

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 256**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/12 (2006.01)

C12Q 1/20 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2008 E 08783303 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2321423**

54 Título: **Método de detección de moléculas bioactivas en una muestra líquida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2014

73 Titular/es:

**LBI INNOVATION INC. (100.0%)
112-1100 Place du Technoparc
Trois-Rivières, Québec G9A0A9, CA**

72 Inventor/es:

**BELLEMARE, FRANÇOIS;
LORRAIN, LUCIE y
BOUCHER, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 439 256 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

Método de detección de moléculas bioactivas en una muestra líquida

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de detección de moléculas bioactivas en una muestra líquida.

10 **Antecedentes de la invención**

10 A escala mundial, la contaminación patógena del agua potable representa el riesgo más significativo para los seres humanos. Sin embargo, los riesgos significativos para la salud humana también pueden ser el resultado de la exposición a contaminantes químicos tóxicos no patógenos que están siempre presentes en las aguas de las que deriva el agua potable. La contaminación química de las corrientes y fuentes de agua se ha convertido en un problema importante ya que muchos de los compuestos químicos que ponen en riesgo la salud de los ecosistemas acuáticos tienen la posibilidad de poner en peligro la salud humana.

15 En la publicación internacional N.º WO 2004/046717 A1, se describieron biosensores y bioensayos basados en la fotosíntesis para detectar moléculas tóxicas en líquidos y métodos y kits para su uso.

20 Es sabido que la inhibición de la fotosíntesis por diferentes contaminantes (inhibidores) puede cambiar el estado fisiológicos de las plantas (Papageorgiou, 1975; Govindjee, 1995; Krause G.H. y Weis E. 1991). Por tanto, los parámetros bioquímicos vegetales ligados a la fotosíntesis, como la formación de ATP, la fijación de CO₂ y la evolución del O₂, se han utilizado en el pasado como indicadores de toxicidad inducida por contaminantes (Samson y Popovic, 1990; Pascal y Popovic, 1993; Laberge y col., 1999; Rouillon y col., 2000). La complejidad de estos métodos y el tiempo necesario para obtener resultados con ellos los hacen, en cambio, poco convenientes como herramientas en toxicología ambiental.

25 El uso de algas fotosintéticas en lugar de tilacoides permite la detección de moléculas bioactivas que actúan sobre procesos metabólicos distintos a la fotosíntesis que pueden medirse indirectamente a través de la actividad fotosintética (organofosforados, antibióticos, amins, etc.).

30 Los métodos de la técnica previa usando algas para detectar contaminantes requerían hasta 7 días de incubación.

35 En la presente invención se hace referencia a varios documentos.

Sumario de la invención

40 La presente invención utiliza de forma ventajosa microorganismos completos como algas unicelulares y cianobacterias. En realizaciones específicas, permiten la detección de contaminantes antes de un máximo de 60 minutos de incubación con o sin adyuvantes.

45 Los adyuvantes pueden modificar la carga de las moléculas bioactivas, la permeabilidad de la membrana, el estado fisiológico del alga y/o determinados procesos metabólicos diferentes que afectan directa o indirectamente a la fotosíntesis. Por ejemplo, el pH modifica la carga de las moléculas bioactivas, la temperatura afecta a la permeabilidad celular, la exposición a la luz o a la oscuridad durante la incubación afecta al estado fisiológico del alga, la adición de moléculas orgánicas (como atrazina o tetraciclina) y/o moléculas inorgánicas (como iones metálicos) en los medios de reacción afecta al metabolismo del alga y el uso de la menor concentración de alga posible optimiza la sensibilidad del ensayo. Los adyuvantes se comportan de forma diferente dependiendo de la especie de alga utilizada. En concreto, la composición de las membranas y las paredes celulares varía con el tipo de microorganismo utilizado y esta variación confiere a estos microorganismos una especificidad y/o sensibilidad mayores a determinadas moléculas bioactivas.

50 Muchas moléculas bioactivas como los COP (contaminantes orgánicos persistentes), insecticidas y antibióticos, no afectan directamente al proceso de fotosíntesis o lo hacen directamente pero con mayor dificultad debido a que no pueden atravesar fácilmente la pared y la membrana celular. En las algas y en otros microorganismos, las moléculas bioactivas interfieren con otros procesos metabólicos celulares como el crecimiento y el ciclo celular, movilidad, respiración, captación de nutrientes y síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. El solicitante determinó que esta interferencia con otros procesos metabólicos celulares también tiene un efecto inhibitorio, aunque indirecto, sobre la actividad fotosintética. Seleccionando la especie de alga más sensible, modificando la permeabilidad de la pared celular (para metales bioactivos, por ejemplo) y la membrana celular (modificando el pH, la temperatura o los iones, usando compuestos químicos conocidos como permeantes de la membrana celular), podrá enfatizarse y/o acelerarse el estado fisiológico del alga por las condiciones de luz y oscuridad, el efecto (directo o indirecto) de moléculas bioactivas sobre la actividad fotosintética.

65 Más específicamente, según la presente invención, se proporciona un método de detección de la presencia de

moléculas bioactivas en una muestra líquida, que comprende poner en contacto una solución de un microorganismo seleccionado a partir del grupo compuesto por un alga unicelular y una cianobacteria con la muestra líquida de modo que se obtenga una formulación que tenga una concentración de microorganismos de $200.000-1 \times 10^7$ células/ml de muestra líquida; incubar la formulación durante 10 a 120 minutos a pH de 7 a 12 y una temperatura entre 18 y 35°C con luz ambiente seguido de incubación con luz verde o en oscuridad y medir la fluorescencia emitida por la formulación, de modo que una fluorescencia emitida por la muestra sea menor que la de la muestra control es una indicación de que la muestra contiene una molécula bioactiva.

En una realización específica, la incubación con luz verde o en oscuridad tiene una duración de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 minutos. En una realización específica, la incubación con luz verde o en oscuridad tiene una duración de aproximadamente 15 minutos. En otra realización específica, el pH de incubación está entre aproximadamente 4 y 12. En otra realización específica, el pH de incubación está entre aproximadamente 11 y 12. En otra realización específica, la solución del microorganismo se activó con luz ambiente antes de la fase de incubación. En otra realización específica, la formulación además comprende un aditivo. En otra realización específica, el aditivo es cadmio. En otra realización específica, el aditivo es H₂O₂. En otra realización específica, el aditivo es cobre. En otra realización específica, los aditivos son cadmio y cobre.

En otra realización específica, el microorganismo es una *Chlorophyceae*. En otra realización específica, el microorganismo es una *Chlorophyceae* de agua dulce. En otra realización específica, el microorganismo es *Chlorella vulgaris*. En otra realización específica, la temperatura de incubación es de aproximadamente 35°C. En otra realización específica, la solución del microorganismo se activó con luz ambiente durante al menos 90 minutos antes de la fase de incubación. En otra realización específica, la concentración celular de microorganismo está entre aproximadamente $2,5 \times 10^6$ y 5×10^6 células/ml de solución acuosa. En otra realización específica, la concentración celular de microorganismo es de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml de solución acuosa. En otra realización específica, la molécula bioactiva se selecciona entre el grupo compuesto por atrazina, diurón, glifosato, clorpirifós, cobre, plomo, cadmio, mercurio, cianuros, tetraciclina, cinc, níquel y nitrógeno amoniacal.

En otra realización específica, el microorganismo es *Ankistrodesmus falcatus*. En otra realización específica, el microorganismo es *Monoraphidium arcuatum*. En otra realización específica, el microorganismo es *Scenedesmus quadricauda*. En otra realización específica, el microorganismo es *Desmosdesmus subspicatus*. En otra realización específica, el microorganismo es *Scenedesmus subspicatus*. En otra realización específica, el microorganismo es *Scenedesmus obliquus*. En otra realización específica, el microorganismo es *Pseudokirchneriella subspicata*. En otra realización específica, el microorganismo es *Chlamydomonas reinhardtii*.

En otra realización específica, el microorganismo es una *Chlorophyceae marina*. En otra realización específica, el microorganismo es *Dunaliella tertiolecta*. En otra realización específica, la concentración celular de *Dunaliella tertiolecta* está entre aproximadamente 200.000 y 350.000 células/ml de solución acuosa. En otra realización específica, la solución de *Dunaliella tertiolecta* se activó con luz ambiente durante al menos 45 minutos antes de la fase de incubación. En otra realización específica, la molécula bioactiva se selecciona entre el grupo compuesto por atrazina, diurón, glifosato, malatión, clorpirifós, progesterona y dicotofós.

En otra realización específica, el microorganismo es una cianobacteria. En otra realización específica, la cianobacteria es *Anabaena sp.* En otra realización específica, la solución de cianobacterias se activó con luz ambiente durante al menos 60 minutos antes de la fase de incubación. En otra realización específica, el microorganismo es *Nostoc commune*. En otra realización específica, el microorganismo es *Phaeodactylum tricorutum*. En otra realización específica, el microorganismo es *Nitzschia closterium*. En otra realización específica, el microorganismo es *Lasallia pustulata*. En otra realización específica, el microorganismo es *Zostera capricorni*.

Definiciones:

Un «pH básico» se define en este documento como un pH de 7,8 o superior.

Una «molécula bioactiva» se define en este documento como una molécula que afecta (activando o inhibiendo) directa (p. ej., atrazina) o indirectamente la actividad fotosintética de algas y cianobacterias. Sin estar demasiado limitadas, estas moléculas incluyen antibióticos como tetraciclina, hormonas como progesterona, pesticidas como triazinas, urea, organofosforados y carbamatos, iones metálicos como cadmio, cobre, cromo, cinc, plomo, mercurio, etc.; analgésicos como ácido acetilsalicílico, antidepresivos como paroxetina, estimulantes como nicotina y cafeína y otros fármacos.

Una «concentración celular inicial» se define en este documento como la concentración de células en la muestra previa a cualquier tratamiento.

Como se usa en este documento, el término «temperatura ambiente» se refiere a una temperatura de entre aproximadamente 18 a aproximadamente 25° centígrados.

Según se usa en este documento, el término «aditivo» se refiere a una sustancia o mezcla de sustancias que

pueden usarse de acuerdo con realizaciones específicas de la presente invención por su capacidad para inhibir determinados procesos metabólicos de microorganismos como algas y cianobacterias cuya inhibición afecta/inhíbe directa o indirectamente la actividad fotosintética del microorganismo. En la presente invención se usa un aditivo para aumentar la detectabilidad de moléculas bioactivas en los ensayos de la presente invención. Sin estar demasiado limitado, estos aditivos incluyen cobre, cadmio, clorpirifós, fenilureas, triazina, níquel, cromo, H₂O₂ o una combinación de los mismos.

Según se usa en este documento, el término «alga unicelular» incluye, sin estar demasiado limitadas, las especies *Desmosdesmus subspicatus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella vulgaris*, *Monoraphidium arcuatum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subpicatus*, *Pseudokirchneriella subspicata*, *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Lasallia pustulata*, *Zostera capricorni* y *Nitzschia closterium*.

Según se usa en este documento, el término «cianobacteria» se refiere a *Cyanophyceae* incluyendo las del orden *Oscillatoriales*, incluyendo la *Spirulina* e incluyendo aquellas del orden *Nostocales*, incluyendo el género *Anabaena* y el género *Nostoc commune*.

