, lo que causa que se vuelvan activos.

El Nutriente puede ser cualquier material conocido capaz de mantener el crecimiento de microorganismos. El Nutriente puede ser seleccionado del grupo que consiste en hidratos de carbono, caldo nutriente que incluye proteínas y otros ingredientes, y mezclas de los mismos con agua. Preferiblemente, el Nutriente es una disolución de dextro-

ES 2 315 301 T3

sa, caldo nutriente y agua. La cantidad de Nutriente añadida a la Parte Alícuota es de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, preferiblemente de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 2000 ppm, y muy preferiblemente es aproximadamente 700 ppm.

5 En los párrafos siguientes se proporciona un resumen de algunos de, pero no todos, los posibles cálculos de RELACIONES Útiles que pueden tener valor en el método del presente invento reivindicado.

Las abreviaturas utilizadas en estos cálculos son las siguientes:

10 AB es la señal fluorescente en la Parte Alícuota-Blanco;

AC es la señal fluorescente en la Parte Alícuota-Colorante;

15 AIC es la señal fluorescente en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;

ANC es la señal fluorescente en la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante;

CF se refiere al Colorante Fluorogénico;

20 CFR se refiere al Colorante Fluorogénico Reaccionado;

TCero se refiere al Tiempo Cero; y

25 TFuturo se refiere al Tiempo Futuro.

Para el aspecto primero del presente invento reivindicado, la RELACIÓN Útil es:

$$30 \frac{AC^{CFR} - AIC^{CFR}}{AC^{CF} - AIC^{CF}}$$

35 Descrito con palabras, esta RELACIÓN Útil es la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Colorante a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico en la Parte Alícuota-Colorante, estando ajustadas ambas señales fluorescentes en cuanto a las interacciones con productos químicos.

Para el aspecto tercero del presente invento reivindicado, la RELACIÓN Útil es:

$$40 \frac{AC^{CFR} - AB^{CFR} - AIC^{CFR}}{AC^{CF} - AB^{CF} - AIC^{CF}}$$

45 Descrito con palabras, esta RELACIÓN Útil es la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Colorante menos la señal fluorescente a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco menos la señal fluorescente a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico en la Parte Alícuota-Colorante menos la señal fluorescente a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico en la Parte Alícuota-Blanco menos la señal fluorescente a la longitud de onda del Colorante Fluorogénico en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante.

55 A esta relación se hace también referencia como RELACIÓN ajustada en cuanto a la interacción con productos químicos y a la fluorescencia de fondo.

Otra RELACIÓN Útil es la RELACIÓN ajustada en cuanto a la fluorescencia de fondo y a la interacción con productos químicos en el Tiempo Cero y en el Tiempo Futuro.

$$60 \frac{(AC^{CFRaTFuturo} - AB^{CFR} - AIC^{CFRaTFuturo} - AB^{CFR}) - (AC^{CFRaTCero} - AB^{CFR} - AIC^{CFRaTCero} - AB^{CFR})}{(AC^{CFaTFuturo} - AB^{CF} - AIC^{CFaTFuturo} - AB^{CF}) - (AC^{CFaTCero} - AB^{CF} - AIC^{CFaTCero} - AB^{CF})}$$

65 = Actividad microbiana activa sólo entre el Tiempo Futuro y el Tiempo Cero

ES 2 315 301 T3

Otra RELACIÓN Útil es la RELACIÓN para la actividad microbiana total, corregida en cuanto a la fluorescencia de fondo y a las interacciones con productos químicos.

$$\frac{(ANC^{CFRaTFuturo} - AB^{CFR}) - AIC^{CFRaTFuturo} - AB^{CFR}}{(ANC^{CFaTFuturo} - AB^{CF}) - AIC^{CFaTFuturo} - AB^{CF}} - \frac{(ANC^{CFRaTCero} - AB^{CFR}) - AIC^{CFRaTCero} - AB^{CFR}}{(ANC^{CFaTCero} - AB^{CF}) - AIC^{CFaTCero} - AB^{CF}}$$

= Actividad microbiana total solamente

Otra RELACIÓN Útil es la RELACIÓN para la actividad microbiana inactiva, corregida en cuanto a la fluorescencia de fondo y a las interacciones con productos químicos, que puede ser obtenida al restar la RELACIÓN para la actividad microbiana activa a la RELACIÓN para la actividad microbiana total.

Como es cierto para los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto del presente invento reivindicado, en los aspectos quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo del presente invento reivindicado, el Colorante Fluorogénico preferido es la resazurina. El Colorante Fluorogénico más preferido es una disolución de resazurina en un tampón de fosfato con un pH de 8,0. Este es el Colorante Fluorogénico más preferido porque el tampón ayuda a aumentar la sensibilidad del ensayo al tamponar el pH de las muestras ligeramente ácidas.

Al llevar a cabo los métodos del presente invento reivindicado, es posible determinar la contaminación microbiana de un medio opaco y utilizar la información de la determinación para controlar la cantidad de biocida añadido al medio opaco.

