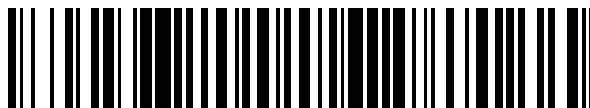


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 265**

21 Número de solicitud: 201300581

51 Int. Cl.:

G01N 1/10 (2006.01)

G01N 21/75 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 35/02 (2006.01)

G01N 35/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.12.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario, s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

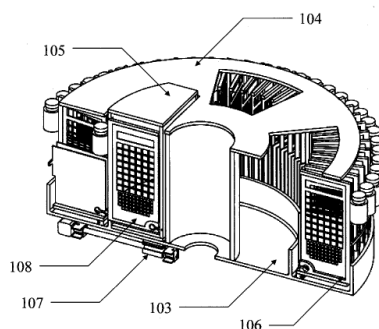
FERNÁNDEZ HERMIDA, Xulio y
DURÁN NEIRA, Carlos

54 Título: **Aparato para el análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas**

57 Resumen:

Esta invención consiste en un aparato para el análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría. El aparato descrito realiza de forma autónoma la toma de muestra, preparación de ésta, cultivo, lectura de resultados y envío de los datos de forma remota. Para ello se basa en técnicas de colorimetría para el recuento de coliformes en muestras de agua mediante el método del número más probable. El aparato se compone de una parte mecánica, encargada de la gestión y manipulación de todos los elementos, cultivo de la muestra y toma de imágenes; una parte hidráulica, encargada de gestionar los líquidos implicados en el proceso, y un dispositivo de envío de datos.

Figura 3



DESCRIPCIÓN

Aparato para el análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas

5 Sector de la técnica

La presente invención se sitúa en el sector de aparatos de análisis de aguas, más concretamente en el de los aparatos de análisis de la calidad microbiana o bacteriológica de las aguas. La presente invención describe como realizar dicho análisis de un modo automatizado, integrando los componentes necesarios para la preparación de la muestra, el análisis de los resultados y el tratamiento informático de los resultados. Como resultado se obtienen la automatización de la tarea y el funcionamiento como módulo autónomo de análisis que puede incorporarse a equipos más complejos de análisis multiparamétrico.

15

Estado de la técnica

Tradicionalmente el análisis de la calidad microbiológica del agua potable o de baño se lleva a cabo mediante el recuento de coliformes. Este procedimiento normalmente implica la toma de una muestra en el lugar elegido y su traslado al laboratorio para el análisis posterior de la misma por parte de personal técnico cualificado.

20

Este análisis incluye generalmente una etapa de preparación de un caldo de cultivo que permite el desarrollo de un tipo de bacteria en particular y la incubación de este caldo a una temperatura controlada durante un tiempo determinado que fomente el desarrollo de las colonias bacterianas deseadas y que contiene un indicador de nutriente. Este indicador de nutriente incluye fuentes de nutrientes unidas a o conjugadas con cromógenos. Los indicadores de nutriente se metabolizan de forma óptima durante los periodos de crecimiento, que al liberar un cromógeno provoca un cambio característico y detectable en la muestra. Los cromógenos incluyen cualquier resto que produce un cambio de color observable en la región del visible o ultravioleta cuando se excita apropiadamente mediante la fuente de energía apropiada. Los ejemplos incluyen restos ortonitrofenilo, fenolftaleína y 4-metilumbeliferona. Aunque el indicador de nutriente puede proporcionar la única fuente de un nutriente esencial, pueden proporcionarse otras fuentes de tales nutrientes (Patente española ES2305912-T3).

25

30

35

La razón de este proceso es proporcionar un crecimiento controlado de colonias bacterianas de la especie que se desea cuantificar, de modo que sea más fácil cuantificarlas. Al haber fomentado el crecimiento de una forma controlada, es posible determinar el recuento bacteriano de la muestra de origen por el cambio de color de la muestra.

40

Uno de los métodos de recuento de coliformes en muestras de agua más empleado, utiliza el método del Número Más Probable (NMP) descrito en "Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Analytical Methods for Biological Pollutants in Wastewater and Sewage Sludge: Final Rule [EPA-HQ-OW-2004-0014; FRL-8228-1] RIN 2040-AE68, in document 40 CFR Parts 136 and 503, US Environmental Protection Agency)" y con anterioridad en "Compendium of methods for the Microbiological Examination on Water and Wasterwater (8ª edición, 1992)". En este

45

procedimiento, un volumen de una muestra de agua, se reparte en varios tubos (por ejemplo 10 tubos de 10 x 10, conteniendo, cada uno de ellos 10 ml) y se permite que crezcan bacterias en cada tubo. Tras la incubación, a una temperatura específica, se cuentan los tubos. El número más probable se determina utilizando la fórmula

5

$$NMP/100ml = P \times 100 / (N \times T)^{(1/2)}$$

En donde P es el número de tubos positivos, N es el volumen de la muestra en ml en los tubos negativos, T es el volumen de la muestra en todos los tubos y NMP es el número más probable. La confianza del método aumenta con el número de tubos empleados.

10

Este procedimiento del Número Más Probable ha sido utilizado en la invención que describe la patente española ES2201099, en la que se cuantifica el número de bacterias en una muestra de líquido empleando un dispositivo consistente en un recipiente equipado con entre 40-60 pocillos transparentes, de fácil llenado y sellado con forma de tableta. El recuento del número de pocillos conduce aplicando el método NMP a la cuantificación por comparación con unos patrones de referencia

15

Este proceso precisa de una considerable aportación de factor humano y de cierto coste y tiempo para obtener los resultados, ya que las muestras se tratan individualmente por parte del personal de laboratorio que realiza la lectura de los resultados. Para mejorar la eficacia resulta de mucho interés la automatización de la tarea, tanto por el considerable ahorro de tiempo que conlleva para el personal técnico, como para aumentar el número de muestras analizadas.

20

25

Descripción

Este documento describe un aparato para el análisis automatizado de la calidad biológica de aguas que utiliza el recuento de coliformes. El sistema descrito realiza de forma autónoma la toma de muestra, preparación de esta, cultivo, lectura de resultados y análisis de los mismos. Para ello se basa en técnicas de tratamiento de imágenes para el recuento de coliformes en muestras de agua mediante el método del Número más Probable, utilizando elementos comerciales y reproduciendo el trabajo de un técnico de laboratorio de forma automática. Los datos de las medidas se obtienen en formato digital, lo que hace muy versátil su tratamiento. El sistema se compone de varias partes: la parte mecánica, encargada de la gestión y manipulación de todos los elementos, cultivo de la muestra y toma de imágenes; la parte hidráulica, encargada de gestionar los líquidos implicados en el proceso y la parte de procesado de imagen encargada de reconocer los colores de las celdas de cultivo y de decidir si en ellas se ha desarrollado o no el cultivo de bacterias.

30

35

40

Los elementos necesarios para llevar a cabo el análisis son:

- microviales o celdas de cultivo **203** donde se realiza el cultivo de la muestra y lectura de los resultados,
- blíster **202** en el que se ubican los microviales de cultivo;
- vial de mezcla **204**, donde se introduce el agua a analizar y se realiza la mezcla con el extracto seco de nutrientes para formar el caldo de cultivo
- una cámara de cultivo o incubadora en la que se aplica temperatura adecuada durante un tiempo determinado de modo que se desarrollen las colonias

45

bacterianas en el caso de que existan estas bacterias en el agua a analizar.

Para la realización del análisis se utiliza:

- 5 – Un sistema de alimentación automático que gestiona los diferentes elementos desechables, tanto los no usados como los usados, e introduce y saca los blísters de la cámara de cultivo
- Un sistema hidráulico que realiza una gestión precisa de los líquidos implicados en el proceso manteniendo la exactitud en las proporciones necesaria para el proceso.
- 10 – Un sistema de agitación para conseguir la adecuada mezcla del agua con el extracto seco de nutrientes ya precargado en el vial de mezcla.
- Un sistema de reparto del caldo en las celdas de cultivo y aislamiento del agua de cada celda.
- 15 – Un sistema electrónico de control de la temperatura y el tiempo de cultivo en la incubadora.
- Un sistema de iluminación y toma de imagen que obtiene las imágenes de las celdas de cultivo en el blíster.
- Un sistema de procesamiento de imagen que analiza esas imágenes comparándolas con una referencia de umbrales y obtiene los NMP de coliformes totales y coliformes fecales.
- 20 – Un sistema de comunicación que transmite la información obtenida (imágenes y/o NMP's a un ordenador o sistema de comunicación externo.
- Un sistema de alimentación eléctrico que provee de energía a todos los sistemas anteriores.