Según se usa en este documento, el término «luz ambiente» se refiere a cualquier luz del día o artificial como la que produce una lámpara fluorescente o una lámpara incandescente. Una temperatura excesiva podría matar al alga o a la cianobacteria. Por tanto, *Chlorella vulgaris* puede crecer óptimamente a una temperatura de hasta 30°C, mientras que *Dunaliella tertiolecta* y *Anabaena sp.* pueden crecer óptimamente a una temperatura de hasta 25°C. Por consiguiente, la luz es de forma ventajosa fluorescente (que no produce calor) o controlable para evitar el calentamiento excesivo. Una temperatura más baja que la óptima simplemente ralentiza el crecimiento. Además, la luminosidad afecta al crecimiento del alga y de la cianobacteria. Por tanto, las algas verdes crecen de forma ventajosa con una luminosidad de hasta 3.500 luxes, mientras que *Anabaena* tolera una luminosidad de hasta aproximadamente 1.000 luxes. No obstante, no se considera que la luminosidad afecte a la incubación.

Aunque el medio de cultivo utilizado en los ejemplos de este documento es BBM, f/2 y BG11, puede usarse cualquier de los distintos medios de cultivo apropiados para el cultivo de algas unicelulares y cianobacterias de los métodos de la presente invención. En particular, puede usarse cualquier medio de cultivo recomendado por cualquier autoridad pertinente como el University of Toronto Cell Culture (UTCC), el Global Bioresource Center en la ATCC, la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) en Escocia y la Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas en Austin (UTEX).

Aunque la estabilización de microorganismos útiles en la presente invención es una ventaja para el almacenamiento y la venta, no es necesaria *per se* en los ensayos de la presente invención. De hecho, como puede verse a continuación en los ejemplos, los microorganismos no estabilizados producen resultados útiles de acuerdo con la presente invención.

Una «muestra» se define en este documento como cualquier líquido que contiene moléculas tóxicas. Sin estar demasiado limitado, incluye aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas pluviales, aguas freáticas, agua potable, aguas residuales de agricultura, aguas residuales industriales (pulpa y papel, agua residuales municipales, lixiviado de vertederos, industria textil, petroquímica, química, minería, etc.) agua extraída a partir de alimentos, lodos, sedimentos y escoria.

La terminología «tóxica» y «toxicidad» se refiere en este documento a la propiedad de una sustancia que le permite alterar (inhibir o potenciar) en parte o por completo la eficiencia fotosintética de algas y cianobacterias unicelulares.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán más aparentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones específicas de la misma, proporcionada a modo de ejemplo solo en referencia a los dibujos que la acompañan.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

la figura 1 demuestra la estabilidad de *Chlorella vulgaris* a 4°C;

la figura 2 demuestra la estabilidad de *Chlorella vulgaris* a 20°C;

la figura 3 demuestra el efecto del pH sobre la inhibición de *Chlorella vulgaris* durante la detección de nitrógeno amoniacal;

la figura 4 demuestra el efecto de la temperatura sobre la inhibición de *Chlorella vulgaris* durante la detección de atrazina;

la figura 5 demuestra el efecto de la exposición de *Chlorella vulgaris* a la luz blanca durante la detección de cianuros y cobre;

5 la figura 6 demuestra el efecto de la exposición de *Dunaliella tertiolecta* a la luz blanca y, posteriormente, a la luz verde durante la detección de progesterona;

la figura 7 demuestra el efecto del uso de una concentración celular baja de *Chlorella vulgaris* durante la detección de cobre y cianuros;

10 la figura 8 muestra el efecto de diversas concentraciones de cadmio y cobre sobre la fluorescencia F_2 con el tiempo;

la figura 9 compara el efecto del cobre o el cadmio como aditivos durante la fase de incubación con un tiempo de incubación de 15 minutos para la detección de diversos metales a diversas concentraciones usando *Chlorella vulgaris*; para calcular la inhibición debida a una muestra que contiene un metal con aditivo, la solución de aditivo correspondiente sirvió como control mientras que para calcular la inhibición producida por la muestra que contiene metal sin aditivo, la muestra de agua sirvió como control (blanco);

15

la figura 10 demuestra el efecto del uso de cobre o cadmio como aditivos durante la fase de incubación con luz blanca y a 35° C a con un tiempo de incubación de 30 minutos para la detección de diversos metales a diversas concentraciones usando *Chlorella vulgaris*; el control y el blanco utilizados son como se describe en la figura 9;

20

la figura 11 demuestra el efecto del uso de cobre o cadmio como aditivos durante la fase de incubación con un tiempo de incubación de 60 minutos para la detección de diversos metales usando *Chlorella vulgaris*; el control y el blanco utilizados son como se describe en la figura 9;

25

la figura 12 demuestra el efecto del uso de cobre o cadmio como aditivos durante la fase de incubación con un tiempo de incubación de 120 minutos para la detección de diversos metales usando *Chlorella vulgaris*; el control y el blanco utilizados son como se describe en la figura 9;

30 la figura 13 demuestra el efecto de diversos aditivos individuales o mezclas de aditivos con un tiempo de incubación de 15 minutos para la detección de plomo usando *Chlorella vulgaris*; para calcular la inhibición producida por una muestra que contenía plomo con aditivo, la solución de aditivo correspondiente sirvió como control mientras que para calcular la inhibición producida por la muestra que contenía plomo sin aditivo, la muestra de agua sirvió como control (blanco);

35

la figura 14 demuestra el efecto de diversos aditivos individuales o mezclas de aditivos con un tiempo de incubación de 30 minutos para la detección de plomo usando *Chlorella vulgaris*; el control y el blanco utilizados son como se describe en la figura 13;

40 la figura 15 demuestra el efecto de diversos aditivos individuales o mezclas de aditivos con un tiempo de incubación de 60 minutos para la detección de plomo usando *Chlorella vulgaris*; el control y el blanco utilizados son como se describe en la figura 13;

45 la figura 16 demuestra el efecto de diversos aditivos individuales o mezclas de aditivos con un tiempo de incubación de 120 minutos para la detección de plomo usando *Chlorella vulgaris*; el control y el blanco utilizados son como se describe en la figura 13 y

la figura 17 demuestra el efecto del uso de luz ambiente, temperatura más alta y concentración celular baja de *Chlorella vulgaris* sobre la detección de tetraciclina.

50

Descripción de realizaciones ilustrativas

Con las realizaciones específicas de los métodos de la presente invención, pueden detectarse moléculas químicas bioactivas que inhiben los constituyentes de la cadena de transporte fotosintético en aproximadamente 15 minutos. El uso de un microorganismo completo como el alga verde *Chlorella vulgaris* proporciona la detección de herbicidas inhibidores de proteína D1 específicos, en concentraciones de atrazina y diurón en aproximadamente 10 minutos, siendo el umbral de la atrazina de 0,0007 ppm y el umbral de diurón menor de 0,0005 ppm. La *Chlorella vulgaris* estabilizada puede conservarse entre 4 y 6 meses a 20°C y 4°C, respectivamente.

55

60 La presente invención también se refiere a un método para la detección de nitrógeno amoniacal que comprende cambiar la permeabilidad de la célula del alga. Este compuesto se detecta a 100 ppm a pH neutro, aunque el aumento de pH hasta 11 disminuye el umbral a 1 ppm. La permeabilidad del alga también puede modificarse aumentando la temperatura de incubación del ensayo. Por ejemplo, la emisión de fluorescencia es inhibida en 15 minutos por iones de cobre, tetraciclina y progesterona si *Chlorella vulgaris* se incubaba a 35°C, mientras que a temperatura ambiente era posible la detección de estos compuestos en 15 minutos cuando estos compuestos están presentes a concentraciones más altas. *Chlorella vulgaris* es un alga de agua dulce y se usa para el control del agua

65

dulce mientras que *Dunaliella tertiolecta* se usa para el control del agua marina.

En realizaciones específicas, la medida de la fluorescencia emitida por los organismos fotosintéticos se realiza como se describe en el documento WO 2004/046717 de Bellemarte y col., publicado el 3 de junio de 2004. F_0 se corresponde con la fluorescencia mínima de los fotosistemas activados. Esta fluorescencia se produce mediante una débil iluminación de los fotosistemas. F_1 corresponde a una iluminación ligeramente superior que F_0 . F_2 (nivel de fluorescencia prácticamente máxima) se corresponde con la fluorescencia inducida por una iluminación fuerte/actínica.

En realizaciones específicas, un fluorómetro ilumina de forma continua aunque débil los fotosistemas con un diodo de emisión de luz (LED) que emite luz a una longitud de onda de 475 nm, 605 nm o 660 nm. Los mejores resultados se obtuvieron con las longitudes de onda de 475 nm y 605 nm con algas y cianobacterias, respectivamente. Con la intención de obtener una sensibilidad más alta para medir la respuesta fotosintética a moléculas bioactivas, la intensidad de la luz de excitación baja se ajustó para obtener un nivel de fluorescencia F_1 ligeramente superior a F_0 .

La fluorescencia medida 2 segundos después de encender un LED es F_1 (corriente aplicada al LED para producir una variación en la intensidad de la luz entre 0 y 1,6 mV). A continuación, se encienden tres LED más de modo que se induce una iluminación actínica F_2 (corriente aplicada a los LED para producir una variación en la intensidad de la luz de entre 2 y 20 mV). Los haces de luz se orientan de modo que formen en conjunto un punto de convergencia de forma precisa al nivel en el que se lee el fotodiodo. Después de un tiempo específico, elegido de acuerdo con la naturaleza de la especie de alga utilizada, del ruido de fondo y del nivel de sensibilidad buscado, se mide la fluorescencia F_2 . Para determinar F_1 y F_2 , el fluorómetro mide las longitudes de onda superiores a 700 nm. La ganancia (integración de la señal que varía según se seleccione de 0,32 a 80 ms) y el retraso (el retraso de 0,1 a 1.000 ms requerido por los LED para producir la iluminación actínica tras la activación de los fotosistemas) se ajustan para obtener la sensibilidad óptima, lecturas F_1 y F_2 .

La eficacia fotosintética se determina con la siguiente fórmula $(F_2 - F_1)/F_2$. Cualquier molécula que afecta directa o indirectamente a los fotosistemas modifica F_1 o F_2 cuya modificación disminuye necesariamente la eficiencia fotosintética. La curva de inhibición de una molécula en particular se determina calculado la actividad de los fotosistemas en ausencia de la molécula y en presencia de la misma, y comparando ambas eficiencias como sigue según se describe en Conrad 1993:

Sin inhibidor (si):

$$\text{eficiencia}_{(si)} = (F_{2(si)} - F_{1(si)})/F_{2(si)}$$

Con inhibidor:

$$\text{Eficiencia fotosintética relativa}_{(muestra)} = (F_{2(muestra)} - F_{1(muestra)})/F_{2(si)}$$

Porcentaje de eficiencia:

$$\text{eficiencia (\%)} = (\text{eficiencia}_{(muestra)} \times 100) / \text{eficiencia}_{(si)}$$

Porcentaje de inhibición:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \text{eficiencia (\%)}$$

La presente invención se ilustra con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Preparación de *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris se obtuvo de la UTCC (University of Toronto Culture Collection) o de la UTEX (The Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas en Austin). Se cultivó en condiciones de iluminación de como máximo 3.500 luxes (lámparas fluorescentes) y a una temperatura de 28°C con una periodicidad de aproximadamente 16 horas de iluminación seguidas de 8 horas de oscuridad en un medio de cultivo estéril BBM (solución nutritiva de agua dulce basal de Bold).

Estabilización de *Chlorella vulgaris*

Cuando la *Chlorella* alcanzaba la fase de crecimiento exponencial (es decir, en concreto entre 7 y 15 días) (dependiendo de la concentración inicial y/o del estado fisiológico del inóculo), se concentró mediante centrifugación (1.575 x g) o gravedad durante 24 horas a 4°C. El sobrenadante se sustituyó por sobrenadante recién preparado. La *Chlorella* se conservó a 4°C en frascos de color ámbar de 5 ml. Es útil que se permita a los microorganismos

utilizados en la presente invención que alcancen su fase de crecimiento exponencial ya que generalmente esta es la fase en la que alcanzan su actividad fotosintética óptima.

