

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 954**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2005 E 05776767 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1778859**

54 Título: **Detección de microorganismos con un dispositivo basado en fluorescencia**

30 Prioridad:

29.07.2004 US 592166 P
11.02.2005 WO PCT/US2005/004331

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2013

73 Titular/es:

CENTRUS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 , US

72 Inventor/es:

EDEN, GIDEON

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 411 954 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

Detección de microorganismos con un dispositivo basado en fluorescencia

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/592.166 presentada el 29 de julio de 2004, y la solicitud internacional n.º PCT/US05/04331, presentada el 11 de febrero de 2005, que se incorporan al presente documento como referencia.

La presente invención se refiere a dispositivos basados en fluorescencia para detectar crecimiento microbiano a partir de muestras de prueba.

Es necesario someter a prueba diversas sustancias industriales, tales como alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos y agua, para determinar contaminación microbiana. Un área de las pruebas biológicas de alimentos, productos lácteos, productos farmacéuticos, cosméticos y tipos relacionados de productos implica la estimación de los números totales de bacterias, levaduras y moho, así como las concentraciones de grupos específicos de organismos dentro del material. Un método ampliamente usado se conoce como el método de "recuento en placa convencional" e implica cultivar una muestra diluida del producto en un medio de crecimiento de agar. Se incuban las placas que contienen la muestra y el medio de crecimiento (por ejemplo, 32°C - 40°C) durante de 24 horas a 5 días, dependiendo del ensayo. Tras la incubación, se cuentan las colonias de microorganismos que han crecido en el agar.

Se han usado satisfactoriamente métodos ópticos para clasificar microorganismos en muestras clínicas (por ejemplo, PASCO de Difco, Detroit, Michigan). Aunque sería deseable utilizar un método colorimétrico, o cualquier otro método óptico, para detectar crecimiento microbiano en muestras industriales, las sustancias sólidas de las muestras de prueba dispuestas en medios acuosos producen habitualmente interferencia óptica para un sistema de detección. Más específicamente, cuando se disponen sustancias sólidas en un medio para permitir el cultivo de microorganismos, el sistema de detección colorimétrico debe hacer pasar luz o bien a su través o bien reflejar luz procedente de los medios que contienen la sustancia sólida. En la mayoría de los casos, las sustancias sólidas interfieren con las características espectrales de los medios, proporcionando una mala relación señal-ruido del sistema de detección.

Se describe un dispositivo para monitorizar de manera continua la actividad biológica en una muestra por Edén en la patente estadounidense n.º 5.366.873. Describe un dispositivo y un método para detectar crecimiento microbiano a partir de una sustancia de muestra. El dispositivo incluye un recipiente que es al menos parcialmente transparente y fluido dispuesto en el recipiente para cultivar microorganismos en el mismo. Se dispone una sustancia indicadora en la capa fluida para experimentar transformación en presencia de crecimiento de microorganismos. Se dispone en el recipiente una segunda capa, compuesta por sustancia semifluida, indicadores y otras sustancias, tales como medios de crecimiento. Las sustancias dentro de la fase semifluida están en equilibrio con las sustancias en la capa fluida y proporcionan una barrera frente a las sustancias sólidas introducidas en la capa fluida a la vez que proporcionan una zona dentro de la que pueden detectarse cambios en la sustancia indicadora, debido a crecimiento microbiano. En la práctica, la sustancia indicadora han sido colorantes que se ven afectados por las variaciones de pH en la capa fluida.

El documento DE 100 38 080 A1 se refiere a un método de registro de la presencia de sustancias inmovilizadas sobre un portador de biochip usando un aparato de exploración de fluorescencia, en el que un láser pulsado excita marcas fluorescentes que van a detectarse entre los pulsos. El aparato puede comprender un fotodiodo como sensor.

El documento "Portable, solid-state fluorometer for the measurement of chlorophyll fluorescent induction in plants" REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS USA, vol. 46, n.º 5, mayo de 1975 (05-1975), páginas 538-542, de SCHREIBER U ET AL: se refiere a un aparato para medir la inducción de fluorescencia de clorofila en plantas. El instrumento se basa en una combinación de sensor-emisor que incluye un fototransistor en combinación con un diodo emisor de luz. Esta combinación está adaptada para detectar fluorescencia y luz reflejada. Un LED emite luz relativamente monocromática con una longitud de onda pico a aproximadamente 670 nm y un fototransistor es sensible en la región de 800 - 900 nm.

