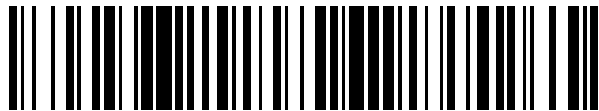


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 478**

21 Número de solicitud: 201231070

51 Int. Cl.:

G01N 33/24 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12R 1/72 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

09.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.01.2014

Fecha de la concesión:

17.10.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

24.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
(100.0%)**

**Jordi Girona, 31
08034 Barcelona (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

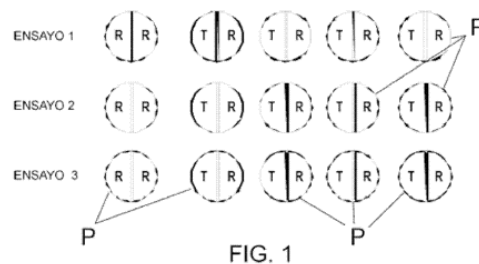
**RIVA JUAN, María Carmen y
RIBÓ ARBOLEDAS, Juan Manuel**

54 Título: **Procedimiento simplificado para la evaluación de la calidad y posible contaminación de un suelo mediante ensayo con organismos, y kit para llevarlo a cabo**

57 Resumen:

Procedimiento simplificado para la evaluación de la calidad y posible contaminación de un suelo mediante ensayo con organismos, y kit para llevarlo a cabo, que comprende

- Preparar cuatro placas de Petri (P) con semicírculos de papel de filtro (F).
- Añadir 0.4 ml de lixiviado de la muestra, en uno de los semicírculos de papel de filtro (F) test (T).
- Añadir 0.4 ml de agua desionizada en el lado opuesto, lado referencia (R), vigilando que el agua moje el otro.
- Colocar 10 organismos de ensayo (O) (colémbolos) sobre la separación (L) entre los semicírculos de filtro (F).
- Dejar reposar, sin luz y a temperatura ambiente (20-25°C) durante el período de exposición seleccionado (de 2 a 48 horas).
- Contar, después del tiempo de exposición, los organismos que hay en cada lado de la placa.
- Opcionalmente recontar a las 24 horas y a las 48 horas de exposición.
- Calcular el grado de alejamiento.



ES 2 437 478 B1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y POSIBLE CONTAMINACIÓN DE UN SUELO MEDIANTE ENSAYO CON ORGANISMOS, Y KIT PARA LLEVARLO A CABO

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 La invención, tal como expresa el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a un procedimiento simplificado para la evaluación de la calidad y posible contaminación de un suelo mediante ensayo con organismos, y kit para llevarlo a cabo, el cual aporta importantes ventajas y características de
15 novedad, que se describirán en detalle más adelante, suponiendo una importante mejora del estado de la técnica respecto de los procedimientos de ensayo actualmente utilizados para el mismo fin.

20 Más en particular, el objeto de la invención se centra en un procedimiento para la evaluación de la toxicidad de una muestra de suelo potencialmente contaminado, utilizando el ensayo de alejamiento con colémbolos y que se basa en la tendencia al alejamiento
25 de la muestra de suelo contaminado que experimentan los organismos de ensayo, con la particularidad de que dicha evaluación se consigue utilizando un sencillo kit de elementos de laboratorio y tan solo después de un tiempo de exposición de 48 horas y a 20°C de
30 temperatura, siendo el parámetro indicador del estado de contaminación del suelo el porcentaje de población que se aleja del suelo muestra.

35

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ensayos actuales normalizados proporcionan resultados sobre la calidad de los suelos, basándose en estudios de ecotoxicología. Normalmente se expresan como la concentración de suelo contaminado que causa un efecto predeterminado (mortalidad, inhibición de reproducción o alejamiento) al 50% de organismos de ensayo, y la duración del mismo está entre 2 y 28 días.

10

El objetivo de la presente invención es desarrollar un nuevo procedimiento de ensayo para evaluar una posible contaminación de un suelo, utilizando organismos, pero de una forma mucho más rápida y simplificada y con las mismas garantías de resultado, debiendo señalarse que, por parte del solicitante se desconoce la existencia de ningún otro procedimiento o invención de aplicación similar que presente unas características técnicas semejantes a las del procedimiento que aquí se preconiza según los principios de las reivindicaciones que acompañan a la presente memoria descriptiva del mismo.

