

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 519**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**C02F 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2007 E 07786497 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2057459**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la detección de células de fitoplancton vivas en agua**

30 Prioridad:

**01.09.2006 DE 102006041347**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.05.2013**

73 Titular/es:

**RWO GMBH (100.0%)  
THALENHORSTSTRASSE 15 A  
28307 BREMEN, DE**

72 Inventor/es:

**KROON, BERND y  
KORNMÜLLER, ANJA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 404 519 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**

Procedimiento y dispositivo para la detección de células de fitoplancton vivas en agua

La invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo para la detección de células de fitoplancton vivas en/de agua, en particular aguas superficiales como arroyos, ríos, estanques, mares y presas, agua salada, agua marina y agua salobre, agua de lastre de barcos, agua de mar profundo, agua de río profundo, agua subterránea y agua de manantial, agua industrial, agua de refrigeración y agua de circulación, aguas residuales, agua de baño y de piscina, agua de criadero y medios de criadero o agua de producción.

En el caso de utilización de aguas naturales, la eliminación de fitoplancton y/o de microorganismos en la preparación del agua es un objetivo importante, para hacer utilizable el agua para diferentes fines y para mantener valores límite de preparación y de introducción. Por ejemplo, el desarrollo de masas de fitoplancton en aguas superficiales y su rotura a través de las instalaciones de filtro y la aparición en la red de distribución de agua potable es un problema conocido. En el caso de preparación insuficiente se plantean problemas a través del propio fitoplancton, como por ejemplo una coloración del agua, una emisión de sustancias olorosas y toxinas así como la multiplicación de otras bacterias no deseables en el agua, que utilizan de nuevo fitoplancton como base de la nutrición. Al mismo tiempo tampoco es deseable una exposición y/o arrastre de tipos de fitoplancton en biotopos extraños, porque de esta manera se provoca un desplazamiento en el equilibrio ecológico.

Por lo tanto, es necesario detectar células de fitoplancton vivas en agua, en particular en el marco de procedimientos de supervisión y de control en línea, en particular para el control de un procedimiento de tratamiento para la eliminación y/o desinfección de las células de fitoplancton vivas y/o de microorganismos en el agua.

Sin embargo, los métodos conocidos actualmente precisamente en zonas límites en tamaños de células inferiores o iguales a 0,1 mm y en la determinación necesaria del número de células no están en condiciones de suministrar resultados de una manera fiable y dentro de límites de tiempo convenientes, en particular en presencia de diferentes tipos y en combinación discrecional. Así, por ejemplo, el procedimiento conocido de la multiplicación de la biomasa es, en efecto, muy sensible, pero es muy costoso de tiempo, puesto que requiere días o incluso semanas, para determinar la biomasa. Además, en este procedimiento es un inconveniente que el número original de las células permanece desconocido. Por lo tanto, este método no es adecuado para la supervisión en línea.

Además, se conoce el método fluorométrico pasivo, con el que se puede determinar la biomasa de las células de fitoplancton en una muestra de agua. En este método es un inconveniente que no proporciona ninguna conclusión sobre células de fitoplancton vivas o muertas, puesto que no es posible una distinción.

El llamado método fluorométrico activo sirve para la determinación de la eficiencia cuantitativa del sistema de fotosíntesis, que se puede determinar específicamente sólo para células vivas. En este método es un inconveniente que no permite una cuantificación de células de fitoplancton.

Se conoce a partir del documento DE 199 30 865 A1 un fluorómetro de clorofila para la determinación del fitoplancton, en el que una muestra de agua es investigada en una cámara de muestras de dos partes, en la que una de las partes es iluminada con una luz de medición de fluorescencia fototácticamente inactiva y la otra parte es iluminada con una luz fototácticamente activa, que solamente en el caso de dinoflagelados, provoca movimientos típicos entre los dos volúmenes parciales, que son característicos para determinados dinoflagelados a través de las modificaciones de la fluorescencia en función del tiempo condicionada de esta manera. De este modo se pueden obtener informaciones con relación a la composición de los tipos de los dinoflagelados en muestras de agua desconocidas, pero es un inconveniente que no se pueden obtener manifestaciones cuantitativas sobre el número absoluto de células vivas de una especie determinada en la muestra de agua.

Se conoce a partir de MOLDAENKE. VC. Y col., "The 1-Hz fluorometer: A new approach to fast and sensitive long-term studies of active chlorophyll and environmental influences", HELGOLÄNDER MESSUNTERSUCHUNGEN, Vol. 49, Nº 1-4, 1995, páginas 785-796, XP008085547 USSN: 0174-3597 un procedimiento para la determinación cuantitativa de la concentración de células de fitoplancton vivas en una muestra de agua, en el que se determina la modulación de la fluorescencia de células de fitoplancton provocada por la luz actínica modulada. Esta modulación corresponde a la modulación del estado "redox" de los aceptores primarios de la clorofila, y se realiza solamente en células de fitoplancton vivas. Este procedimiento se calibra con una muestra, que contiene las mismas especies de células que en la muestra de agua, para obtener el número de células de fitoplancton vivas en la muestra de agua.

PARESYS, G. y col.; "Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton communities by trichromatic chlorophyll fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria", WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 39, Nº 5, Marzo de 2005 (2005-03), páginas 911-921, XP004789874 ISSN: 0043-13534 describe un procedimiento para la determinación de la concentración de organismos de referencia conocidos sobre la base de la medición de la fluorescencia mínima. En este caso, es un inconveniente que este procedimiento solamente es aplicable a especies conocidas, encontrando consideración solamente células vivas de estas especies conocidas. No es posible una distinción entre células vivas y células muertas. Con este procedimiento tampoco es

posible determinar el número de células vivas de una especie desconocida en una muestra de agua. Además, este procedimiento no es adecuado para una diagnosis en línea.