El documento WO 01/28006 se refiere a una fuente de excitación ultravioleta de alto rendimiento compuesta por uno o más LED emisores de ultravioleta. Tal fuente emisora de ultravioleta puede usarse para autentificar características tanto visibles (marcas de agua) como invisibles (fluorescentes ultravioletas) de un artículo en examen, comprendiendo además la fuente al menos un LED de luz blanca.

La presente invención proporciona un método para detectar crecimiento microbiano usando la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible generadas por al menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta según las reivindicaciones independientes 1 y 18. La presente invención proporciona además un dispositivo para detectar crecimiento microbiano mediante la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible generadas por al menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta según la reivindicación independiente 19 y un dispositivo para detectar crecimiento microbiano mediante la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible y señales secundarias en la banda del visible generadas por al

menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta y en la banda del visible según la reivindicación independiente 38. Se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

Se apreciarán fácilmente las ventajas de la presente invención cuando se entiendan mejor las mismas mediante referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se considera en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

5 la figura 1 muestra una realización de la presente invención; y

la figura 2 muestra otra realización de la presente invención.

En general, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar crecimiento microbiano a partir de una sustancia de muestra, incluyendo el dispositivo al menos un recipiente que es al menos parcialmente transparente a radiación visible y/o ultravioleta (UV). Se dispone una capa fluida en el recipiente para cultivar microorganismos en la misma. Se dispone una sustancia indicadora que fluoresce en la capa fluida para que experimente transformación en presencia de crecimiento de microorganismos. Se dispone una capa de barrera en el recipiente que es una sustancia semifluida, cuya parte fluida es de la misma composición que la capa fluida en la que se cultivan los microorganismos. Por tanto, el fluido en la capa semifluida está en equilibrio con la capa fluida. La sustancia semifluida proporciona una barrera frente a las sustancias sólidas introducidas en la capa fluida a la vez que proporciona una zona dentro de la que pueden detectarse cambios en la al menos una sustancia indicadora que fluoresce, debido a crecimiento microbiano.

Más específicamente, la capa de barrera se compone de agentes gelificantes, tales como agar. Al llevar a cabo la presente invención, puede utilizarse cualquier tipo de sustancia gelificante o agar, tal como se define en el Índice Merck. Existen varios productos gelificantes comerciales disponibles que son adecuados, incluyendo gelatina, carragenanos y pectina.

La importante propiedad de tales agentes gelificantes usados en la presente invención es su capacidad para transferir iones, tales como H^+ y moléculas pequeñas, a la vez que bloquean bacterias y partículas de desecho más grandes. Si la concentración de las partículas pequeñas cambia debido a crecimiento de organismos (por ejemplo, pH o reacciones redox), la concentración de las partículas idénticas en la capa de barrera también seguirá estos cambios. El coeficiente de difusión de la capa de barrera determina la tasa en la que se siguen las variaciones en la capa líquida por cambios idénticos en la capa de barrera.

La figura 1 ilustra una configuración típica de los diversos componentes de un sistema que puede utilizarse según esta invención. El vial 10 está compuesto por material transparente al UV (por ejemplo, vidrio, plásticos transparentes al UV). La capa de barrera 16 puede componerse por cualquier agar disponible (por ejemplo, agar Muller Hinton de Difco, Detroit, Michigan) y colorante que fluoresce no tóxico 14, tal como umbeliferona. Esta capa se fabrica mediante la dispensación de la mezcla, esterilizada térmicamente, a la parte inferior del vial 10 y dejando que solidifique a temperatura ambiente. Se vierte una mezcla estéril de los medios líquidos 12 y el colorante 14 a temperatura ambiente encima de la capa de barrera.