25 El sistema de alimentación automático comprende un carrusel circular, similar al de un proyector de diapositivas, que contiene los casettes que se introducen en la incubadora para hacer el análisis de aguas y se devuelven al carrusel una vez han sido usados. El carrusel contiene los casettes preparados para su uso y los ya usados tras haber pasado por la incubadora. Dispone de un motor y un sistema de control para el movimiento del carrusel y de otro motor con su sistema de control para la introducción del cassette en la incubadora y su retirada posterior de vuelta al carrusel una vez analizada el agua.

30 Cada cassette contiene un marco en el que va enganchado un blíster conectado con el catéter de trasvase al vial de mezcla y los viales de mezcla precargados con el extracto seco de nutrientes. Todo el conjunto está perfectamente aislado e higienizado.

 El sistema hidráulico está formado por una parte mecánica (que se encarga de clavar dos agujas en el tapón de goma del vial de mezcla) y por una parte hidráulica (que se encarga de introducir las cantidades exactas de agua a analizar y agua destilada en el vial de mezcla para, posteriormente ser mezcladas con los nutrientes para formar el caldo, y a continuación hacer el trasvase del caldo al blíster.

40 El sistema de agitación se pone en marcha una vez que el vial de mezcla ya ha sido cargado con el agua a analizar (el extracto seco de nutrientes se encuentra dentro) y se detiene antes de que el sistema hidráulico trasvase el caldo desde el vial de mezcla al blíster.

45 El sistema de reparto del caldo está incluido dentro de la incubadora y se encarga de hacer el reparto del caldo en las celdas de cultivo y de que el caldo en cada celda quede aislado de las demás celdas.

El sistema electrónico de control de la incubadora actúa cuando el blíster del cassette ya tiene todas las celdas llenas y aisladas con el caldo. En ese momento sube la temperatura hasta la temperatura de cultivo y cuando ésta se alcanza empieza a contar el tiempo de cultivo. Pasado ese tiempo da paso al sistema de iluminación y toma de imagen.

El sistema de iluminación y toma de imagen está también incluido dentro de la incubadora y hace las fotos con luz blanca y ultravioleta de todas las celdas del blister.

El sistema de procesamiento de imagen analiza estas fotos y obtiene los NMP's de coliformes totales y coliformes fecales. El procesamiento consiste en estudiar la coloración de cada celda y compararla con unos umbrales. Aplicando este procesamiento a la imagen obtenida con luz blanca se obtiene el MNP de coliformes totales. Aplicándolo a la imagen obtenida con luz ultravioleta se obtiene el MNP de coliformes fecales.

En ambos casos, se encuentran disponibles comercialmente líquidos coloreados con el color umbral que se usará para la detección de positivos. Si la saturación del color es igual o mayor que la del líquido de referencia, se considera positiva la presencia de bacterias; en caso contrario se considera negativa. El blíster contiene celdas grandes y celdas pequeñas. Contando el número de celdas positivas y negativas grandes y pequeñas, los valores tabulados indican el NMP de bacterias existentes en el agua objeto del análisis.

El sistema de transmisión comunica estos datos (imágenes digitalizadas y valores NMP) hacia el exterior. Si el equipo está en un laboratorio se comunica con una pantalla propia o con un ordenador al que esté conectado (mediante puertos RS232 o USB). Si está integrado en una boya o cualquier otro aparato de análisis se comunica con el sistema de comunicaciones de la boya o de dicho aparato.

El sistema de alimentación eléctrico aporta la energía para accionar todos los sistemas. Si el equipo va a estar en un laboratorio se prepara para funcionar enchufado a la red eléctrica. Si va a estar instalado en una boya se prepara para funcionar conectado a una batería de 12 voltios.

El aparato hasta aquí descrito es completamente autónomo, y se ha tenido en cuenta la posibilidad de integrarlo en equipos para el muestreo de aguas *in situ*, como pueden ser boyas autónomas. La integración de este módulo, aportaría información complementaria a boyas de análisis multiparamétricos. Por otro lado, el aparato descrito en la presente invención se serviría del sistema de muestreo y del sistema de comunicaciones, haciendo posible el análisis biológico de forma remota y autónoma.

El estado del arte más próximo sobre aparatos para el muestreo de aguas de forma remota está representado por la patente US8312768B2 (Autonomous and Remote-Controlled Multi-Parametric Buoy for Multi-Depth Water Sampling, Monitoring, Data Collection, Transmission and Analysis), que describe una boya autónoma para el muestreo de aguas a diversas profundidades que comprende un módulo de análisis independiente y que tiene capacidad para el muestreo, auto-mantenimiento, recogida, análisis y transmisión de datos de diferentes parámetros físicos de las aguas

El funcionamiento de este aparato de análisis se describe a continuación y en él se

pueden distinguir las siguientes etapas:

- 5

 - Toma de una muestra del agua a analizar y creación del caldo de cultivo mediante mezcla por agitación con el extracto seco de nutrientes:
 - Si se trata de agua dulce: Toma una muestra del agua a analizar y mezcla de ésta con el medio de cultivo (envasado por dosis) en el vial de mezcla **204** mediante agitación.
 - Si se trata de agua de mar: Toma una muestra de menor volumen de agua de mar que se diluye con un volumen de agua destilada de modo que en conjunto alcanza el volumen de caldo necesario para rellenar los microviales o celdas de cultivo que contiene un blíster.
 - En ambos casos, (aguas dulces o aguas saladas) el proceso es reproducible y garantiza que los volúmenes de agua de mar y de agua destilada así como la mezcla con el caldo son los correctos.
- 10

 - Una vez preparado el caldo en el vial de mezcla: Traspaso del caldo de cultivo al blíster mediante técnicas hidráulicas y reparto del caldo en todas las celdas de cultivo (pequeñas y grandes).
- 15

 - Una vez repartido el caldo en las celdas de cultivo: Sellado de las celdas para evitar que el caldo pueda moverse entre celdas y así que las bacterias en una celda puedan alcanzar el caldo de otras celdas lo que falsearía el recuento final.
 - Este sellado puede ser térmico (existen blíster comerciales preparados para poder hacer este sellado)
 - pero también puede ser mecánico siempre que garantice la estanqueidad de las celdas durante el tiempo de cultivo y fotografiado.
- 20

 - Con el caldo repartido y aislado en las celdas de cultivo: Cultivo termostatzado del blíster en una incubadora en las condiciones de temperatura y tiempo elegidas (generalmente para coliformes 18 horas a 35 °C)
- 25

 - Pasado el tiempo de cultivo en la incubadora: Lectura de los resultados, haciendo recuento de celdas coloreadas (debido a la proliferación de colonias bacterianas).
 - Se hace la foto con luz blanca y se compara el color de cada celda con el color umbral. Se obtiene en Número Más Probable de coliformes totales.
 - Se hace la foto iluminando con luz ultravioleta (longitud de onda 365 nm.) y se compara el color de cada celda con el color umbral. Se obtiene el Número Más Probable de coliformes fecales.
- 30

 - Comunicación de los datos por el puerto de comunicaciones que se haya especificado (puerto RS232, USB, etc.) y en el formato que se haya especificado (solamente valores NMP, solamente fotografías, ambos, etc.)
- 35

 - Comunicación de los datos por el puerto de comunicaciones que se haya especificado (puerto RS232, USB, etc.) y en el formato que se haya especificado (solamente valores NMP, solamente fotografías, ambos, etc.)
- 40

 - Comunicación de los datos por el puerto de comunicaciones que se haya especificado (puerto RS232, USB, etc.) y en el formato que se haya especificado (solamente valores NMP, solamente fotografías, ambos, etc.)
- 45

 - Los dibujos, así como la descripción general de la patente, se refieren

Descripción detallada de un modo de realización

La presente invención puede adoptar diversas realizaciones. En el caso de uso en laboratorio no hay limitaciones en la alimentación eléctrica y la salida de datos se hace directamente a un ordenador. A continuación se describe a efectos ilustrativos, pero no limitativos un modo particular de realización. Se trata de un aparato pensado para su uso integrado en una boya en el mar. En el caso de análisis de aguas dulces, las diferencias afectarían exclusivamente a la forma de usar las bombas que mueven agua y aire en las dos agujas que acceden al vial de mezcla.

10

La **figura 1** representa el módulo de análisis biológico de aguas para su instalación en una boya, donde se indica la carcasa protectora **101** y a través de un corte el dispositivo de análisis **102** alojado en el interior de la misma.

