

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 772**

51 Int. Cl.:

B01D 61/12 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

B01D 65/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2012 PCT/IL2012/050080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120517**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2012 E 12719453 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2683472**

54 Título: **Procedimientos y dispositivos de manipulación de la bioincrustación**

30 Prioridad:

07.03.2011 US 201161449887 P

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

15.09.2017

73 Titular/es:

**MEKOROT WATER COMPANY LTD. (100.0%)
9 Lincoln Street
61201 Tel-Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**KOTZER, ELI y
ARMON, ROBERT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 632 772 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

Procedimientos y dispositivos de manipulación de la bioincrustación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a la bioincrustación y, específicamente, a procedimientos y dispositivos para predecir y reducir la bioincrustación en sistemas fluidos, tales como sistemas de desalinización.

Antecedentes de la invención

El problema de la bioincrustación de membranas, tuberías, torres de refrigeración y otras superficies en contacto con el agua, es un problema constante en los procedimientos y sistemas relacionados con el agua, y, particularmente, en los procesos de desalinización de agua.

10 El desarrollo de la bioincrustación en las superficies de membranas presenta uno de los problemas más graves en el funcionamiento de las plantas de desalinización basadas en la tecnología de ósmosis inversa (RO, *reverse osmosis*), especialmente para la desalinización de aguas residuales tratadas después del tratamiento secundario.

15 La capa de bioincrustación en las membranas provoca un aumento en la presión de entrada, una disminución en el flujo de producto y un aumento en la disminución de la presión en la superficie de las membranas entre el lado de alimentación y el lado de concentración. Estos cambios provocan una disminución de la producción de las instalaciones de desalinización, un aumento en el consumo de energía y una necesidad frecuente de limpieza química de las membranas con el fin de eliminar las capas de bioincrustación.

El desarrollo de la contaminación biológica es el resultado de la adsorción y el crecimiento de microorganismos, que se encuentran en el agua de alimentación, en las superficies de la membrana.

20 Existen varios procedimientos para la predicción de la bioincrustación, algunos son pruebas de laboratorio que incluyen AOC (carbono orgánico asimilable), BDOM (materia orgánica disuelta biodegradable), DBO (demanda bioquímica de oxígeno), DOC (carbono orgánico disuelto), TBC (recuento de microorganismos totales), TOC (carbono orgánico total). Para las pruebas de campo, la mayoría de las mediciones se basan en el crecimiento de biopelícula en las superficies de medición. Existen varios kits comerciales de identificación de biopelículas, que detectan la presencia de biopelícula; el más habitual de estos es el kit de la prueba de la reacción de la actividad biológica (BART) o el kit de la prueba HydroBio.

25 También se describieron colorantes para detectar microorganismos. [Turner Nikki, W. E. Sandine, P. R. Elliker y E. A. Day, "Use of Tetrazolium Dyes in an Agar Medium for Differentiation of Streptococcus Lactis and Streptococcus Cremoris", *Journal of Dairy Science*, 46:380-385 (1963); Hayashi Shuhei, Takeshi Kobayashi y Hiroyuki Honda, "Simple and rapid cell growth assay using tetrazolium violet coloring method for screening of organic solvent tolerant bacteria", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4):360-363 (2003)].

30 Armon y col., (*Journal of Biotechnology* 51, (1996), 279-285) describen aplicaciones de sol-gel en biotecnología ambiental.

Sumario de la divulgación

35 La presente divulgación proporciona, de acuerdo con un aspecto, un biosensor como se define en las reivindicaciones, que comprende un armazón que comprende una matriz formada a partir de un material de formación de armazón que comprende uno o más polisacáridos que tienen una temperatura de transición de fase sólida a líquida a una temperatura por encima de 35 °C y no más de 95 °C y que se convierte en una estructura sólida o semisólida tras el enfriamiento y un complejo de colorante, el complejo de colorante comprende un material de arcilla asociado con un material de colorante en el que el material de colorante proporciona una señal detectable en presencia de microorganismos; en el que el complejo de colorante está incrustado, al menos parcialmente, en el armazón y el armazón está caracterizado por poros y / o huecos.