20

25 EXPLICACION DE LA INVENCION

Esencialmente, con el procedimiento que la invención propone, la calidad ambiental de un suelo potencialmente contaminado, se evalúa a partir de la capacidad que tiene una muestra de suelo de causar el alejamiento de un porcentaje de individuos de la población de colémbolos que se expone al mismo, estando basado, concretamente, en el efecto del suelo contaminado sobre colémbolos de la especie *Folsomia Candida*. Estos invertebrados están presentes en la mayoría de suelos autóctonos.

30

35

Para la evaluación de la calidad ambiental de suelos, la invención propone una versión simplificada del ensayo de alejamiento que permite determinar el
5 grado de alejamiento (porcentaje de población alejada) causado por el suelo contaminado, respecto a un control.

Mediante dicho procedimiento se determina
10 directamente el Grado de Alejamiento que experimentan estos organismos causado por una muestra de suelo contaminado. El grado de alejamiento indica la calidad del suelo que se examina.

Los resultados se obtienen después de unas
15 horas de exposición (entre 2 y 48 horas) de los organismos de ensayo al suelo contaminado, tiempo muy inferior al que necesitan otros ensayos normalizados. El procedimiento descrito y el uso del kit presentado
20 permitirá, por lo tanto, realizar el ensayo de alejamiento de forma sencilla y rápida, sin necesidad de mantener un cultivo sincronizado de los organismos de ensayo, proporcionando resultados igualmente fiables

Las principales novedades y ventajas del kit
25 y del procedimiento propuesto respecto de los sistemas normalizados son:

- Minimización de la manipulación
30 experimental de la muestra de suelo. En el procedimiento propuesto se determina el Grado de Alejamiento (%) causado por el lixiviado del suelo contaminado. Este parámetro indica el efecto causado por los contaminantes presentes en el suelo muestra. Se
35 evita la manipulación del suelo en la preparación de distintas concentraciones del mismo para obtener la

CE50 (concentración de suelo que causa el 50% de alejamiento), que es el parámetro que se determina en los ensayos normalizados de toxicidad de suelos.

5 - Minimización de la variabilidad de resultados. El procedimiento experimental propuesto suprime el efecto de las diferencias edafológicas entre el suelo contaminado y el suelo de referencia. El ensayo se realiza utilizando el lixiviado del suelo
10 contaminado, depositado en la superficie de un papel de filtro colocado en placas de Petri, donde se expone a los organismos de ensayo, utilizando como referencia agua.

15 Ventajas en relación a la manipulación experimental:

 - El ensayo se realiza sobre el lixiviado de la muestra de suelo contaminado,
20

 - No es necesario tamizar, homogeneizar ni manipular el suelo.

 - No es necesario tener un stock de suelo
25 control.

 - No es necesario preparar diferentes concentraciones de suelo contaminado en suelo control.

30 Ventajas en relación a los organismos de ensayo:

 - No es necesario tener una infraestructura para reproducir los organismos de ensayo.

35 - No es necesario mantener un cultivo sincronizado de colémbolos adultos.

Cabe mencionar, además, que el procedimiento propuesto se puede llevar a cabo utilizando un sencillo kit de elementos de laboratorio, en el que se incluyen
5 todos los materiales necesarios para la realización del ensayo de alejamiento con colémbolos y determinar el grado de alejamiento de los mismos de un suelo potencialmente contaminado, permitiendo dicho kit la realización de hasta tres ensayos, bien de tres suelos
10 diferentes o determinación en triplicado sobre la misma muestra (que suele ser lo habitual para garantizar un resultado fiable).

El descrito procedimiento simplificado para
15 la evaluación de la calidad y posible contaminación de un suelo mediante ensayo con organismos, y el kit para llevarlo a cabo, representan, pues, una innovación de características estructurales y constitutivas desconocidas hasta ahora para tal fin, razones que
20 unidas a su utilidad práctica, la dotan de fundamento suficiente para obtener el privilegio de exclusividad que se solicita.

25 **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Para complementar la descripción que se está realizando del procedimiento objeto de la invención y para ayudar a una mejor comprensión del mismo, se
30 acompaña la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, de un juego de planos, en los que con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

35 La figura número 1.- Muestra una representación esquematizada de la distribución de las

placas de Petri utilizadas para el ensayo por triplicado, según el procedimiento objeto de la invención.

5 La figura número 2.- Muestra una representación de una de las placas con los semicírculos de papel de filtro y la disposición de las muestras y organismos.