5 Se conoce a partir del documento EP 1 582 859 A1 un procedimiento para la determinación de microbios, en el que se mide la fluorescencia de las sustancias colorantes formadas por esporas. Sin embargo, este procedimiento no es adecuado para determinar el número de células de fitoplancton vivas en una muestra de agua.

DUBINSKI, ZVY y col: "Listening to phytoplankton; Measuring biomass and photosynthesis by photoacoustics", "JOURNAL OF PHYCOLOGY", Vol. 34, Nº 5, Octubre de 1998 (1998-10), páginas 888-892, XP002457528 UISSN: 0022-3546 describe un procedimiento a base de la medición del desarrollo de calor como consecuencia de una entrada de luz.

10 El cometido de la invención es crear un procedimiento y un dispositivo para la detección de células de fitoplancton activas en/de agua, con los que es posible determinar el número de células de fitoplancton vivas en una muestra de agua con gasto reducido y en el tiempo más corto posible y en particular posibilitar una supervisión en línea de agua.

15 Este cometido se soluciona por medio de un procedimiento según la reivindicación 1 así como por medio de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 17.

El procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de células de fitoplancton vivas en o de agua presenta las siguientes etapas:

- 20 • Medición de fluorescencia mínima ( $F_o$ ) de acuerdo con un estado, en el que prácticamente todos los aceptores de electrones primarios están todavía oxidados, de acuerdo con un estado en la oscuridad y a través de la aplicación de una fuente de luz con más de 700 nm,
- Medición de la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) en una entrada de luz, de acuerdo con la fluorescencia, en la que al menos casi todos los aceptores de electrones primarios están reducidos, así como
- 25 • Cálculo de la fluorescencia variable  $F_v$  a través de la formación de la diferencia de la fluorescencia máxima  $F_m$  menos la fluorescencia mínima  $F_o$  en una cámara de medición, independientemente de su geometría, que contiene el agua y/u organismos a ensayar, y
- Cálculo del número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en la cámara de medición en función de la fluorescencia variable  $F_v$ .

30 De acuerdo con la invención, se lleva a cabo un cálculo de un número equivalente de células de fitoplancton vivas de otros tamaños de células que el tipo de referencia, en particular a través de comparación volumétrica. Los contenidos de células de fitoplancton son normalmente proporcionales al volumen de las células. Con la ayuda de esta relación se puede llevar a cabo un cálculo de un número equivalente de células de fitoplancton vivas con tamaños de células diferentes al tamaño de las células del tipo de referencia.

35 En este caso, la fluorescencia mínima  $F_o$  designa la fluorescencia de células vivas y muertas, la fluorescencia máxima  $F_m$  corresponde a la fluorescencia, a la que al menos aproximadamente todos los aceptores de electrones primarios están reducidos, y la fluorescencia variable  $F_v$  corresponde a la diferencia entre la fluorescencia máxima  $F_m$  y la fluorescencia mínima  $F_o$ , respectivamente, con relación al agua y/u organismos que se encuentran en el agua y que deben ensayarse.

40 Para el cálculo de materiales biológicos en el agua se puede detectar la fluorescencia por medio de un fluorómetro. En este caso, se pueden distinguir dos estados, por una parte la fluorescencia mínima  $F_o$  (estado oscuro) así como la fluorescencia máxima  $F_m$  a la entrada de una luz, en particular de luz de longitud de onda predeterminada. Se ha mostrado de manera sorprendente que la diferencia de la fluorescencia máxima  $F_m$ , menos la fluorescencia mínima  $F_o$ , es decir, la fluorescencia variable  $F_v$ , es una medida del número de células de fitoplancton vivas en la cámara de ensayo o bien de la cantidad de ensayo del agua y/o de los organismos, puesto que la fluorescencia variable  $F_v$  y el número de las células vivas están correlacionados.

45 A través de una medición de la fluorescencia mínima  $F_o$  (sin iluminación), una medición de la fluorescencia máxima  $F_m$  (con iluminación) así como el cálculo de la fluorescencia variable  $F_v$  a través de la formación de la diferencia  $F_m$  menos  $F_o$ , se puede calcular el número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en la cámara de medición o bien en la cantidad de agua de ensayo y/o de los organismos.

50 En el dispositivo de acuerdo con la invención para la detección de células de fitoplancton vivas en/desde agua está previsto al menos un fluorómetro para la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  y de la fluorescencia máxima  $F_m$  de una cantidad de agua y/o cantidad de organismos dentro de una cámara de ensayo, de manera que el fluorómetro presenta varias fuentes de luz y al menos un detector. Por lo demás, está prevista una instalación de

