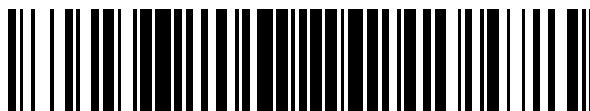


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 533**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2006** **E 06709209 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 1844330**

54 Título: **Procedimiento de determinación de la reactividad biogeoquímica de una muestra acuosa de materia orgánica**

30 Prioridad:

31.01.2005 FR 0500957

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

15.07.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (33.3%)**

**147, RUE DE L'UNIVERSITE
75338 PARIS CEDEX 07, FR;**

**UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**DUDAL, YVES;
GUILLON, EMMANUEL;
DUPONT, LAURENT;
QUIQUAMPOIX, HERVÉ y
BOUDENNE, JEAN-LUC**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 577 533 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de determinación de la reactividad biogeoquímica de una muestra acuosa de materia orgánica

- 5 **[0001]** La invención se refiere a un procedimiento de determinación de la reactividad biogeoquímica de muestras acuosas de materias orgánicas, especialmente con el fin de evaluar la ecotoxicidad.
- [0002]** Se estima que en Francia, se reciclan 250 millones de toneladas de residuos agrícolas y 10,5 millones de toneladas de residuos industriales cada año por esparcimiento en el suelo.
- 10 **[0003]** Esta práctica suscita la cuestión del destino de las materias orgánicas contenidas en estos residuos en los suelos, de su capacidad para alcanzar las capas freáticas, de su influencia en las propiedades y funciones de los suelos y de las modificaciones biogeoquímicas que implican, especialmente en términos de contaminación.
- 15 **[0004]** En general se reclaman técnicas de análisis simples, especialmente de la composición (carbono, nitrógeno, fósforo) de las materias orgánicas presentes en estos residuos, para determinar la cantidad de residuos que es posible esparcir. Estas técnicas no permiten evaluar la reactividad de los residuos en el suelo y, en consecuencia, no dan indicaciones sobre su tiempo de permanencia en el suelo, su capacidad de transferencia hacia la capa freática y sus impactos ambientales potenciales, especialmente en términos de movilización de
- 20 microcontaminantes presentes, metálicos y/u orgánicos.
- [0005]** Fang y col. (1998) *Analytica Chimica Acta* 373:139-151 describe el estudio de la relación, por espectrofluorometría, de tres pesticidas con ácido húmico y muestras de suelo.
- 25 **[0006]** Klapper y col. (2002) *Environ. Sci. Technol.* 36:3170-3175 describe el uso de espectroscopia de fluorescencia 3D para evaluar el estado de oxidación de sustancias húmicas, por observación de la fluorescencia natural de sus residuos de quinona.
- [0007]** Senesi y col. (1990) *Analytica Chimica Acta* 232:77-106 describe el estudio de las interacciones del
- 30 ácido fúlvico con iones metálicos y compuestos orgánicos por espectrofluorometría.
- [0008]** Existe así la necesidad de una prueba, preferentemente sencilla y rápida, que permita evaluar cuantitativamente el destino de estos residuos en los suelos y los impactos ambientales potenciales.
- 35 **[0009]** La presente invención responde a esta necesidad, por medio de una prueba en microplaca que usa una lectura de fluorescencia, que permite cuantificar de forma rutinaria la reactividad de una muestra acuosa de materia orgánica, con componentes del suelo.
- [0010]** La invención tiene así por objeto un procedimiento de determinación de la reactividad biogeoquímica
- 40 de una muestra acuosa de materia orgánica, en el que se evalúa el destino de dicha materia orgánica en un suelo, que comprende:
- a. la mezcla de la muestra con un componente de un suelo con el que la muestra es susceptible de reaccionar, siendo dicho componente de un suelo un microorganismo; y
- 45 b. el análisis en microplaca de la fluorescencia emitida por dicha mezcla en presencia de un revelador redox fluorescente sensible al catabolismo de la materia orgánica de la muestra;
- una variación de fluorescencia, con respecto a la fluorescencia emitida por el componente del suelo en ausencia de
- 50 la muestra o por la muestra en ausencia del componente del suelo, que es indicadora de la capacidad de la muestra de ser degradada por un microorganismo del suelo.
- [0011]** La solicitud describe igualmente un procedimiento de determinación de la reactividad biogeoquímica de una muestra acuosa de materia orgánica, que comprende:
- 55 a. la mezcla de la muestra con un suelo seco o un componente de un suelo con el que la muestra es susceptible de reaccionar, y
- b. cuando la muestra se mezcla con un suelo seco, la recuperación de la fase líquida; y

c. el análisis en microplaca de la fluorescencia emitida por dicha mezcla o dicha fase líquida;

una variación de fluorescencia, con respecto a la fluorescencia emitida por el componente del suelo en ausencia de la muestra o por la muestra en ausencia del componente del suelo, que es indicadora de la reactividad de la muestra.

[0012] La invención tiene igualmente por objeto un kit para la implementación del procedimiento según la invención.

Definiciones:

[0013] La expresión «muestra acuosa de materia orgánica» reagrupa especialmente residuos o productos fermentables líquidos acuosos, tales como lodos de estaciones de depuración o residuos o efluentes agroalimentarios. Se incluyen igualmente aguas de superficie, tales como aguas de lagos, suelos o ríos, aguas marinas o aguas subterráneas, o incluso extractos acuosos de un suelo o suelos. En el caso de un extracto acuoso de suelo o de un residuo orgánico bifásico, se efectúa una extracción en agua (normalmente una masa de suelo o de residuo para dos volúmenes de agua) y un centrifugado (por ejemplo al menos 5 minutos a 5.000 rpm) y después un filtrado de la muestra acuosa (por ejemplo, con un filtro de 0,45 µm). En el caso de una muestra de agua o de residuo líquido (con o sin dilución previa), puede realizarse un filtrado simple. Preferentemente, las muestras acuosas de materia orgánica no comprenden o no están constituidas por ácido fúlvico o ácido húmico.

[0014] El término «reactividad biogeoquímica» hace referencia a la capacidad de la muestra de reaccionar con determinados componentes del suelo, tales como metales o microorganismos, o con un suelo seco.

[0015] Más en particular, el procedimiento descrito en el presente documento permite cuantificar la reactividad de la muestra probada con un suelo seco o un componente de un suelo, eligiéndose dicho componente entre una exoenzima, un microorganismo, un catión metálico y un microcontaminante orgánico. Preferentemente, el suelo seco o el componente de un suelo no comprenden o no están constituidos por ácido fúlvico o ácido húmico.

[0016] Estos componentes se designan igualmente en el presente documento como «componentes o sondas biogeoquímicas».

[0017] En particular, el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva está destinado a evaluar las interacciones de la materia orgánica, de las que proviene la muestra acuosa de materia orgánica, con un suelo, ya sea directamente a partir de una muestra de este suelo, o a partir de elementos representativos de los suelos, tales como los componentes o sondas biogeoquímicas citados anteriormente. Más en particular, el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva está dirigido a evaluar el destino de dicha materia orgánica, o de asociaciones de dicha materia orgánica con determinados elementos del suelo, en el suelo en cuestión.

Formato de la prueba:

[0018] El procedimiento desarrollado en microplaca permite trabajar con bajos volúmenes, y permite probar numerosas muestras rápidamente.