La **figura 2** representa el dispositivo de análisis. Un bastidor **103** hace de soporte a toda la estructura. Un tambor giratorio **106** contiene los elementos desechables para el análisis (cassettes) y los transporta hacia la cámara de cultivo **105**. Este tambor aloja los elementos para el análisis (conjunto blíster + vial de mezcla), referidos como cassettes, tanto los que están listos para usar como los ya usados. Un soporte superior extraíble **104** completa la estructura. La cámara de cultivo (incubadora) **105** se encarga de mantener las condiciones de temperatura óptimas para el cultivo de la muestra y contiene los sistemas de sellado del blíster y de toma de imágenes para la lectura de resultados.

La **figura 3** representa una sección del dispositivo de análisis. El tambor giratorio **106** gira 360° sobre la base del bastidor **103**, permitiendo sustituir un cassette usado por otro nuevo. Un sistema de desplazamiento lineal **107** se encarga de sacar el cassette (conjunto blíster + vial de mezcla) **108** desde el tambor hasta el interior de la cámara de cultivo o incubadora **105**. Una vez situado el cassette dentro de la cámara de cultivo se inyecta la muestra en el vial de mezcla mediante un sistema de agujas para la preparación del caldo de cultivo y se hace el trasvase del caldo desde el vial de mezcla hacia el blíster.

La **figura 4** representa en detalle el sistema del tambor. Una estructura giratoria **110** contiene los alojamientos para los cassettes **108**. Esta estructura gira guiada por la base del bastidor **103**.

La **figura 5** representa una vista en planta en la que se pueden ver fijados a la parte inferior de la base del bastidor **103** el actuador lineal **107** que se encarga de desplazar los cassettes desde el tambor hacia el interior de la cámara de cultivo (incubadora), y el motor **109** encargado de hacer girar el tambor que contiene los cassettes.

La **figura 6** representa el cassette, la unidad básica para el análisis (conjunto vial de mezcla + blíster). Está formado por una rejilla **202** sobre la que encajan perfectamente las celdas de cultivo del blíster **203**. Este soporte está rodeado por un marco **201**. El vial de mezcla **204** está enganchado en este marco y unido al blíster a través de un catéter de trasvase **205** que permite el paso del caldo de cultivo desde el vial de mezcla hacia el blíster. El tapón del vial de mezcla es de goma (u otro material blando) permitiendo así que las agujas por las que se inyecta la muestra lo atraviesen fácilmente. Su resistencia es suficiente para mantener la pequeña presión del sistema hidráulico necesaria para

transferir el caldo. Una muesca en el marco **206** permite que el sistema de desplazamiento encargado de meter/sacar los casettes del tambor hacia la cámara de cultivo los enganche con facilidad.

- 5 La **figura 7** representa un esquema de la cámara de cultivo (incubadora). Está formada por una estructura base **302** más una tapa extraíble **301**. Cuando el cassette **108** entra en la incubadora un sistema de agujas pincha el tapón de goma del vial de mezcla e inyecta la muestra para preparar el caldo de cultivo. Un sistema de agitación garantiza la homogeneidad del caldo. Una vez preparado, el caldo se trasvasa mediante un sistema
10 neumático al blíster a través del catéter de trasvase.

- Un sistema de sellado **304** se encarga de presionar por la parte posterior al blíster. Por la forma de aplicar esta presión, el caldo se va distribuyendo por todas las celdas que van quedando llenas y aisladas unas de otras. La cámara de cultivo contiene un sistema de
15 termostatización que permite mantener las condiciones de temperatura óptimas para el cultivo durante el tiempo necesario.

- Un sistema de toma de imágenes **303** se encarga de realizar la lectura del color de las celdas de cultivo del blíster una vez finalizado el cultivo. Para hacer la toma de
20 imágenes usa un sistema de iluminación con luz blanca y ultravioleta obteniendo así dos imágenes a partir de las cuales obtendrá el NMP de coliformes totales y de coliformes fecales.

- La **figura 8** representa un esquema del sistema hidráulico. Una bomba **405** se encarga de aspirar la muestra de agua a analizar a través de una toma de muestreo **403**. El catéter **406** que une la bomba con la aguja que inyecta la muestra en el vial de mezcla está dimensionado de tal modo que contiene la cantidad exacta de la muestra de agua que
25 queremos analizar, garantizando así la precisión en el muestreo.

- Otra bomba **401** suministra el agua destilada procedente de un depósito **402** completando así el volumen de agua para mezclar con el extracto seco de nutrientes. Un sistema de inyección **407** con una aguja por cada líquido, inyecta los líquidos en el vial de mezcla **204** a través de un tapón de goma o similar.
30

- El vial de mezcla está precargado con el extracto seco de nutrientes que, al mezclarse con el agua, formará el caldo de cultivo. Un sistema de agitación mecánico garantiza la homogenización del caldo. Una vez mezclado, se trasvasa al blíster **203** a través del catéter de trasvase **205**.
35

- Si se trata de aguas saladas, los pasos son los siguientes: se inyecta primero el agua salada a analizar en el vial de mezcla (poca cantidad); a continuación se inyecta el agua destilada necesaria para completar la muestra mientras la otra bomba (por donde entró el agua salada) aspira aire para evitar que pase líquido por el catéter de trasvase antes de
40 tiempo.

- Una vez el agua salada y el agua destilada han entrado al vial de mezcla (o simplemente esa misma cantidad total en el caso de aguas dulces), un sistema mecánico agita el vial de mezcla para garantizar la disolución del extracto seco de nutrientes. La válvula **404** permite que la bomba **405** inyecte aire en el interior del vial de mezcla **204** obligando al
45

caldo de cultivo a circular a través del catéter de trasvase **205** hasta el blíster **203**, esto garantiza además que el circuito de muestreo de agua salada quede lleno de aire y que la siguiente muestra no se contamine con líquido que haya podido quedar dentro del catéter. Una vez finalizado el proceso comienza la fase de sellado del blíster y de cultivo en la incubadora.

Si se trata de aguas dulces el sistema es ligeramente diferente. En este caso se usa igualmente el sistema de inyección con dos agujas. Mientras el agua dulce entra al vial de mezcla por una aguja, se retira el mismo volumen de aire por la otra aguja de modo que el agua se mantenga en el vial de mezcla, junto con el extracto seco de nutrientes y no se pase todavía al blíster pues necesita ser adecuadamente mezclado con los nutrientes.

En el siguiente muestreo, se usan las agujas al revés (inyectando la muestra de agua por el catéter que antes se ha usado para sacar aire y que ahora está seco, y sacando aire por el catéter que antes introdujo el agua y que puede haber quedado lleno de agua). Esta es una manera muy sencilla de conseguir que el catéter que se usa para introducir el agua a analizar esté vacío de agua de un tiempo de muestreo anterior. Si se considera que ningún catéter debe quedar lleno de agua entre muestreos, este deberá ser vaciado una vez que las agujas se hayan extraído del tapón del vial de mezcla. En este caso, el catéter por el que se introduce el agua puede ser siempre el mismo pues se vacía luego de haber introducido agua en el vial de mezcla.

Descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un módulo autónomo de análisis biológico de aguas que se puede incorporar en una boya, donde muestra el interior a través de un corte. Se indican la carcasa **101** y el sistema de análisis **102** alojado en el interior de la misma

La **Figura 2** muestra el esquema general del sistema (contenido en el interior del cuerpo de la boya). Se indican el bastidor **103**, el tambor giratorio **106**, la cámara de cultivo (incubadora) **105** y el soporte superior extraíble **104**.

La **Figura 3** muestra una sección del sistema. Se indican: sistema de desplazamiento lineal **107** y cassette **108**.

La **Figura 4** muestra el esquema del tambor con la estructura giratoria **110**

La **Figura 5** muestra una vista de la planta del sistema. Se indica el motor **109** encargado de hacer girar el tambor que contiene los cassettes.

La **Figura 6** muestra el cassette, como unidad básica. Se indican: la rejilla **202** sobre la que encajan perfectamente las celdas del blíster **203**. Este soporte está rodeado por un marco **201**. El vial de mezcla **203** está enganchado en este marco y unido al blíster a través de un catéter de trasvase **205** que permite el paso del caldo de cultivo desde el vial de mezcla hacia el blíster. El marco **206** permite al sistema de desplazamiento encargado de meter/sacar los "casetes" del tambor hacia la cámara de cultivo enganchar los cassettes.

La **Figura 7** muestra un esquema de la cámara de cultivo (incubadora). Se indican: la estructura base **302** más una tapa extraíble **301**, el sistema de sellado **304**, y el sistema de toma de imágenes **303**.

- 5 La **Figura 8** muestra un esquema del sistema hidráulico. Se indican: la bomba de aspiración **405**, la toma de muestreo **403**, el catéter **406** que une la bomba con la aguja que inyecta la muestra en el vial de mezcla, la bomba **401** encargada de suministrar agua destilada procedente del depósito **402**, el sistema de inyección **407** con una aguja por cada líquido, y la válvula **404** que permite que la bomba **405** inyecte aire en el
10 interior del vial de mezcla **204**.