40 En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de un biosensor como se define en las reivindicaciones, el procedimiento comprende: (i) mezclar un complejo de colorante que comprende un material de arcilla y un material de tinte que proporciona una señal detectable en presencia de microorganismos con un material formador de armazón que comprende uno o más polisacáridos que tienen una temperatura de transición de fase de sólido a líquido a una temperatura por encima de 35 °C y no más de 95 °C y que se convierte en una estructura sólida o semisólida al enfriarse a una temperatura a la cual el complejo de colorante y el material que forma un armazón están en una mezcla acuosa fluida tal como una temperatura entre 35 °C y 95 °C; ii) añadir a la mezcla de fluidos un reactivo no electrolítico; y (iii) enfriar la mezcla fluida con el reactivo no electrolítico a una temperatura a la que se solidifica la mezcla; por lo que se forma un biosensor que comprende el armazón caracterizado por poros y / o huecos y el complejo de colorante que está al menos parcialmente incrustado en el armazón.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un aparato como se define en las reivindicaciones,

que comprende al menos una entrada de fluido y al menos una salida de fluido, estando dicha entrada de fluido y salida de fluido en comunicación fluida; estando situada una cámara biosensora entre la entrada de fluido y la salida de fluido y que comprende un biosensor como se define en el presente documento.

5 También se describe un procedimiento como se define en las reivindicaciones para detectar microorganismos viables en una muestra de ensayo de fluido acuoso, que comprende

(a) poner en contacto la muestra de ensayo de fluido acuoso con un biosensor como se describe en el presente documento;

(b) detectar una intensidad de señal del biosensor, siendo la intensidad de señal indicativa de la presencia de microorganismos en la muestra de ensayo de fluido acuoso.

10 En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para predecir la bioincrustación en un sistema de flujo fluido, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra de fluido acuoso del sistema de flujo de fluido acuoso, con un biosensor como se define en el presente documento; (b) detectar una intensidad de señal en el biosensor, siendo la intensidad de señal correlativa con el potencial del sistema de flujo fluido para formar bioincrustación.

15 También se describe un procedimiento para determinar una concentración de desinfectante requerida para desinfectar un fluido acuoso, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto una o más muestras del fluido acuoso con una o más concentraciones diferentes de un desinfectante;

20 (b) poner en contacto cada una de una o más muestras que contienen el desinfectante con un biosensor que comprende (i) un armazón y (ii) un complejo de colorante que comprende un material de arcilla y un material colorante en el que el complejo de colorante está, al menos parcialmente, incrustado en el armazón;

(c) para cada una de las una o más muestras, detectar una intensidad de señal del biosensor;

25 (d) seleccionar una muestra para la cual la intensidad de señal está entre un intervalo determinado como un tratamiento eficaz para dicho fluido acuoso o para dicho desinfectante; en el que la concentración del desinfectante añadido a la muestra seleccionada es la concentración eficaz para desinfectar el fluido acuoso.

Breve descripción de los dibujos

Con el fin de entender la invención y de ver cómo se puede llevar a cabo en la práctica, a continuación se describirán realizaciones solo a modo de ejemplo no limitante, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

30 La **Figura 1** proporciona una ilustración esquemática en sección transversal de un aparato biosensor (10) de acuerdo con una realización de la invención.

La **Figura 2** proporciona un gráfico que muestra un índice de biopelícula para las tres alimentaciones de agua diferentes (a la etapa I, a la etapa II y a la etapa III en sistema de desalinización por ósmosis inversa), determinado usando un biosensor de acuerdo con una realización de la invención.

35 La **Figura 3** proporciona un gráfico que muestra el biovolumen (en μm^3) de biopelícula que ha crecido en una membrana de ósmosis inversa (RO) después de 15 días, para tres etapas de agua de alimentación diferentes, a la etapa I, a la etapa II y a la etapa III, siendo el biovolumen medido con una microscopía confocal de barrido láser (CLSM).