[0019] Preferentemente, el volumen de líquido depositado en el pocillo de la microplaca es inferior a aproximadamente 1 ml, preferentemente inferior a aproximadamente 500 µl, preferentemente comprendido incluso entre aproximadamente 200 y aproximadamente 400 µl. La mezcla de la muestra con el componente del suelo se realiza ya sea directamente en los pocillos de la microplaca o previamente. Cuando el componente del suelo es sólido, la mezcla con la muestra se realiza fuera de la microplaca, más en general se centrifuga, para recuperar la fase líquida que se deposita finalmente en los pocillos de la microplaca. En el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva, la «fase líquida» designa así la fase líquida de la muestra acuosa de materia orgánica que se ha puesto en contacto con el suelo seco.

[0020] La microplaca (normalmente, pero de forma no obligatoria, de 96 pocillos) se elige de un material de autofluorescencia mínima. Puede tratarse por ejemplo de una microplaca de polipropileno blanco y opaco.

[0021] En la misma microplaca pueden someterse a ensayo varias funcionalidades, es decir, varias reactividades.

[0022] De forma ventajosa se prevén pocillos de calibrado, para cuantificar las respuestas obtenidas por las muestras sometidas a ensayo.

5 **[0023]** El procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva puede presentarse así en forma de una prueba multiformato, que comprende la mezcla de la muestra por separado con varios suelos secos o componentes del suelo, y el análisis de la fluorescencia en la misma microplaca.

[0024] Además, pueden someterse a ensayo varias muestras en la misma microplaca.

10

[0025] El análisis de la fluorescencia emitida puede realizarse simultáneamente para el conjunto de los pocillos de la microplaca, o, según la naturaleza del componente del suelo, se puede analizar una parte de la microplaca, y después otra más tarde, es decir, unas horas o unos días después.

15 **[0026]** La lectura de fluorescencia puede realizarse mediante espectrofluorimetría con ayuda de un espectrofluorímetro (por ejemplo el modelo Perkin Elmer LS55) equipado de un lector de microplaca.

[0027] Resulta especialmente ventajoso someter a ensayo en la misma microplaca las cinco reactividades descritas más en detalle a continuación, es decir, probar en la misma microplaca la reactividad de una muestra con un suelo seco, una exoenzima, un microorganismo, un catión metálico y un microcontaminante orgánico. Esta prueba múltiple, de detección única (por fluorescencia), permite evaluar fácilmente, y de forma cuantitativa, el destino de las muestras acuosas de materia orgánica en los suelos, y los impactos ambientales potenciales.

Reactividad con un suelo seco:

25

[0028] La muestra sujeta a prueba puede ponerse en contacto con un suelo seco. Por «suelo seco», se entiende una muestra de suelo a base de materia sólida mineral y/u orgánica, preferentemente secada a aproximadamente 100-120°C, y después tamizada. Por ejemplo, se procede a un secado a 105°C durante 24 horas y después a un tamizado a 2 mm. En este caso se habla también de «superficie sólida».

30

[0029] En este caso, la muestra se mezcla con el suelo seco, la materia orgánica de la muestra se adsorbe en dicho suelo seco y después se recupera la fase líquida por centrifugado o filtrado al vacío. Se analiza entonces la disminución de la fluorescencia emitida por la fase líquida, por el hecho de que una parte de la materia orgánica se mantiene en adsorción en el suelo seco, con respecto a la fluorescencia emitida por la muestra líquida que no se ha puesto en contacto con el suelo seco. En cada lectura se tiene en cuenta la contribución a la fluorescencia del suelo seco mezclado con un tampón acuoso.

35

[0030] A continuación se describe un ejemplo (fuera de la invención). En este ejemplo, la reacción de adsorción se realiza en un tampón, el MES (ácido 2[N-morfolino] etanosulfónico), pH 6,3 mezclando la muestra con el tampón en una relación comprendida entre 1/1 y 1/5 (1 ml de muestra + 250 µl de tampón + 5 a 200 mg de superficie). Esta mezcla se pone en contacto con la materia sólida durante 24 horas en tubos eppendorf (1,5 ml). Se usan diferentes cantidades de materia sólida para una misma cantidad de muestra líquida (4, 10, 20, 50, 75, 100 y 150 mg para 1 ml). Para cada medida es necesario un segundo tubo (misma masa de superficie + 1 ml de agua + 250 µl de tampón MES) con el fin de medir la contribución a la fluorescencia del extracto acuoso de cantidad de materia sólida dada. Finalmente, un control permite medir la contribución a la fluorescencia de la muestra (1 ml de muestra líquida + 250 µl de tampón MES) con el fin de cuantificar las contribuciones de fluorescencia de cada uno de estos dos componentes. Los 15 tubos se colocan en oscuridad y a temperatura constante (entre 20 y 25°C) durante 24 h en un agitador (aproximadamente 200 rpm). A continuación se recupera el sobrenadante de cada tubo después de centrifugado (10.000 rpm, 5 minutos) y se depositan 270 µl de este último en los pocillos de la microplaca.

50

[0031] La detección se efectúa de forma ventajosa para longitudes de onda de excitación y de emisión propias de la materia orgánica soluble de la muestra, determinadas previamente por un barrido 3D en el espectrofluorímetro. No obstante de forma general, las coordenadas siguientes (longitud de onda de excitación λ_{ex} 330 nm y longitud de onda de emisión λ_{em} 440 nm) son convenientes para la mayoría de las muestras y permiten reducir al mínimo la autofluorescencia de la placa, máxima para las longitudes de onda de excitación bajas. La intensidad de fluorescencia (F) es leída por el lector de microplaca para cada uno de los 15 pocillos.

55

[0032] Las lecturas en bruto sirven para calcular el porcentaje de materia orgánica restante adsorbido en la

superficie para cada cantidad de superficie diferente según la ecuación siguiente: $[F(\text{mat.org.}) + F(\text{surf}) - F(\text{sobrenadante})] / F(\text{mat.org.})$.

- [0033]** La interpretación puede hacerse de dos formas en función del uso o no de un análisis matemático. En primer lugar, la interpretación puede realizarse por simple cálculo del porcentaje de la muestra adsorbida, que puede compararse así con otras muestras o suministrar un orden de magnitud de la reactividad entre la muestra y el suelo. La lectura simple puede hacerse en la masa de suelo que se añadirá para atenuar la señal de fluorescencia del 50% (LD50 equivalente) con una rejilla de lectura en tres niveles: menos de 20 mg (adsorción intensa), entre 20 y 100 mg (adsorción media), más de 100 mg (adsorción baja) para 1 ml de muestra. En segundo lugar, la interpretación de los resultados puede realizarse con ayuda del modelo simple de afinidad/saturación (de tipo Michaelis-Menten o Langmuir) que suministra un parámetro cuantitativo: la afinidad entre las materias orgánicas solubles y el suelo. La afinidad representa la masa de suelo que se añadirá para obtener la semisaturación, con lo que cuanto más bajo sea el valor más intensa es la afinidad.
- [0034]** La figura 1 presenta los resultados obtenidos con diferentes suelos. La muestra sometida a ensayo es una muestra acuosa de materia orgánica que proviene de un suelo de superficie (0-30 cm) de un campo no cultivado de la región mediterránea obtenido por filtrado a 0,45 μm y centrifugado (5 minutos a 5.000 rpm). Los puntos corresponden a los resultados experimentales y las curvas se han establecido de acuerdo con un modelo de afinidad/saturación (Michaelis-Menten). Por ejemplo, las afinidades de la muestra de suelo obtenidas para los suelos de la figura 1 son: 20,8 mg para el suelo de Vaucluse, 50,9 mg para el suelo del Alto Rin y 139,3 mg para el suelo del Marne.

Reactividad con exoenzimas:

- [0035]** El componente del suelo puesto en contacto con la muestra sujeta a prueba puede ser una exoenzima, es decir, una enzima usada por los microorganismos de forma extracelular para romper ciertas moléculas de alto peso molecular, tales como celulosa, no asimilables en forma entera. Las exoenzimas pueden ser especialmente hidrolasas u oxidoreductasas, enzimas implicadas en el proceso de humificación, es decir, de prolongación de las cadenas carbonadas de polifenoles. Puede tratarse, por ejemplo, de la β -glucosidasa o la lacasa.