- La **Figura 9** muestra un diagrama esquemático del proceso completo que se realiza en el equipo y los sistemas que los van implementando. En la primera línea está la parte de preparación de la muestra y su cultivo. En la segunda línea están los procesos de
15 iluminación, captura y análisis de imagen y la comunicación de resultados al exterior. También el retorno del casete al carrusel y el giro de carrusel para tener un nuevo casete preparado para un nuevo análisis.

- Sistema alimentación automático (**A**), sistema hidráulico (**B**), sistema agitación (**C**), sistema de reparto (**D**), control temperatura y tiempo (**E**), iluminación con luz blanca
20 (**F**), imagen umbral (**G**), procesado de imagen (**H**), iluminación con luz ultravioleta (**I**), Imagen umbral (**J**), procesado de imagen (**K**), sistema comunicación (**L**),

- casete en carrusel (**1**), casete en incubadora (**2**), agua en el vial de mezcla (**3**), caldo en el vial de mezcla (**4**), caldo en el blíster (**5**), caldo en las celdas (**6**), blíster listo para
25 análisis de imagen (**7**), foto para coliformes totales (**8**), número coliformes totales (**9**), foto para coliformes fecales (**10**), número coliformes fecales (**11**), blíster analizado por imágenes, (**12**), comunicación resultado imágenes y/o NMP (**13**) casete usado vuelve al carrusel (**14**), giro carrusel y nuevo casete en incubadora (**15**)

REIVINDICACIONES

1.-Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, que comprende

5

a) un plato portador de muestras dispuesto para su rotación alrededor de un eje vertical dotado de una serie de separadores de que alojan recipientes destinados a contener muestras, que cuenta con medios de transporte para llevar los recipientes a una cámara de termostatización;

10

b) medios hidráulicos para la toma y preparación de muestras, y transporte de líquidos hasta los recipientes destinados a contener muestras;

c) una cámara para termostatización de la muestra; que contiene medios para la iluminación de la muestra y medios para la toma de imágenes de la muestra;

d) medios para el análisis digital de las imágenes.

15

2.-Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicación 1, que comprende un bastidor (103), donde se aloja un motor (109) que mueve un tambor giratorio (106) que contiene una serie de recipientes destinados a contener muestras (108) en espacios separados, un sistema de desplazamiento lineal (107), una cámara incubadora (105) que mantiene las condiciones de temperatura deseadas en el interior y que contiene un sistema de sellado del blíster (304), un sistema de iluminación y un sistema toma de imágenes (303).

20

3.- Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicación 1-2, en el que los elementos desechables para el análisis (108) comprenden un blíster (203), un soporte marco (201) al que está sujeto un vial de mezcla (204) unido al blíster a través de un tubo (205) que permite el paso del caldo de cultivo desde el vial de mezcla hacia el blíster.

30

4.- Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicación 1-3, en el que el sistema de transporte de líquidos comprende una bomba (405) que aspira la muestra de agua a analizar a través de una toma de muestreo (403), un tubo (406) que une la bomba con la aguja que inyecta la muestra en el vial de mezcla (204).

35

5.- Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicación 4, en el que el sistema de transporte de líquidos comprende además una bomba (401) que suministra agua destilada procedente de un depósito (402) para dilución de muestras marinas.

40

6.- Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicaciones 1-5, caracterizado por detectar la presencia de microorganismos por cultivo e incubación de la muestra con un caldo de cultivo que contiene un indicador de nutriente que libera un cromógeno que colorea la muestra.

45

7.- Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicaciones 1-6, caracterizado por

cuantificar el número de microorganismos en una muestra según el procedimiento del Número Más Probable, empleando un dispositivo consistente en un recipiente equipado con entre 40-60 pocillos transparentes, susceptible de llenado y sellado automático.

- 5 8.- Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicaciones 1-4, caracterizado por realizar el análisis de resultados por comparación de imágenes de los recipientes destinados a contener muestras con imágenes de referencia.
- 10 9. Aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría, según reivindicaciones 1-8, caracterizado por funcionar como módulo autónomo de análisis en una boya para análisis de aguas *in situ*.
- 15 10. Uso del aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas según reivindicaciones 1-8, para análisis de aguas *in situ* en cualquier tipo de boyas.
11. Uso del aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas según reivindicaciones 1-8, para el análisis de microorganismos.
- 20 12. Uso del aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas según reivindicación 1-8, para el análisis de bacterias coliformes.
13. Uso del aparato para análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas según reivindicación 1-8, para el análisis de bacterias coliformes fecales y totales.