5 Justo antes de la prueba, *Chlorella vulgaris* se reactivó mediante la exposición a la luz ambiente y temperatura ambiente durante 90 minutos. Esta reactivación favorecía la actividad fotosintética óptima.

Se usaron 100 μl o 50 μl de *Chlorella vulgaris* con 2 ml de solución acuosa (p. ej., agua destilada) para la prueba. Cien μl y 50 μl de *Chlorella vulgaris* se corresponden con 5×10^6 y $2,5 \times 10^6$ células/ml, respectivamente.

10 Ejemplo 2

Preparación de *Dunaliella tertiolecta*

15 *Dunaliella tertiolecta* se obtuvo de la UTCC (University of Toronto Culture Collection) o de la UTEX (The Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas en Austin). Se cultivó en condiciones de iluminación de como máximo 3.500 luxes (lámparas fluorescentes) y a una temperatura ambiente con una periodicidad de aproximadamente 12 horas de iluminación seguidas de 12 horas de oscuridad en un medio de cultivo f/2 (Sigma, UTEX) producido con agua de mar esterilizada. *Dunaliella tertiolecta* se usó cuando estaba en su fase de crecimiento exponencial.

20 *Dunaliella tertiolecta* se recuperó de su medio de cultivo 45 minutos después del inicio del periodo de iluminación. Esta reactivación favorecía una actividad fotosintética óptima. Se usaron 500 μl del alga en 2 ml de solución acuosa (es decir, agua destilada). Quinientos μl de *Dunaliella tertiolecta* se corresponden con 200.000 a 350.000 células/ml

25 Ejemplo 3

Preparación de *Anabaena sp.*

30 *Anabaena sp.* se obtuvo de la UTCC (University of Toronto Culture Collection) o de la UTEX (The Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas en Austin). Se cultivó en condiciones de iluminación de como máximo 1000 luxes (originados por lámparas fluorescentes) y a temperatura ambiente con una periodicidad de aproximadamente 16 horas de iluminación seguidas de 8 horas de oscuridad en un medio de cultivo estéril BG11 (Universidad de Toronto). *Anabaena sp.* se usó cuando estaba en su fase de crecimiento exponencial.

35 *Anabaena sp.* se recuperó de su medio de cultivo 60 minutos después del inicio del periodo de iluminación. Esta reactivación favorecía la actividad fotosintética óptima. Se usaron 100 μl de alga en 2 ml de solución acuosa (es decir, agua destilada) para la prueba. Estos 100 μl de *Anabaena sp.* se corresponden con 1×10^7 células/ml.

Ejemplo 4

40 Evaluación de la estabilidad de *Chlorella vulgaris*

La estabilidad de *Chlorella vulgaris* se evaluó determinando la Cl_{20} de atrazina usando siete concentraciones diferentes de este compuesto. Cl_{20} es la concentración de atrazina que inhibe el 20% de la eficacia emitida por *Chlorella vulgaris* en comparación con una preparación de *Chlorella vulgaris* control. La Cl_{20} se determina estadísticamente con la versión 2.0 del software Icp. La estabilidad con el tiempo se determina evaluando el valor de Cl_{20} dentro de un intervalo de 2σ de la media.

50 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó anteriormente, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

A continuación, el cultivo se incubó con atrazina durante 10 minutos con luz verde y a temperatura ambiente. La concentración celular del alga era de 5×10^6 células/ml de solución (100 μl de alga en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía atrazina). La concentración de atrazina variaba entre 0 y 0,04 mg/l. La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

60 En las figuras 1 y 2 se muestra que *Chlorella vulgaris* conservada a 4°C era estable durante al menos 6 meses y a 20°C al menos durante cuatro meses. La Cl_{20} está dentro del intervalo de la media (0,0037) + o – dos σ (en concreto, 0,002).

Ejemplo 5

Efecto del pH sobre la detección de moléculas bioactivas

65 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó anteriormente,

el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

A continuación, el cultivo se incubó con nitrógeno amoniacal durante 10 minutos con luz verde y a temperatura ambiente. El pH deseado se alcanzó añadiendo NaOH a un tampón glicina 20 mM. La concentración celular de alga era de 5×10^6 células/ml de solución (100 μ l del alga en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía nitrógeno amoniacal). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética. Aunque se usó el Luminotox™ en los ejemplos presentados en este documento, puede usarse cualquier fluorómetro capaz de medir la actividad sintética según la presente invención.

En la figura 3 se muestra que si el pH se elevaba de 7 a 12, aumentaba el porcentaje de inhibición de *Chlorella vulgaris*. De hecho, a pH= 7, se alcanzaba una inhibición del 20% cuando la concentración de NH₃ era de 100 ppm, mientras que a pH = 9, se alcanzaba una inhibición del 20% cuando la concentración de NH₃ era solo de 5 ppm. Cuando el pH tenía un valor de 11 o 12, la inhibición del 20% se alcanzaba cuando la concentración de NH₃ era inferior a 2 ppm. Por tanto, un pH básico permitía una mejor detección del nitrógeno amoniacal. Puesto que la diferencia en la sensibilidad de la prueba entre un pH de 11 y un pH de 12 era más bien pequeña, es preferible un pH de 11 ya que el alga tolera mejor este pH.

Ejemplo 6

Efecto de la temperatura sobre la detección de moléculas bioactivas

Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

El cultivo se incubó a continuación durante 10 minutos con atrazina a concentraciones crecientes con luz verde a pH neutro, y a temperaturas de 20, 25, 30, 35 o 40°C. La concentración celular del alga era de 5×10^6 células/ml (100 μ l de alga en 2 ml de solución acuosa (es decir, agua destilada) que contenía atrazina). La temperatura se controló con un baño termostatzado. La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

En la figura 4 se muestra que para concentraciones de atrazina inferiores a 0,005 ppm, el porcentaje de inhibición aumentaba al aumentar la temperatura. Para concentraciones bajas, un aumento en la temperatura potencia el límite de detección de atrazina. En la figura 2 también se muestra que para concentraciones de atrazina superiores a 0,01 ppm, la sensibilidad de la prueba disminuía a 40°C. Por tanto, se observó que la temperatura óptima para ambas concentraciones altas y bajas era de 35°C para *Chlorella vulgaris*.

Sin ceñirse a la teoría, se afirma que pH y temperatura tienen una influencia significativa sobre la inhibición de la actividad fotosintética del alga debido a que modulan la difusión de moléculas bioactivas a través de la bicapa lipídica de las células vegetales. El pH es especialmente importante cuando la molécula bioactiva es un ion ya que los iones tienen más dificultades para penetrar la bicapa lipídica debido a su carga. Además, sometiendo al alga a temperaturas superiores a las necesarias para su crecimiento se produce un aumento de la inhibición de la actividad fotosintética del vegetal así como un aumento de la permeabilidad de la bicapa lipídica. El aumento de la permeabilidad de la membrana lleva a un aumento de moléculas tóxicas dentro de las células lo que tiene como resultado un aumento de la inhibición de estas células y lecturas de fluorescencia más altas.

Ejemplo 7

Efecto de la exposición del alga a la luz combinado con una baja concentración de alga y un aumento de la temperatura sobre la detección de moléculas bioactivas

Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

A continuación, el cultivo se incubó con varias concentraciones de cobre o cianuros. La prueba con cianuros se realizó durante 15 minutos a 35°C con luz ambiente y con luz verde a temperatura ambiente. La prueba con cobre se realizó a 35°C con luz ambiente durante 15 y 60 minutos y con luz verde a temperatura ambiente durante 60 minutos. La concentración celular de alga era de $2,5 \times 10^6$ células/ml de solución (50 μ l del alga en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía cobre o cianuros). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

En la figura 5 se muestra que, para ambas moléculas bioactivas, el porcentaje de inhibición es mayor cuando la prueba se realiza con luz ambiente a una temperatura de 35°C que cuando la prueba se realiza con luz verde a temperatura ambiente.

Sin ceñirse a la teoría, se afirma que la exposición de las células del alga a luz con una intensidad más alta que la requerida para la saturación de la fotosíntesis daba lugar a un aumento de la inhibición de la fotosíntesis y, por tanto, permite potenciar la inhibición de estas células y da lugar a lecturas de fluorescencia más altas potenciando de este modo la detección de moléculas bioactivas.

5

Ejemplo 8

Comparación de la exposición a luz blanca seguida de recuperación con luz verde con la exposición solo a luz verde

10 Se preparó un cultivo de *Dunaliella tertiolecta* como se describe en el ejemplo 2 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 2, el alga se reactivó antes de la prueba durante 45 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

15 A continuación, la formulación se incubó con progesterona a concentraciones de 0; 0,05; 0,5 o 1 ppm durante 15 minutos con luz verde solo o durante 15 minutos con luz ambiente seguido de 5 a 35 minutos con luz verde. La concentración celular era de 350.000 células/ml (500 µl de algas en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía progesterona). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

20 En la figura 6 se muestra que cuando el alga se expone a luz verde solo en presencia de progesterona, el porcentaje máximo de inhibición obtenido es del 40% cuando la concentración de progesterona es de 1 ppm. Se obtuvieron porcentajes de inhibición sustancialmente más altas cuando el alga se expuso a luz blanca durante 15 minutos tras una recuperación con luz verde.

25 Es bien sabido en la técnica que la fotosíntesis no se produce con luz verde ni tampoco se produce en la oscuridad. Por tanto, sustituyendo la recuperación en luz verde con una recuperación en oscuridad se espera que se produzcan resultados similares a los que se muestran en la figura 6.

Ejemplo 9

30 Comparación de la exposición a luz blanca seguida de recuperación con luz verde con la exposición solo a luz blanca

35 Se preparó un cultivo de *Anabaena sp.* como se describe en el ejemplo 3 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 3, las cianobacterias se reactivaron antes de la prueba con luz ambiente y a temperatura ambiente durante 60 minutos.

40 A continuación, el cultivo se incubó con las moléculas bioactivas enumeradas en la tabla 1 a continuación a concentraciones de 1 ppm (excepto en el caso de atrazina, que se usó a una concentración de 1 parte por mil millones [ppb]) durante 10 minutos con luz ambiente después de 10 minutos con luz verde y a pH neutro. La concentración celular era de $1,0 \times 10^7$ células/ml (100 µl de cianobacterias en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contiene el agente bioactivo). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

Tabla 1: Resultados de la detección de varias moléculas bioactivas con *Anabaena*

| | Inhibición obtenida a 1 ppm (10 min con luz ambiente) → % | Inhibición obtenida a 1 ppm (seguida de 10 min con luz verde) → % |
|------------------|--|--|
| aldicarb | 0 | 30 |
| atrazina (1 ppb) | 1 | 13 |
| bentazona | 0 | 28 |
| clorpirifós | 0 | 10 |
| cianuro | 0 | 16 |
| dicrotofós | 2 | 17 |
| glifosato | 0 | 7 |
| gramicidina | 0 | 15 |
| malatión | 0 | 17 |
| metolaclor | 0 | 22 |
| tetraciclina | 0 | 30 |

45

La tabla 1 muestra que la exposición de *Anabaena* a la luz ambiente solo en presencia de las diversas moléculas

bioactivas no producía una inhibición detectable a la concentración especificada de moléculas bioactivas. Por tanto, las cianobacterias se expusieron a continuación de forma ventajosa a la luz verde para inducir una inhibición detectable.