- [0036]** Al no poder realizarse la medida directa de la actividad enzimática por detección por fluorescencia, se analiza la inhibición competitiva por la materia orgánica de la muestra de una reacción entre una exoenzima y un sustrato fluorescente de la exoenzima. Se añade así un sustrato fluorescente de referencia a la exoenzima con el fin de realizar una medida indirecta, basada en la inhibición competitiva operada por los sustratos contenidos en la muestra de materias orgánicas en la reacción entre el sustrato artificial y la enzima. Como sustrato se elige preferentemente un sustrato específico de la enzima que tiene una afinidad (constante de Michaelis-Menten, K_M) para ella de un orden de magnitud similar a la afinidad de un sustrato natural de la enzima presente potencialmente en la muestra. La relación de afinidades (relación de K_M de los dos sustratos para la enzima) determina la relación de las concentraciones usadas en la prueba. La determinación de estas concentraciones puede ser objeto de un estudio preliminar, por ejemplo, en el que se usa celobiosa para la β -glucosidasa.

- [0037]** En un ejemplo fuera de la invención, la reacción de inhibición competitiva tiene lugar en los pocillos de la microplaca haciendo reaccionar 90 μl de sustrato artificial fluorescente (el resorufin- β D-glucopiranosido) a una concentración determinada según las afinidades (aproximadamente 10^{-5} M en MES), con 90 μl de enzima (1 unidad/ml en el tampón MES, pH 6,3 en KNO_3 0,1 M) y 90 μl de muestra que contiene la materia orgánica sujeta a prueba. Además, se preparan tres pocillos de control: uno que contiene 90 μl de sustrato artificial tamponado, 90 μl de tampón y 90 μl de agua para verificar la no degradación del sustrato en ausencia de enzima; el segundo que contiene 90 μl de sustrato, 90 μl de enzima y 90 μl de agua con el fin de obtener un valor de referencia de la reacción enzimática, sin inhibición competitiva y el tercero que contiene 90 μl de sustrato, 90 μl de muestra y 90 μl de tampón con el fin de verificar la no degradación del sustrato por las materias orgánicas de la muestra. Estas reacciones se realizan por duplicado.

- [0038]** Para el conjunto de los ocho pocillos, se examina la cinética para la aparición de producto fluorescente (las longitudes de onda de excitación y de emisión de fluorescencia se proporcionan en el folleto comercial) derivado del sustrato degradado por la enzima. Cuanto más reacciona la muestra de materia orgánica con la enzima, más se inhibe la reacción con el sustrato artificial y más disminuye la velocidad de aparición de fluorescencia medida (intensidad de fluorescencia en función del tiempo).

[0039] La interpretación de los resultados puede hacerse de dos formas diferentes. En primer lugar, puede realizarse por simple cálculo de la inhibición de la reacción en presencia de la muestra (competidor) comparada con la obtenida en ausencia de muestra: menos del 20% (reactividad con la exoenzima baja), del 20 al 60% (reactividad media) y más del 60% (reactividad alta). Puede realizarse igualmente por comparación de las medidas de fluorescencia de la muestra con respecto a la fluorescencia de una gama de concentraciones de un segundo sustrato conocido no fluorógeno (por ejemplo, la celobiosa) de la exoenzima que genera una competición y con ello una respuesta idéntica. El resultado de la competición ejercida por la muestra se lee en términos de concentración de sustrato y se expresa en equivalente de sustrato. La lectura de los resultados en bruto en términos de velocidad de reacción enzimática para diferentes concentraciones de sustrato permite calcular la afinidad de la muestra de materia orgánica hacia la enzima mediante la ecuación de Michaelis-Menten.

[0040] Debe observarse que las longitudes de onda de excitación y de emisión de los sustratos enzimáticos artificiales y de los productos de sus reacciones enzimáticas están comprendidas en general en el espectro visible y, por tanto, se reducen al mínimo los problemas de autofluorescencia (de la microplaca).

[0041] La figura 2 presenta un ejemplo de gama obtenido con una enzima (la celobiasa extraída de *Aspergillus niger*). La muestra es una solución de resorufin- β D-glucopiranosido, el sustrato fluorescente, que contiene diferentes adiciones de celobiosa, que es el competidor. La figura muestra la cinética de aparición de fluorescencia correspondiente a la formación del producto de la reacción entre el sustrato fluorescente y la enzima, en ausencia de competidor y en presencia de éste a diferentes concentraciones crecientes. El competidor es la celobiosa, sustrato natural de la enzima, encontrado en las muestras de suelo.

Reactividad con los microorganismos:

[0042] El componente del suelo puede ser un microorganismo, en particular una bacteria elegida preferentemente entre *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* 4B, *Acetogenium*, *Fusarium*, etc. En el caso de microorganismos anaerobios, es preferible colocar una o varias gotas de parafina en el pocillo lleno de la microplaca, con el fin de detener la transferencia de oxígeno y situarse así en condiciones anaerobias.

[0043] Se analiza entonces la variación de fluorescencia en presencia de un revelador redox fluorescente sensible al catabolismo de la materia orgánica de la muestra.

[0044] Este tipo de revelador es conocido para el experto en la materia. Permite medir la evolución del par NADH/NAD^+ (Abe y col., 2002; Chen y col., 2000; Gloeckner y col., 2001).

[0045] El revelador redox puede intervenir en la cadena de transporte de electrones, y se reduce por acoplamiento con NAD^+/NADH , revelando así el fenómeno de la respiración.

[0046] El revelador puede ser 2,3,4,5,6-pentafluorodihidrotetrametilrosamina (Redox Sensor™ Red CC-1, Chen y col., 2000), MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un compuesto amarillo soluble en agua que, una vez reducido, forma una sal de formazán violeta insoluble en medio acuoso. Se recuperan los cristales de formazán con sulfóxido de dimetilo (DMSO) para poder leer la densidad óptica.

[0047] Otro revelador es la resazurina (Atamarblue™, véase la patente de EE.UU. 5.501.959). Éste presenta la doble ventaja del cambio de color pero también de la formación de un producto fluorescente. Así este producto puede usarse tanto en colorimetría como espectrofluorimetría (Abe y col., 2002; Gloeckner y col., 2001; Kuda y col., 2003).

[0048] Además, este indicador posee un potencial redox superior al del MTT, y se sitúa entre la reducción de oxígeno y de la citocromo-oxidasa, cuya cadena respiratoria se efectúa hasta el final sin riesgo de interrupción.

[0049] El cambio de color entre la forma oxidada no fluorescente, azul, y la forma reducida fluorescente, violeta, es acusada y se observa a simple vista en espectroscopia.

[0050] En un ejemplo de realización, la reacción no se realiza ya directamente en pocillo, sino que pasa por una etapa en frasco de color ámbar (20 ml). El objeto de este cambio de protocolo es no limitar la aportación de oxígeno durante la respiración. Las soluciones de sustrato (glucosa), revelador redox (Alamarblue) y de *Pseudomonas* se añaden en las mismas relaciones.

[0051] La cepa de microorganismo se conserva en el medio de cultivo, antes de usarse, por ejemplo en forma de una solución salina que comprende del orden de 10^7 a 10^8 bacterias/ml.