La **Figura 4** proporciona un gráfico que muestra un índice de bioincrustación en función de la concentración total de cloro en agua.

40 La **Figura 5** Proporciona un gráfico que muestra el biovolumen de la biopelícula que ha crecido en la membrana de RO para el agua de alimentación a la etapa I (alimentación I) sin cloraminas y para el agua de alimentación a la etapa I con cloraminas (alimentación I + CA) después de 15 días, medida con CLSM.

45 La **Figura 6** proporciona un gráfico que muestra el espesor de la biopelícula que ha crecido en la membrana de RO con agua de alimentación a la etapa I (alimentación I) y agua de alimentación a la etapa I con cloraminas (alimentación I + CA) después de 15 días, medida con CLSM.

La **Figura 7** proporciona una gráfica que muestra el flujo de permeado normalizado en función del tiempo de operación para una planta piloto con dosis bajas de cloraminas, según se determina con la prueba de biosensor.

Descripción detallada de las realizaciones

50 La presente divulgación se basa en el desarrollo de un material biosensible inmovilizado que permite la detección incluso de pequeñas cantidades de microorganismos en el líquido que fluye. El material biosensible se incorporó de

este modo en un sistema de comunicación fluida para permitir la predicción de la bioincrustación y, de este modo, evitar el taponamiento de las membranas como resultado de la formación de bioincrustación.

La presente divulgación proporciona un campo fiable, cuantitativo y reproducible, biosensor y aparato en tiempo real, que los contiene para determinar el potencial de formación de bioincrustación.

- 5 Además, como se tratará más adelante en el presente documento, el biosensor permite la correlación entre sus mediciones y el potencial de bioincrustación en el fluido de entrada (fluido que fluye, por ejemplo, agua que fluye), y determinar un posible protocolo de tratamiento de fluido, basado en los resultados de la correlación.

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un biosensor como se define en el presente documento.

- 10 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de un biosensor como se define en el presente documento.

El "**armazón**" es una matriz formada a partir de un **material formador del armazón**. El material formador de armazón puede ser un material formador de armazón natural, semisintético o sintético que tiene una temperatura de transición de fase de sólido a líquido por encima de 35 °C, a veces por encima de 50 °C e incluso por encima de 65 °C. La temperatura de transición de fase no es superior a 95 °C. El armazón es de un tipo al que los microorganismos son capaces de adherirse y los microorganismos adheridos son capaces de crecer encima. Además, el armazón se caracteriza por poros / huecos cuyas dimensiones se manipulan en presencia de un agente químico o de condiciones físicas. Por ejemplo, la deshidratación de un material formador de armazón puede dar como resultado la retracción de los huecos del armazón. La deshidratación puede conseguirse exponiendo material formador de armazón a alcohol.

Al enfriar, el material formador de armazón se solidifica. En el contexto de la presente divulgación, la solidificación incluye la transición a una forma sólida así como semi(casi) sólida.

El material formador de armazón comprende uno o más polisacáridos.

- 25 En una realización, el armazón es agar, que se sabe que se produce a partir de algas y está compuesto por una mezcla de dos polisacáridos: agarosa y agarpectina. Aunque el agar es bien conocido en la materia, las Tablas 1A y 1B proporcionan algunas propiedades del agar que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación.

En las **Tablas 1A** y **1B** se proporcionan algunas propiedades de agar e ingredientes inorgánicos de agar, respectivamente (obtenidos de <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Agars.pdf>).