10 La figura número 3.- Muestra una fotografía de una de las placas Petri utilizadas en el ensayo

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCIÓN

15

En la descripción detallada del procedimiento preconizado que se hace a continuación y en las figuras descritas, se han utilizado las siguientes definiciones y referencias alfanuméricas:

20

- (T) Suelo Test: es la muestra de suelo supuestamente contaminado, sobre la cual se realiza el ensayo.

25

- (R) Suelo Referencia: Suelo sin carga contaminante (C=0%)

- (P) Placa de Petri.

30

- (F) Semicírculos de papel de filtro.

- (L) Línea de separación entre filtros

35

- (O) Organismos de ensayo, consistentes en colémbolos de la especie *Folsomia candida*, individuos adultos de entre 12 y 20 días de edad.

De forma concreta, el procedimiento preconizado tiene como finalidad la determinación del Grado de Alejamiento (Porcentaje de organismos de ensayo que se han alejado del suelo contaminado) para cada muestra de suelo ensayado.

El porcentaje de alejamiento causado se determina utilizando cuatro placas de Petri (P) con 10 individuos u organismos (O) en cada una (total 40 individuos en cada réplica de ensayo).

Normalmente se realizan tres replicados para obtener el resultado final de Grado de Alejamiento para una muestra concreta. (Expresado como el promedio de las tres determinaciones).

El ensayo se realiza sobre el lixiviado de la muestra de suelo contaminado cuya obtención comprende los siguientes pasos:

- Colocar 100 g de suelo contaminado en un recipiente y mezclar con 1 L de agua desionizada.
- Cerrar el recipiente y mantener agitación durante 24 horas.
- Filtrar o centrifugar la mezcla para obtener el líquido sobrenadante.
- Utilizar este líquido sobrenadante para la realización del ensayo.

Para la determinación del Grado de Alejamiento, el procedimiento comprende los siguientes pasos:

5 - Preparar cada una de las placas de Petri (P) con dos semicírculos de papel de filtro (F). Al menos cuatro placas de test más una de control por cada réplica de ensayo.

10 - Añadir 0.4 ml del lixiviado de la muestra, obtenido tal como se ha descrito anteriormente, en uno de los lados de cada una de las cuatro placas (P) de cada fila de ensayo, sobre el semicírculo de papel de filtro (F) de manera que siempre sea en el mismo lado de las placas, tal como muestra el diagrama representado en la figura 1 donde dicho lado se ha referenciado con (T) por constituir el lado test.

15 - Añadir 0.4 ml de agua desionizada en el lado R de cada una de las placa de Petri, es decir, sobre el otro semicírculo de papel de filtro de la placa, en este caso referenciado con (R) ya que se tratará del lado referencia. Es importante impedir que el agua moje el semicírculo de papel de filtro que contiene el lixiviado de la muestra del lado (T) de la placa.

25 - Trasladar con cuidado 10 colémbolos (organismos de ensayo (O)) a la línea de separación (L) entre los dos semicírculos de papel de filtro (F) (cada uno de los tubos suministrados en el Kit contiene 10 colémbolos adultos listos para su utilización)

30 - Dejar en reposo, en ausencia de luz y a temperatura ambiente (entre 20 - 25°C) durante 48 horas.

35 - Después de 2 horas de exposición contar los colémbolos que hay en cada lado de la placa.

- Opcionalmente se puede realizar el recuento de colémbolos a las 24 horas y a las 48 horas de exposición.

5

El Grado de alejamiento, para cada réplica de ensayo (tres filas de Placas de Petri), se calcula con la fórmula siguiente:

10
$$\% \text{Alejamiento} = 100 * (R-T) / N$$

donde:

R: es el número total de individuos en el lado R o Referencia (suma de cuatro placas)

15

T: es el número total de Individuos en el lado T o Test (suma de cuatro placas).

20 N: es el número total de individuos en el ensayo (N= 40).

El test queda invalidado si en alguna de las placas se detecta la muerte de más de uno de los organismos de ensayo.

25

El procedimiento descrito se puede llevar a cabo utilizando un sencillo kit en el que se incluyen todos los materiales necesarios para la realización del ensayo de alejamiento con colémbolos y para determinar el grado de alejamiento de los organismos de ensayo de un suelo potencialmente contaminado, el cual comprende:

30

- Quince placas de Petri (P) de 5 mm de diámetro, que contienen cada una dos semicírculos de papel de filtro (F) donde se deposita respectivamente el lixiviado del suelo contaminado y el agua de

35

referencia.