5 [0052] La solución salina puede ser un medio salino mineral (MSM) desprovisto de carbono orgánico (1 litro de MSM en la composición siguiente, en gramos: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,883; K_2HPO_4 2,257; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,096; NaNO_3 1,001. A esta solución se le añade 1 ml/l de la solución siguiente de composición, en mg/L: $\text{Co}(\text{NO}_2)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 291; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 474; CuSO_4 160; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 288; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2780; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1690; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 482; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2362). La medida de la actividad se realiza en este caso con ayuda de un
10 revelador redox fluorescente, azul de Alamar (solución comercial) que cambia de especiación y por tanto de coordenadas de fluorescencia cuando se intercambian electrones (cadena respiratoria) durante la asimilación de un sustrato por el microorganismo.

[0053] La reacción tiene lugar en cuatro pocillos de la microplaca: el primero contiene 90 μl de revelador
15 redox (30% de la solución comercial) y 180 μl de MSM con el fin de verificar su no degradación en el curso de la medida; el segundo contiene 90 μl de revelador redox, 90 μl de muestra y 90 μl de MSM para verificar la ausencia de reacción entre los dos; el tercero contiene 90 μl de revelador redox, 90 μl de solución de microorganismos y 90 μl de MSM para verificar el nivel del ruido de fondo de metabolismo de los microorganismos en ausencia de sustrato orgánico. Finalmente, el último contiene 90 μl de cada reactivo (microorganismos, revelador y muestra) y sirve de
20 medida de la actividad. El dispositivo de los cuatro pocillos se repite una vez.

[0054] Los ocho pocillos se siguen en el curso de la incubación a 37°C durante 48 a 72 horas, a una frecuencia escogida (ej.: 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72). En cada momento se efectúa una lectura de los ocho pocillos y se compara la intensidad de fluorescencia con los controles para obtener una actividad.

25 [0055] La interpretación puede hacerse de dos formas diferentes. Puede realizarse por simple cálculo de la inhibición de la reacción en presencia de la muestra comparada con la obtenida para el testigo; menos del 20% (reactividad con el microorganismo baja), del 20 al 60% (reactividad media) y más del 60% (reactividad elevada). Puede realizarse igualmente por comparación de las medidas de fluorescencia de la muestra con respecto a una
30 gama de concentraciones de un sustrato fácilmente degradable, como la glucosa. El resultado de la muestra se lee en términos de concentración de glucosa y se expresa en equivalente de glucosa.

[0056] La figura 3 presenta los resultados obtenidos con una cepa AK15 de *Pseudomonas fluorescens*, siendo el sustrato glucosa y viniendo la muestra acuosa de materia orgánica de un suelo de superficie (0-30 cm)
35 de un campo no cultivado de la región mediterránea. La figura muestra la cinética de aparición de fluorescencia que corresponde a la acumulación del revelador redox en forma reducida. El testigo corresponde a la cepa bacteriana en presencia del revelador, pero sin glucosa. La muestra acuosa de materia orgánica, que presenta un contenido de carbono de 226 mg C/L, a una actividad catabólica bacteriana, deducida de la curva, evaluada a 20 mg C/L (100 mg Glu/L $\leftrightarrow$ 6,7 mg C/L), lo que corresponde al 9% del contenido total.

40 [0057] Este tipo de medida ofrece una indicación de la forma en que una muestra acuosa de materia orgánica puede ser degradada por las bacterias del suelo.

Reactividad con cationes metálicos:

45 [0058] El componente del suelo puede ser un catión metálico, por ejemplo elegido entre Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} y Cd^{2+} .

[0059] El catión metálico está en solución ácida (por ejemplo a pH 2).

50 [0060] Según un ejemplo fuera de la invención, se analiza la extinción («quenching») de la fluorescencia de la materia orgánica que forma complejo con el catión metálico presente en concentraciones crecientes (Ryan y Weber, 1982).

55 [0061] Según un ejemplo fuera de la invención, la reacción de formación de complejo de metales con las materias orgánicas de la muestra se realiza en los pocillos de la microplaca. Se añaden 10 μl de solución de catión o cationes metálicos a concentraciones crecientes (0 a $2,5 \cdot 10^{-3}$ M a pH 3 a 4 en HCl 0,1 M) a 200 μl de muestras y 50 μl de tampón (N-metil-piperacina 0,1 M en KNO_3 0,1 M, pH 9,3). El tiempo de reacción es de dos minutos después

de la mezcla.

[0062] Las longitudes de onda usadas para la detección corresponden a las de la materia orgánica (λ_{ex} 330 nm y λ_{em} 440 nm). La formación de complejo de los cationes por la materia orgánica genera una disminución de la intensidad de fluorescencia.

[0063] La interpretación de los resultados puede hacerse de dos formas, en función del uso o no de un análisis matemático. En primer lugar, la interpretación puede realizarse por simple cálculo del porcentaje de la muestra que forma complejo, y compararse así con otras muestras o suministrar un orden de magnitud de la interacción entre la muestra y el catión metálico. La lectura simple puede hacerse en la concentración de catión metálico que se añadirá para atenuar la señal de fluorescencia del 50% (LD50 equivalente) con una rejilla de lectura en tres niveles: menos de 20 μM (formación de complejo alta), entre 20 y 100 μM (formación de complejo media), más de 100 μM (formación de complejo baja). En segundo lugar, la interpretación de los resultados puede realizarse con ayuda del modelo simple de afinidad/saturación (de tipo Michaelis-Menten o Langmuir) que suministra un parámetro cuantitativo: la afinidad entre las materias orgánicas solubles y el catión metálico.

[0064] Los resultados en bruto se comunican en términos de intensidad de fluorescencia relativa (intensidad de fluorescencia medida, con respecto a la intensidad de fluorescencia del pocillo con la muestra en solitario) en función de la concentración en cationes metálicos. La regresión no lineal entre la curva obtenida y el modelo de afinidad-saturación, efectuada con ayuda del programa libre WinReg (http://www.unilim.fr/pages_perso/jean.debord/winreg/winreg1.htm) proporciona los parámetros de formación de complejo: la constante de equilibrio (K_c) y la cantidad total de metal en complejo en saturación.

[0065] La figura 4 presenta los resultados obtenidos con varios cationes (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+}). La figura muestra la amplitud de la atenuación de fluorescencia de una muestra de suelo observada durante adiciones crecientes de concentraciones de cationes metálicos. Los puntos corresponden a los resultados experimentales y las curvas se han establecido según un modelo de afinidad/saturación. Las afinidades de la muestra de materia orgánica que provienen de un extracto acuoso de suelo agrícola de Vaucluse obtenidas para los cationes de la figura 4 son: 51,4 μM para Cu^{2+} , 70,0 μM para Ni^{2+} y un valor infinito para Cr^{3+} ya que no se observa ninguna formación de complejo. La afinidad representa la concentración de catión metálico que se añadirá para obtener la semisaturación, con lo que cuanto más bajo es el valor más intensa es la afinidad.

[0066] Según otro ejemplo fuera de la invención, se analiza el aumento de la fluorescencia de la materia orgánica relacionada con la inhibición competitiva de la formación de complejo de la materia orgánica con el catión metálico por un ligando del catión metálico de afinidad conocida para el catión.

[0067] Según un ejemplo fuera de la invención, se mide la emisión de fluorescencia de la mezcla de una cantidad dada de materia orgánica y de catión metálico y se compara con las intensidades de fluorescencia medidas en presencia además de un ligando del catión metálico o de varios ligandos del catión metálico, tomados por separado, conociéndose la afinidad de los ligandos para el catión metálico. Los ligandos se añaden preferentemente en una cantidad dada de forma que el aumento de fluorescencia en presencia de ligando, con respecto al control sin ligando, esté correlacionada con la afinidad del ligando para el catión metálico.