Los ejemplos siguientes se presentan para que sean ilustrativos del presente invento y para enseñar cómo preparar y utilizar el invento a quien tiene una experiencia corriente. Con estos ejemplos no se pretende limitar el invento ni su protección en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1

Propiedades fluorescentes de un colorante fluorogénico y del colorante fluorogénico reaccionado en una lechada mineral

Ejemplo 1a

Investigación de las propiedades de las señales fluorescentes de la resazurina

La resazurina, en forma de sal sódica, es asequible de Aldrich. La sal se disuelve en lechadas y coloides acuosos y en ciertos fluidos para procesamiento de metales, quedando la resazurina como un Colorante Fluorogénico que puede reaccionar con la enzima respiratoria, la deshidrogenasa, presente en la membrana de muchos organismos microbiológicos. A causa de esta reacción con la deshidrogenasa, la resazurina es reducida hasta la 7-hidroxi-3H-fenoxazín-3-ona, también conocida como resorrufina. La resazurina y la resorrufina tienen diferentes señales fluorescentes. La resazurina presenta un conocido máximo de señal fluorescente de emisión a 634 nm, mientras que la resorrufina presenta un conocido máximo de señal fluorescente de emisión a 583 nm.

En la Figura 1 se muestra un gráfico de las señales fluorescentes (en cuentas por segundo) de la resazurina y la resorrufina en una lechada mineral en el Tiempo Cero y en el Tiempo Futuro. La lechada mineral contenía 25 ppm de resazurina en el Tiempo Cero. En este Ejemplo, el Tiempo Cero es aproximadamente un minuto. El Tiempo Futuro es aproximadamente 4 horas.

Los espectros mostrados en la Figura 1 se obtuvieron utilizando un fluorómetro SPEX™ asequible de Jobin Yvon Spex, 3880 Park Avenue, Edison, New Jersey 08820, EE.UU. El fluorómetro se ajustó del modo siguiente: el ancho de banda se ajustó a 2,5 nm tanto para la excitación como para la emisión, la longitud de onda de excitación se ajustó a 550 nm, y se barrió la emisión entre 570 y 650 nm a intervalos escalonados de 1 nm, con un tiempo de integración de 0,2 segundos en cada escalón. El fluorómetro SPEX™ usa cuentas de fotones individuales, por lo que las lecturas se presentan en cuentas por segundo.

En la Figura 1, el espectro en el Tiempo Cero se muestra como una línea continua, y el eje Y para el espectro en el Tiempo Cero es el eje Y secundario con unidades que van de 0 a 200.000 cuentas por segundo. En la Figura 1, el espectro en el Tiempo Futuro se muestra como una línea discontinua, y el eje Y para el espectro en el Tiempo Futuro es el eje Y primario con unidades que van de 0 a 2.000.000 de cuentas por segundo. Estos dos ejes Y se eligieron con el fin de ajustar los espectros en el Tiempo Futuro y el Tiempo Cero en la misma figura.

ES 2 315 301 T3

El espectro en el Tiempo Cero presenta picos a 583 nm y 634 nm, lo que indica la presencia de pequeñas cantidades de resorruфина en la muestra de resazurina. La muestra de resazurina utilizada tenía presente una pequeña cantidad de resorruфина, lo que significa que este espectro reflejaba precisamente la composición de la muestra en el Tiempo Cero. El espectro de las 4 horas también presenta picos a 583 nm y 634 nm, pero las intensidades relativas de estos picos son considerablemente diferentes. Los espectros, examinados conjuntamente, indican que del Tiempo Cero al Tiempo Futuro la resazurina se está reduciendo hasta resorruфина, sea por la acción de los organismos microbiológicos presentes en la lechada mineral o sea por la acción de la reducción de resazurina en resorruфина inducida por productos químicos, o sea por una combinación de estas dos acciones.

La acción de los organismos microbiológicos reduce la resazurina a causa de las deshidrogenasas presentes en los microorganismos, unidas a las membranas. Las deshidrogenasas son una clase de enzimas de transferencia electrónica presentes en todos los organismos microbiológicos. Sin la interacción con los organismos microbiológicos, la resazurina no se convierte por sí misma en resorruфина, en tiempo real, en ausencia de agentes químicos reductores.

La interacción continua con organismos microbiológicos causa que la intensidad del pico a 583 nm aumente en comparación con la del pico a 634 nm. Calculando la RELACIÓN de la intensidad del pico a 583 nm (pico del Colorante Fluorogénico Reaccionado) con la del pico a 634 nm (pico del Colorante Fluorogénico), se puede determinar el grado de actividad microbiológica y la presencia de agentes químicos reductores en el sistema.

Ejemplo 1b

Discusión de los límites de la RELACIÓN

La RELACIÓN calculada de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico presenta valores limitantes. Después de la interacción con los organismos microbiológicos, la RELACIÓN aumenta continuamente. Éste aumento continúa proporcionalmente a la actividad microbiana hasta que el valor se satura. El valor al cual se satura la RELACIÓN depende de la sensibilidad y la calibración del fluorómetro así como de la elección del Colorante Fluorogénico. Cuando se elige resazurina como Colorante Fluorogénico y se utiliza un fluorómetro SPEX™, la RELACIÓN calculada se satura en 5. Cuando se elige resazurina como Colorante Fluorogénico y se utilizan ciertos fluorómetros de diodos emisores de luz, la RELACIÓN calculada se satura en 6.