Tabla 1A: Propiedades del agar (1,5 % en agua)

% de cenizas	3,6
Claridad (NTU)	4,3
Pérdida por desecación (%)	17,3
pH	6,5
Resistencia del gel (g/cm ²)	600
Punto de gelificación (°C)	35 °C
Punto de fusión (°C)	88 °C

- 30 **Tabla 1B:** Ingredientes inorgánicos del agar (1,5 % en agua)

Elemento	%
Calcio	0,179
Cloruro	0,021
Cobalto	<0,001
Cobre	<0,001
Hierro	0,002
Plomo	<0,001
Magnesio	0,068

Los formazanos tienen una variedad de colores que van desde el azul oscuro al rojo oscuro a naranja, dependiendo de las propiedades químicas originales del compuesto de tetrazolio que están determinadas por los diversos grupos orgánicos unidos al anillo tetrazol (representado por los restos R). El cambio de color puede detectarse en pocas horas en luz visible o bajo radiación ultravioleta.

5 En general, los compuestos de tetrazolio pueden dividirse en subgrupos, de acuerdo con el sitio en el que la actividad de reducción del compuesto de tetrazolio con respecto a la célula de microorganismos:

(i) compuestos de tetrazolio que producen un derivado de formazán que es soluble en agua. La reducción de tales compuestos de tetrazolio tiene lugar fuera de las células del microorganismo.

10 (ii) Compuestos de tetrazolio que producen un derivado de formazán que no es soluble en agua. Tales compuestos de tetrazolio, especialmente el grupo de monotetrazolio, penetran en la envoltura celular y, por tanto, la reacción de reducción tiene lugar dentro de la célula.

Los compuestos de tetrazolio se pueden seleccionar del grupo no limitante que consiste en cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), bromuro de 2-(4,5-dimetiltiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), sal interna de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazolio de sodio (XTT), sal interna de 5-[3-(carboximetoxi)fenil]-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (TTC), sal interna de 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio de sodio (WST-1), cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (rojo tetrazolio), cloruro de 2,5-difenil-3-[alfa-naftil]-1-tetrazolio (violeta de tetrazolio), cloruro de 3,3'-(4,4'-bifenil)bis(2,5-difenil-2H-tetrazolio (cloruro de neotetrazolio), cloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)bis(2,5-difenil-2H-tetrazolio (cloruro de azul tetrazolio), cloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)bis[2-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio] (tetrazolio de nitroazul) o cloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)bis[2,5-bis(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio] (tetrazolio de tetranitroazul).

En una realización preferente, el material colorante es del tipo que se metaboliza dentro del microorganismo. Esto asegura que una vez que el biosensor se pone en contacto con el fluido que fluye y se crea la señal, la señal no se elimina del biosensor.

25 De acuerdo con esta realización, pueden usarse varios compuestos de tetrazolio, preferentemente compuestos de monotetrazolio.

En la **Tabla 2** se proporcionan ejemplos de compuestos de monotetrazolio específicos que entran en las células para someterse a una reacción de reducción por la cual se crea un color.

Tabla 2: compuestos de monotetrazolio

Nombre del compuesto	Peso molecular (g/mol)
Cloruro de trifeniltetrazolio	334,8
Rojo tetrazolio	348,5
Violeta de tetrazolio (C ₂₃ H ₁₇ ClN ₄)	384,84
(Fuente: Graham D. Horace, 1967)	

30 De acuerdo con una realización, el compuesto de tetrazolio es el violeta de tetrazolio (también conocido como cloruro de 2,5-difenil-3-[alfa-naftil]-1-tetrazolio).

35 Con el fin de asegurar el atrapamiento del material colorante, se forma un complejo con un material de arcilla, que actúa como anclaje del colorante. La interacción (asociación) entre el material colorante y el material de arcilla es no covalente, como se ha tratado anteriormente. En una realización, la interacción se basa en la interacción iónica entre el material colorante cargado positivamente y el material de arcilla cargada negativamente, lo que da como resultado un complejo de colorante de alto peso molecular.

Debe entenderse que el "**material de arcilla**" se refiere a cualquier silicato de aluminio compuesto principalmente por minerales granulados.

40 En una realización, el material de arcilla comprende minerales de arcilla. Los minerales de arcilla son filosilicatos de aluminio hidratado que comprenden cantidades variables de hierro, magnesio, metales alcalinos, alcalinotérreos y otros cationes.