[0068] Los resultados pueden referirse en términos de intensidad de fluorescencia relativa (intensidad de fluorescencia medida en presencia de ligando con respecto a la intensidad de fluorescencia medida en ausencia de ligando) en función de la afinidad de los ligandos del catión metálico usados.

[0069] Los ejemplos de ligandos de catión metálico incluyen EDTA y derivados de EDTA, diferentes ácidos carboxílicos, los derivados del fenol o incluso aminas.

Reactividad con microcontaminantes orgánicos:

[0070] El componente del suelo puede ser un microcontaminante orgánico, tal como un pesticida (por ejemplo atracina) o un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), tal como el fenantreno (siendo los HAP los contaminantes sistemáticos del suelo de las antiguas fábricas de gas y las coquerías).

[0071] Según un ejemplo fuera de la invención, se analiza la variación de la fluorescencia de la materia orgánica usando un microcontaminante orgánico, en el que se hace variar la concentración.

[0072] En un ejemplo fuera de la invención, la reacción de formación de complejo de los microcontaminantes por las materias orgánicas de la muestra se realiza en los pocillos de la microplaca. Se añaden 10 µl de una solución de microcontaminante de concentraciones crecientes (0 a 10^{-4} M) a 200 µl de muestras y 50 µl de tampón (N-metilpiperacina 0,1 M, pH 9,3 en KNO_3 0,1 M). El tiempo de reacción es de dos minutos después de la mezcla.

[0073] Las longitudes de onda usadas para la detección corresponden a las de la materia orgánica (λ_{ex} 330 nm y λ_{em} 440 nm). La formación de complejo de los contaminantes por la materia orgánica genera una disminución de la intensidad de fluorescencia.

[0074] Los resultados en bruto se comunican en términos de intensidad de fluorescencia relativa (intensidad de fluorescencia medida y con respecto a la intensidad de fluorescencia del pocillo con la muestra en solitario) en función de la concentración de microcontaminante. La regresión no lineal entre la curva obtenida y el modelo de afinidad-saturación proporciona los parámetros de formación de complejo: la constante de equilibrio (K_c) y la cantidad total de microcontaminante en complejo en saturación.

[0075] La figura 5 presenta los resultados obtenidos con un contaminante (isoproturón). La figura muestra la amplitud de la desactivación de fluorescencia de dos extractos acuosos del mismo suelo (correspondientes al primer al suelo muestreado en superficie (0-30 cm) y para la segunda muestra a una profundidad comprendida entre 30-60 cm) observada durante las adiciones de concentraciones crecientes de un microcontaminante orgánico no fluorescente (isoproturón). Los puntos representan los resultados experimentales y las rectas representan las aproximaciones lineales de estos puntos.

[0076] La interpretación puede hacerse según la amplitud de variación de la intensidad de fluorescencia (desactivación o quenching) observada durante un aumento de un factor 2 de la concentración en microcontaminante orgánico. Esto corresponde a un parámetro conocido generalmente por el término Q_2 . El Q_2 medido por las muestras 1 y 2 (Figura 5) es respectivamente del 3,3 y el 3,1% calculado en la extensión de las concentraciones de isoproturón sometidas a ensayo. Q_2 inferiores al 5% (reactividad baja con el microcontaminante orgánico), entre el 5 y el 25% (reactividad media) y por encima del 25% (reactividad elevada).

[0077] Según otro ejemplo fuera de la invención, se analiza la extinción («quenching») de la fluorescencia de un microcontaminante orgánico fluorescente tal como proponen Fang y col., 1998. Como microcontaminante orgánico fluorescente se pueden citar los compuestos de la familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o ciertos pesticidas. Esta forma de realización permite liberarse de la medida de fluorescencia de la materia orgánica de la muestra, si se desea.

Kit:

[0078] La solicitud describe igualmente un kit para la implementación del procedimiento tal como se define anteriormente, que comprende una microplaca y al menos un recipiente que contiene una muestra de suelo seco o un componente de un suelo.

[0079] La invención tiene igualmente por objeto un kit para la implementación del procedimiento según la invención, que comprende una microplaca, al menos un recipiente que contiene un componente de un suelo, siendo dicho componente de un suelo un microorganismo, y un revelador redox fluorescente sensible al catabolismo de la materia orgánica de una muestra acuosa de materia orgánica sujeta a prueba.

[0080] El kit puede comprender así un recipiente que contiene una primera muestra de suelo seco o un primer componente de un suelo, y al menos un recipiente que contiene una segunda muestra de suelo seco o un segundo componente de un suelo.

[0081] Pueden añadirse soluciones tampón, sustratos enzimáticos y/o reveladores redox.

[0082] La figura 6 es un esquema general de la microplaca usada en los ejemplos anteriores: MES: ácido 2[N-morfolino]jetanosulfónico; MSM: medio salino mineral; μ orgs: microorganismos; NMP: N-metilpiperacina; mPO: microcontaminante orgánico; POi: i-ésima concentración del microcontaminante orgánico.

BIBLIOGRAFÍA

[0083]

- Abe y col. (2002) Neuroscienceletters, 326(3): p. 179-182
- Chen y col. (2000) Free Radical Biology and Medicine 28(8): p. 1266-1278
- 5 - Fang y col. (1998) Analytica Chimica 373 139-151
- Gloeckner y col. (2001) Journal of immunological methods, 252(1-2):p. 131-138
- 10 - Ryan y Weber, (1982) Environ. Sci. Technol. 16, 866-872

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de determinación de la reactividad biogeoquímica de una muestra acuosa de materia orgánica, en el que se evalúa el destino de dicha materia orgánica en un suelo, que comprende:
 - a. la mezcla de la muestra con un componente de un suelo con el que la muestra es susceptible de reaccionar, siendo dicho componente de un suelo un microorganismo; y
 - b. el análisis en microplaca de la fluorescencia emitida por dicha mezcla en presencia de un revelador redox fluorescente sensible al catabolismo de la materia orgánica de la muestra;una variación de fluorescencia, con respecto a la fluorescencia emitida por el componente del suelo en ausencia de la muestra o por la muestra en ausencia del componente del suelo, que es indicadora de la capacidad de la muestra de ser degradada por un microorganismo del suelo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en forma de una prueba multiformato, que comprende la mezcla de la muestra con varios componentes del suelo tomados por separado, y el análisis de la fluorescencia en la misma microplaca.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el componente del suelo es un microorganismo elegido entre bacterias u hongos.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el componente del suelo es un microorganismo elegido entre *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* 4B, *Acetogenium*, *Fusarium*.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el componente del suelo es un microorganismo anaerobio.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que se colocan una o dos gotas de parafina en el pocillo lleno de la microplaca analizada en la etapa b) con el fin de detener la transferencia de oxígeno y de situarse así en condiciones anaerobias.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el revelador es 2,3,4,5,6-pentafluorodihidrotetrametilrosamina, o resazurina.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra acuosa de materia orgánica se elige entre lodos de estaciones de depuración, residuos o efluentes agroindustriales, aguas de lagos, suelos, ríos y aguas marinas o subterráneas.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra acuosa de materia orgánica no está constituida por ácido fúlvico.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que un pocillo de la microplaca contiene un volumen inferior a aproximadamente 1 ml de dicha mezcla.
11. Kit para la implementación del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende una microplaca, al menos un recipiente que contiene un componente de un suelo, siendo dicho componente de un suelo un microorganismo, y un revelador redox fluorescente sensible al catabolismo de la materia orgánica de una muestra acuosa de materia orgánica sujeta a prueba.
12. Kit según la reivindicación 11, que comprende al menos un recipiente que contiene un primer componente de un suelo, siendo dicho primer componente de un suelo un microorganismo, y al menos un recipiente que contiene una muestra de suelo seco o un segundo componente de un suelo.