Por “se satura” se quiere significar que este es el máximo valor mensurable de la RELACIÓN. La actividad microbiana puede continuar constante durante mucho después, pero el valor de la RELACIÓN no continúa aumentando. En realidad, la RELACIÓN disminuirá finalmente ya que la resorruфина es luego reducida hasta dihidrorresorruфина no fluorescente.

El espectro de la resorruфина (pura) presenta una RELACIÓN de 5 entre la intensidad 583 nm y la intensidad 634 nm. Por lo tanto, si la concentración de resazurina es muy pequeña, predomina el espectro de la resorruфина. Esto se debe a que una molécula de resorruфина tiene un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia en comparación con una molécula de resazurina.

Se cree, sin pretender quedar vinculado por ello, que la razón de la saturación se basa en lo siguiente. La resorruфина presenta un máximo de emisión a 583 nm; sin embargo, también emite algo a 634 nm. La intensidad de la emisión a 634 nm es la quinta parte de la intensidad a 583 nm. Además, la resorruфина es una especie más fluorescente que la resazurina (es decir, si se excitan cantidades equimolares de resazurina y resorruфина a una longitud de onda concreta, 550 nm en este caso, la intensidad de la fluorescencia de la resorruфина es muy superior a la de la resazurina). Como resultado, cuando la mayor parte de la resazurina ha sido convertida en resorruфина por los organismos microbiológicos, la RELACIÓN de intensidades de fluorescencia se satura hasta el valor del pico de resorruфина solo.

Procedimiento para los Ejemplos 2 y 3

Reactivos

El Colorante Fluorogénico era una disolución de 1000 ppm de resazurina en agua, tamponada hasta un pH de 8,0.

El Nutriente era una disolución de 28.000 ppm de glucosa y caldo nutriente comercial [de Becton Dickinson Microbiological Systems, Sparks, Maryland, 21152 EE.UU., (410)-316-4000] en agua.

El Inhibidor metabólico era una disolución de 200.000 ppm de pentaclorofenol en dipropilenglicol-metil-éter.

ES 2 315 301 T3

Aparatos necesarios

Pipetas y puntas (para pipetas para disoluciones de 200 μ l)

5 Pipetas de transferencia

Cubetas desechables estándares

Tubos de centrífuga de poliestireno, de 15 ml de capacidad, con tapa o cualquier tubo transparente con tapa

10 Fluorómetro de cara frontal

Procedimiento

15 Si la lechada es demasiado espesa para mezclar, se diluye la lechada (inicialmente, antes de la transferencia) justo lo suficiente para permitir un mezclamiento adecuado de la lechada y los reactivos. Esta lechada se debería usar también para la medición del blanco.

- 20 1. Transferir 8 ml de Parte Alícuota de lechada a un tubo de centrífuga de 15 ml de capacidad.
2. Añadir 0,2 ml de Nutriente al tubo y marcar éste como “Parte Alícuota-Nutriente-Colorante”.
3. Colocar la tapa al tubo y sacudir bien para mezclar.
- 25 4. Transferir 8 ml de la misma muestra a otro tubo de centrífuga de 15 ml de capacidad.
5. Añadir 0,2 ml del Inhibidor metabólico a este tubo y marcar éste como “Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante”.
- 30 6. Colocar la tapa al tubo y sacudir bien para mezclar.
7. Seguir este procedimiento repitiendo las operaciones 1 a 6 para un número “n” de Partes Alícuotas.
8. Dejar reposar los tubos durante 15 minutos.
- 35 9. Añadir 240 μ l de Colorante Fluorogénico a cada tubo.
10. Colocar las tapas a los tubos y sacudir bien para mezclar.
- 40 11. Transferir una Parte Alícuota de aproximadamente 4,0 ml de cada tubo a distintas cubetas desechables estándares.
- 45 12. Medir la fluorescencia del Colorante Fluorogénico Reaccionado y del Colorante Fluorogénico en aproximadamente un minuto. Se excitan el Colorante Fluorogénico y el Colorante Fluorogénico Reaccionado a 532 nm y se miden los picos emitidos a 634 nm y 583 nm, respectivamente. Anotar las lecturas. Por ejemplo, la lectura de fluorescencia de la Parte Alícuota 1, Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, debe ser anotada bajo “Colorante Fluorogénico Reaccionado, Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en Tiempo Cero” y “Colorante Fluorogénico, Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en Tiempo Cero”, respectivamente. La lectura de fluorescencia de la Parte Alícuota 2, Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, debe ser anotada bajo “Colorante Fluorogénico Reaccionado, Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante en Tiempo Cero” y “Colorante Fluorogénico, Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante en Tiempo Cero”, respectivamente.
- 50 13. Repetir las operaciones 11 y 12 para cada conjunto de partes alícuotas.
14. Incubar las partes alícuotas restantes a 37°C en los tubos de centrífuga.
- 55 15. En el Tiempo Futuro, que es 6 horas después del Tiempo Cero, sacar los tubos de la incubadora. Transferir aproximadamente 3 ml de cada parte alícuota de los tubos a otro conjunto de cubetas desechables estándares.
- 60 16. Medir la fluorescencia del Colorante Fluorogénico Reaccionado y del Colorante Fluorogénico de cada parte alícuota. Anotar las lecturas. Por ejemplo, la lectura de fluorescencia de la Parte Alícuota 1, Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, debe ser anotada bajo “Colorante Fluorogénico Reaccionado, Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en Tiempo Futuro” y “Colorante Fluorogénico, Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en Tiempo Futuro”, respectivamente. La lectura de fluorescencia de la Parte Alícuota 2, Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, debe ser anotada bajo “Colorante Fluorogénico Reaccionado, Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante en Tiempo Futuro” y “Colorante Fluorogénico, Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante en Tiempo Futuro”, respectivamente.
- 65 17. Repetir las operaciones 15 y 16 para cada conjunto de partes alícuotas.