- Dos pipetas de 5 ml de un solo uso.
- 5 - Quince tubos con diez colémbolos adultos cada uno.

10 Descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como la manera de ponerla en práctica, no se considera necesario hacer más extensa su explicación para que cualquier experto en la materia comprenda su alcance y las ventajas que de ella se derivan, haciéndose constar que, dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras 15 formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba siempre que no se altere, cambie o modifique su principio fundamental.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y POSIBLE CONTAMINACIÓN DE UN
5 SUELO MEDIANTE ENSAYO CON ORGANISMOS, aplicable para la
evaluación de la toxicidad de una muestra de suelo
potencialmente contaminado, basado en el ensayo de
alejamiento con organismos (O) y que se fundamenta en
la tendencia al alejamiento de la muestra de suelo
10 contaminado que experimentan los organismos de ensayo,
caracterizado, en primer lugar, porque se realiza
sobre el lixiviado de la muestra de suelo contaminado,
y comprende los siguientes pasos:

- Preparar, placas de Petri (P) con dos
15 semicírculos de papel de filtro (F). Al menos, cuatro
placas de test y, opcionalmente una de control.

- Añadir 0.4 ml del lixiviado de la muestra,
en el lado T (test) de cada una de las cuatro placas
(P), sobre el semicírculo de papel de filtro (F)
20 correspondiente, de manera que siempre sea en el mismo
lado de cada placa.

- Añadir 0.4 ml de agua desionizada en el
lado R de cada una de las cuatro placas de Petri, es
decir, sobre el otro semicírculo de papel de filtro que
25 será el lado referencia (R), impidiendo que el agua
moje el semicírculo de papel de filtro que contiene el
lixiviado de la muestra de suelo test (T) del otro lado
de la placa.

- Colocar 10 organismos de ensayo (O) sobre
30 la línea de separación (L) entre los dos semicírculos
de papel de filtro (F). Cada tubo proporcionado en el
kit contiene los 10 individuos necesarios para cada una
de las placas.

- Dejar en reposo, en ausencia de luz y a
35 temperatura ambiente (entre 20 - 25°C) durante el
período de exposición elegido (entre 2 y 48 horas).

- Contar después de 2 horas de exposición los organismos que hay en cada lado de la placa.

5 - Si procede, Realizar el recuento de colémbolos a las 24 horas y a las 48 horas de exposición.

- Para verificar el correcto funcionamiento del ensayo, colocar también en las placas de control 0.4 ml de agua desionizada en ambos lados de la placa, a razón de una placa control por cada cuatro placas de
10 ensayo.

- Calcular el grado de alejamiento mediante la siguiente fórmula:

$$\%Alejamiento = 100 * (R-T)/N$$

15 donde:

R: es el número total de individuos en el lado Referencia (suma de cuatro placas)

20 T: es el número total de individuos en el lado Test (suma de cuatro placas).

N: es el número total de individuos en el ensayo (N=40).

25 2.- PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y POSIBLE CONTAMINACIÓN DE UN SUELO MEDIANTE ENSAYO CON ORGANISMOS, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la obtención del lixiviado de la muestra de suelo contaminado comprende los siguientes pasos:

30 - Colocar 100 g de suelo contaminado en un recipiente y mezclar con 1 L de agua desionizada.

- Cerrar el recipiente y mantener agitación durante 24 horas.

35 - Filtrar o centrifugar la mezcla para obtener el líquido sobrenadante.

- Utilizar este líquido sobrenadante para la

realización del ensayo.

3.- PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y POSIBLE CONTAMINACIÓN DE UN
5 SUELO MEDIANTE ENSAYO CON ORGANISMOS, según la
reivindicación 1, **caracterizado** porque los organismos
(O) utilizados son colémbolos de la especie *Folsomia*
candida, individuos adultos de entre 12 y 20 días de
edad.

10

4.- PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y POSIBLE CONTAMINACIÓN DE UN
SUELO MEDIANTE ENSAYO CON ORGANISMOS, según la
reivindicación 1, **caracterizado** porque se realizan tres
15 réplicas idénticas del ensayo con los mismos pasos de
procedimiento en cada una.