La muestra de prueba 28 se sitúa en la capa fluida. El vial 10 se sitúa entonces en un dispositivo de incubación, a una temperatura apropiada, para fomentar el crecimiento de organismos. El dispositivo de incubación puede ser un incubador de aire, bloques calefactores o refrigeradores o intercambiador de calor.

Una fuente de luz ultravioleta 18 se coloca en la parte inferior del vial 10 de manera que la luz UV transmitida se dirija a través de las paredes transparentes al UV del vial 10 y la capa de barrera 16. La fuente luminosa puede comprender cualquier ultravioleta de onda larga o corta procedente de diversas fuentes UV. Por ejemplo, más del 50% de las longitudes de onda procedentes de la fuente luminosa pueden ser menores que 400 nanómetros. En determinadas realizaciones, al menos el 75% de las longitudes de onda procedentes de la fuente luminosa pueden ser menores que 400 nanómetros, por ejemplo, al menos el 85% de las longitudes de onda procedentes de la fuente luminosa pueden ser menores que 400 nanómetros, y al menos el 95% de las longitudes de onda procedentes de la fuente luminosa pueden ser menores que 400 nanómetros.

Pueden usarse diodos emisores de luz (LED) para proporcionar luz ultravioleta. En realizaciones de la presente invención, más del 50% de la luz generada por el diodo emisor de luz puede tener una longitud de onda menor que 400 nanómetros, tal como, por ejemplo, más del 75%, más del 85% y más del 95%. En una realización de la invención, puede utilizarse un diodo emisor de luz ultravioleta de longitud de onda larga (por ejemplo, de 350 a 400 nanómetros).

En otra realización de la presente invención, una multiplicidad de diodos emisores de luz pueden controlarse mediante el controlador 20, que proporciona energía eléctrica que puede ser espacialmente uniforme y estable.

Materiales adecuados que pueden usarse como el al menos un compuesto que fluoresce incluyen materiales que emiten luz visible con la exposición a radiación ultravioleta, tales como, por ejemplo umbeliferonas y cumarinas. Al tratar con ensayos de fluorescencia, debe recordarse que la longitud de onda de la radiación emitida por el compuesto que fluoresce es más larga que la de la fuente luminosa. Por ejemplo, la irradiación de umbeliferona con una fuente de luz UV de 380 nanómetros (invisible) genera una radiación visible verde azulada. Por consiguiente,

debe tenerse cuidado de que el sensor de luz no se vea influido por luz parásita generada por la fuente de luz UV. Si la fuente UV 18 se sitúa directamente enfrentada al sensor de luz 22, tal como se muestra en la figura 1, se requiere un filtro óptico paso banda 23 adicional para bloquear la influencia de la radiación UV sobre el sensor. Alternativamente, la fuente de luz UV 18 y el sensor 22 pueden situarse uno junto a otro enfrentados a la sección transparente al UV del vial a ángulos específicos, tal como se muestra en la figura 2, de modo que la radiación de fluorescencia se refleje de vuelta al sensor de luz. Puesto que la radiación de fluorescencia se irradia igualmente en todas las direcciones, pueden ajustarse los ángulos específicos para minimizar la luz reflejada UV, permitiéndose de ese modo que el sensor de luz mida sólo la energía de fluorescencia.

Los cambios dinámicos de la luz de fluorescencia, que es el indicador de la actividad bacteriana, se convierte en energía eléctrica utilizando un sensor de luz 22. Aunque puede utilizarse una amplia variedad de sensores (por ejemplo, elementos fotovoltaicos, fotodiodos, fototransistores, fotomultiplicadores, dispositivos acoplados por carga (CCD) y dispositivos multicanal) puede emplearse sensores de estado sólido de bajo coste debido a la alta energía de la luz que alcanza el sensor. Por tanto, cada vial puede tener su propio par de fuente de luz y sensor, eliminando así complejos dispositivos de indexación mecánicos utilizados en lectores ópticos y aumentando de ese modo la fiabilidad y la vida útil del instrumento. El diodo emisor de luz puede proporcionar energía o bien estacionaria (constante) o bien pulsada. Si se emplea un diodo emisor de luz adicional que opera en el rango visible, puede accionarse uno de los diodos emisores de luz a un nivel constante de energía mientras que el otro puede pulsarse, permitiendo que un único sensor de luz detecte ambas señales. En otra realización, pueden combinarse tanto un diodo emisor de luz UV como un diodo emisor de luz en el rango visible en un único paquete formando fuentes de luz visible y UV de banda dual que pueden activarse independientemente.