- 5 evaluación, por medio de la cual se realiza una determinación de la fluorescencia variable  $F_v$  así como un cálculo del número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en el volumen de ensayo en función de la fluorescencia variable  $F_v$  calculada, y se realiza un cálculo de un número equivalente de células de fitoplancton vivas de otros tamaños de células que el tipo de referencia por medio de una comparación volumétrica, estando prevista una unidad de control, por medio de la cual se puede controlar una instalación de eliminación y/o desinfección, en el que delante o detrás del dispositivo está conectada una instalación de eliminación y/o desinfección, que recibe sus instrucciones de control desde la unidad de control.
- 10 La intensidad de la luz fluorescente es directamente proporcional al número de las células de un tipo de referencia en la cámara de medición o bien de la cantidad de ensayo en/desde el agua, es decir, que la relación sigue una recta, siendo la gradiente de las rectas de proporcionalidad de nuevo una medida para el tamaño de las células individuales.
- 15 En la "cámara de ensayo" se puede tratar de un volumen de ensayo, que está lleno con el agua a investigar, es decir, una muestra de agua, pero se puede tratar también de un filtro de membrana, por medio de la cual se ha filtrado una cantidad determinada del agua a investigar y en el que la medición de la fluorescencia mínima  $F_o$  y de la fluorescencia máxima  $F_m$  se realiza directamente con la capa de células sobre la superficie del filtro de membrana sin agua.
- 20 Se ha mostrado de manera sorprendente que la determinación del número de células vivas es posible sobre la base del cálculo de la fluorescencia variable  $F_v$  a través de las células vivas debido a una entrada de luz, es decir, de una radiación de corta duración de las células en la cámara de medición con luz.
- 25 La fluorescencia variable  $F_v$  es, por lo tanto, una medida de las células vivas en el volumen de medición, es decir, que las dos magnitudes son especialmente equivalente entre sí, puesto que las células vivas desarrollan fluorescencia debido a una radiación de corta duración con luz y, por lo tanto, es posible un cálculo del número de células vivas de un tipo de referencia en la cámara de medición en función de la fluorescencia variable.
- Otras configuraciones ventajosas de la invención se indican en las reivindicaciones dependientes.
- 30 Así, por ejemplo, es ventajoso que se realiza una o varias veces antes de la medición antes de la determinación de la fluorescencia  $F_o$ ,  $F_m$  la calibración lineal para la determinación de la relación entre fluorescencia variable  $F_v$  y el número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en la cámara de medición, en particular un tipo de referencia de un tamaño de célula de más de  $0,8 \mu\text{m}$  en la longitud mínima.
- 35 El tipo de referencia así como el tamaño de la célula de más de  $0,8 \mu\text{m}$  en la longitud mínima se puede determinar o bien calcular por medio de procedimientos microscópicos conocidos, es decir, que se puede determinar el tipo de referencia.
- Con la ayuda de esta calibración lineal se puede calcular ahora el número de células a partir del valor calculado de la fluorescencia variable  $F_v$ .
- 40 Con preferencia, se lleva a cabo una determinación de la luz dispersa, en particular antes de la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  y/o de la fluorescencia máxima  $F_m$ . La determinación de la luz dispersa se puede realizar inmediatamente antes de la realización de la medición, en particular, de  $50 \mu\text{s}$  a  $100 \mu\text{s}$ , en particular  $80 \mu\text{s}$  antes de la determinación de la fluorescencia mínima  $F_p$  y/o de la fluorescencia total  $F_m$ . Esta medición detecta luz dispersa eventualmente presente o cualquier otra forma de luz, que no se determina por células vivas.
- 45 Con preferencia, la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  se realiza a través de la formación del valor medio a partir de varias mediciones individuales de la fluorescencia mínima dentro del volumen de ensayo. Con preferencia, se llevan a cabo varias mediciones individuales en una secuencia temporal de  $20 \text{ms}$  a  $100 \text{ms}$ .
- De manera alternativa o acumulativa, la determinación de la fluorescencia máxima  $F_m$  se puede realizar a través de una formación del valor medio a partir de varias mediciones individuales de la fluorescencia máxima  $F_m$ , en particular se pueden realizar varias mediciones individuales en el intervalo de tiempo de  $20 \text{ms}$  a  $100 \text{ms}$ .
- 50 A través de una formación del valor medio de la fluorescencia mínima  $F_o$  y/o de la fluorescencia máxima  $F_m$  se puede elevar la exactitud de la medición. Puesto que se pueden realizar varias mediciones individuales en secuencia temporal muy corta, de ello no resulta ninguna demora de tiempo relevante durante la aplicación del procedimiento, en particular en el marco de una supervisión en-línea de una instalación para la supervisión de la calidad del agua.
- Es ventajoso que el cálculo de la fluorescencia variable  $F_v$  se realice utilizando un valor medio de la fluorescencia mínima  $F_o$  y/o un valor medio de la fluorescencia máxima  $F_m$ . De esta manera se puede elevar de la misma manera la calidad y la exactitud.
- Con preferencia, la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  y de la fluorescencia máxima  $F_m$  se realiza por

## ES 2 404 519 T3

medio de un fluorómetro empleando al menos una fuente de luz pulsátil PL y/o al menos una fuente de luz continua KL, sirviendo como fuente de luz PL y KL especialmente LEDs.

Con preferencia, la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  se realiza utilizando luz pulsátil, especialmente con una longitud de onda de 420 nm.

- 5 Con preferencia, la consecución del estado para la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  se puede acelerar a través de la utilización de una fuente de luz con una longitud de onda mayor que 700 nm, sirviendo como fuente de luz especialmente LEDs.

10 Con preferencia, la determinación de la fluorescencia mínima  $F_o$  se realiza utilizando al menos una fuente de luz pulsátil PL, especialmente de impulsos de luz de la fuente de luz pulsátil con un intervalo de tiempo de 20 ms a 100 ms.

La determinación de la fluorescencia máxima  $F_m$  se realiza con preferencia utilizando luz continua, especialmente con una longitud de onda de 660 nm.

15 Es ventajoso que la determinación de la fluorescencia se realice utilizando al menos una fuente de luz pulsátil PL, especialmente de impulsos de luz de la fuente de luz pulsátil PL con un intervalo de tiempo de 20 ms a 100 ms, y al menos con una fuente de luz continua KL.

En el marco de una supervisión continua, el procedimiento, es decir, las etapas individuales del procedimiento, se pueden repetir en número predeterminado. De esta manera, es posible realizar una supervisión continua y un control de calidad continuo del agua a verificar y en el marco de una supervisión en-línea. En particular, a través de una supervisión de un valor límite predeterminado se puede disparar de forma automática una alarma.