5.- KIT PARA LLEVAR A CABO UN PROCEDIMIENTO
como el descrito en las reivindicaciones 1 a 4,
20 **caracterizado** porque comprende:

- Quince placas de Petri (P) de 5 mm de
diámetro, que contienen cada una dos semicírculos
separados de papel de filtro (F), donde se deposita
25 respectivamente el lixiviado del suelo contaminado, y
la referencia.

- Dos pipetas de 5 ml de un solo uso.

- Quince tubos con diez organismos (O)
colémbolos cada uno.

30

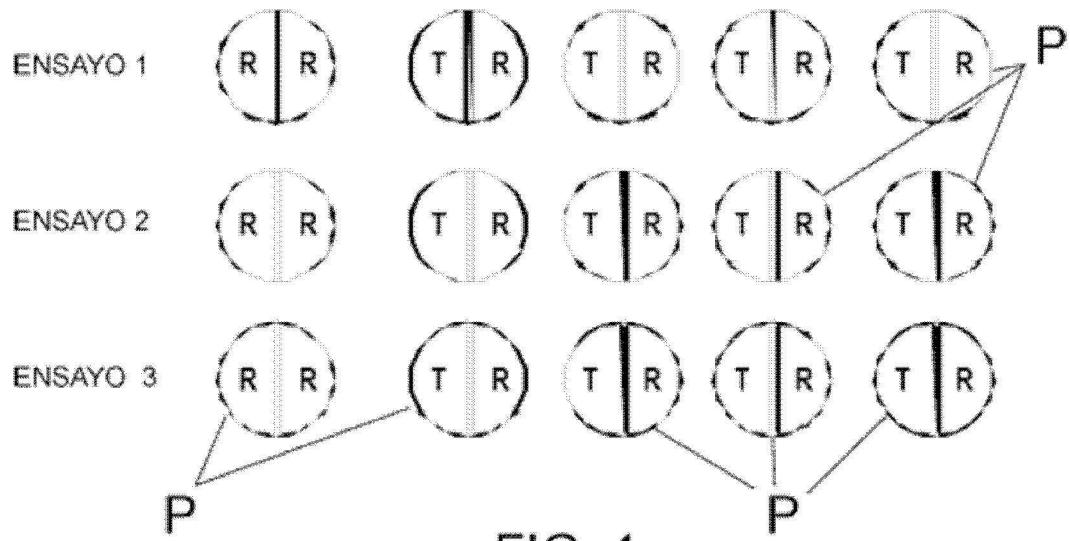


FIG. 1

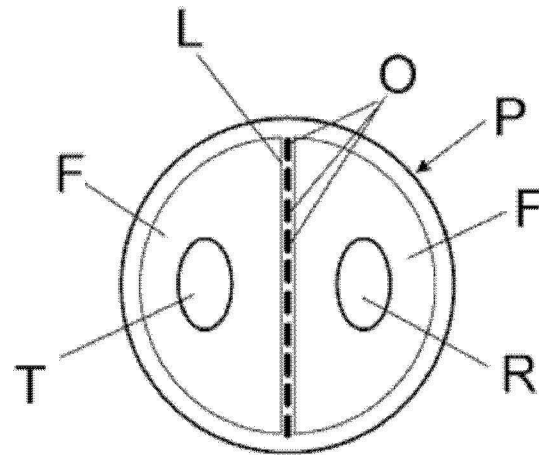


FIG. 2

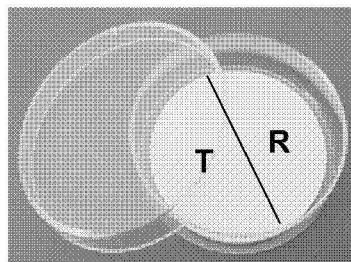


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201231070
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.07.2012
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	DOMENE XAVIER et al. INFLUENCE OF SOIL PROPERTIES ON THE PERFORMANCE OF FOLSOMIA CANDIDA: IMPLICATIONS FOR ITS USE IN SOIL ECOTOXICOLOGY TESTING. Environmental Toxicology and Chemistry. Jul. 2011. Vol: 30 No: 7 Págs: 1497-1505. ISSN 0730-7268(print) ISSN 1552-8618(electronic).	1-5
A	SANTOS M J G et al. Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod Porcellionides pruinosus and the collembolan Folsomia candida. CHEMOSPHERE. Ago 2008. Vol: 80 No: 9 Págs: 1021-1030. ISSN 0045-6535.	1-5
A	LORS C et al. Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. ENVIRONMENTAL POLLUTION. Ago. 2010. Vol. 158 No: 8 Págs: 2640-2647. ISSN 0269-7491.	1-5
A	NATAL-DA-LUZ T et al. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY. 01.10.2008. Vol. 71 No: 2 Págs: 545-551. ISSN 0147-6513.	1-5
A	BOITAUD L et al. Avoidance of low doses of naphthalene by Collembola. ENVIRONMENTAL POLLUTION. 01.02.2006. Vol. 139 No: 3 Págs: 451-454 ISSN 0269-7491.	1-5
A	WO 02099121 A2 (UNIV SURREY et al.) 12.12.2002, todo el documento	1-5