ES 2 315 301 T3

Medición del Blanco

18. Transferir 3 ml de la muestra original a otro conjunto de cubetas desechables estándares. Marcar éstas como “Parte Alícuota-Blanco” para cada parte alícuota.
19. Medir la fluorescencia de cada parte alícuota a las longitudes de onda del Colorante Fluorogénico Reaccionado y del Colorante Fluorogénico. Anotar las lecturas. Por ejemplo, la lectura de fluorescencia de la Parte Alícuota 3 debe ser anotada bajo “Colorante Fluorogénico Reaccionado, Parte Alícuota-Blanco” y “Colorante Fluorogénico, Parte Alícuota-Blanco”, respectivamente.

Interpretación de los resultados

Una actividad microbiológica total calculada $< 0,1$ significa actividad microbiológica baja;
una actividad microbiológica total calculada entre $0,1$ y $0,2$ significa actividad microbiológica media; y
una actividad microbiológica total calculada $> 0,2$ significa actividad microbiológica elevada.

Ejemplo 2

El medio opaco elegido para el análisis fue un revestimiento de la industria papelera que contenía arcilla, almidón, carbonato cálcico y un polímero de látex.

Se realizaron una vez mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco en el Tiempo Cero, y se utilizaron las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco tanto para el Tiempo Cero como para el Tiempo Futuro.

Se realizaron mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Colorante en el Tiempo Cero. Las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco fueron restadas de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Colorante tomadas en el Tiempo Cero, respectivamente. Se calculó la RELACIÓN Útil de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado a las del Colorante Fluorogénico de la Parte Alícuota-Colorante, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco.

Se realizaron mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante en el Tiempo Cero. Las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco fueron restadas de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante tomadas en el Tiempo Cero, respectivamente. Se calculó la RELACIÓN Útil de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado a las del Colorante Fluorogénico de la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco.

Se realizaron mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en el Tiempo Cero. Las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco fueron restadas de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante tomadas en el Tiempo Cero, respectivamente. Se calculó la RELACIÓN Útil de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado a las del Colorante Fluorogénico de la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco.

Se realizaron mediciones similares de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado y del Colorante Fluorogénico en la Parte Alícuota-Colorante, la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante y la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en el Tiempo Futuro, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco, y se calcularon las RELACIONES Útiles. El Tiempo Futuro fue seis horas después del Tiempo Cero.

ES 2 315 301 T3

Descripción de la muestra	Parte Alícuota-Colorante: RELACIÓN Útil de Colorante Fluorogénico Reaccionado a Colorante Fluorogénico		Parte Alícuota-Inhibidor-colorante: RELACIÓN Útil de Colorante Fluorogénico Reaccionado a Colorante Fluorogénico		Parte Alícuota-Nutriente-colorante: RELACIÓN Útil de Colorante Fluorogénico Reaccionado a Colorante Fluorogénico	
	Tiempo Cero	Tiempo Futuro	Tiempo Cero	Tiempo Futuro	Tiempo Cero	Tiempo Futuro
Revestimiento de la industria papelera, que consiste en arcilla, almidón, carbonato cálcico y polímero de látex	0,279	0,565	0,126	0,356	0,259	0,52
	actividad total sin Nutriente: Tiempo Futuro – Tiempo Cero 0,565 – 0,279 = 0,286		Interferencia química: Tiempo Futuro – Tiempo Cero 0,356 – 0,126 = 0,230		actividad total con Nutriente: Tiempo Futuro – Tiempo Cero 0,52 – 0,259 = 0,261	
actividad total sin Nutriente = microbiológica activa + interferencia química actividad total con Nutriente = microbiológica activa + microbiológica inactiva + interferencia química microbiológica total = actividad total con Nutriente - interferencia química = 0,261 – 0,230 = 0,031 microbiológica activa = actividad total sin Nutriente - interferencia química = 0,286 – 0,230 = 0,056 microbiológica inactiva = microbiológica total - microbiológica activa = 0,031 – 0,056 = -0,025; este número es indicativo de ausencia de microbiológica inactiva						

La actividad microbiológica total de 0,031 indica una actividad microbiológica muy baja, que corresponde a una densidad baja de 1000 unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (determinada mediante actividad de cuenta de placas estándar).