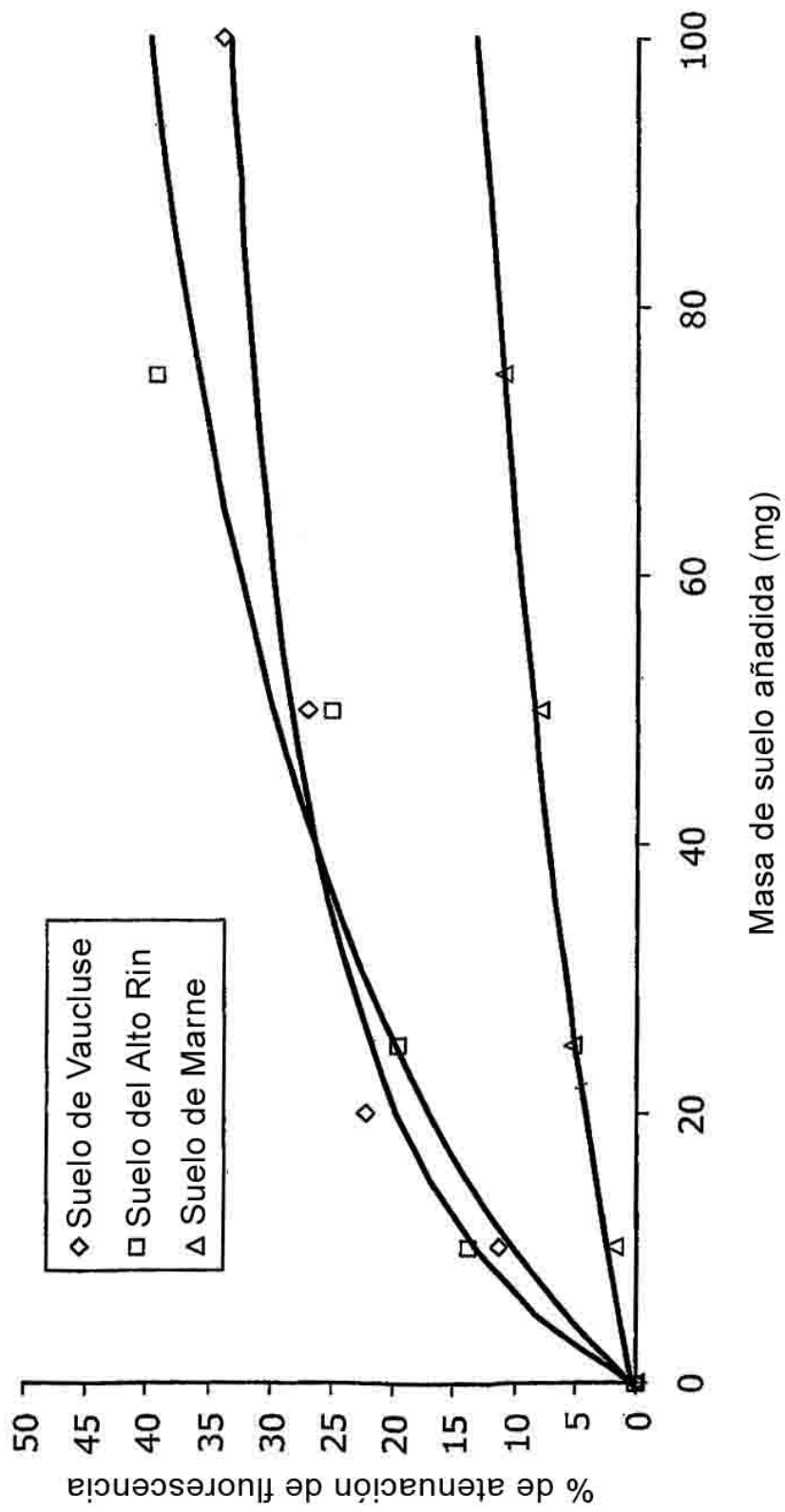


FIG.1