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
23.05.2013

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/24 (2006.01)

C12Q1/04 (2006.01)

C12R1/72 (2006.01)

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

G01N, C12R, C12Q

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, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-5	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	DOMENE XAVIER et al. INFLUENCE OF SOIL PROPERTIES ON THE PERFORMANCE OF FOLSOMIA CANDIDA: IMPLICATIONS FOR ITS USE IN SOIL ECOTOXICOLOGY TESTING. Environmental Toxicology and Chemistry. Jul. 2011. Vol: 30 No: 7 Págs: 1497-1505. ISSN 0730-7268(print) ISSN 1552-8618(electronic).	30.06.2011
D02	SANTOS M J G et al. Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod Porcellionides pruinosus and the collembolan Folsomia candida. CHEMOSPHERE. Ago 2008. Vol: 80 No: 9 Págs: 1021-1030. ISSN 0045-6535.	01.08.2010
D03	LORS C et al. Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. ENVIRONMENTAL POLLUTION. Ago. 2010. Vol. 158 No: 8 Págs: 2640-2647. ISSN 0269-7491.	01.08.2010
D04	NATAL-DA-LUZ T et al. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY. 01.10.2008. Vol. 71 No: 2 Págs: 545-551. ISSN 0147-6513.	01.10.2008
D05	BOITAUD L et al. Avoidance of low doses of naphthalene by Collembola. ENVIRONMENTAL POLLUTION. 01.02.2006. Vol. 139 No: 3 Págs: 451-454 ISSN 0269-7491.	01.02.2006
D06	WO 02099121 A2 (UNIV SURREY et al.)	12.12.2002

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 divulga un procedimiento para la evaluación de la toxicidad de una muestra de suelo potencialmente contaminado, que se evalúa a partir de la capacidad que tiene una muestra de suelo de causar el alejamiento de un porcentaje de organismos invertebrados.

Las reivindicaciones 1, 3, 4 caracterizan el procedimiento, basado en un test de alejamiento, llevado a cabo sobre unas placas de Petri con dos semicírculos de papel de filtro. En uno de ellos se añade la muestra de suelo lixiviado y en la otra agua desionizada. Después se colocan en ambos semicírculos los correspondientes organismos, se dejan reposar y se cuantifican los organismos que hay en cada lado, calculando finalmente el grado de alejamiento mediante la fórmula reivindicada. La reivindicación 2 caracteriza la forma de obtención del lixiviado. Y la reivindicación 5 caracteriza un Kit para llevar a cabo dicho procedimiento.

D01-D06 representan el estado de la técnica más cercano al objeto de la invención. Cada uno de ellos divulga un procedimiento de análisis de una muestra de suelo contaminado haciendo uso de tests que se basan en el alejamiento que experimentan los organismos de ensayo respecto a la muestra de suelo. En D01 el test de alejamiento se lleva a cabo en frascos cilíndricos de polietileno horizontalmente divididos en dos secciones. En D02-D06 se utilizaron placas Petri, o cajas de plástico adecuadas para el ensayo.

La diferencia entre estos documentos y el objeto de las reivindicaciones 1-5 sería que el procedimiento se lleva a cabo sobre el lixiviado de la muestra y no sobre muestras de suelo secas o humedecidas con agua desionizada como en D01, o D03. El efecto técnico producido por esta diferencia sería la minimización de la variabilidad de los resultados al suprimir el efecto de las diferencias edafológicas entre el suelo contaminado y el suelo de referencia.

Ninguno de los documentos del estado describe un procedimiento como el que se divulga en las reivindicaciones 1-5, ni se puede derivar de manera obvia tomados los documentos solos o en combinación. Por tanto, la presente solicitud cumpliría con los requisitos de novedad y actividad inventiva tal y como se menciona en los arts. 6, 8 de la Ley 11/1986.