Sin limitarse a ello, el mineral de arcilla puede seleccionarse del grupo que consiste en caolín, esmectita, clorito de illitem, sepiolita y atapulgita.

45 En una realización preferida, el mineral de arcilla es caolín. El caolín es una sustancia pulverulenta blanca que comprende, principalmente, el mineral caolinita, así como otros minerales, tales como dickita, haloisita y nacrita. El caolín es bien conocido en la materia y está comercialmente disponible en diversas formas.

El caolín, así como otros minerales de arcilla, pueden denominarse "**intercambio catiónico**", ya que los materiales de arcilla usualmente comprenden una carga negativa sobre su superficie y, por lo tanto, son capaces de adsorber y mantener especies cargadas positivamente.

5 Sin estar limitado por la teoría, la asociación entre los materiales colorantes y el material de arcilla implica la interacción entre el material colorante cargado positivamente que es adsorbido sobre la superficie del material de arcilla iónica formando así el complejo de colorante.

Una ventaja del uso de caolín como material de arcilla reside en su color blanco natural, que sirve como un color de fondo para permitir una detección clara del cambio de color sobre la superficie del biosensor.

10 En el ejemplo no limitativo de la presente invención, la cantidad de material colorante que quedó expuesta sobre una superficie del armazón que tiene un área superficial de 70 cm² fue suficiente para permitir la detección de al menos 40 UFC / ml de microorganismo (a un TOC de al menos 1,2 mg / l).

De acuerdo con algunas realizaciones, el complejo de colorante tiene un peso molecular en el intervalo de 300 g / mol a 1500 g / mol, preferentemente en el intervalo de 500 g / mol a 1300 g / mol, más preferentemente en el intervalo de 700 g / mol a 1300 g / mol.

15 El atrapamiento o incrustación, que es un atrapamiento físico (mecánico) del complejo de colorante en el armazón, puede conseguirse exponiendo el material formador de armazón a un agente químico tal como un reactivo no electrolítico, que da como resultado la retracción del material formador de armazón. El reactivo no electrolítico puede entenderse que indica cualquier sustancia química que no existe en forma iónica en una solución acuosa.

20 La retracción puede conseguirse por deshidratación (total o parcialmente) del material formador de armazón en presencia del complejo de colorante, como se tratará más adelante. Como resultado, el complejo de colorante está al menos parcialmente incrustado o atrapado en el armazón. En este contexto, debe entenderse que "*al menos parcialmente incrustado en el armazón*" significa que una porción del material colorante que responde a la presencia de microorganismos en el fluido se expone fuera del armazón, pero aún así, el complejo de colorante está atrapado de forma estable en el armazón.

25 De acuerdo con una realización, la incrustación del complejo de colorante en el armazón es proporcionada por la exposición del material formador de armazón a un alcohol. Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el biosensor comprende un alcohol.

30 El "**alcohol**" en el contexto de la invención indica un carbohidrato que contiene hidroxilo alifático o aromático saturado o no saturado, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, el alcohol es un alcohol, por ejemplo, alcohol C₁-C₂₀. Esto puede incluir, sin limitaciones a los mismos, alcohol metílico (metanol), alcohol etílico (etanol), alcohol terc-butílico, alcohol *n*-propílico, alcohol *iso*-propílico (alcohol *sec*-propílico), alcohol *n*-butílico, alcohol *iso*-butílico (alcohol *sec*-butílico).

En una realización preferida, el alcohol es etanol.

35 De acuerdo con la presente invención, y sin quedar limitado a teoría alguna, parece que el reactivo no electrolítico, tal como un alcohol añadido al armazón y al complejo de colorante, retrae los poros del armazón y, por tanto, mantiene físicamente el complejo de colorantes e impide la difusión del complejo de colorante del armazón polimérico, por ejemplo, en presencia de fluido que fluye.