5 Ejemplo 10

Efecto de la luz ambiente, la temperatura y la baja concentración de alga sobre la detección de cianuro y cobre

10 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

15 A continuación, la formulación del alga se incubó durante 15 o 60 minutos con agua que contenía cobre o cianuros a las concentraciones indicadas (figura 7) con luz ambiente a una temperatura de 35°C y a pH neutro. Se probaron concentraciones de algas de $2,5 \times 10^6$ células/ml y 5×10^6 células/ml (50 μ l y 100 μ l de algas, respectivamente con 2 ml de soluciones acuosas, [es decir, agua destilada] que contenía metales). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

20 En la figura 7 se muestra el efecto de la concentración celular inicial del alga, la temperatura y la luz ambiente cuando se detectan cianuros y cobre. El uso de la concentración celular más baja producía porcentajes de inhibición más altos del alga y, por tanto, un mejor límite de detección de moléculas bioactivas.

Ejemplo 11

25 Estabilidad de la fluorescencia F_2 después de hasta 120 minutos de incubación

30 Los niveles de fluorescencia F_2 producidos por *Chlorella vulgaris* preparada como se describe en el ejemplo 1 anterior se midieron tras la incubación con los aditivos probados anteriormente, en concreto, cadmio (0,5 ppm), cadmio (1 ppm), cobre (0,1 ppm) y cobre (0,25 ppm). Como puede verse en la figura 8, la fluorescencia F_2 era estable después de hasta 120 minutos de incubación para cada uno de estos aditivos. Solo el cadmio a 1 ppm inducía una disminución de la fluorescencia después de 120 minutos de incubación, de modo que puede ser deseable utilizar Cd a una concentración inferior a 1 ppm.

Ejemplo 12

35 Efecto del tiempo de incubación, la luz ambiente, la temperatura, aditivos y la baja concentración de alga sobre la detección de moléculas bioactivas

40 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

45 A continuación, la formulación se incubó con luz ambiente a 35°C y a pH neutro con cadmio, cobre, cromo, cinc, níquel o plomo, a las concentraciones indicadas con tiempos de incubación que variaban entre 15 minutos y 120 minutos (figuras 9 a 12). Las formulaciones se analizaron sin aditivos o con 1 ppm de cadmio, 0,1 ppm de cobre o 0,25 ppm de cobre como aditivo. La concentración celular era de $2,5 \times 10^6$ células/ml (50 μ l de cianobacterias en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía el agente bioactivo). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

50 En la figura 9 se muestra que después de 15 minutos de incubación, solo se detectaba el cobre a 0,5 ppm (inhibición del 15%) sin aditivo y que la adición de cadmio a una concentración de 1 ppm aumentaba la inhibición al 30%. No se detectaba el cadmio a 1 ppm solo. Después de 30 minutos de incubación (figura 10), se detectaban cadmio a 1 ppm y cinc a 0,5 ppm en presencia de cobre a 0,25 ppm y se producía una inhibición de fluorescencia de aproximadamente el 10%. La detección de cobre aumentaba con el tiempo de incubación.

55 Después de 60 minutos de incubación (figura 11), sin aditivo se detectaban aunque débilmente cadmio a 1 ppm, cromo a 0,1 ppm y plomo a 1 ppm. La adición de 1 ppm de plomo aumentaba el porcentaje de inhibición de cobre a 1 ppm, níquel a 1 ppm y cobre a 0,1 ppm y 0,25 ppm. El cromo se detectaba mejor solo o en presencia de cobre a 0,1 ppm en presencia de cadmio a 1 ppm (efecto antagonista) o cobre a 0,25 ppm. El cobre a una concentración de 0,25 ppm aumenta la detección de cadmio a 1 ppm, cinc a 0,5 ppm y níquel a 1 ppm. No se detecta cobre a 0,25 ppm sin aditivos.

65 Después de 120 minutos de incubación (figura 12), se detecta débilmente níquel a 1 ppm. La adición de cobre a una concentración de 0,25 ppm aumenta la detección de cadmio (1 ppm), cinc (0,5 ppm) y níquel (1 ppm). La adición de cadmio a 1 ppm aumenta la detección de plomo (1 ppm) y cobre (0,5 ppm).

Ejemplo 13

Efecto del tiempo de incubación, la luz ambiente, la temperatura, aditivos y la baja concentración de alga sobre la detección de plomo

5 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

10 A continuación, la formulación se incubó con luz ambiente a 35°C y a pH neutro con plomo, a las concentraciones indicadas y con tiempos de incubación que variaban entre 15 minutos y 120 minutos (figuras 13 a 16). Las formulaciones se probaron con o sin aditivos usados como aditivos únicos (Cd a 1 ppm, Cu a 0,1 ppm y Cu a 0,25 ppm), o mezclas de aditivos (Cu a 0,1 ppm + Cd a 0,5 ppm; Cu a 0,1 ppm + Cd a 1 ppm; Cu a 0,25 ppm + Cd a 1 ppm). La concentración celular era de $2,5 \times 10^6$ células/ml (50 µl de cianobacteria en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] con o sin aditivos). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

15 En la figura 13 se muestra que después de 15 minutos de incubación, solo se detectaba el plomo (1 ppm) con mezclas de aditivos.

20 Después de 30 minutos de incubación (figura 14), se detectó plomo a 0,1 ppm con la mezcla de Cu a 0,1 ppm + Cd a 1 ppm.

Después de 60 minutos de incubación (figura 15), todas las mezclas de aditivos aumentaban la detección de plomo a una concentración de 0,1 ppm o superior.

25 Después de 120 minutos de incubación (figura 16), se detectó plomo a 0,01 ppm (normativa canadiense sobre agua potable de 2007) con las mezclas de aditivos Cu a 0,1 ppm + Cd a 0,5 ppm y Cu a 0,25 ppm + Cd a 1 ppm. Sin embargo, la mezcla de aditivos que menos afecta a la fluorescencia inicial en comparación con la solución acuosa (es decir, agua destilada) es Cu a 0,1 ppm + Cd a 0,5 ppm. Por tanto, esta última representa la mejor opción para la detección de plomo.

30 Es razonablemente predecible que puedan utilizarse diversos aditivos y mezclas de aditivos diferentes con el objetivo de aumentar la inhibición de contaminantes. Clorpirifós para la detección de atrazina (Lydy y Linck, 2003), fenilureas para la detección de otras fenilureas (Detection y col., 2004b); triazinas para la detección de otras triazinas (Faust y col., 2001), cobre, níquel o cromo para la detección de otros contaminantes (Rai y col.), cobre para contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Babu y col., 2001 y 2005) y agentes oxidantes fuertes como H₂O₂ para la detección de cianuros y otros compuestos y sustancias inorgánicas.

Ejemplo 14

40 Efecto de la luz ambiente, la temperatura y la baja concentración de alga sobre la detección de tetraciclina

45 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

A continuación, la formulación del alga se incubó durante 15 o 60 minutos con agua que contenía tetraciclina a las concentraciones indicadas (figura 17) con luz ambiente a una temperatura de 35°C y a pH neutro. Se probaron concentraciones de alga de $2,5 \times 10^6$ células/ml (50 µl de alga en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía tetraciclina). La prueba se realizó por triplicado. La fluorescencia emitida por cada formulación se determinó a continuación con Luminotox™, fluorómetro que mide la actividad fotosintética.

50 En la figura 17 se muestra el efecto de la concentración celular inicial del alga, la temperatura y la luz ambiente cuando se detecta la tetraciclina. La tetraciclina se detectó en 15 minutos a una concentración de 10 µg/ml. La prolongación del tiempo de incubación no se traducía en un menor umbral de detección.

Ejemplo 15

Umbral de detección de *Chlorella vulgaris* para diversas moléculas bioactivas

60 Se preparó un cultivo de *Chlorella vulgaris* como se describe en el ejemplo 1 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 1, el alga se reactivó antes de la prueba durante 90 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

65 A continuación, las formulaciones de alga se incubaron durante 15 minutos con agua que contenía uno de los diversos agentes contaminantes enumerados a continuación en la tabla 2 a pH neutro con luz verde y a temperatura ambiente o con luz ambiente y a una temperatura de 35°C. La concentración de alga era de 5×10^6 células/ml (100 µl de alga en 2 ml de solución acuosa [es decir, agua destilada] que contenía la sustancia que se desea detectar en

las concentraciones indicadas). Para cada sustancia se probaron 5 concentraciones por triplicado. Se utilizó el software TOXSTAT™ para calcular, a partir de los valores de inhibición y las desviaciones típicas obtenidas, la concentración máxima sin efecto observable y la concentración mínima con efectos observables. El umbral se calculó con la fórmula siguiente: (concentración máxima sin efecto observable x concentración mínima con efectos observables)^{1/2} (consulte la tabla 2 a continuación). La temperatura se controló mediante un baño termostatzado.

El umbral de detección se obtuvo con la media geométrica. Este se calculó con la fórmula siguiente:

$$\text{Umbral de detección} = (\text{CSEO} \times \text{CMEO})^{1/2}$$

donde

CSEO = concentración máxima que no da lugar a inhibición detectable alguna de la eficacia del alga. Más específicamente, es la concentración más alta probada cuya eficacia (inhibición) no difieren del control.

CMEO = concentración mínima que produce una inhibición detectable de la eficacia del alga. Es la concentración más baja probada cuya eficacia difiere significativamente de la del control.

CSEO y CMEO se estimaron mediante un análisis de varianza ANNOVA™ seguido de una comparación múltiple de Dunnet en la que se comparó la media de la eficacia de cada concentración probada con la media del control. Los cálculos se realizaron con TOXSTAT™ (Versión 3.5).

Ejemplo 16

Umbral de detección de *Dunaliella tertiolecta* para diversas moléculas bioactivas

Se preparó un cultivo de *Dunaliella tertiolecta* como se describe en el ejemplo 2 anterior. Como se indicó en dicho ejemplo 2, el alga se reactivó antes de la prueba durante 45 minutos con luz ambiente y a temperatura ambiente.

A continuación, las formulaciones del alga se incubaron durante 15 minutos con agua que contenía uno de los diversos contaminantes enumerados en la tabla 2 a pH neutro con luz verde y a temperatura ambiente. La concentración de alga era de 350.000 células/ml (500 µl de alga en 2 ml de solución acuosa (es decir, agua destilada) que contenía la sustancia que se quiere detectar a las concentraciones indicadas). Para cada sustancia se probaron 5 concentraciones por triplicado. Se utilizó el software TOXSTAT™ para calcular, a partir de los valores de inhibición y las desviaciones típicas obtenidas, la concentración máxima sin efecto observable y la concentración mínima con efectos observables (consulte la tabla 2 a continuación). La temperatura se controló mediante un baño termostatzado. Las pruebas se realizaron por triplicado. A continuación, la fluorescencia emitida por cada formulación se midió con Luminotox™, una fluorómetro que mide la actividad fotosintética y se determinó el umbral de detección como se describe en el ejemplo anterior.

Tabla 2

| Sustancias | <i>Chlorella vulgaris</i> | | <i>Dunaliella tertiolecta</i> |
|-------------|--|---|---|
| | 10-15 min de exposición a luz verde a temperatura ambiente | 10-15 min de exposición a luz ambiente a 35°C | 15 min de exposición a luz verde a temperatura ambiente |
| Atrazina | 0,0007 ppm | 0,0001 ppm | 0,01 ppm |
| Diurón | < 0,0005 ppm | 0,006 ppm | 0,002 ppm |
| Glifosato | n.d. | 100 ppm | 50 ppm |
| Malatión | n.d. | n.d. | 50 ppm |
| Clorpirifós | n.d. | 1 ppm | 1 ppm |
| Dicrotófós | n.d. | n.d. | 235 ppm |
| Cu | n.d. | 0,25 ppm | n.d. |
| Pb | n.d. | < 0,5 ppm | n.d. |
| Cd | n.d. | 0,3 ppm | n.d. |
| Hg | n.d. | 0,22 ppm | n.d. |
| Cr | n.d. | n.d. | n.d. |
| Cianuros | n.d. | 0,16 ppm | n.d. |

| | | | |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Nitrógeno amoniacal | 1 ppm a pH 11 n.d. a pH 7 | 1 ppm a pH 11 n.d. a pH 7 | 1 ppm a pH 11 n.d. a pH 7 |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|

n.d.: no detectado.