Figura 1

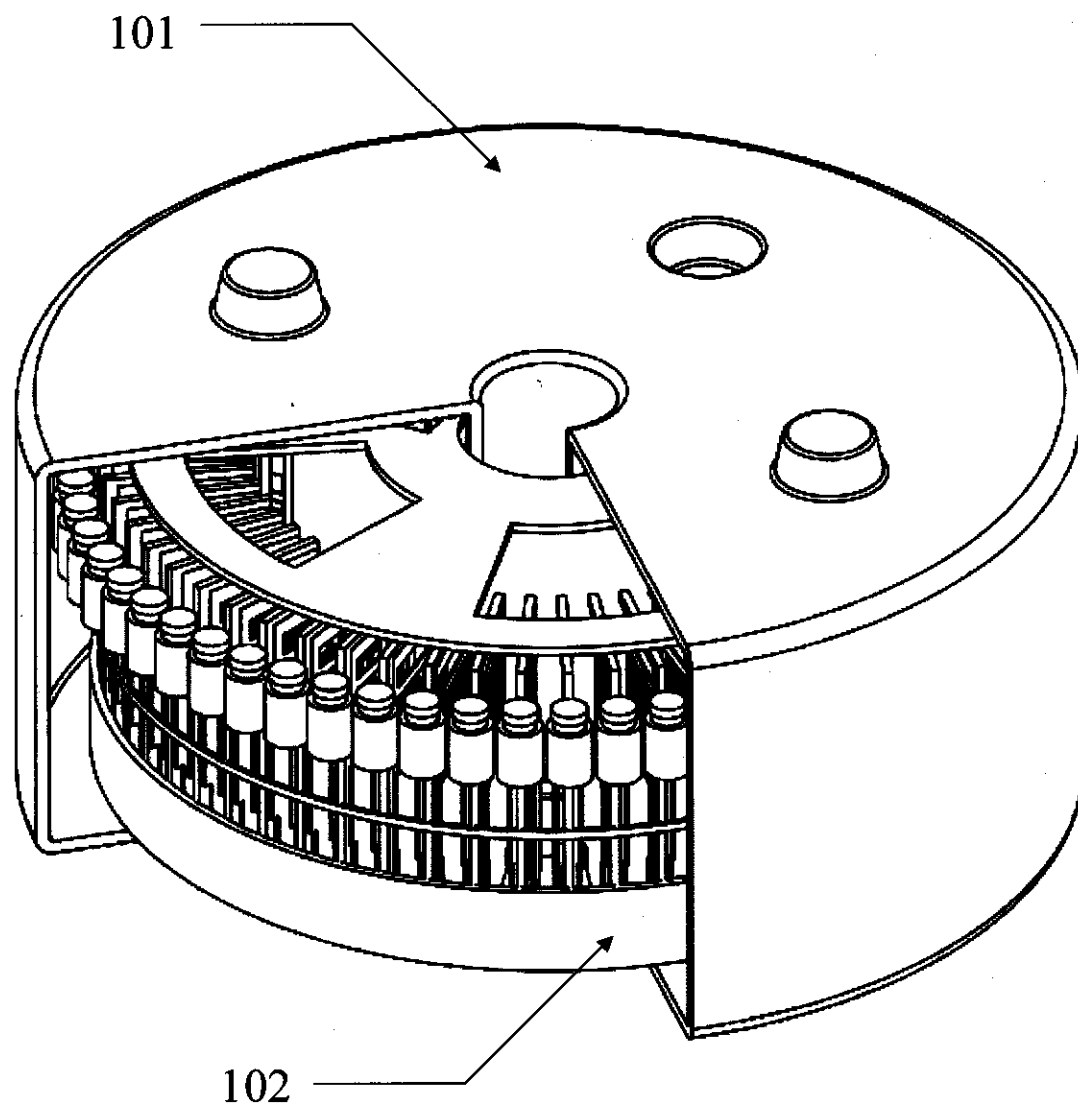


Figura 2

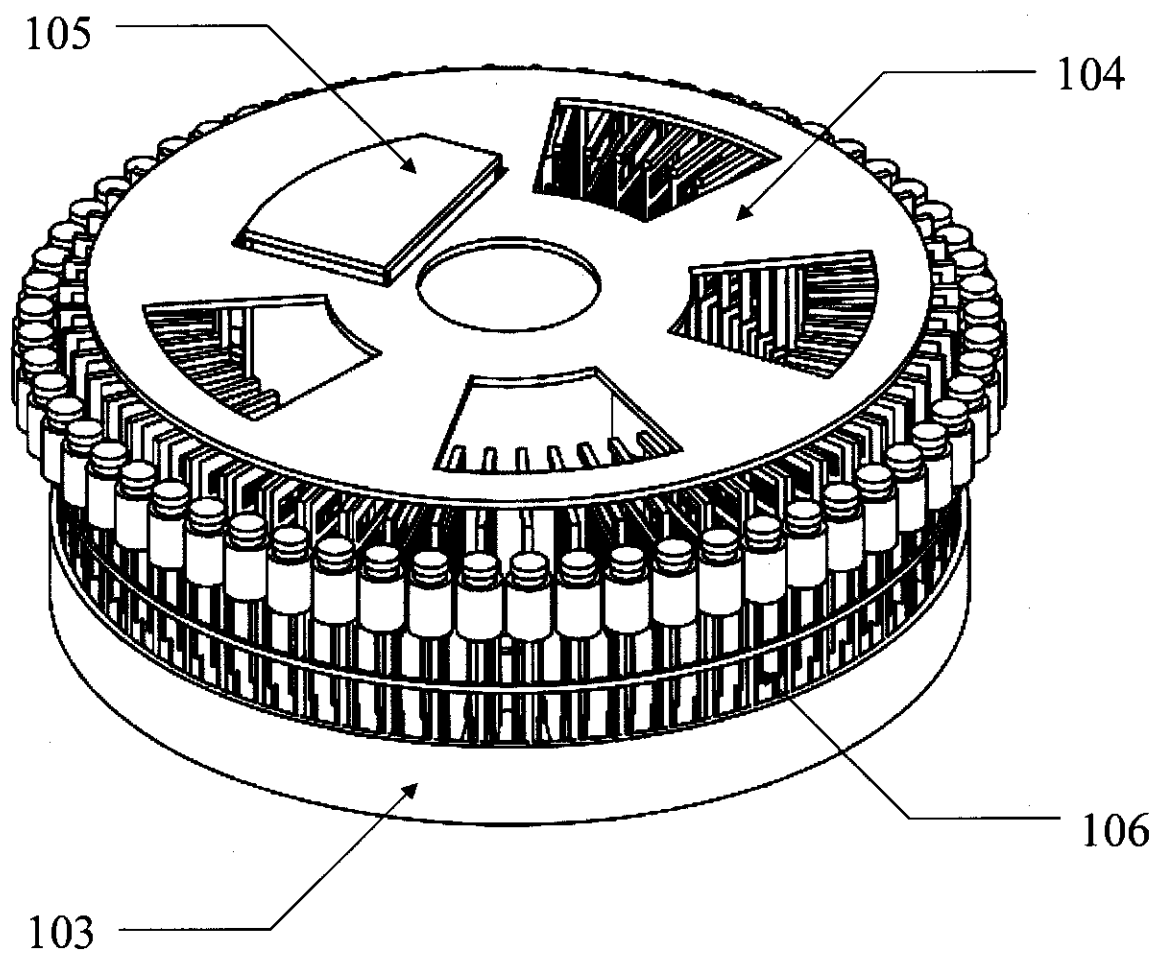


Figura 3

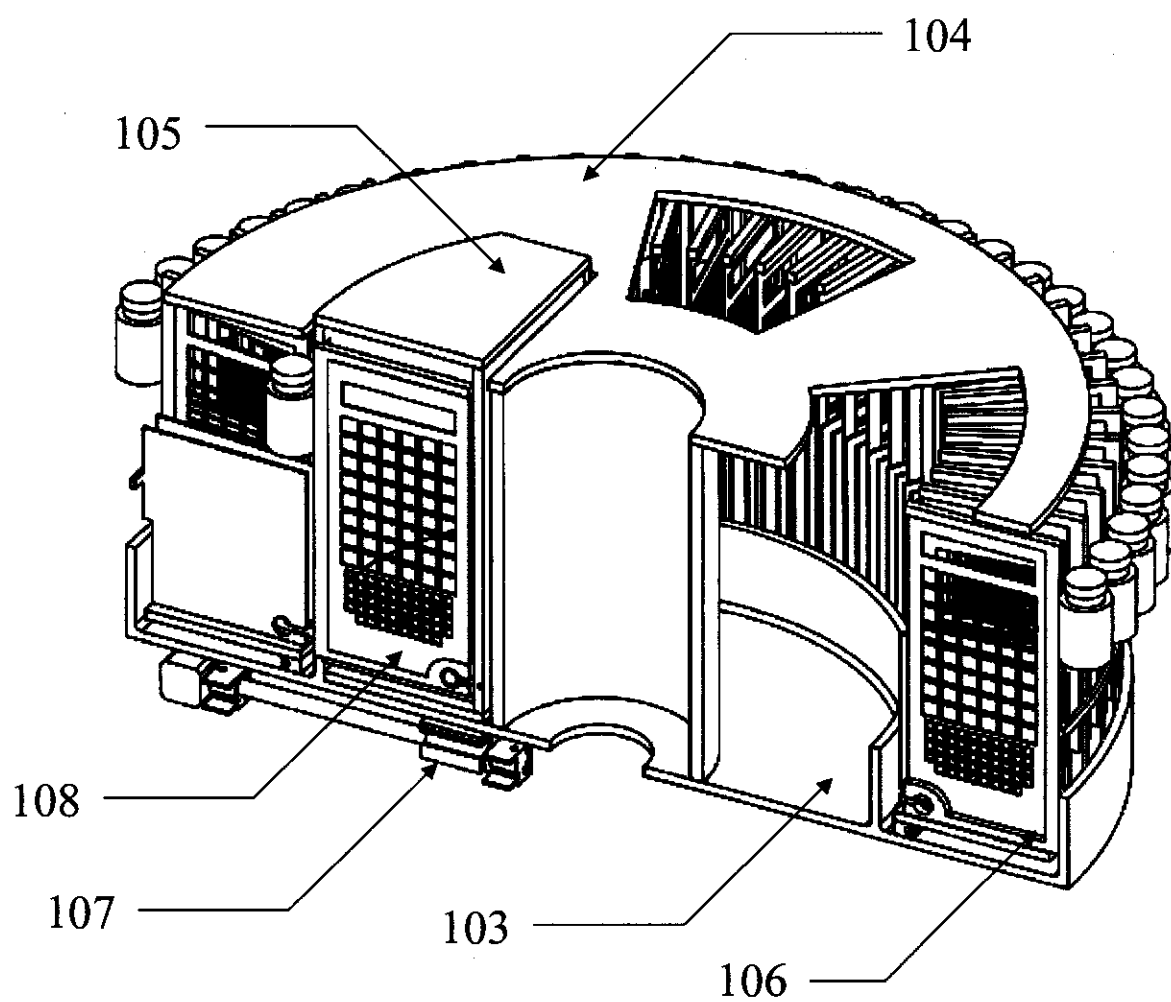