En una realización de la invención, se toman lecturas cada seis minutos, y los datos analógicos pueden convertirse por el convertidor 24 a forma digital. Se transfieren los datos del procedimiento a un procesador 26, en el que pueden visualizarse, almacenarse y analizarse para la detección en tiempo real.

El agente gelificante o agar puede colocarse en el recipiente de manera que esté en una región transparente del recipiente para facilitar la medición de cambios en esta fase del sistema cuando está en uso. Si el recipiente es un vial o tubo, normalmente podría situarse el agar en la parte inferior de tal receptáculo, tal como se ilustra en la figura 1, y sería de aproximadamente 2 a 3 mm de grosor. El agar podría estar en forma de un disco, unido a cualquier pared del recipiente u otra configuración según pueda ser conveniente para lograr la medición que es el objeto de la presente invención.

La capa semifluida (por ejemplo, la fase gelificante o de agar) puede situarse en la fase líquida dentro del recipiente de manera que las sustancias líquidas dentro del agar están en equilibrio con el líquido restante en el recipiente. En la práctica de la presente invención, la fase líquida dentro del recipiente es un medio líquido adecuado para cultivar el crecimiento de microorganismos. Se sitúa una muestra de una sustancia que puede albergar microorganismos en la fase líquida en el recipiente y se incuba para fomentar el crecimiento de los microorganismos. Cuando están presentes microorganismos, su crecimiento dará como resultados cambios en la composición de la fase líquida en la totalidad del recipiente en la medida que el líquido en la fase semifluida o de agar esté en equilibrio con el resto del líquido en el recipiente. El contenido del medio de crecimiento líquido puede seleccionarse para que dé como resultado una amplia variedad de cambios en la composición del líquido que pueden detectarse y medirse, tal como se expone en más detalle a continuación. El cambio en la composición del medio de crecimiento líquido puede detectarse y medirse en la fase semifluida, que está libre de la muestra que está sometándose a prueba y libre de microorganismos. La muestra que está someténdose a prueba es habitualmente demasiado grande a nivel molecular para penetrar en la fase de agar, como lo son los microorganismos. Por tanto, la fase semifluida proporciona una zona dentro de la que pueden detectarse y medirse fácilmente cambios en la fase líquida, provocados por el crecimiento de microorganismos, sin ninguna interferencia de la muestra de prueba.

La fase líquida de la presente invención puede ser un medio adecuado para el fomento del crecimiento de microorganismos y para el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos. Tales medios de crecimiento se conocen bien en la técnica.

Tras haberse situado una muestra de prueba en la fase líquida del recipiente, el recipiente puede incubarse a una temperatura apropiada (por ejemplo, de aproximadamente 15°C a 65°C) durante de aproximadamente 24 a 48 horas, o algún otro periodo de tiempo adecuado, tras el cual pueden medirse los cambios en la al menos una sustancia que fluoresce. Se detectan y se miden los cambios en la al menos una sustancia que fluoresce en la fase semifluida analizando los cambios en la fluorescencia relacionados con el crecimiento de microorganismos. Pueden detectarse y medirse los cambios en la sustancia indicadora en la fase semifluida puesto que el líquido en esta fase puede estar en equilibrio con el líquido restante en el recipiente. Por tanto, cualquier cambio que se produzca en la sustancia con fluorescencia estará presente en la totalidad del recipiente. La detección y medición en la fase semifluida libre de moléculas grandes (por ejemplo, la muestra que está someténdose a prueba) y microorganismos proporciona medios precisos y sistemáticos de detección del crecimiento de microorganismos con una alta relación señal-ruido.