Concentraciones probadas para cada muestra:

Nitrógeno amoniacal (pH 7): 0; 5; 10; 50; 100; 200

Nitrógeno amoniacal (pH 11) : 0; 0,2; 0,6; 1,2; 3; 6; 12

5 Cobre (Cu) 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 ppm

Mercurio (Hg): 0,1; 0,5; 1; 2; 5 ppm

Cadmio (Cd): 0; 0,1; 0,5; 1; 2,0; 5,0 ppm

Plomo (Pb): 0; 0,1; 0,5; 1; 2,0; 5,0 ppm

Cromo (Cr): 0; 0,1; 0,5; 1; 2,0; 5,0 ppm

10 Cianuros : 0; 0,25; 0,5; 1; 5; 10 ppm

Atrazina : 0,00025; 0,0005; 0,001; 0,004; 0,01; 0,04 ppm

Diurón : 0,00025; 0,0005; 0,001; 0,004; 0,01; 0,04 ppm

Glifosato : 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 ppm

Malatión : 0,01; 0,1; 10; 50 ppm

15 Clorpirifós : 0; 0,01; 0,1; 1 ppm

Dicrotofós : 0,1; 1,0; 10,0; 100; 500 ppm

Se observó que la temperatura de incubación más alta a la que se observaba inhibición de *Dunaliella tertiolecta* por una molécula bioactiva era de 30°C.

20

Ejemplo 17

Estabilización del alga seleccionada para condiciones del laboratorio y de campo

25 El alga se estabiliza y concentra mediante centrifugación para permitir un muestreo de 100 µl por prueba (que se corresponde con una concentración de clorofila de 10 µg/ml, el kit de ensayo comercial contiene para 50 pruebas (5 ml)). El alga se conserva en botellas de color ámbar para protegerla de la luz. Esta permanece estable durante 6 meses a 4°C. Su estabilidad se determina con un contaminante de referencia midiendo su IC₅₀ (concentración que proporciona una inhibición del 50% de la fluorescencia). Los kit de ensayo comerciales incluyen como ventaja más

30 de un microorganismo (es decir, alga o cianobacteria unicelular) para obtener resultados óptimos.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en este documento a modo de realizaciones específicas de la misma, esta puede modificarse, sin apartarse del espíritu y naturaleza del objeto de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35

Bibliografía

1. François Bellemare, Marie-Eve Rouette, Lucie Lorrain, Élisabeth Perron y Nathalie Boucher (2006). Combined use of photosynthetic enzyme complexes (PECs) and micro-algae photosynthetic systems for rapid screening of wastewater toxicity. *Env. Toxicol.* 21: 445-449.

40

2. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, 2007. Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, 15 páginas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de la presencia de moléculas bioactivas en una muestra líquida, que comprende:
 - 5 poner en contacto una solución de un microorganismo seleccionado entre el grupo compuesto por un alga y una cianobacteria unicelulares con la muestra líquida de modo que se obtenga una formulación que tenga una concentración de microorganismos de 200.000-1 x 10⁷ células/ml de muestra líquida,
 - 10 incubar la formulación durante 10 a 120 minutos a un pH de 7 a 12 y una temperatura entre 18 y 35°C con luz ambiente seguido de una incubación con luz verde o en oscuridad, y
 - medir la fluorescencia emitida por la formulación;
 - 15 en el que una fluorescencia emitida por la muestra menor que la de la muestra control es una indicación de que la muestra contiene una molécula bioactiva.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la incubación con luz verde o en oscuridad tiene una duración de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 minutos, incluso más preferiblemente de aproximadamente 15 minutos.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el pH de incubación está entre aproximadamente 4 y 12, más preferiblemente entre aproximadamente 11 y 12.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la solución de microorganismo se activó con luz ambiente antes de la fase de incubación.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la formulación además comprende un aditivo, preferiblemente el aditivo es cadmio, H₂O₂, cobre o cadmio y cobre.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es una *Chlorophyceae*.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es una *Chlorophyceae* de agua dulce, preferiblemente *Chlorella vulgaris*.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que la temperatura de incubación es de aproximadamente 35°C.
9. El método de la reivindicación 7, en el que la solución de microorganismo se activó con luz ambiente durante al menos 90 minutos antes de la fase de incubación.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la concentración celular de microorganismo está entre aproximadamente 2,5 x 10⁶ y 5 x 10⁶ células/ml de solución acuosa, preferiblemente de aproximadamente 2,5 x 10⁶ células/ml de solución acuosa.
- 45 11. El método de una cualquier de las reivindicaciones 7 a 10 en el que la molécula bioactiva se selecciona entre el grupo compuesto por atrazina, diurón, glifosato, clorpirifós, cobre, plomo, cadmio, mercurio, cianuros, tetraciclina, cinc, níquel y nitrógeno amoniacal.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es *Ankistrodesmus falcatus*, *Monoraphidium arcuatum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Desmosdesmus subspicatus*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Pseudokirchneriella subspicata*, *Chlamydomonas reinhardtii*, marine *Chlorophyceae*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia closterium*, *Lasallia pustulata* o *Zostera caprocorni*.
- 50 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es *Dunaliella tertiolecta*.
14. El método de la reivindicación 13, en el que la concentración celular de *Dunaliella tertiolecta* está entre aproximadamente 200.000 y 350.000 células/ml de solución acuosa y, preferiblemente, la solución de *Dunaliella tertiolecta* se activó con luz ambiente durante al menos 45 minutos antes de la fase de incubación.
- 55 15. El método de la reivindicación 13 o 14 en el que la molécula bioactiva se selecciona entre el grupo compuesto por atrazina, diurón, glifosato, malatión, clorpirifós, progesterona y dicrotofós.
- 60 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es una cianobacteria, preferiblemente *Anabaena sp.* o *Nostoc commune* y en el que la solución de cianobacteria se activó preferiblemente con luz ambiente durante al menos 60 minutos antes de la fase de incubación.