Figura 4

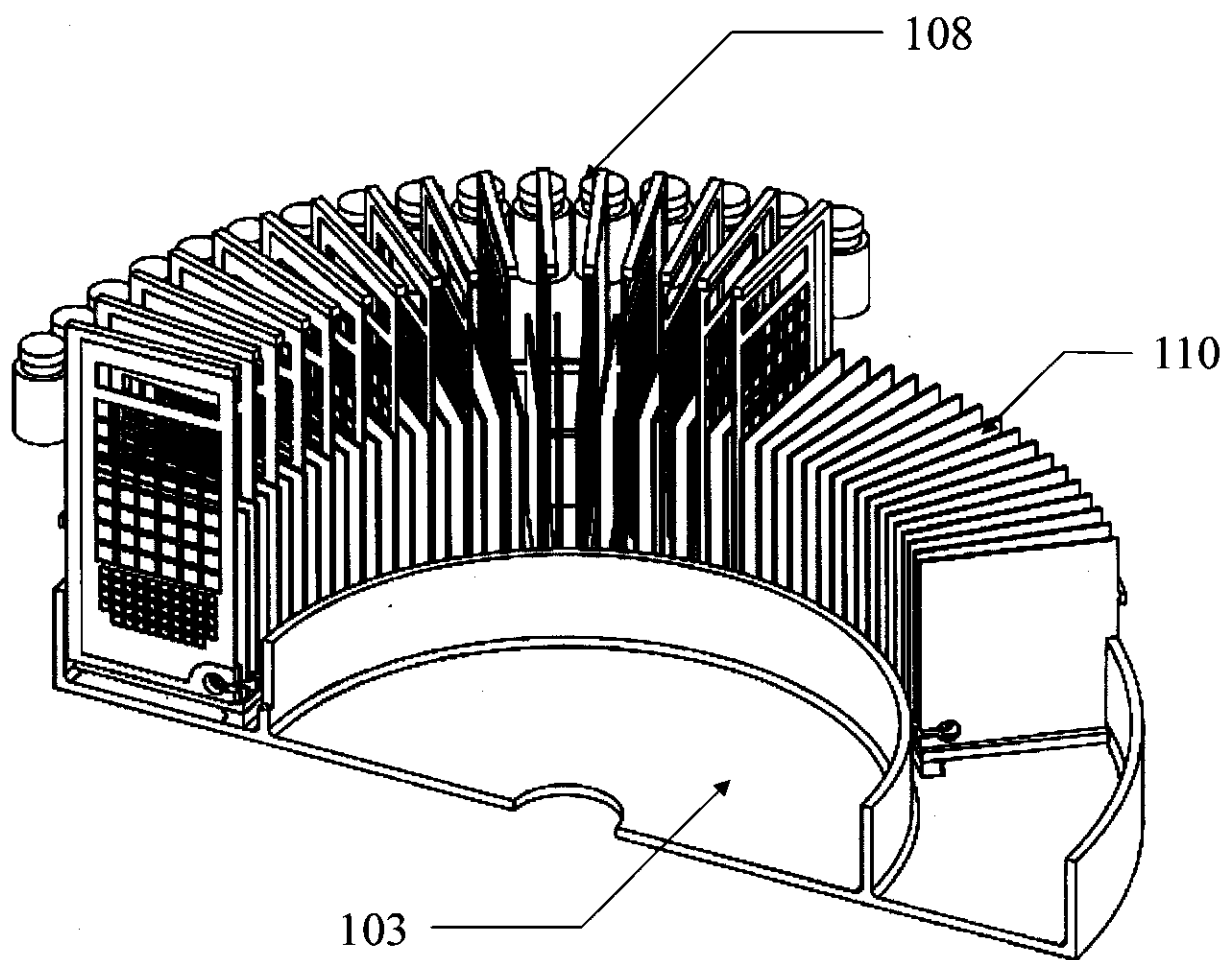


Figura 5

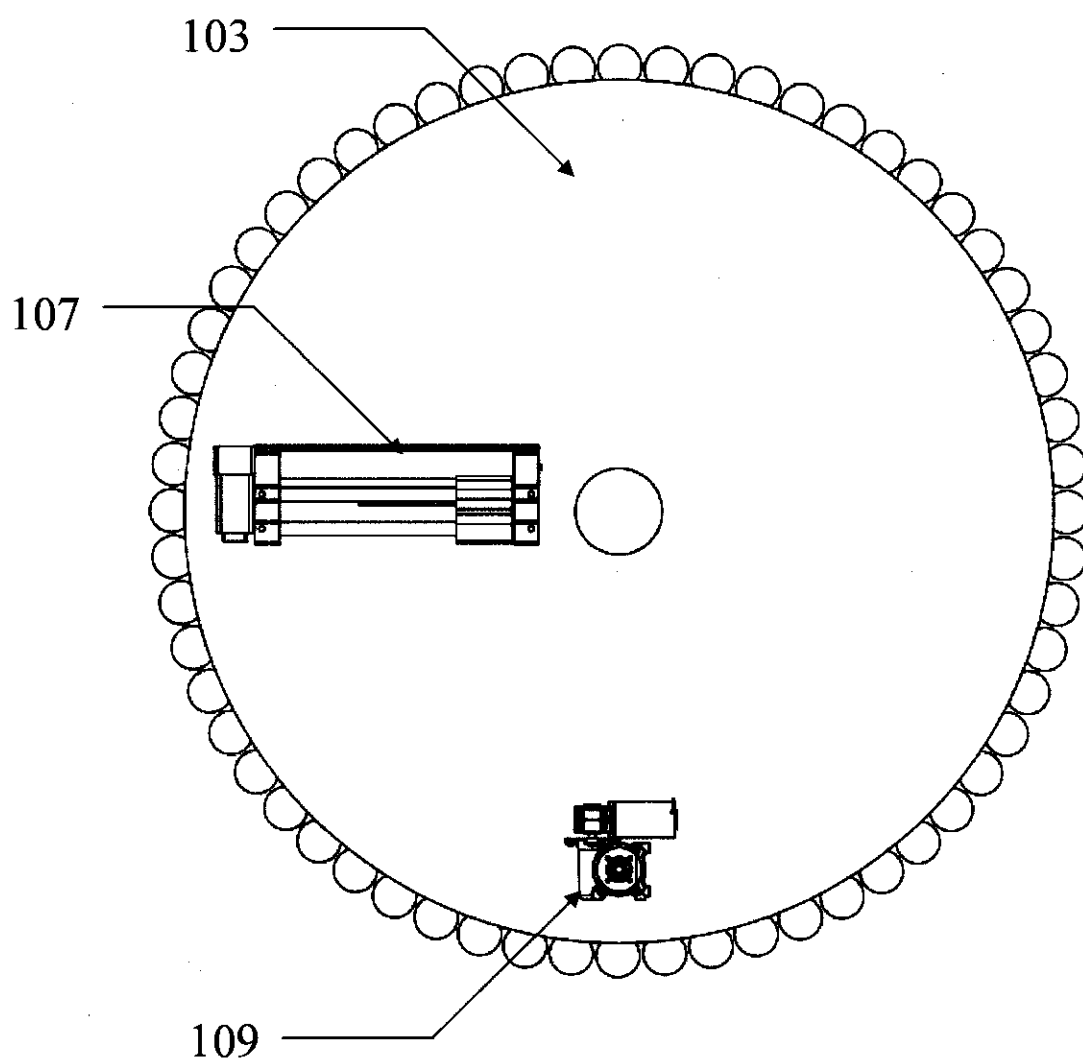


Figura 6

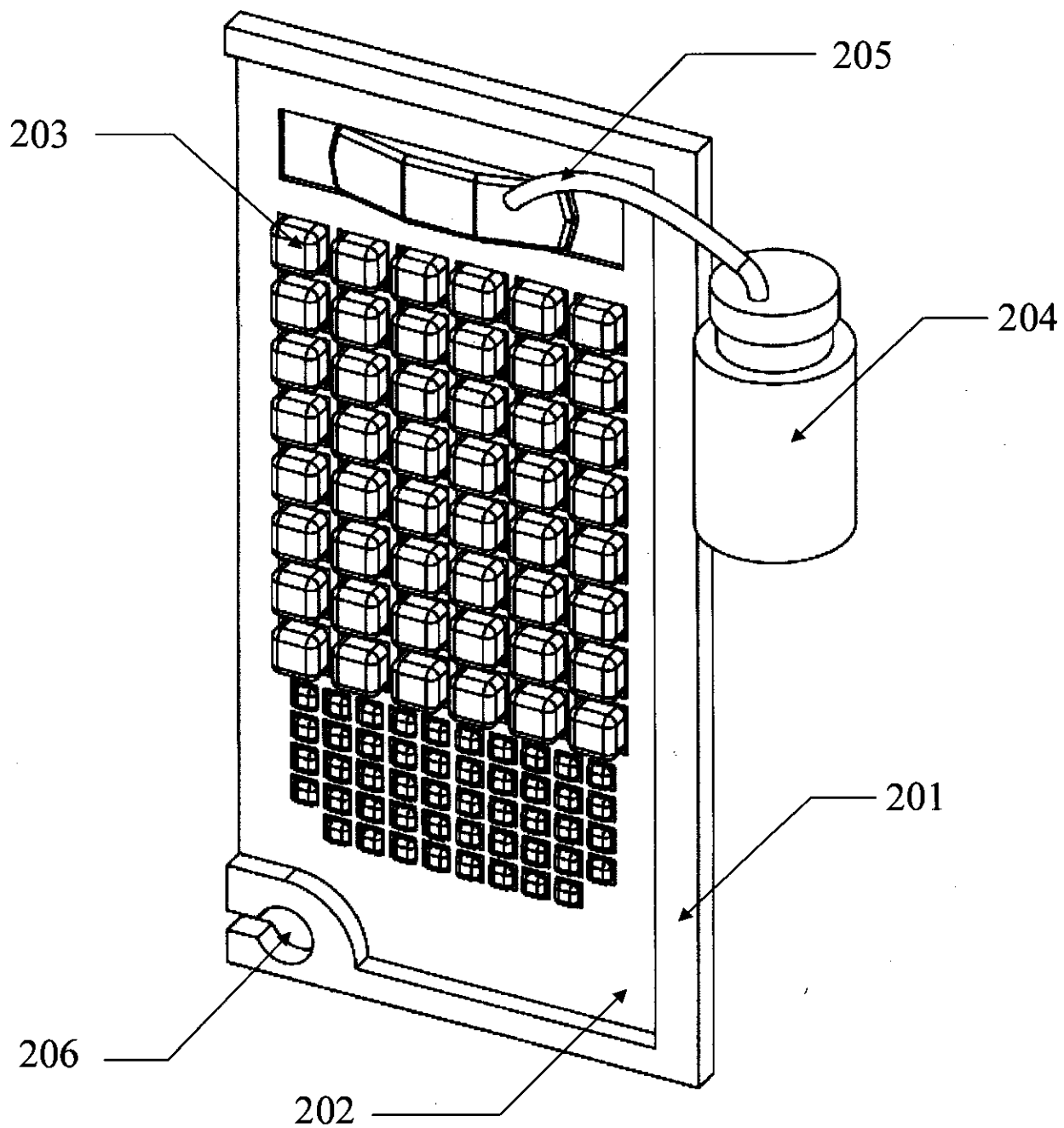