Los números que representan la microbiológica total y la microbiológica activa, 0,031 y 0,056 respectivamente, están tan próximos que la diferencia entre ellos es insignificante.

La muestra mostraba originalmente una elevada actividad total, con y sin Nutrientes, y una elevada interferencia química. La interferencia química restada de la actividad total con Nutrientes condujo a una microbiológica total baja, que corresponde a bajas cuentas de placas.

Ejemplo 3

El medio opaco elegido para el análisis fue una lechada de almidón crudo procedente de la industria papelera.

Se realizaron una vez mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco en el Tiempo Cero, y se utilizaron estas mediciones en la Parte Alícuota-Blanco tanto para el Tiempo Cero como para el Tiempo Futuro.

Se realizaron mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante en el Tiempo Cero. Las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco fueron restadas de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante tomadas en el Tiempo Cero, respectivamente. Se calculó la RELACIÓN Útil de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado a las del Colorante Fluorogénico de la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco.

ES 2 315 301 T3

Se realizaron mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en el Tiempo Cero. Las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Blanco fueron restadas de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado en la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante tomadas en el Tiempo Cero, respectivamente. Se calculó la RELACIÓN Útil de las mediciones de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado a las del Colorante Fluorogénico de la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco.

Se realizaron mediciones similares de las señales fluorescentes del Colorante Fluorogénico Reaccionado y del Colorante Fluorogénico en la Parte Alícuota-Colorante, la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante y la Parte Alícuota-Nutriente-Colorante en el Tiempo Futuro, ajustadas en cuanto a las mediciones en la Parte Alícuota-Blanco, y se calcularon las RELACIONES Útiles. El Tiempo Futuro fue seis horas después del Tiempo Cero.

Descripción de la muestra	Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante: RELACIÓN Útil de Colorante Fluorogénico Reaccionado a Colorante Fluorogénico		Parte Alícuota-Nutriente-Colorante: RELACIÓN Útil de Colorante Fluorogénico Reaccionado a Colorante Fluorogénico	
	Tiempo Cero	Tiempo Futuro	Tiempo Cero	Tiempo Futuro
Lechada de almidón crudo procedente de la industria papelera	0,186	0,225	0,167	0,781
	Interferencia química: Tiempo Futuro – Tiempo Cero 0,225 – 0,186 = 0,039		actividad total: Tiempo Futuro – Tiempo Cero 0,781 – 0,167 = 0,614	
actividad total = microbiológica total + interferencia química = 0,614 microbiológica total = actividad total – interferencia química = 0,614 – 0,039 = 0,575				

Se determinaron las cuentas bacterianas mediante métodos estándares para cuentas de placas, y se hallaron aproximadamente 56.000.000 de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra.

La muestra mostraba originalmente una elevada actividad total y una baja interferencia química. La interferencia química restada de la actividad total condujo a una microbiológica total elevada, que corresponde a elevadas cuentas de placas.

Se pueden realizar cambios en la composición, funcionamiento y disposición del método del presente invento reivindicado aquí descrito sin apartarse del concepto ni del alcance del invento como se define en las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 315 301 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, **caracterizado** por comprender:

- (a) obtener dos Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (b) añadir un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la segunda Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- (c) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado, teniendo dicho Colorante Fluorogénico y dicho Colorante Fluorogénico Reaccionado diferentes señales fluorescentes;
- (d) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (e) utilizar dichos medios de medición para medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;
- (f) calcular la RELACIÓN Útil, siendo la RELACIÓN Útil la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos; y
- (g) utilizar la RELACIÓN Útil para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

2. El procedimiento de la Reivindicación 1, **caracterizado** por comprender además:

- (h) utilizar dicha RELACIÓN Útil para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar al medio opaco; y
- (i) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

3. El procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco de la Reivindicación 1, **caracterizado** por:

- (A) separar tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (B) no añadir nada a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco, añadir un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la tercera Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;

ES 2 315 301 T3

(F) calcular la RELACIÓN Útil, siendo la RELACIÓN Útil la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo; y

(G) utilizar la RELACIÓN Útil para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

4. El procedimiento de la Reivindicación 3, **caracterizado** además por comprender:

(H) utilizar la RELACIÓN Útil de las operaciones (F) y (G) para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

(I) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

5. El procedimiento para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco de la Reivindicación 1, **caracterizado** por:

(a) obtener dos Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;

(b) añadir un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico a la segunda Parte Alícuota, seguido de la adición de un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;

(c) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes durante un periodo de tiempo conocido como “Tiempo Cero”, para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;

(d) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;

(e) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Colorante y en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado después del Tiempo Cero, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado;

(f) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos;

(g) esperar durante un periodo de tiempo, denominado “Tiempo Futuro”;