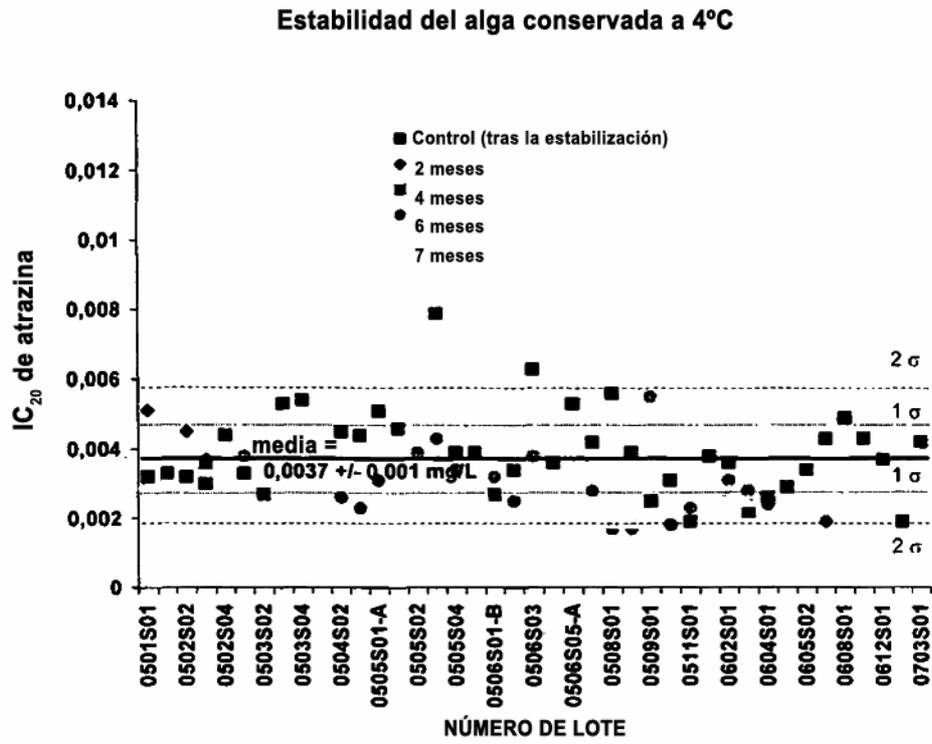


Figura 1

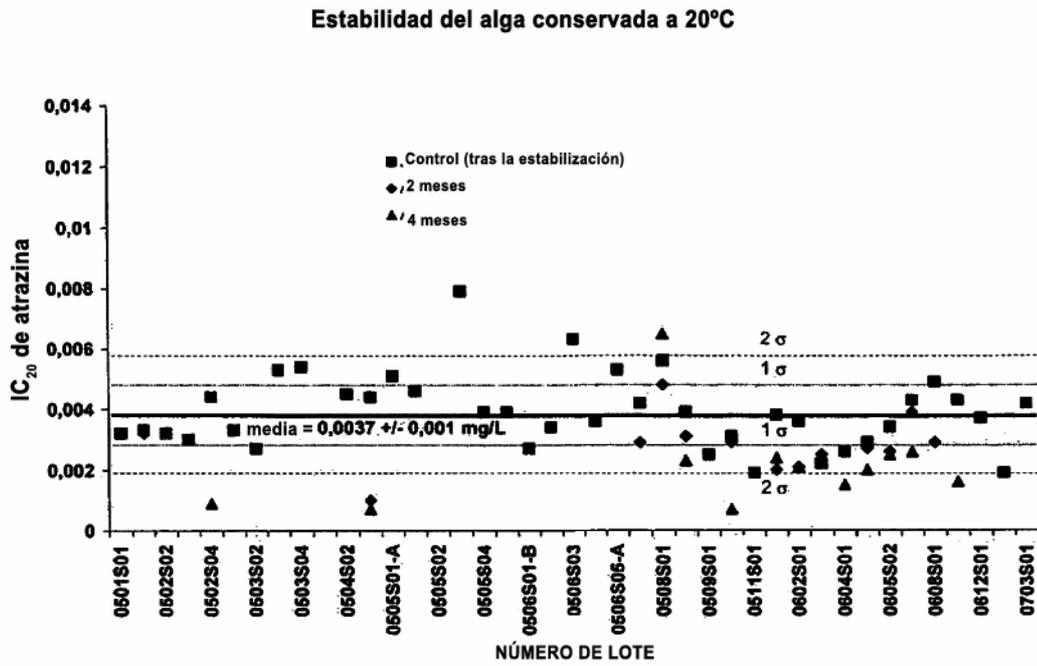


Figura 2

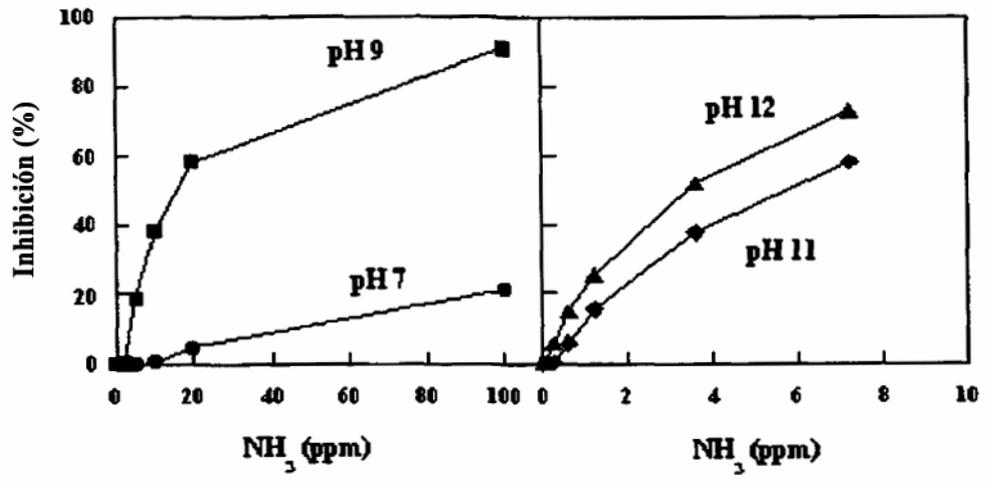


Figura 3

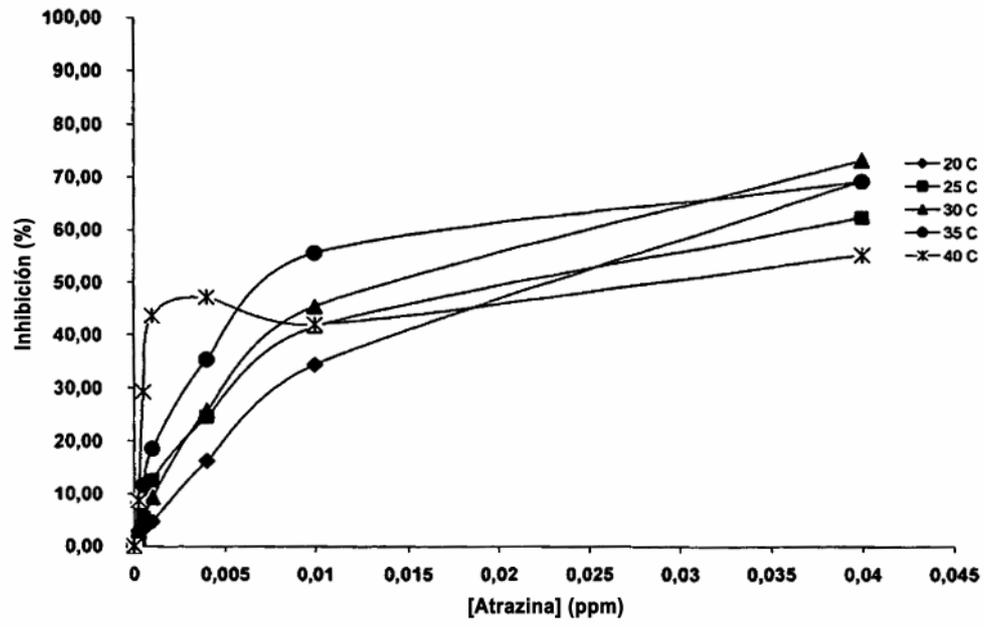


Figura 4

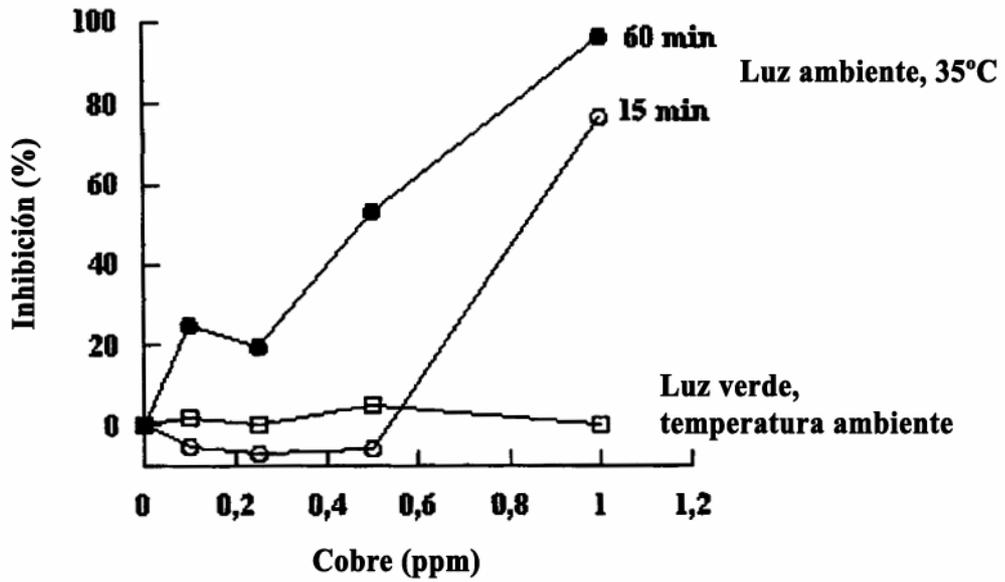
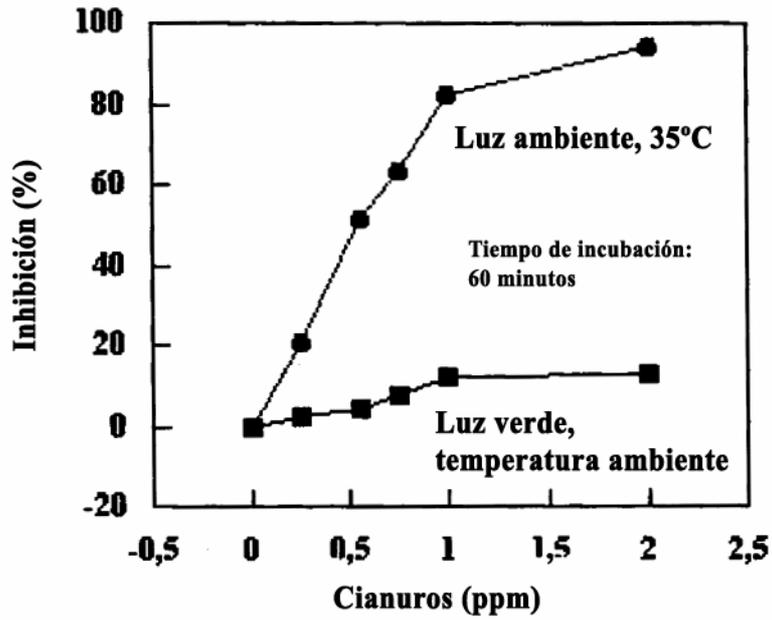


Figura 5

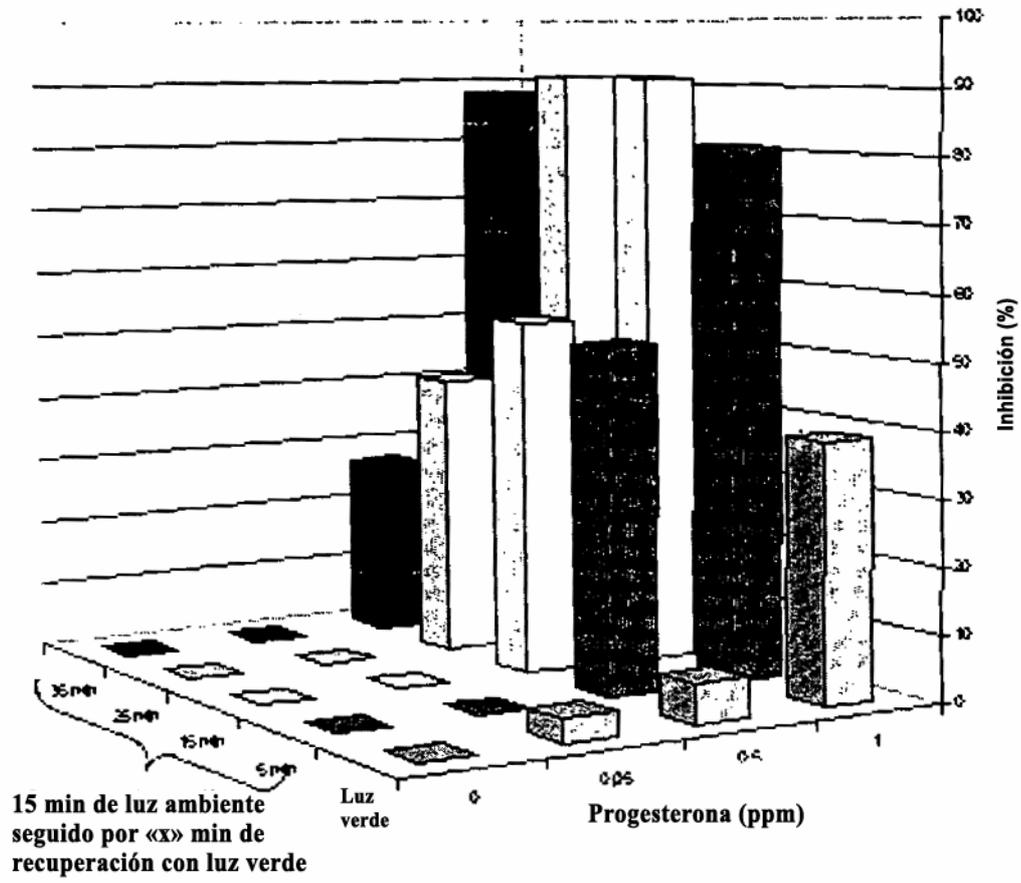


Figura 6

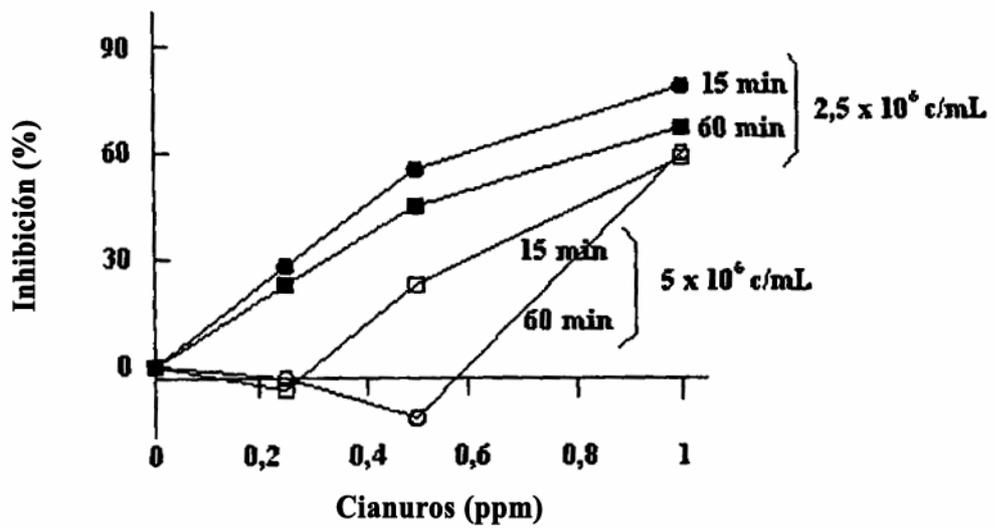
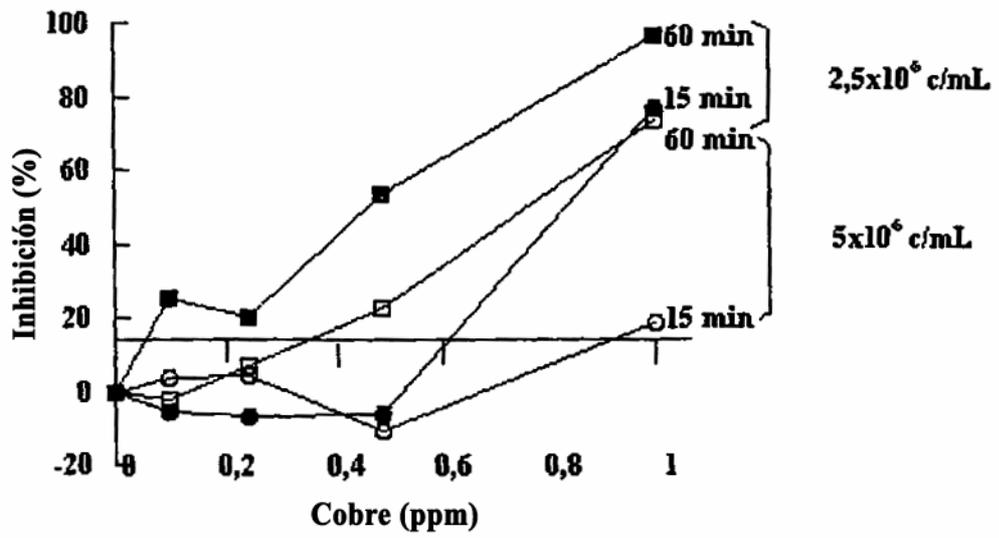