40 El reactivo no electrolítico se añade a la mezcla del material formador de armazón y del material complejo de colorante cuando está en forma fluida. Para ello, se calienta la mezcla de los componentes, a saber, el material formador de armazón y el material de complejo de colorante. En algunas realizaciones, el calentamiento es a una temperatura entre 35 °C y 95 °C, a veces entre 55 °C y 85 °C adicionalmente a veces, a una temperatura en el intervalo de 45 °C-85 °C o incluso a 65 °C a 85 °C. A continuación, se añade una cantidad predeterminada del reactivo no electrolítico, estando la cantidad en correlación con el nivel de retracción deseado.

45 En algunas realizaciones, el material colorante y el material de arcilla se mezclan a un pH en el intervalo de pH 4 a pH 6. En una realización particular; la mezcla está a un pH de 4,5±0,5.

50 La mezcla homogénea formada de este modo se enfría después a una temperatura a la cual la mezcla forma una estructura sólida o semisólida. En algunas realizaciones, la temperatura puede estar entre 10 °C y 35 °C, preferentemente entre 20 °C y 30 °C y, a veces, entre 20 °C y 25 °C. En algunas realizaciones, el material formador de armazón se añade en exceso al material colorante. En una realización, la mezcla está en una proporción estequiométrica de 2:1, a veces de 3:1 e incluso de 4:1 entre el material formador de armazón y el complejo de colorante.

El biosensor en un sólido o semisólido puede proporcionarse en diversas formas. En una realización, el complejo de colorante incrustado en el armazón se proporciona como un laminado o capa sobre una placa. Con este fin, la mezcla fluida puede verterse en un molde, tal como una placa, que cubre la superficie de la placa. El biosensor en

forma de un laminado puede definirse de modo que tenga una superficie superior y una superficie inferior, exponiéndose el material al menos en la superficie superior del laminado.

5 La placa puede ser, por ejemplo, una placa de microtitulación (también conocida como microplaca o placa de micropocillos) preparada a partir de un material seleccionado de poliestireno, polipropileno, policarbonato o cicloolefinas. La microplaca puede tener cualquier número de pocillos. Las placas comercialmente disponibles comprenden 6, 12, 24, 48, 96, 384 o incluso 1536 pocillos de muestra.

De acuerdo con algunas otras realizaciones, el biosensor está en forma de materia en partículas con el material de colorante expuesto en la superficie exterior de la materia en partículas. Las partículas se pueden obtener usando técnicas de pulverización bien conocidas o cualquier otra técnica conocida que forme perlas.

10 A continuación, el material biosensible en partículas puede suspenderse en un tampón adecuado, en un recipiente o está alojado en una columna. Cuando está en forma de partículas, el diámetro puede variar y, en algunas realizaciones, la distribución de tamaño de la materia en partículas puede estar en el intervalo de 0,01 micrómetros a 10 micrómetros. Las partículas pueden ser de tamaño uniforme o de tamaño variable.

15 El biosensor puede ser desechable, para un solo uso, puede reutilizarse, para varias pruebas. Cuando se usa más de una vez, se purga entre usos. La purga puede conseguirse reemplazando el complejo de colorante con el nuevo complejo de colorante.

20 En el procedimiento para la preparación del biosensor, se encontró que la capacidad del armazón para atrapar un material dentro de sus poros depende del tamaño de poro del polímero y que el tamaño de los poros se puede ajustar usando una concentración más alta que la convencional (mayor que la recomendada por el fabricante) del material formador de armazón. El tamaño de poro reducido reduce el coeficiente de difusión (salida) del complejo de colorante atrapado dentro del armazón.

25 Por tanto, por ejemplo, aunque en medios de cultivo convencionales se utiliza agar en una concentración de 1,8 % en agua destilada (que es la concentración recomendada por los fabricantes de agar), los inventores han descubierto que, con el fin de obtener un atrapamiento óptimo del complejo de colorante en agar (óptimo en el sentido de que el complejo de colorante no se libera del biosensor una vez que el fluido fluye sobre el biosensor), la concentración de agar en la mezcla de fluidos debe incrementarse al menos por dos veces, a veces 3 veces e incluso 4 veces y, en los ejemplos específicos, se aumentó a 7,2 %.