(h) medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Colorante y en la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante después del Tiempo Futuro a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado;

(i) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro la RELACIÓN, en el Tiempo Futuro, de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos;

(j) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y

(k) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

ES 2 315 301 T3

6. El procedimiento de la Reivindicación 5, **caracterizado** además por comprender:

- (l) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y
- (m) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

7. El procedimiento de la Reivindicación 1 para la determinación de poblaciones microbiológicas en un medio opaco, **caracterizado** por:

- (A) separar tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- (B) no añadir nada a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco, añadir un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico seguido de un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes durante un periodo de tiempo conocido como "Tiempo Cero", para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, en dicha Parte Alícuota-Colorante y en dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante después del Tiempo Cero a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, mientras se desechan los valores de señales fluorescentes medidas que están por debajo de un nivel de ruido predeterminado, para obtener las señales fluorescentes en el Tiempo Cero;
- (F) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero la RELACIÓN de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo;
- (G) esperar durante un periodo de tiempo, denominado "Tiempo Futuro";
- (H) utilizar dichos medios de medición para medir las señales fluorescentes después del Tiempo Futuro en la Parte Alícuota-Blanco, la Parte Alícuota-Colorante y la Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- (I) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, siendo la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro la RELACIÓN, en el Tiempo Futuro, de la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo, a la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico ajustada en cuanto a interacciones con productos químicos y a la fluorescencia de fondo;
- (J) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y
- (K) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

8. El procedimiento de la Reivindicación 7, **caracterizado** además por comprender:

- (L) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y
- (M) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

ES 2 315 301 T3

9. El procedimiento de la Reivindicación 1 para la determinación de poblaciones microbiológicas tanto activas como inactivas en un medio opaco, **caracterizado** por comprender:

- 5
- (A) obtener tres Partes Alícuotas de material procedentes del medio opaco;
- 10
- (B) añadir directamente un Colorante Fluorogénico a la primera Parte Alícuota, primera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Colorante, añadir un Nutriente y un Colorante Fluorogénico a la segunda Parte Alícuota, segunda Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Nutriente-Colorante, y añadir un Inhibidor Metabólico y un Colorante Fluorogénico a la tercera Parte Alícuota, tercera Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante;
- 15
- (C) dejar que dicho Colorante Fluorogénico sea reducido por las deshidrogenasas presentes en las membranas de los organismos microbiológicos presentes durante un periodo de tiempo conocido como “Tiempo Cero”, para producir un Colorante Fluorogénico Reaccionado;
- 20
- (D) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante, dicha Parte Alícuota-Nutriente-Colorante y dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante, midiéndose las señales fluorescentes en cada Parte Alícuota a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, respectivamente;
- 25
- (E) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes después del Tiempo Cero en dicha Parte Alícuota-Colorante, dicha Parte Alícuota-Nutriente-Colorante y dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y a la longitud de onda de emisión del Colorante Fluorogénico Reaccionado, para obtener las señales fluorescentes en el Tiempo Cero;
- 30
- (F) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero que puede ser seleccionada del grupo que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Cero, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado en cuanto a interacciones con productos químicos con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico en cuanto a interacciones con productos químicos, la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Cero, y la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Cero;
- 35
- (G) esperar durante un periodo de tiempo, denominado “Tiempo Futuro”, y medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Colorante, dicha Parte Alícuota-Inhibidor-Colorante y dicha Parte Alícuota-Nutriente-Colorante a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado después del Tiempo Futuro;
- 40
- (H) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro que es seleccionada del grupo que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Futuro, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado en cuanto a interacciones con productos químicos con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico en cuanto a interacciones con productos químicos, la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica activa del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Futuro, y la RELACIÓN de la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico Reaccionado a la señal fluorescente microbiológica inactiva del Colorante Fluorogénico en el Tiempo Futuro;
- 45
- (I) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y
- 50
- (J) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.
- 55

10. El procedimiento de la Reivindicación 9, **caracterizado** además por comprender:

- 60
- (K) obtener una cuarta Parte Alícuota de material procedente del medio opaco;
- (L) no añadir nada a la cuarta Parte Alícuota, cuarta Parte Alícuota a la que ahora se hace referencia como Parte Alícuota-Blanco;
- 65
- (M) proporcionar medios para la medición de las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco, midiéndose las señales fluorescentes a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado;

ES 2 315 301 T3

(N) utilizar dichos medios para la medición de dichas señales fluorescentes, para medir las señales fluorescentes después del Tiempo Cero en dicha Parte Alícuota-Blanco a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado, para obtener las señales fluorescentes en el Tiempo Cero;

(O) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero, RELACIÓN Útil que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Cero, teniendo en cuenta las interferencias de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta las interferencias de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico;

(P) esperar durante un periodo de tiempo, denominado “Tiempo Futuro”, y medir las señales fluorescentes en dicha Parte Alícuota-Blanco a las longitudes de onda de emisión del Colorante Fluorogénico y del Colorante Fluorogénico Reaccionado después del Tiempo Futuro;