Figura 7

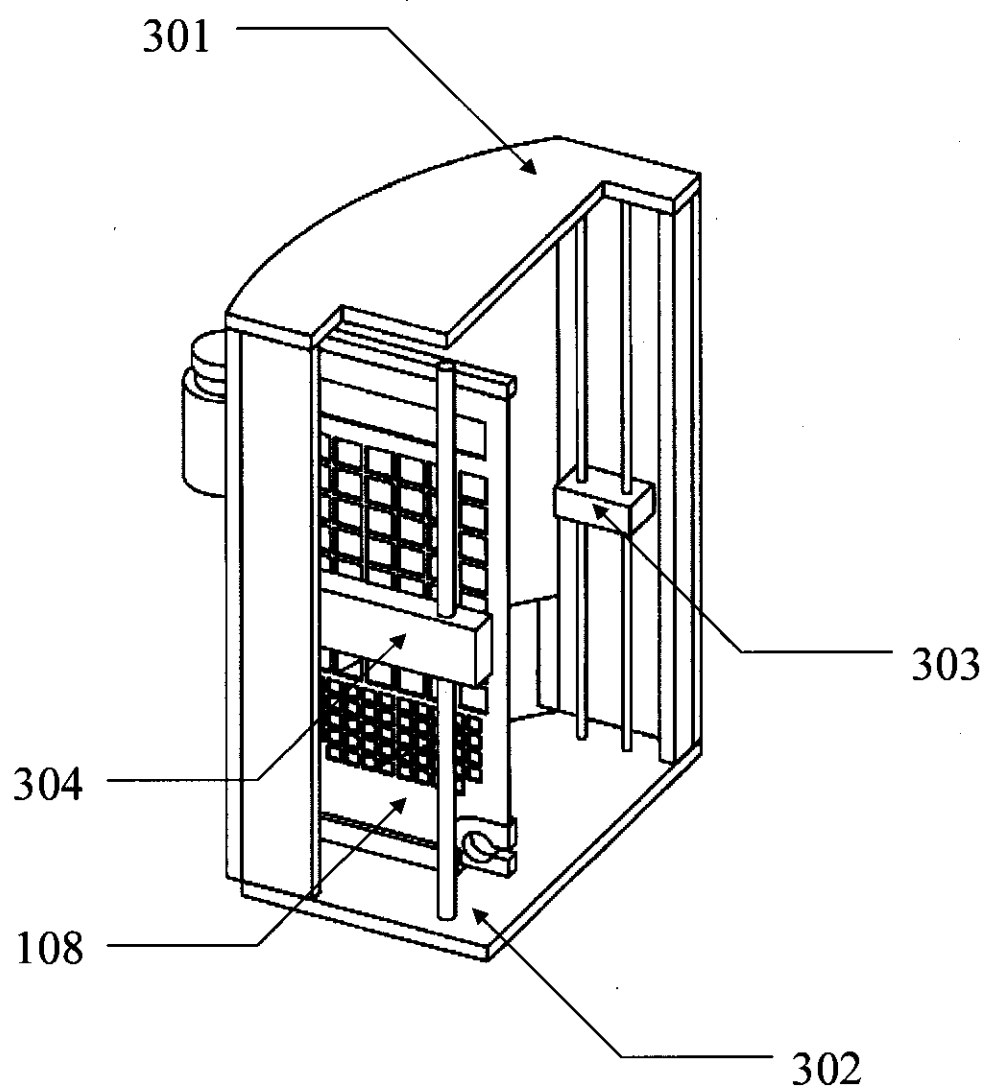


Figura 8

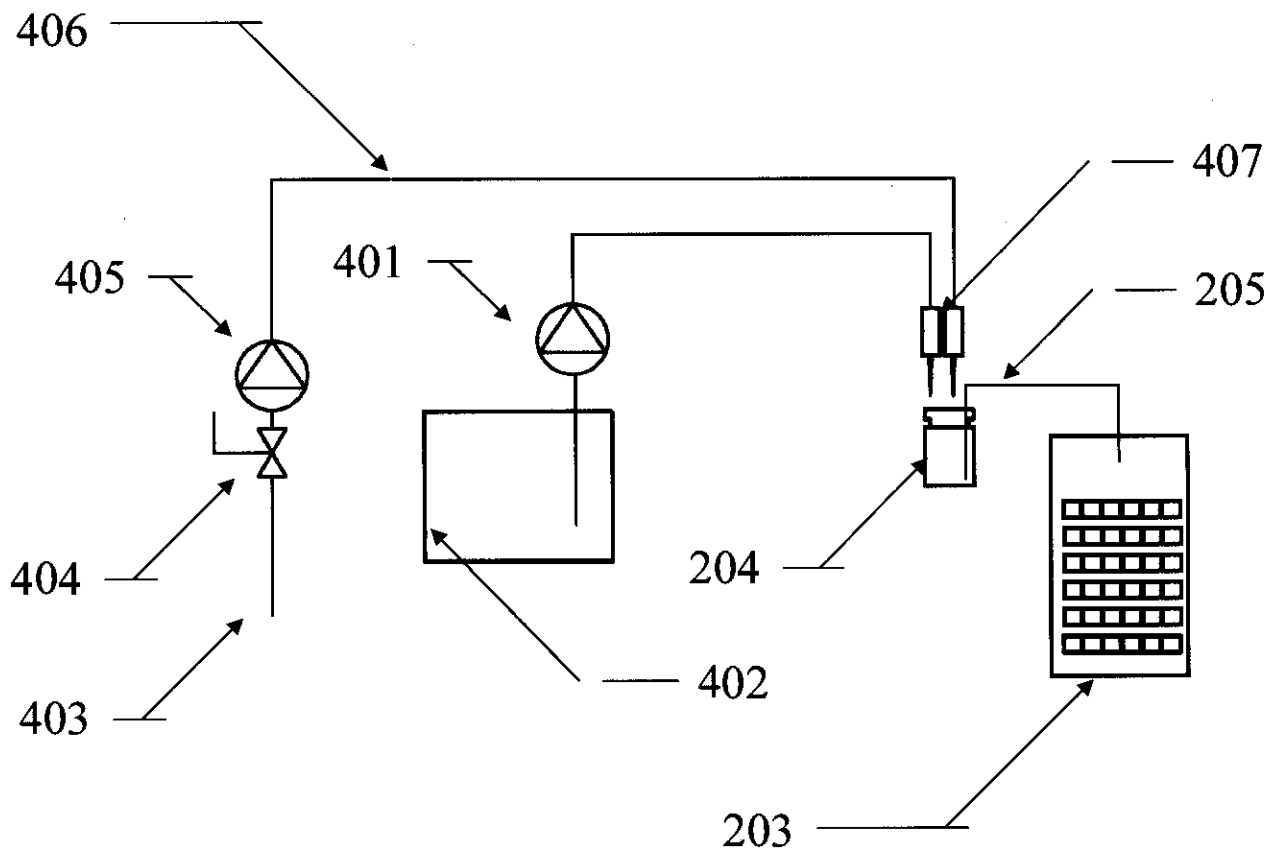
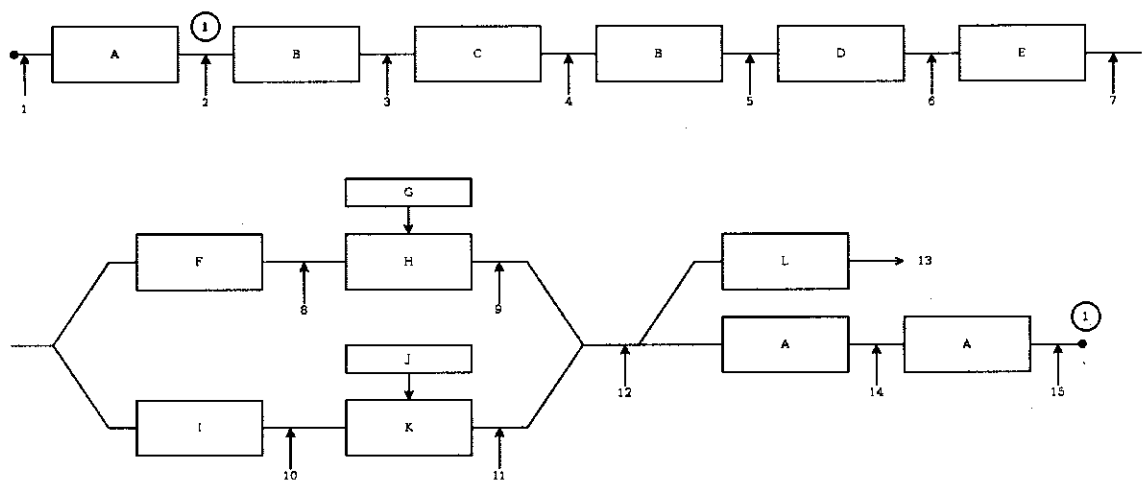