20 Es ventajoso que en un proceso de supervisión continuo se tomen desde una reserva de agua y/o desde una corriente de agua de forma repetida volúmenes de ensayo o cantidades de ensayo y se apliquen las etapas del procedimiento, respectivamente una o varias veces en cada volumen de ensayo y se transmita el número calculado en cada caso de las células de fitoplancton vivas a una unidad de supervisión y/o de control. En particular, los datos calculados, es decir, el número calculado de células de fitoplancton vivas pueden ser conducidos a la cámara de medición de una instalación, con la que se controla y/o supervisa la eliminación de las células del agua y/o la desinfección el agua.

Un control de un procedimiento de tratamiento para la eliminación y/o desinfección de las células de fitoplancton vivas en/desde agua se puede realizar, por lo tanto, en función del número calculado de células de fitoplancton vivas y/o en función de un número equivalente calculado de células de fitoplancton vivas.

30 Con preferencia, se lleva a cabo un registro en memoria volátil o duradera al menos del número calculado de las células de fitoplancton vivas, en particular para fines de documentación.

Es ventajoso que el número calculado de las células de fitoplancton vivas en el agua sea supervisado para determinar si se excede un valor límite predeterminado, en particular en el caso de que se exceda el valor límite, se realiza una activación de una alarma.

35 El dispositivo de acuerdo con la invención para la detección de células de fitoplancton vivas en/desde agua presenta con preferencia una cámara de medición, que está formada especialmente por una cubeta, en particular una cubeta de vidrio o de plástico.

40 Con preferencia, la cámara de ensayo presenta una entrada y/o una salida. Especialmente, la cámara de ensayo puede estar incrustada en una corriente de transporte continua o sincronizada del agua a ensayar, es decir, que puede estar integrada en el conducto de transporte por medio de la entrada y la salida.

Con preferencia, el dispositivo presenta al menos una fuente de luz pulsátil y/o al menos una fuente de luz continua, sirviendo como fuente de luz especialmente LEDs.

45 Con preferencia, están dispuestas al menos una fuente de luz pulsátil, especialmente de luz azul con una longitud de onda de aproximadamente 420 nm y al menos una fuente de luz continua, especialmente de luz roja con una longitud de onda de aproximadamente 660 nm y al menos una fuente de luz con una longitud de onda mayor que 700 nm.

Con preferencia, delante y/o detrás del dispositivo está conectada una instalación para la eliminación de células del agua y/o para la desinfección del agua.

50 Con preferencia, al menos una válvula controlable está dispuesta en una entrada y/o en una salida de la cámara de ensayo. De esta mane, es posible incorporar el dispositivo en un proceso de transporte continuo, pudiendo interrumpirse el transporte del agua a ensayar por medio de la válvula controlable durante el tiempo de una medición

por medio del fluorómetro.

Es ventajosa la disposición de una bomba de transporte para el transporte del agua.

5 Con preferencia, está prevista una unidad de control, por medio de la cual se puede controlar la unidad de evaluación y/o de una o varias válvulas y/o una bomba de transporte y/o una instalación de eliminación y/o desinfección.

Es ventajoso que esté prevista una unidad de control, por medio de la cual se pueden registrar en memoria volátil o duradera al menos la fluorescencia variable  $F_v$  calculada y/o el número calculado de células de fitoplancton vivas y/o de microorganismos.

De esta manera se posibilita una documentación verificable.

10 La invención se explica en detalle con la ayuda de las figuras. En este caso:

La figura 1 muestra un ejemplo de una curva de inducción de fluorescencia.

La figura 2 muestra un esquema de un ejemplo de realización del dispositivo para la detección de células de fitoplancton vivas y/o de microorganismos en el agua.

15 La figura 3 muestra la relación entre la fluorescencia variable  $F_v$  y el número de las células vivas por mililitro en un volumen de medición.

20 La figura 1 muestra una curva de inducción de fluorescencia medida en el ciclo temporal. El nivel de fluorescencia mínima  $F_o$  medido se consigue cuando se provoca un estado, en el que prácticamente todos los aceptores de electrones primarios están todavía oxidados, de acuerdo con un estado en la oscuridad o a través de la aplicación de una fuente de una luz con una longitud de onda de más de 700 nm. A través de la conexión de una fuente de luz intermitente o continua en el instante  $T_1$  se activan reacciones fotoquímicas, que tienen como consecuencia que se reducen los aceptores de electrones primarios. Cuando al menos aproximadamente todos los aceptores de electrones primarios están reducidos, el nivel de fluorescencia alcanza la fluorescencia máxima  $F_m$ . A partir del desarrollo de la curva de inducción de fluorescencia sobre el tiempo después de la conexión de la fuente de luz en el instante  $T_1$  se puede deducir que una subida de la fluorescencia desde la fluorescencia mínima  $F_o$  a la fluorescencia máxima  $F_m$  no tiene lugar de forma repentina, son que se eleva de forma continua en un proceso dinámico, lo que es atribuible al procedimiento de las células de fitoplancton vivas.

La caída de la curva de inducción de fluorescencia después de una desconexión de la fuente de luz en el instante  $T_2$  se puede deducir de la misma manera a partir de la figura 1.

30 La fluorescencia variable  $F_v$ , que corresponde a la diferencia de fluorescencia máxima  $F_m$  menos la fluorescencia mínima  $F_o$ , es proporcional el número de las células vivas dentro de la cámara de medición. Con la ayuda de una relación establecida previamente en el marco de una calibración entre fluorescencia variable  $F_v$  y el número de las células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia determinado predefinido, es posible, por lo tanto, calcular en función de la fluorescencia variable  $F_v$  el número de células de fitoplancton vivas del tipo de referencia.