(Q) calcular la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro, RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro que consiste en la RELACIÓN de la microbiológica total en el Tiempo Futuro, teniendo en cuenta la interferencia de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico Reaccionado con respecto a la microbiológica total, y teniendo en cuenta la interferencia de fondo en la señal fluorescente del Colorante Fluorogénico;

(R) comparar la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero; y

(S) utilizar la comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

11. El procedimiento de la Reivindicación 9 ó 10, **caracterizado** además por comprender:

utilizar dicha comparación de la RELACIÓN Útil en el Tiempo Futuro con la RELACIÓN Útil en el Tiempo Cero para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

12. El procedimiento de la Reivindicación 7 o la Reivindicación 10, **caracterizado** porque las señales fluorescentes detectadas en la Parte Alícuota-Blanco en el Tiempo Cero se usan tanto para el Tiempo Cero como para el Tiempo Futuro.

13. El procedimiento de la Reivindicación 1, 3, 5, 7, 9 ó 10, **caracterizado** porque dicho Colorante Fluorogénico es resazurina.

14. El procedimiento de la Reivindicación 1, 7, 9 ó 10, **caracterizado** porque dicho medio para la medición de señales fluorescentes es un fluorómetro de cara frontal.

15. El procedimiento de la Reivindicación 5 ó 7, **caracterizado** por comprender además:

(l) repetir las operaciones (g) a (j); y

(m) representar gráficamente el valor de la RELACIÓN Útil frente al tiempo en que se calculó cada RELACIÓN Útil y utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

16. El procedimiento de la Reivindicación 15, **caracterizado** además por comprender:

(n) utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

(o) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

17. El procedimiento de la Reivindicación 9, **caracterizado** por comprender además:

(K) repetir las operaciones (G) a (J); y

(L) representar gráficamente el valor de la RELACIÓN Útil frente al tiempo en que se calculó cada RELACIÓN Útil y utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

ES 2 315 301 T3

18. El procedimiento de la Reivindicación 17, **caracterizado** por comprender además:

(M) utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

(N) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

19. El procedimiento de la Reivindicación 10, **caracterizado** por comprender además:

(T) repetir las operaciones (P) a (S); y

(U) representar gráficamente el valor de la RELACIÓN Útil frente al tiempo en que se calculó cada RELACIÓN Útil y utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar el grado de contaminación microbiológica en dicho medio opaco.

20. El procedimiento de la Reivindicación 19, **caracterizado** por comprender además:

(V) utilizar la velocidad de cambio de la RELACIÓN Útil con el tiempo para determinar la cantidad óptima de biocida que hay que suministrar a dicho medio opaco; y

(W) suministrar dicha cantidad óptima de biocida al medio opaco.