Figura 7

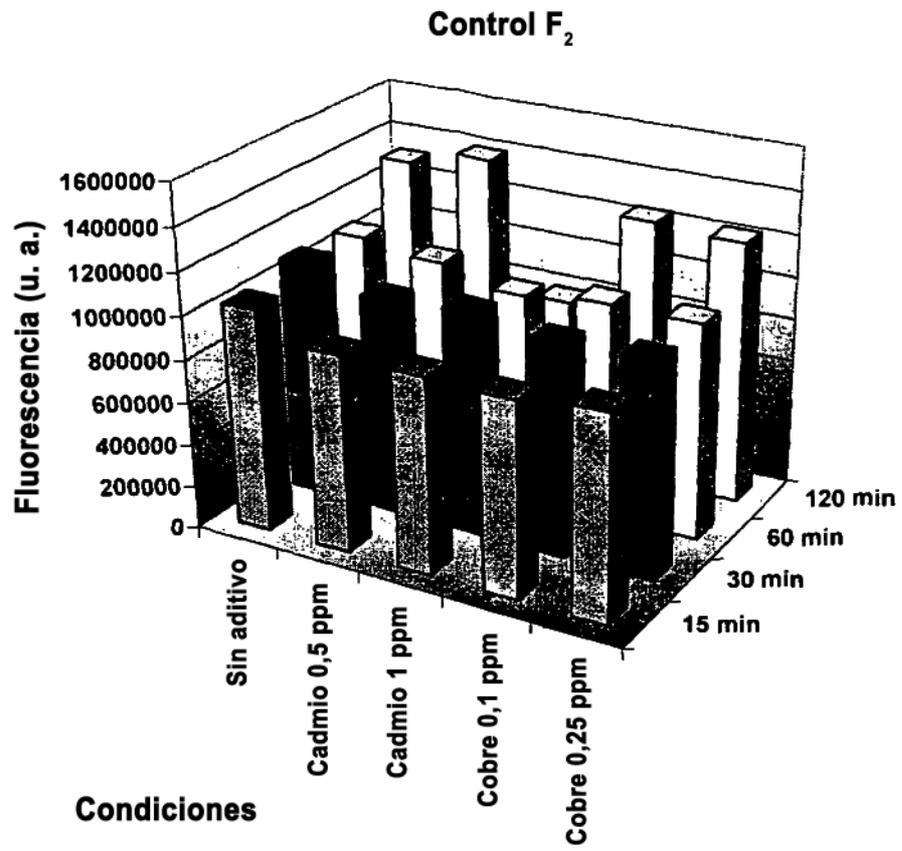


Figura 8

Detección de metales en 30 minutos con diferentes aditivos

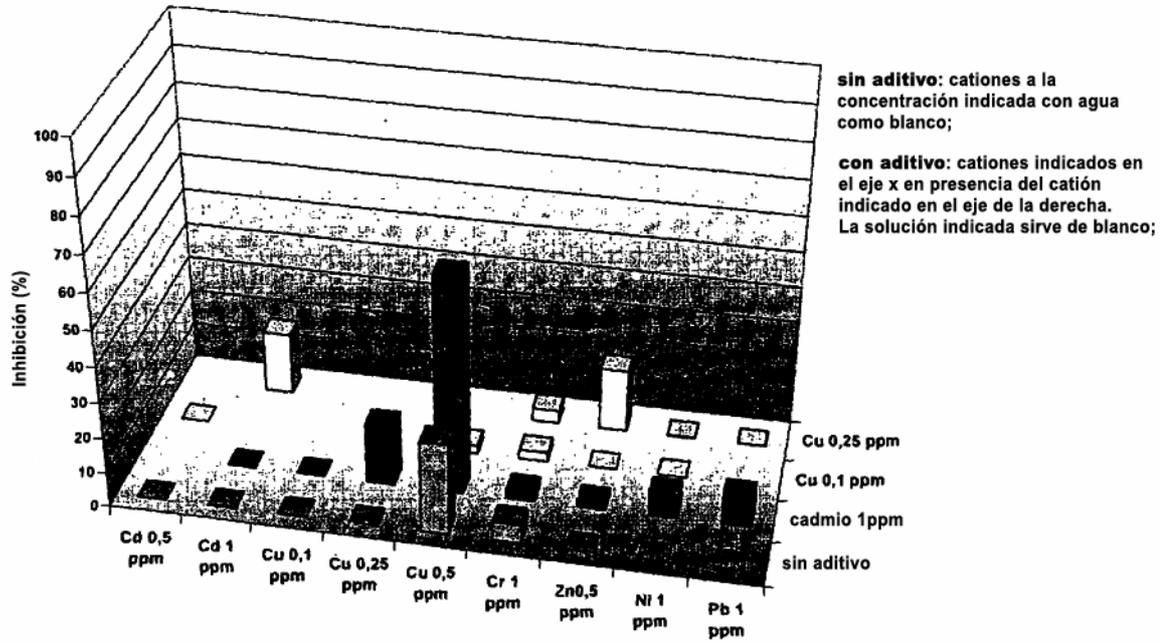


Figura 10

Detección de metales en 60 minutos con diferentes aditivos

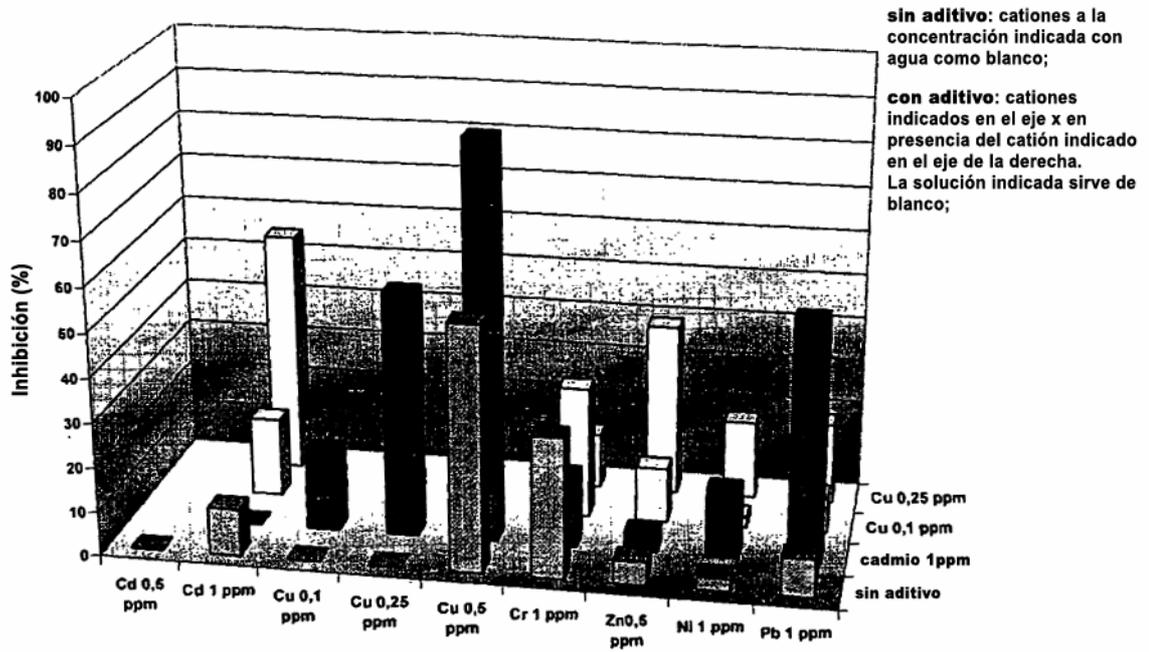


Figura 11

Detección de metales en 120 minutos con diferentes aditivos

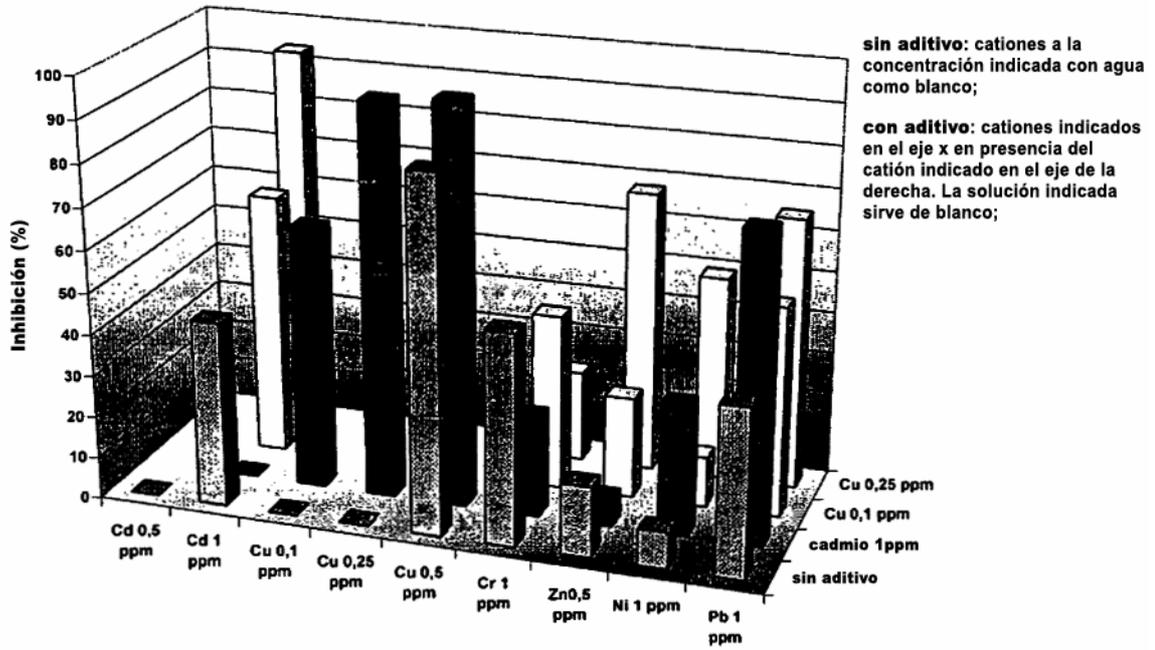


Figura 12

Detección de Pb en 15 minutos con diferentes mezclas de [Cu+Cd]