35 En la figura 3 se representa un esquema de un ejemplo de realización de un dispositivo para la detección de células de fitoplancton vivas en/desde agua.

El dispositivo presenta un fluorómetro así como una unidad de evaluación, de supervisión y de control.

La cámara de ensayo 11 del fluorómetro está formada por una cubeta con dos superficies de vidrio paralelas al plano.

40 El fluorómetro presenta fuentes de luz en forma de tres tipos de LEDs, una fuente de luz que emite luz de una longitud de onda de más de 700 nm, una fuente de luz pulsátil y una fuente de luz continua. Por lo demás, el fluorómetro presenta un detector. La fuente de luz es controlada por la unidad de control, es decir, que es conectada y desconectada. Por medio del detector es posible detectar la curva de inducción de fluorescencia de la fluorescencia de la cantidad de agua que se encuentra en la cubeta y que debe ensayarse, es decir, especialmente cuando la fuente de luz está desconectada, la fluorescencia mínima  $F_o$  así como cuando la fuente de luz está conectada la fluorescencia máxima  $F_m$  y transmitirlas a la unidad de control para la evaluación posterior.

45 El fluorómetro está incorporado en un proceso de transporte discontinuo o continuo y presenta una entrada y una salida.

Por medio de la unidad de control se lleva a cabo una evaluación de los valores de medición de la fluorescencia, transmitidos a través de una línea de datos desde el fluorómetro, calculando a través de la formación de la diferencia de la fluorescencia máxima  $F_m$  menos la fluorescencia mínima  $F_o$  la fluorescencia variable  $F_v$  y calculando a partir

de ésta fluorescencia variable calculada por medio de una recta de calibración medida y registrada el numero de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en el agua a ensayar que se encuentra en la cubeta.

5 Por lo demás, a través de la unidad de control se lleva a cabo una supervisión para determinar si se excede un valor límite predeterminado y registrado, siendo emitido un mensaje de alarma en el caso de que se exceda el valor límite a través de la línea de datos.

La unidad de control está conectada a través de la línea de datos con una unidad de memoria, por medio de la cual se puede registrar el número calculado de células de fitoplancton vivas.

El dispositivo está incorporado en una corriente de transporte continua y de esta manera configura una supervisión continua en-línea del agua a ensayar.

10 Delante y/o detrás del dispositivo de supervisión está conectada una unidad de eliminación y/o de desinfección no representada, que recibe sus instrucciones de control desde la unidad de control.

La figura 3 muestra la relación entre la fluorescencia variable Fv y el número de las células vivas por mililitro en un volumen de medición,

15 La Organización Marítima Internacional predetermina como norma de salida desde instalaciones de tratamiento de agua de lastre a bordo de buques valores límite para ciertas clases de tamaños de organismos. El intervalo de tamaños de  $\geq 10 \mu\text{m}$  a  $< 50 \mu\text{m}$  es dominado por fitoplancton. A tal fin, se prescribe un valor límite de salida de  $< 10$  organismos vivos e la longitud mínima por mililitro.

20 Hasta ahora solamente es posible una supervisión a través de recuento microscópico laborioso en tierra. Puesto que la introducción de agua de lastre se realiza directamente en el medio ambiente, es necesaria una supervisión en línea en tiempo real.

En este ejemplo según la figura 3, se han empleado las algas marinas verdes *Tetraselmis suecica* con un tamaño de  $10 \mu\text{m}$  como organismo de referencia para el procedimiento.

25 La figura 3 muestra la dependencia de la señal Fv del número de células Tetraselmis vivas recontadas microscópicamente en la entrada y en la salida de una instalación de tratamiento de agua de lastre, que está constituida por una separación previa mecánica seguida por un tratamiento de desinfección.

Como se muestra en la figura 3, el rendimiento cualitativo utilizado normalmente (que corresponde a  $Fv/Fm = Fm - Fo$ ) no permite realizar ninguna correlación con el número de células vivas.

30 En cambio, la señal Fv determinada con el procedimiento de acuerdo con la invención y utilizada en adelante proporciona una dependencia lineal clara con el número de células vivas ( $R^2 = 0,98$ ) también en un intervalo de números de células muy amplio.

La conversión de esta señal para biomasa viva en número de células vivas se basa en una relación volumétrica.

De acuerdo con la invención, a través de la raíz a la tercera potencia se calculan números de células equivalentes para otros tamaños de células que el tipo de referencia. En este caso, el gradiente de las rectas de proporcionalidad es una medida para el tamaño de las células individuales. Esta relación se reproduce en la Tabla siguiente:

Especies	Pendiente Tetraselmis / Pendiente Especies	$X^{(1/3)}$
Thalassiosira weissflogii	1.34	1.10
Isochrysis galbana	7.27	1.94
Nannochloropsis oculata	73.80	4.19

35 Una ventaja de la dependencia de la raíz de tercera potencia es que las células de fitoplancton vivas en un tamaño inferior a  $10 \mu\text{m}$ , incluso en número elevado, apenas influye en la señal, mientras que las células de fitoplancton vivas mayores que  $10 \mu\text{m}$ , ya en número de células inferior a 10 por mililitro, provocan una señal significativa. De esta manera, se puede garantizar una supervisión segura de estos valores límites.