El recipiente usado en la presente invención puede ser de vidrio o plásticos transparentes al UV largos, tales como poliestirenos. No es necesario que todo el recipiente sea transparente, pero la parte del recipiente que rodea la fase

5 semifluida debe ser transparente para permitir la medición de cualquier cambio en la sustancia indicadora en respuesta al crecimiento de microorganismos. Además, el recipiente puede ser de cualquier forma o tamaño, pero normalmente será un vial o un tubo que puede cerrarse una vez que se incorporan al mismo la fase de agar y la fase líquida. Una vez que se cargan las dos fases en el recipiente, pueden enviarse al emplazamiento necesario para realizar el análisis de las muestras de prueba. No existen requisitos especiales de temperatura o almacenamiento para el recipiente.

10 En una realización de la presente invención, una multiplicidad de compuestos que fluorescen pueden excitarse mediante una multiplicidad de diodos emisores de luz para hacer que los compuestos que fluorescen emitan luz visible. Los compuestos que fluorescen pueden estar presentes en el mismo recipiente antes de la excitación con los diodos emisores de luz, o los compuestos que fluorescen pueden estar presentes en diferentes recipientes antes de la excitación. En determinadas realizaciones, puede usarse un único detector de luz o una multiplicidad de detectores de luz. En determinadas realizaciones, se usa una multiplicidad de recipientes, teniendo cada recipiente su propio diodo emisor de luz y su propio detector de luz.

15 En determinadas realizaciones de la invención que comprenden al menos un diodo emisor de luz ultravioleta y al menos un diodo emisor de luz en la banda del visible, uno de los diodos emisores de luz puede estar generando energía estacionaria y el otro diodo emisor de luz puede ser pulsado, generando de ese modo una combinación de energía constante y energía pulsada dirigida al detector de luz y correspondiente a la señal de fluorescencia individual y la señal secundaria. El diodo emisor de luz ultravioleta y el diodo emisor de luz en la banda del visible pueden empaquetarse en un único recinto, formando de ese modo un diodo emisor de luz de banda dual.

20 En una realización de la invención que comprende al menos un diodo emisor de luz ultravioleta y al menos un diodo emisor de luz en la banda del visible, uno de los diodos emisores de luz puede estar activado durante una cantidad de tiempo específica mientras que el otro diodo emisor de luz puede estar desactivado, seguido por la activación del diodo emisor de luz desactivado y la desactivación del diodo emisor de luz activado, alternando de ese modo la generación de la señal de fluorescencia y la señal secundaria en periodos de tiempo consecutivos.

25 En una realización adicional de la invención que comprende al menos un diodo emisor de luz ultravioleta y al menos un diodo emisor de luz en la banda del visible, la interacción del diodo emisor de luz en la banda del visible con el al menos un compuesto colorante visible define la transmitancia óptica del al menos un compuesto colorante visible.

30 Los compuestos colorantes visibles adecuados incluyen, por ejemplo, indicadores de pH tales como púrpura de bromocresol, rojo de fenol, verde de bromocresol, azul de bromofenol, azul de bromotimol; e indicadores redox tales como resazurina, azul de metileno, tetrazolio y tionina.

La invención se ha descrito de manera ilustrativa, y ha de entenderse que la terminología que se ha usado pretende ser de naturaleza de términos descriptivos más que limitativos.