Figura 9





- ②① N.º solicitud: 201300581
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0682244 A1 (ANJOU RECH) 15.11.1995, columna 4, líneas 38-51; columna 5, líneas 5-8; columna 6, líneas 11-16,42-52; columna 9, líneas 1-3; figura 2.	1-13
A	WO 2006116835 A1 (KANIPAYOR RAVI et al.) 09.11.2006, párrafos [0001],[0009],[0031],[0039],[0045]-[0050],[0069].	1-13
A	WO 9523026 A1 (IDEXX LABORATORIES, INC) 31.08.1995, página 1, líneas 15-19; página 2, líneas 12-36; página 4, líneas 1-17; página 7, líneas 27-36.	1-13
A	EP 2273251 A2 (DURAN NEIRA CARLOS et al.) 12.01.2011, párrafos [0007],[0008],[0053]; reivindicación 1.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.10.2013

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N1/10 (2006.01)

G01N21/75 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

G01N35/02 (2006.01)

G01N35/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0682244 A1 (ANJOU RECH)	15.11.1995
D02	WO 2006116835 A1 (KANIPAYOR RAVI et al.)	09.11.2006
D03	WO 95/23026 A1 (IDEXX LABORATORIES, INC)	31.08.1995
D04	EP 2273251 A2 (DURAN NEIRA CARLOS et al.)	12.01.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente hace referencia, tal y como ha sido redactada, a un aparato para el análisis automatizado de la calidad microbiológica de aguas que utiliza la técnica de análisis por colorimetría y que comprende: un plato portador de muestras; medios hidráulicos para la toma y preparación de muestras, y transporte de líquidos hasta los recipientes destinados a contener muestras; una cámara para termostatación de la muestra y medios para el análisis digital de las imágenes (reivindicación 1). Dicho aparato comprende: un bastidor, un motor, un tambor giratorio, recipientes destinados a contener muestras, un sistema de desplazamiento lineal, una cámara incubadora, un sistema de sellado del blíster, un sistema de iluminación y un sistema de toma de imágenes (reivindicación 2). Los elementos desechables para el análisis comprenden: un blíster, un soporte marco, un vial de mezcla y un tubo que permite el paso del caldo de cultivo desde el vial de mezcla hacia el blíster (reivindicación 3). El sistema de transporte de líquidos comprende una bomba que aspira la muestra de agua a analizar y un tubo que une la bomba con la aguja que inyecta la muestra en el vial de mezcla (reivindicación 4), además dicho sistema de transporte de líquidos comprende una bomba que suministra agua destilada procedente de un depósito para la dilución de muestras marinas (reivindicación 5). Para detectar la presencia de microorganismos se utiliza un indicador de nutriente que libera un cromógeno que colorea la muestra (reivindicación 6). Se cuantifica el número de microorganismos según el procedimiento del Número Más Probable (reivindicación 7). Se realiza el análisis de resultados por comparación de imágenes de los recipientes destinados a contener muestras con imágenes de referencia (reivindicación 8). Dicho aparato puede funcionar como módulo autónomo de análisis en una boya para análisis de aguas *in situ* (reivindicación 9). Y por último se reivindica el uso de dicho aparato (reivindicaciones 10-13).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 y 8 DE LA LP

El documento D01 describe una aparato de medida para controlar la calidad bacteriológica del agua que comprende al menos un recinto controlado termostáticamente, medios para medir la absorción colorimétrica, medios para la medición de fluorescencia, medios de grabación para el almacenamiento de datos, y medios de visualización de dichas medidas de absorción colorimétrica y de fluorescencia, para la detección de la presencia de contaminación bacteriana en dicha muestra de agua. Dicho aparato se caracteriza porque utiliza dos medios de medida óptica para determinar la calidad del agua, uno de absorción colorimétrica y otro de fluorescencia (véase columna 4, líneas 38-51 y columna 5, líneas 5-8). Además, puede funcionar automáticamente (véase columna 6, líneas 11-16). El aparato comprende un plato horizontal circular, que posee tres anillos concéntricos en los que se depositan los contenedores que comprenden las muestras de agua a analizar junto con el reactivo, que gira de manera que se puedan llevar a cabo las medidas de un gran número de muestras (véase columna 6, líneas 42-52; columna 9, líneas 1-3 y figura 2).

El documento D02 trata sobre un sistema para el análisis rápido de parámetros microbiológicos (véase párrafo [0001]) que comprende un recipiente que tiene la muestra líquida junto con un reactivo que proporciona un parámetro detectable (véase párrafos [0009], [0045]- [0050]), un sistema de incubación (véase párrafo [0031]) y un sistema espectrofotómetro (véase párrafo [0039]) para medir la luz absorbida o emitida por las muestras líquidas al mismo tiempo que los materiales microbiológicos se están incubando. El sistema de incubación calienta y mantiene la temperatura de las muestras líquidas, mientras que el sistema espectrofotómetro propaga la luz dentro del recipiente que comprende la muestra. Y por último, se ha utilizado el tiempo de detección de población (tpop) para estimar los parámetros de crecimiento bacterianos (véase párrafo [0069]).

EL documento D03 hace referencia a un aparato y procedimiento para la cuantificación de material biológico en muestras líquidas, tales como agua (determinación de la concentración de bacterias en agua), aguas residuales, agua de entrada en sistemas de purificación y aguas superficiales entre otras (véase página 1, líneas 15-19). Menciona también, el procedimiento del número más probable para llevar a cabo el examen biológico (véase página 2, líneas 12-36). El procedimiento incluye las siguientes etapas: la adición de un medio de test de ensayo a la muestra; el emplazamiento de la muestra en un artículo designado para retener la muestra y permitir su rápida y sencilla distribución en alícuotas; la distribución de la muestra de una forma sustancialmente igual, entre una pluralidad de compartimentos discretos, no permeables, en el artículo; el sellado de los compartimentos; la incubación del artículo y el registro de los resultados del análisis (véase página 7, líneas 27-36). El aparato consiste en una bolsa con una pluralidad de divisiones o particiones, configuradas para separar una o más porciones de la mezcla de muestra líquida/medio de test de ensayo y para efectuar una sencilla y rápida separación en alícuotas de la citada mezcla (véase página 4, líneas 1-17).

El documento D04 se refiere a un aparato de toma de muestras y análisis de agua, concretamente una boya, que comprende un dispositivo para la toma de muestras a distintas profundidades, que a su vez comprende una manguera y una pluralidad de tubos internos independientes con una pluralidad de entradas de muestreo; y un sistema de bombeo para bombear la muestra de agua recogida a un módulo aislado para el análisis. La boya es una boya autónoma con capacidades para el muestreo de agua a distintas profundidades, con auto-mantenimiento, seguimiento, recogida de datos, transmisión y análisis (véase párrafos [0007] y [0008] y reivindicación 1). Dicha boya comprende entre otros un módulo de almacenamiento de muestras que tiene una pluralidad de recipientes para las muestras (véase párrafo [0053]).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, se puede decir que la presente solicitud de patente, tal y como ha sido presentada, posee novedad y actividad inventiva, ya que no se ha encontrado un aparato automático para el análisis de la calidad microbiológica de aguas que utilice la técnica de análisis por colorimetría con las características técnicas reivindicadas. Ni tampoco, en los documentos citados, existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-13. Por lo que, las reivindicaciones 1-13 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.