40

**REIVINDICACIONES**

1.- Procedimiento para la detección de células de fitoplancton vivas en o de agua en el marco de una supervisión continua en línea del agua, en particular agua de lastre de barcos, aguas corrientes, aguas residuales o agua en instalaciones de piscinas o de baños, que comprende las siguientes etapas:

- 5           • Medición de fluorescencia mínima (Fo) de acuerdo con un estado, en el que prácticamente todos los aceptores de electrones primarios están todavía oxidados, de acuerdo con un estado en la oscuridad y a través de la aplicación de una fuente de luz con más de 700 nm,
- Medición de la fluorescencia máxima (Fm) en una entrada de luz, de acuerdo con la fluorescencia, en la que al menos casi todos los aceptores de electrones primarios están reducidos, así como
- 10          • Cálculo de la fluorescencia variable Fv a través de la formación de la diferencia de la fluorescencia máxima Fm menos la fluorescencia mínima Fo en una cámara de medición, y
- Cálculo del número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en la cámara de medición en función de la fluorescencia variable Fv, con la ayuda de una calibración lineal, en el que se realiza un cálculo de un número equivalente de células de fitoplancton vivas de otros tamaños de células que el tipo
- 15          de referencia por medio de una comparación volumétrica.

2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se realiza una calibración lineal para la determinación de la relación entre fluorescencia variable (Fv) y el número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en la cámara de medición, en particular de un tipo de referencia de un tamaño de células mayor que 0,8 µm en la longitud mínima, en particular porque la calibración lineal se realiza una o más veces antes de la determinación de la fluorescencia (Fo, Fm).

3.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se realiza una determinación de la luz dispersa, en particular porque se realiza una determinación de la luz dispersa de 50 µm a 100 µs, en particular 80 µs, antes de la determinación de la fluorescencia mínima (Fo) y/o de la fluorescencia máxima (Fm).

4.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la fluorescencia mínima (Fo) se realiza a través de la formación del valor medio de varias mediciones individuales de la fluorescencia mínima (Fo), en particular porque se realizan varias mediciones individuales a intervalos de 20 ms a 100 ms.

5.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la fluorescencia máxima (Fm) se realiza a través de la formación del valor medio de varias mediciones individuales de la fluorescencia máxima (Fm), en particular porque se realizan varias mediciones individuales a intervalos de 20 ms a 100 ms.

6.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el cálculo de la fluorescencia variable (Fv) se realiza utilizando un valor medio de la fluorescencia mínima (Fo) y/o un valor medio de la fluorescencia máxima (Fm).

7.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de las fluorescencias (Fo, Fm) se realiza por medio de un fluorómetro empleando al menos una fuente de luz pulsátil (PL) y/o al menos una fuente de luz continua (KL), sirviendo como fuentes de luz (PL, KL) especialmente LEDs.

8.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la fluorescencia se realiza utilizando luz pulsátil, en particular luz con una longitud de onda de 420 nm.

9.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la fluorescencia mínima (Fo) se realiza utilizando al menos una fuente de luz pulsátil (PL) y/o al menos una fuente de luz con una longitud de onda mayor que 700 nm, en particular de impulsos de luz de la fuente de luz pulsátil (PL) con un intervalo de tiempo de 20 ms a 100 ms.

10.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la fluorescencia máxima (Fm) se realiza utilizando luz continua, en particular luz con una longitud de onda de 660 nm.

11.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la fluorescencia máxima (Fm) se realiza utilizando al menos una fuente de luz pulsátil (PL), en particular de impulsos de luz de la fuente de luz pulsátil (PL) con un intervalo de tiempo de 20 ms a 100 ms, y con al menos una fuente de luz continua (KL).

12.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las etapas del

procedimiento se repiten en número predeterminable.

- 5 13.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en un proceso de supervisión continua se extraen volúmenes de ensayo de forma repetida desde una reserva de agua y/o desde una corriente de agua y se aplican las etapas del procedimiento en cada caso una o varias veces sobre cada volumen de agua y se transmite el número calculado en cada caso de células de fitoplancton vivas a una unidad de supervisión y/o de control.
- 10 14.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se realiza un control de u procedimiento de tratamiento para la eliminación y/o desinfección de las células de fitoplancton vivas en el agua en función del número calculado de células de fitoplancton vivas y/o en función de un número equivalente calculado de células de fitoplancton vivas.
- 15 15.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se realiza un almacenamiento volátil o duradero del número calculado de las células de fitoplancton vivas en el agua y/o un almacenamiento volátil o duradero de las fluorescencias calculadas (Fo, Fm, Fv).
- 15 16.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se supervisa el número calculado de las células de fitoplancton vivas en el agua para determinar si se excede un valor límite predeterminable, en particular porque en el caso de que se exceda el valor límite, se genera un mensaje de alarma.
- 20 17.- Dispositivo para la detección de células de fitoplancton vivas en o bien desde agua, con al menos un fluorómetro para la determinación de la fluorescencia mínima (Fo) de acuerdo con un estado, en el que prácticamente todos los aceptores de electrones primarios están todavía oxidados, de acuerdo con un estado en la oscuridad y a través de la aplicación de una fuente de luz con más de 700 nm, y medición de la fluorescencia máxima (Fm) en una entrada de luz, de acuerdo con la fluorescencia, en la que al menos casi todos los aceptores de electrones primarios están reducidos, dentro de una cámara de ensayo, en el que el fluorómetro presenta varias fuentes de luz y al menos un detector, caracterizado porque está prevista una unidad de evaluación, por medio de la cual se lleva a cabo una determinación de la fluorescencia variable (Fv) así como un cálculo del número de células de fitoplancton vivas de un tipo de referencia en la cámara de ensayo en función de la fluorescencia variable (Fv) calculada con la ayuda de una calibración lineal y en el que se lleva a cabo un cálculo de un número equivalente de células de fitoplancton vivas de otros tamaños de células que el tipo de referencia por medio de una comparación volumétrica, en el que está prevista una unidad de control, por medio de la cual se puede controlar una instalación de eliminación y/o desinfección, en el que delante o detrás del dispositivo está conectada una instalación de eliminación y/o desinfección, que recibe sus instrucciones de control desde la unidad de control.
- 25 18.- Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque la cámara de ensayo está formada por una cubeta, que está constituida especialmente de vidrio o de plástico.
- 30 19.- Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque la cámara de ensayo presenta una entrada y/o una salida.
- 35 20.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque presenta al menos una fuente de luz pulsátil, y/o al menos una fuente de luz continua, sirviendo como fuente de luz especialmente LEDs.
- 40 21.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 20, caracterizado porque están dispuestas al menos una fuente de luz pulsátil, en particular de luz azul con una longitud de onda de aproximadamente 420 nm y/o al menos una fuente de luz continua, en particular de luz roja con una longitud de onda de aproximadamente 660 nm y/o una fuente de luz con una longitud de onda mayor que 700 nm.
- 22.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 21, caracterizado porque al menos una válvula controlable está dispuesta en una entrada y/o en una salida de la cámara de ensayo.
- 23.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 22, caracterizado porque está prevista una bomba de transporte para el transporte del agua.
- 45 24.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 23, caracterizado porque está prevista una unidad de control, por medio de la cual se puede controlar la unidad de evaluación y/o una o varias válvulas y/o una bomba de transporte.
- 50 25.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 24, caracterizado porque está prevista una unidad de memoria, por medio de la cual se puede registrar en memoria volátil o duradera la(s) fluorescencia(s) medida(s) (F0, Fm) y/o la fluorescencia variable calculada (Fv) y/o el número calculado de células de fitoplancton vivas.