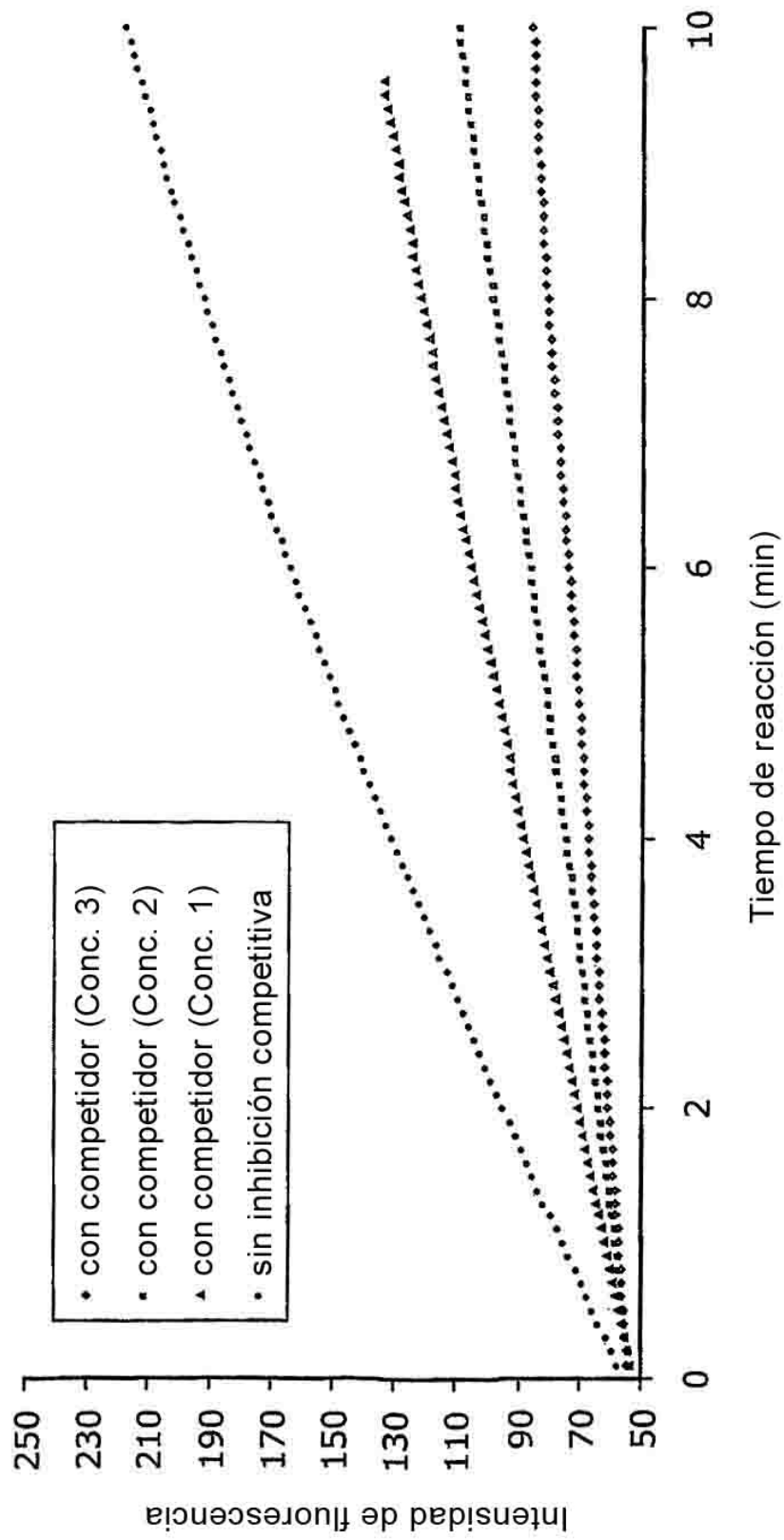
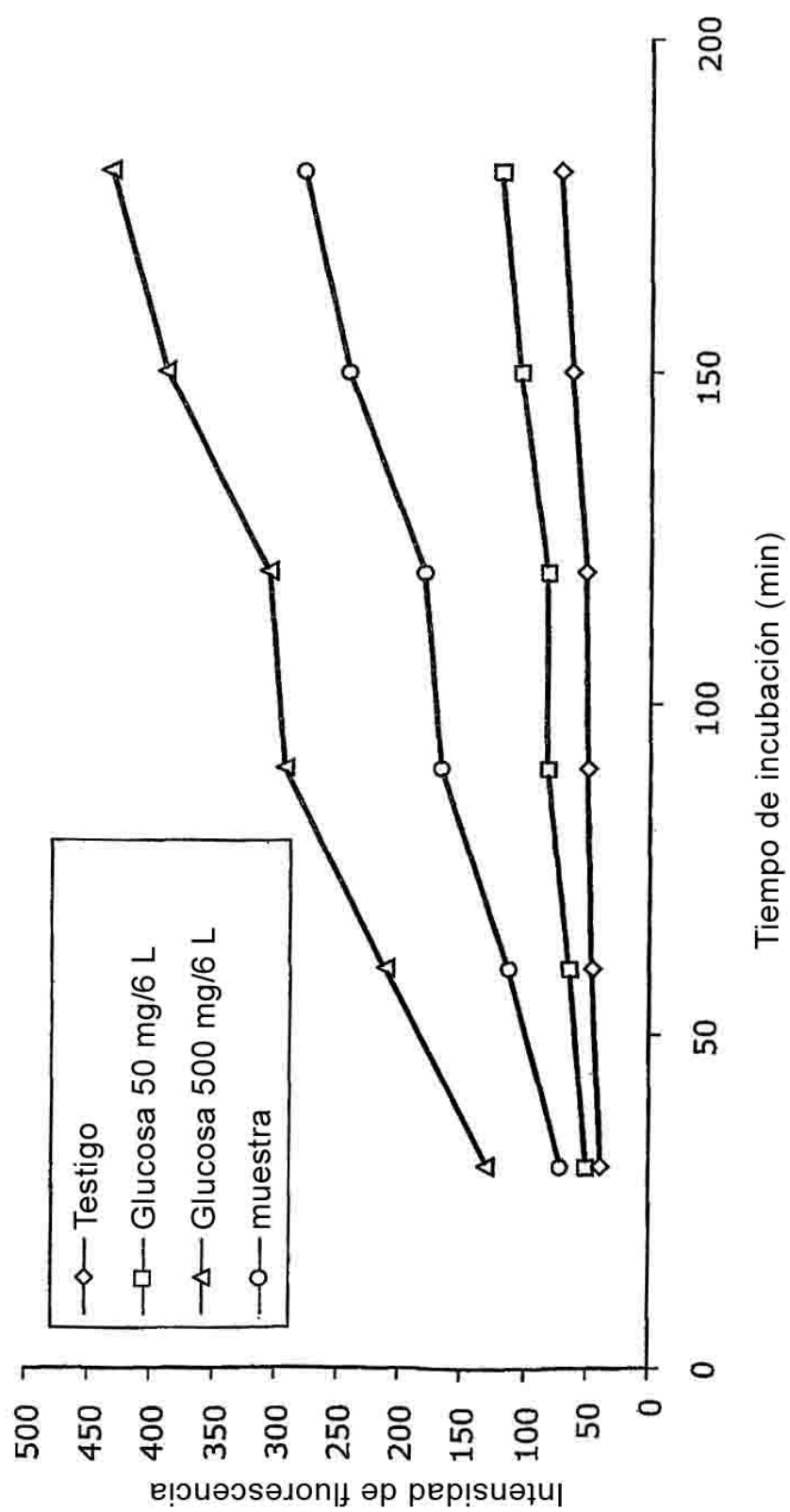