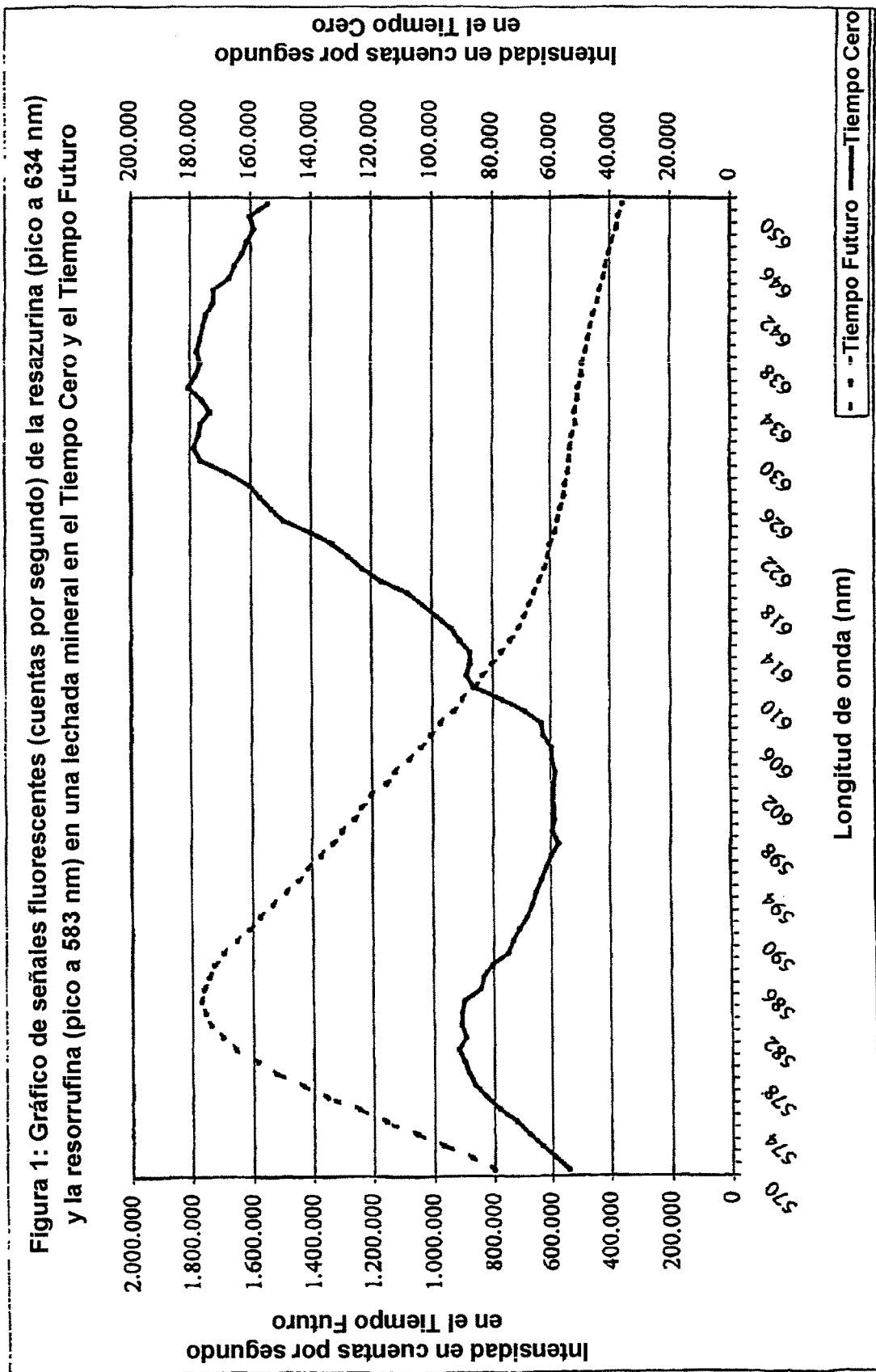


FIGURA 1

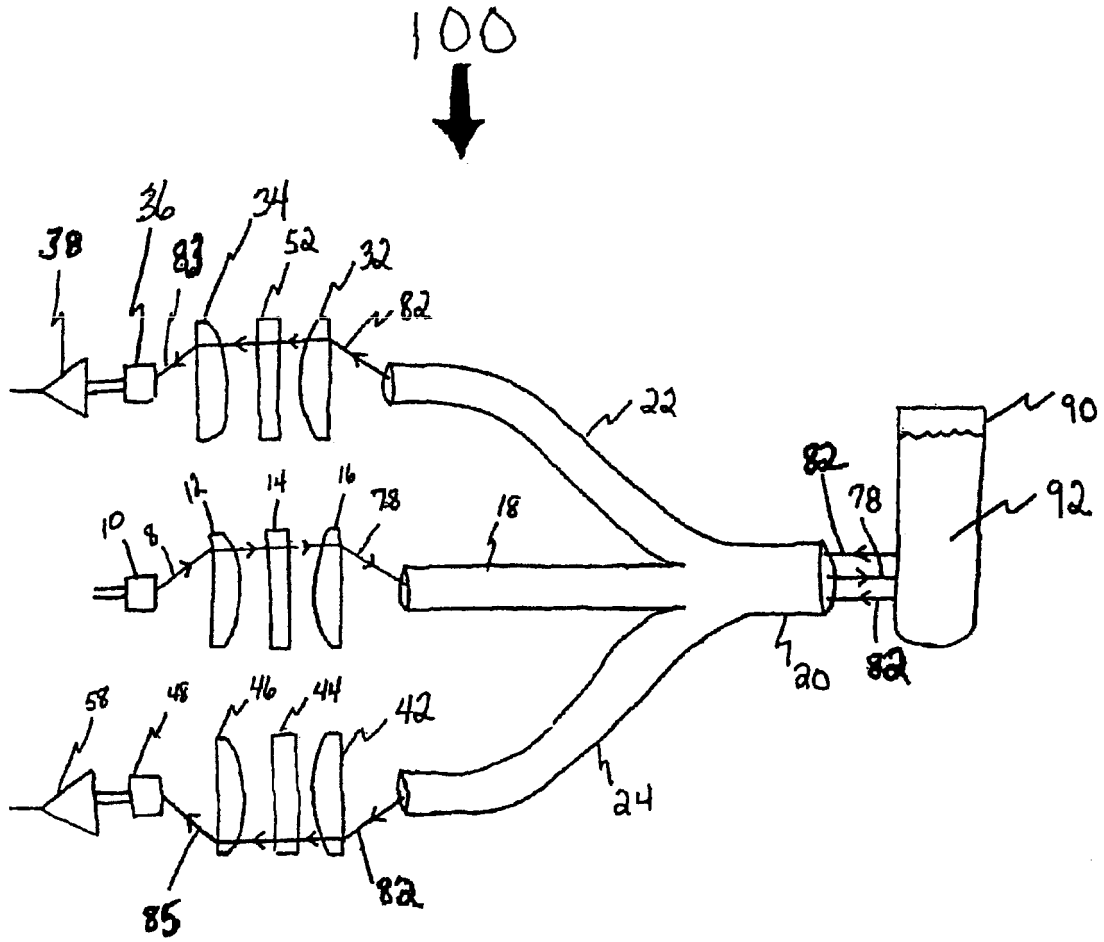


FIGURA 2