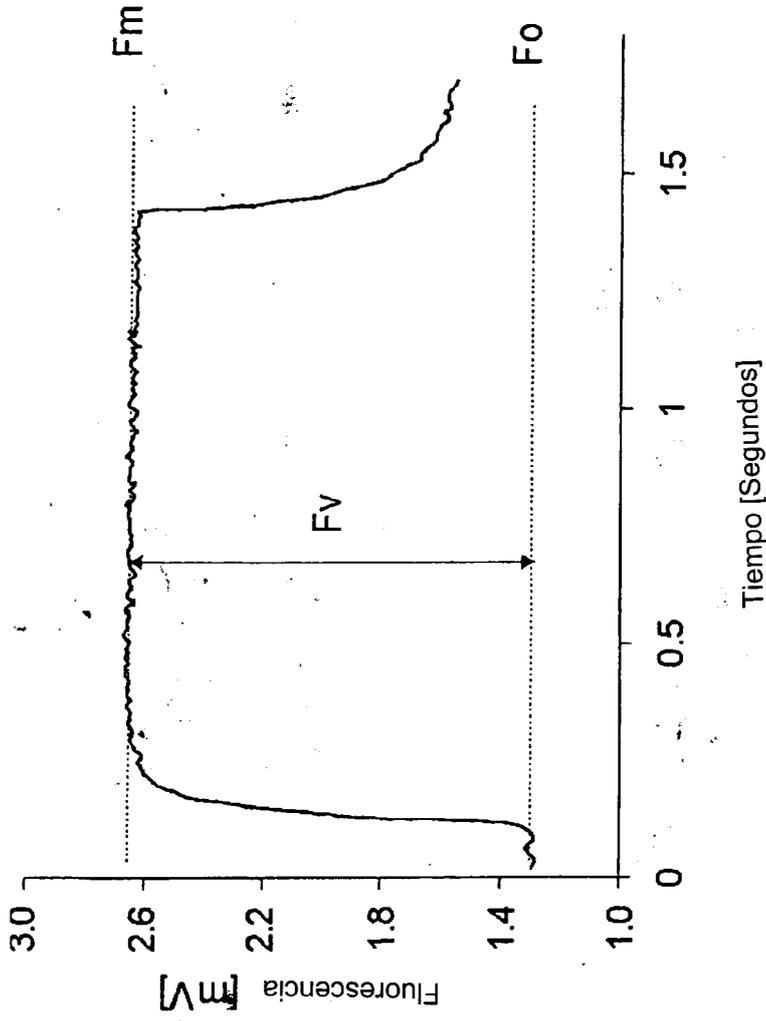


Fig. 1

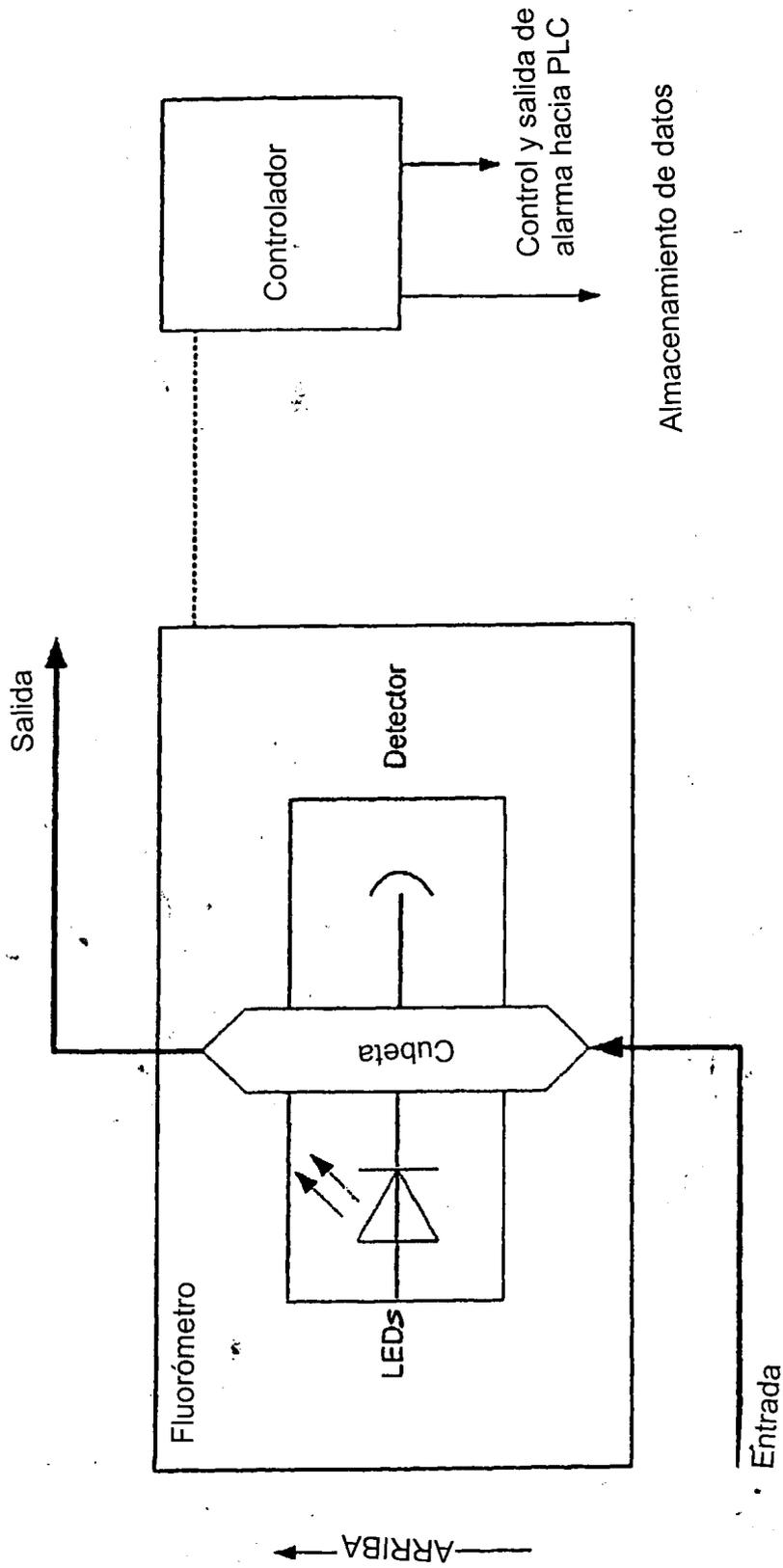