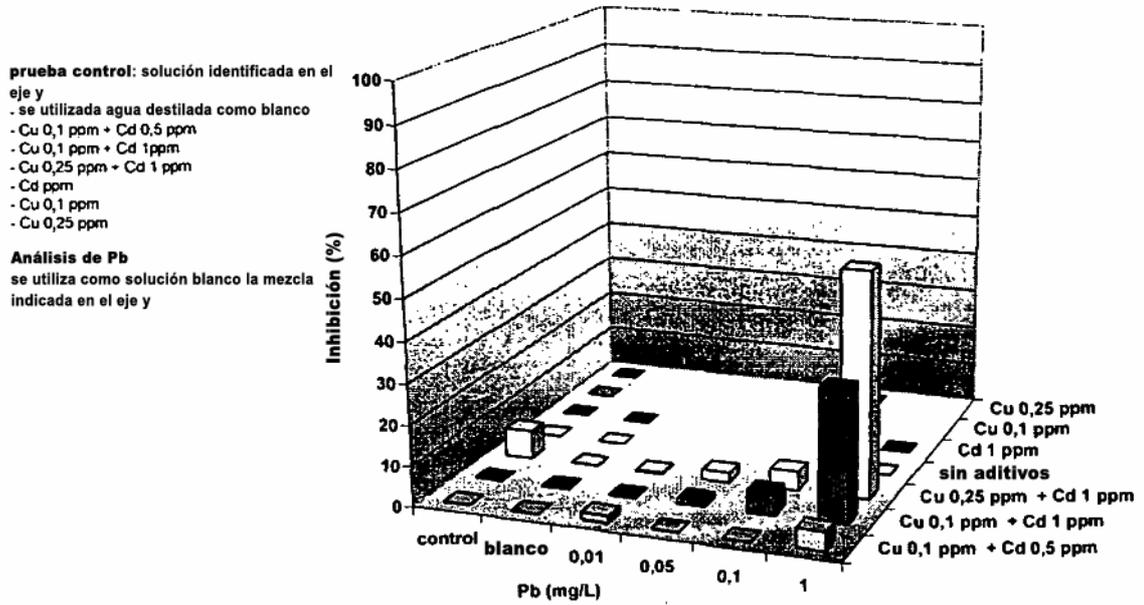


Figura 13

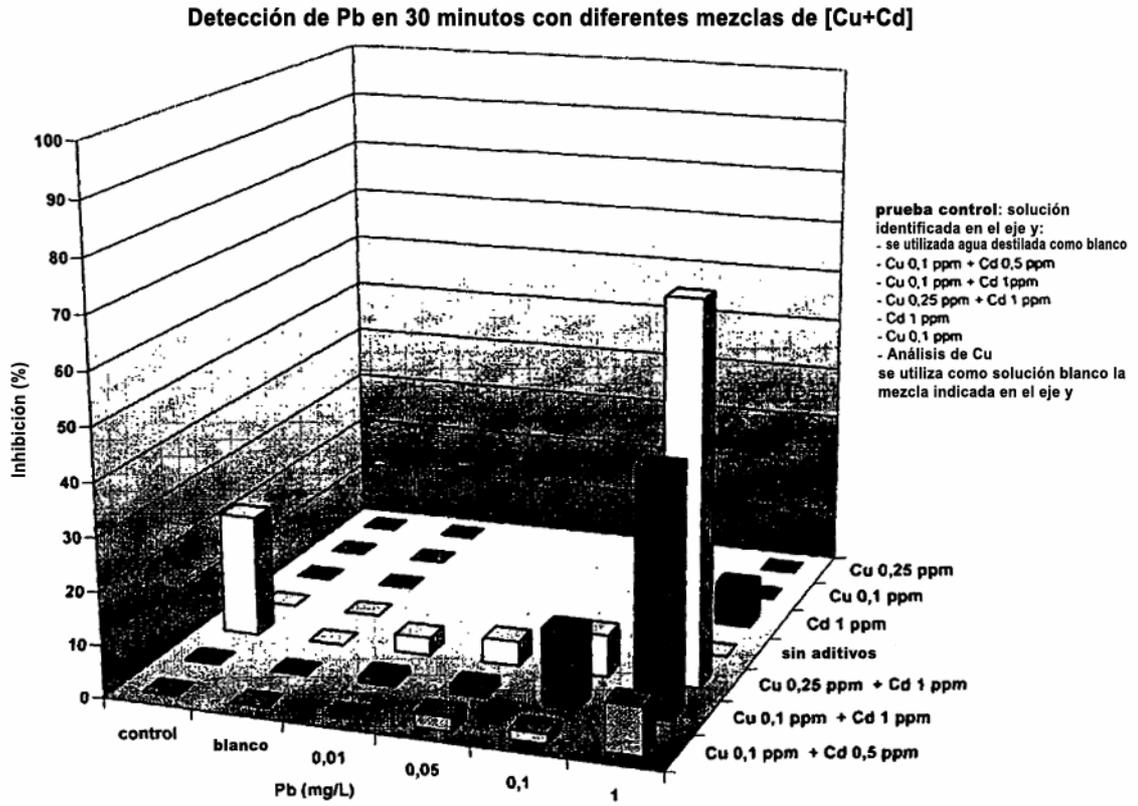


Figura 14

Detección de Pb en 60 minutos con diferentes mezclas de [Cu+Cd]

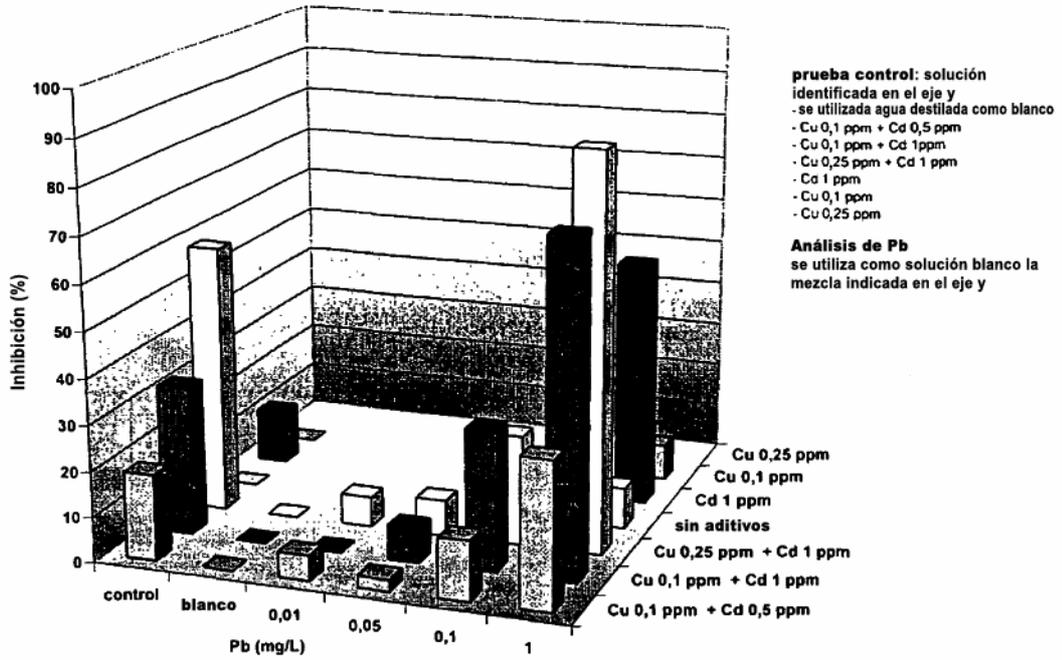


Figura 15

Detección de plomo en 120 minutos con diferentes mezclas de [Cu+Cd]

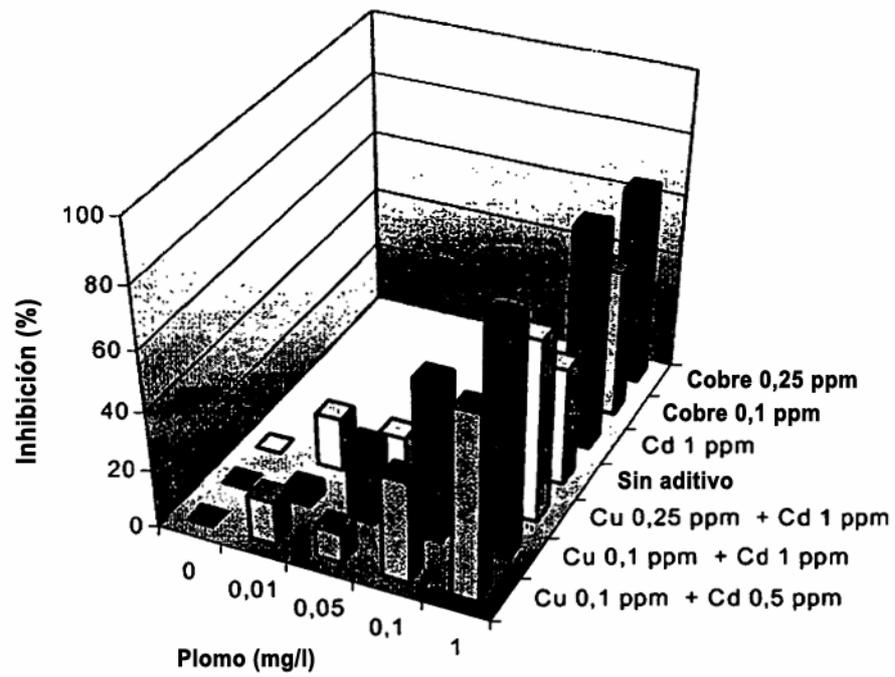


Figura 16

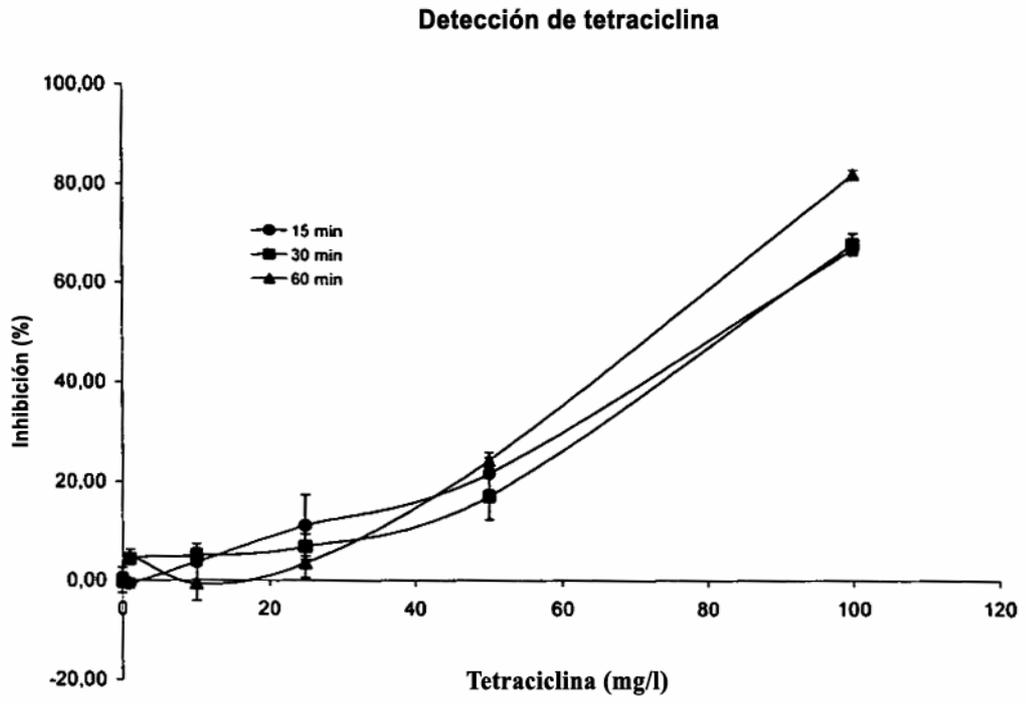


Figura 17