FIG.2

**FIG.3**

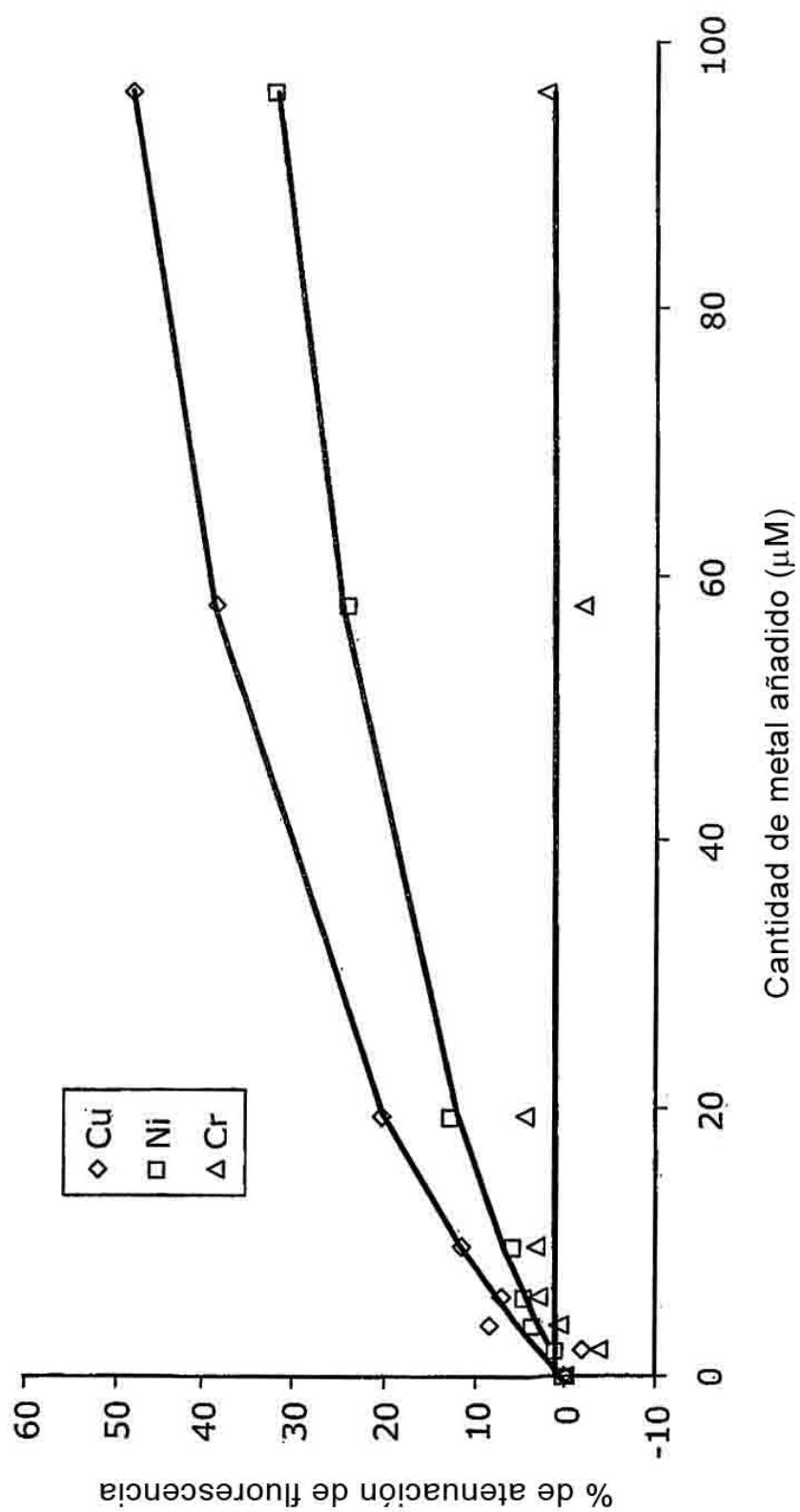


FIG.4

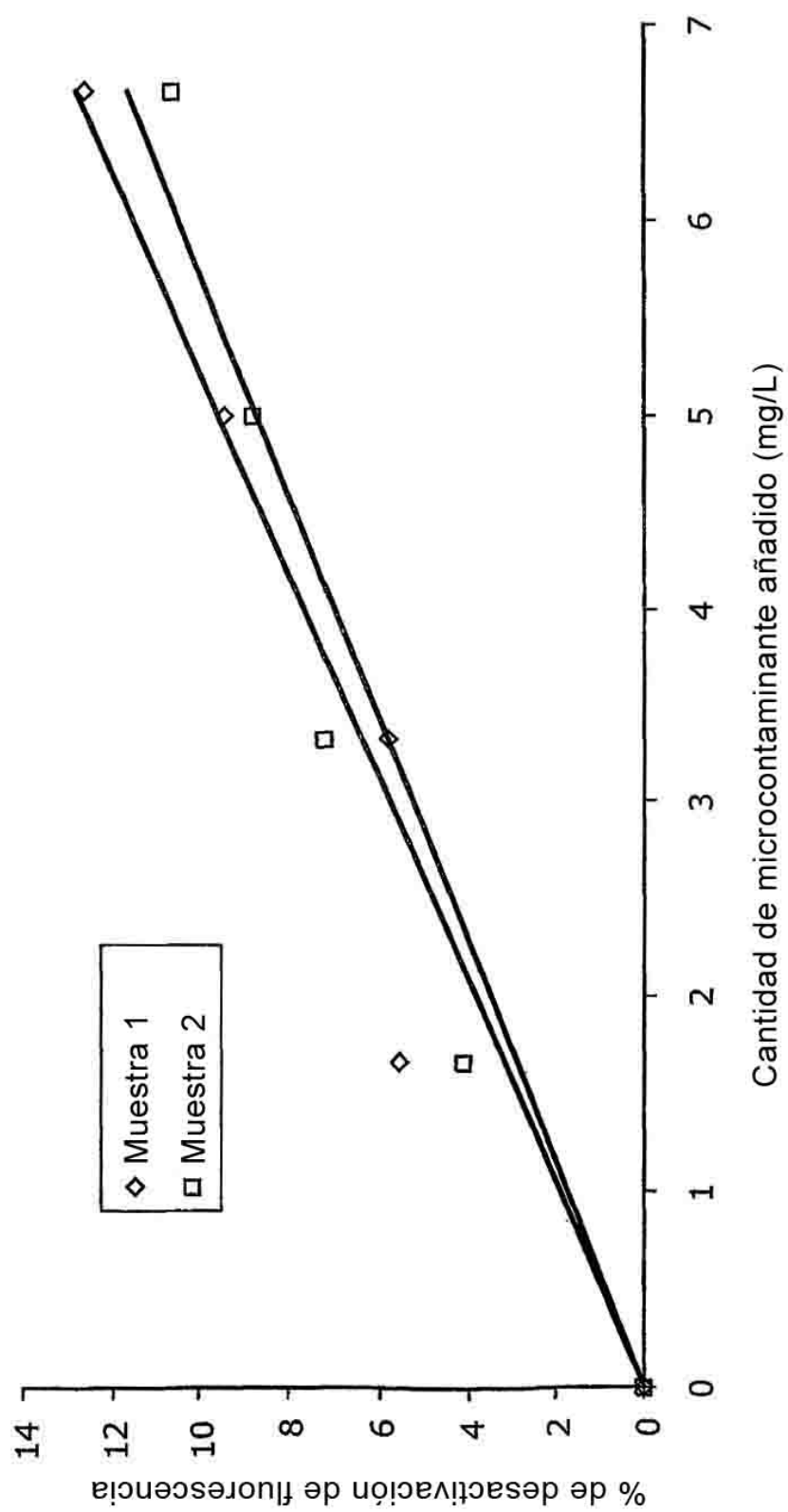


FIG.5

Suelo seco		Enzima		Microorganismo		Cationes metálicos		Microcontaminantes	
Mues: muestra T: tampón MES 0,1 M pH 6,3 KNO ₃ 0,1 M S: 5-100 mg suelo seco 25°C, 24 h Centrif.: 10.000 rpm, 5 min		Mues: muestra T: tampón MES 0,1 M pH 6,3 KNO ₃ 0,1 M E: enz. 1 U/6 mL MES S: sus. 10-5 M MES		Mues: muestra T: MSM pH 7,1 B: μ org 107/6 mL en MSM R: Azul Al. 30% MSM		Mues: muestra T: NMP 0,1 M pH 9,3, KNO ₃ 0,1 M M: cat. met. 0 a 3•103M pH 3-4 HCl 0,1 M		Mues: muestra T: NMP 0,1 M pH 9,3 KNO ₃ 0,1 M POI: 0 a 10-4 M NMP 0,1 M	
200 μ L Mues. 50 μ L T	1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m4mg S1 Centrif.→270 μ L	90 μ L S 90 μ L T 90 μ L H ₂ O	90 μ L R 90 μ L T 90 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L HCl pH-3	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L T
1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m1mg S1 Centrif.→270 μ L	1000 μ L Mues. 250 μ L T m4mg S1 Centrif.→270 μ L	90 μ L S 90 μ L T 90 μ L Mues.	90 μ L R 90 μ L Mues. 90 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]1	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]1	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]1	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]1	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]1	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]1
1000 μ L Mues. 250 μ L T m1mg S1 Centrif.→270 μ L	1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m5mg S1 Centrif.→270 μ L	90 μ L S 90 μ L E1 90 μ L H ₂ O	90 μ L R 90 μ L B1 90 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]2	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]2	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]2	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]2	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]2	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]2
1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m2mg S1 Centrif.→270 μ L	1000 μ L Mues. 250 μ L T m5mg S1 Centrif.→270 μ L	90 μ L S 90 μ L E1 90 μ L Mues.	90 μ L R 90 μ L B1 90 μ L Mues.	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]3	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]3	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]3	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]3	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]3	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]3
1000 μ L Mues. 250 μ L T m2mg S1 Centrif.→270 μ L	1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m6mg S1 Centrif.→270 μ L	Repetición 90 μ L S 90 μ L T 90 μ L H ₂ O	Repetición 90 μ L R 90 μ L T 90 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]4	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]4	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]4	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]4	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]4	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]4
1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m3mg S1 Centrif.→270 μ L	1000 μ L Mues. 250 μ L T m6mg S1 Centrif.→270 μ L	Repetición 90 μ L S 90 μ L T 90 μ L Mues.	Repetición 90 μ L R 90 μ L Mues. 90 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]5	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]5	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]5	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]5	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]5	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]5
1000 μ L Mues. 250 μ L T m3mg S1 Centrif.→270 μ L	1000 μ L H ₂ O 250 μ L T m7mg S1 Centrif.→270 μ L	Repetición 90 μ L S 90 μ L E1 90 μ L H ₂ O	Repetición 90 μ L R 90 μ L B1 90 μ L T	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]6	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]6	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]6	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]6	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]6	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]6
	1000 μ L Mues. 250 μ L T m7mg S1 Centrif.→270 μ L	Repetición 90 μ L S 90 μ L E1 90 μ L Mues.	Repetición 90 μ L R 90 μ L B1 90 μ L Mues.	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]7	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]7	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]7	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]7	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]7	200 μ L Mues. 50 μ L T 10 μ L [M1]7

FIG.6