Fig. 2

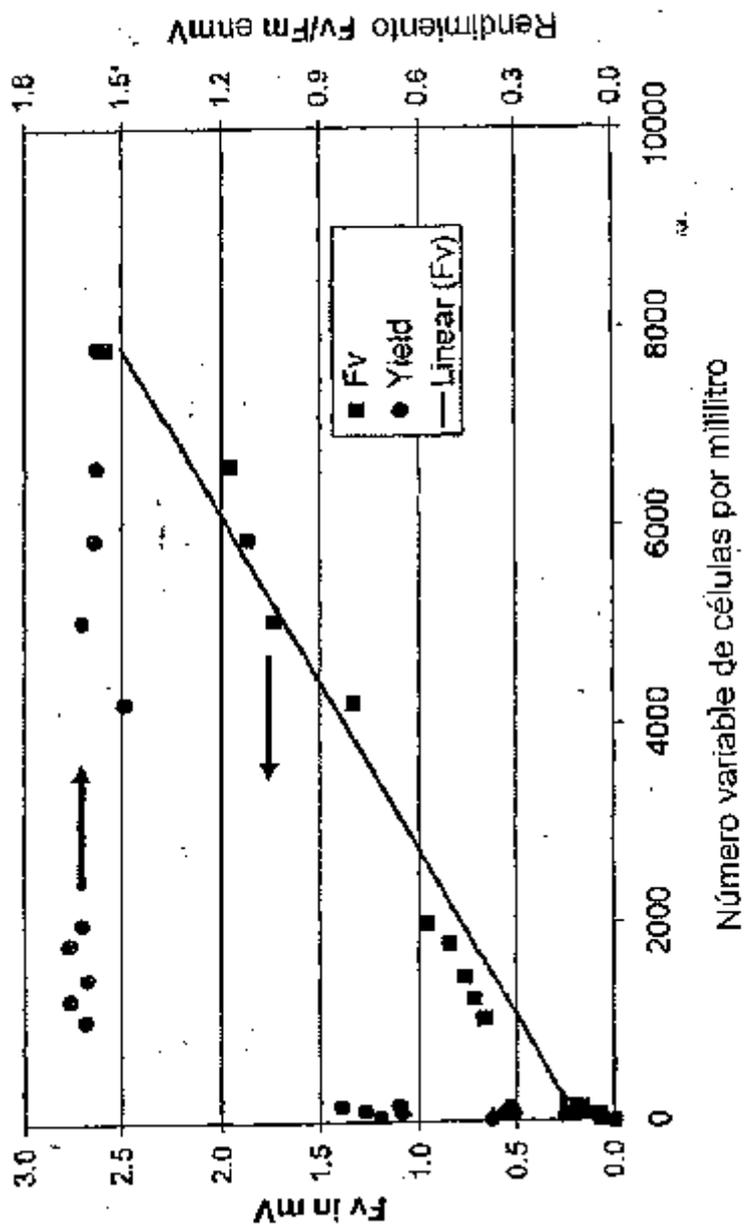


Fig. 3