35 Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por tanto, ha de entenderse que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de otro modo al descrito específicamente.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar crecimiento microbiano usando la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible generadas por al menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta, experimentando el compuesto que fluoresce transformación en presencia de crecimiento microbiano, comprendiendo el método:
 - (a) proporcionar un recipiente que tiene (i) una matriz de barrera semifluida en el recipiente y (ii) una capa fluida adyacente a la matriz de barrera semifluida en el recipiente, en el que (A) la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden ambas el al menos un compuesto que fluoresce, y (B) el recipiente es al menos parcialmente transparente a la radiación electromagnética en los rangos de longitud de onda visible y ultravioleta;
 - (b) excitar dicho al menos un compuesto que fluoresce en la matriz de barrera semifluida con energía ultravioleta emitida desde un diodo emisor de luz que comprende longitudes de onda menores que 400 nanómetros; y
 - (c) detectar una señal de fluorescencia en la banda del visible generada por dicho al menos un compuesto que fluoresce excitado en la matriz de barrera semifluida con al menos un detector de luz sensible a energía electromagnética que comprende longitudes de onda mayores que o iguales a 400 nanómetros.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho detector de luz es un fototransistor con sensibilidad disminuida por debajo de una longitud de onda de 400 nanómetros.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un diodo emisor de luz genera un nivel estacionario de energía.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un diodo emisor de luz genera energía pulsada.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un compuesto que fluoresce se elige de umbeliferonas y cumarinas.
6. Método según la reivindicación 1, en el que la capa fluida es un medio de crecimiento líquido para los microorganismos.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la matriz de barrera semifluida comprende agar.
8. Método según la reivindicación 1, en el que la matriz de barrera semifluida comprende un agente gelificante seleccionado del grupo que consiste en gelatina, carragenanos y pectina.
9. Método según la reivindicación 6, en el que se hacen crecer células biológicas en dicha capa fluida.
10. Método según la reivindicación 9, en el que dichas células biológicas son microorganismos.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden además al menos un compuesto colorante visible de manera que dichos microorganismos hacen que dicho al menos un compuesto colorante visible emita una señal secundaria en la banda del visible cuando se expone a luz visible.
12. Método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un diodo emisor de luz y dicho al menos un detector de luz están enfrentados entre sí.
13. Método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un diodo emisor de luz y dicho al menos un detector de luz están dispuestos formando un ángulo.
14. Método según la reivindicación 13, en el que dicho al menos un detector de luz detecta luz no directa generada por dicho al menos un diodo emisor de luz.
15. Método según la reivindicación 1, en el que no se emplea ningún filtro paso banda.
16. Método según la reivindicación 1, en el que una multiplicidad de compuestos que fluorescen se excitan mediante una multiplicidad de diodos emisores de luz.
17. Método según la reivindicación 16, en el que se emplea una multiplicidad de recipientes.
18. Método para detectar crecimiento microbiano usando la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible generadas por al menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta, experimentando el compuesto que fluoresce transformación en presencia de crecimiento microbiano, comprendiendo el método:

- 5 (a) proporcionar un recipiente que tiene (i) una matriz de barrera semifluida en el recipiente y (ii) una capa fluida adyacente a la matriz de barrera semifluida en el recipiente, en el que (A) la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden ambas el al menos un compuesto que fluoresce, y (B) el recipiente es al menos parcialmente transparente a la radiación electromagnética en los rangos de longitud de onda visible y ultravioleta;
- (b) excitar dicho al menos un compuesto que fluoresce en la matriz de barrera semifluida con energía ultravioleta; y
- 10 (c) detectar una señal de fluorescencia en la banda del visible generada por dicho al menos un compuesto que fluoresce excitado en la matriz de barrera semifluida con un detector de luz sensible a energía electromagnética que comprende longitudes de onda mayores que o iguales a 400 nanómetros.
19. Dispositivo para detectar crecimiento microbiano mediante la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible generadas por al menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta, comprendiendo el dispositivo:
- 15 (a) un recipiente que tiene (i) una matriz de barrera semifluida en el recipiente y (ii) una capa fluida adyacente a la matriz de barrera semifluida en el recipiente, en el que (A) la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden ambas el al menos un compuesto que fluoresce, (B) el al menos un compuesto que fluoresce experimenta transformación en presencia de crecimiento de microorganismos, y (C) el recipiente es al menos parcialmente transparente a la radiación electromagnética en los rangos de longitud de onda visible y ultravioleta;
- 20 (b) al menos un diodo emisor de luz ultravioleta que genera radiación electromagnética que comprende longitudes de onda menores que 400 nanómetros y que puede excitar dicho al menos un compuesto que fluoresce en la matriz de barrera semifluida; y
- 25 (c) al menos un detector de luz sensible a energía electromagnética que comprende longitudes de onda mayores que o iguales a 400 nanómetros para la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible generadas por dicho al menos un compuesto que fluoresce en la matriz de barrera semifluida.
20. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que dicho detector de luz es un fototransistor con sensibilidad disminuida por debajo de una longitud de onda de 400 nanómetros.
21. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que dicho diodo emisor de luz genera un nivel estacionario de energía.
- 30 22. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que dicho diodo emisor de luz genera energía pulsada.
23. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que dicho al menos un compuesto que fluoresce se elige de umbeliferonas y cumarinas.
24. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que la capa fluida es un medio de crecimiento líquido para los microorganismos.
- 35 25. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que la matriz de barrera semifluida comprende agar.
26. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que la matriz de barrera semifluida comprende un agente gelificante seleccionado del grupo que consiste en gelatina, carragenanos y pectina.
27. Dispositivo según la reivindicación 24, en el que pueden hacerse crecer células biológicas en dicha capa fluida.
- 40 28. Dispositivo según la reivindicación 27, en el que dichas células biológicas son microorganismos.
29. Dispositivo según la reivindicación 28, en el que la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden además al menos un compuesto colorante visible de manera que dichos microorganismos hacen que dicho al menos un compuesto colorante visible emita una señal secundaria en la banda del visible cuando se expone a luz visible.
- 45 30. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que dicho al menos un diodo emisor de luz y dicho al menos un detector de luz están enfrentados entre sí.
31. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que dicho al menos un diodo emisor de luz y dicho al menos un detector de luz están dispuestos formando un ángulo.
- 50 32. Dispositivo según la reivindicación 31, en el que dicho al menos un detector de luz detecta luz no directa generada por dicho al menos un diodo emisor de luz.

33. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que una multiplicidad de compuestos que fluorescen se excitan mediante una multiplicidad de diodos emisores de luz.
34. Dispositivo según la reivindicación 33, en el que se emplea una multiplicidad de recipientes.
35. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que no se emplea ningún filtro paso banda.
- 5 36. Dispositivo según la reivindicación 19, que comprende además al menos un filtro paso banda ubicado en la trayectoria de dicha radiación electromagnética delante de una zona sensible a la luz de dicho al menos un detector de luz.
37. Instrumento para mediciones simultáneas de una multiplicidad de compuestos que fluorescen, que comprende múltiples unidades que comprenden cada una el dispositivo según la reivindicación 19.
- 10 38. Dispositivo para detectar crecimiento microbiano mediante la detección de señales de fluorescencia en la banda del visible y señales secundarias en la banda del visible generadas por al menos un compuesto que fluoresce excitado mediante energía ultravioleta y en la banda del visible, comprendiendo el dispositivo:
- 15 (a) un recipiente que tiene (i) una matriz de barrera semifluida en el recipiente y (ii) una capa fluida adyacente a la matriz de barrera semifluida en el recipiente, en el que (A) la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden ambas el al menos un compuesto que fluoresce, (B) el al menos un compuesto que fluoresce experimenta transformación en presencia de crecimiento de microorganismos, (C) el recipiente es al menos parcialmente transparente a la radiación electromagnética en los rangos de longitud de onda visible y ultravioleta, (D) la matriz de barrera semifluida y la capa fluida comprenden ambas al menos un compuesto colorante visible y (E) el al menos un compuesto colorante visible experimenta transformación en presencia de crecimiento de microorganismos;
- 20 (b) al menos un diodo emisor de luz ultravioleta que genera radiación electromagnética que comprende longitudes de onda menores que 400 nanómetros, pudiendo dicho al menos un diodo emisor de luz ultravioleta excitar dicho al menos un compuesto que fluoresce en la matriz de barrera semifluida, generando de ese modo dicha señal de fluorescencia en la banda del visible;
- 25 (c) al menos un diodo emisor de luz en la banda del visible que genera radiación electromagnética que comprende longitudes de onda mayores que o iguales a 400 nanómetros, pudiendo dicho al menos un diodo emisor de luz en la banda del visible interactuar con al menos un compuesto colorante visible en la matriz de barrera semifluida, generando de ese modo dicha señal secundaria en la banda del visible;
- 30 (d) al menos un detector de luz sensible a energía electromagnética que comprende longitudes de onda mayores que o iguales a 400 nanómetros para detectar dicha señal de fluorescencia en la banda del visible y dicha señal secundaria en la banda del visible.