En una realización particular, el biosensor comprende un complejo de colorante de caolín y violeta de tetrazolio incrustado en agar (el armazón).

30 Se observa que el agar es un gel a temperatura ambiente y permanece sólido a una temperatura tan alta como de 65 °C. El agar se funde a aproximadamente 85 °C y luego se solidifica a una temperatura por debajo de aproximadamente 45 °C, específicamente a un intervalo de temperaturas de 32 °C a 40 °C.

De acuerdo con esta realización, el biosensor se prepara mediante un procedimiento que comprende:

- 35 (a) mezclar un complejo de colorante que comprende caolín y violeta de tetrazolio con agar a una temperatura en el intervalo de 65 °C a 85 °C para formar una mezcla fluida que retiene el complejo de colorante y el agar en forma fluida acuosa;
 (b) añadir a la mezcla fluida etanol; y
 (c) enfriar la mezcla fluida con etanol hasta una temperatura en el intervalo de 20 °C-25 °C;

40 con lo que se forma un biosensor que comprende el complejo de colorante que está incrustado, al menos parcialmente, en agar.

Asimismo, la presente divulgación proporciona un aparato que comprende:

- al menos una entrada de fluido y al menos una salida de fluido en comunicación fluida;
 - estando situada una cámara biosensora entre la entrada de fluido y la salida de fluido y que comprende un biosensor que comprende:
 45 (i) un armazón;
 (ii) un complejo de colorante que comprende un material de arcilla asociado con un material colorante;

en el que el complejo de colorante está incrustado al menos parcialmente en el armazón.

Una ilustración en sección transversal de un aparato biosensorial de acuerdo con una realización de la invención se proporciona en **Figura 1**.

50 Por consiguiente, un aparato biosensor (10) comprende una base (12) y paredes laterales (14) y (14'), una cámara biosensora (16), una entrada de fluido (18) en la base proximal a una pared lateral (14) para liberar fluido a la cuba de amortiguación (20) dentro de la cámara biosensora (16) y una salida (22) proximal a la otra pared lateral (14')

para expulsar el fluido de la cámara biosensora (16).

La cámara biosensora (16) comprende un biosensor (24) que comprende un armazón; y un complejo de colorante que comprende un material de arcilla asociado con un material colorante; en el que el complejo de colorante está al menos parcialmente incrustado en el armazón.

- 5 La cámara biosensora (16) se puede construir para llevar uno (como se muestra en la **Figura 1**) o una serie de biosensores (no mostrados). El uno o más biosensores pueden estar alineados uno junto al otro y / o apilados uno encima del otro de una manera que permita que el fluido fluya entre ellos.

10 La cuba de amortiguación (20) que a veces se puede denominar cuba silenciadora, se utiliza para silenciar el fluido que entra en la cámara biosensora (16), es decir reducir, si no eliminar, las oscilaciones de fluido que entra en la cámara biosensora (16) y para formar un flujo laminar fino y silencioso (26) de líquido sobre el biosensor (24). La oscilación puede producirse como resultado de los golpes de una bomba (no mostrada) para retirar fluido al aparato biosensor.

Las dimensiones de una cuenca de amortiguación (20) se calcula de modo que las oscilaciones del fluido que entra por la entrada (18) sean mínimas y se forme un flujo laminar constante sobre el biosensor.

- 15 Para mantener un flujo laminar sobre el biosensor (24), fue necesario calcular las condiciones para obtener un número de Reynolds (R_e) por debajo de 2.000, incluso por debajo de 1.000 y, a veces, incluso preferentemente, entre 300 y 800 (un número de Reynolds por encima de 2.000 se correlaciona con el flujo turbulento). El número de Reynolds se calcula de acuerdo con la ecuación:

$$R_e = \frac{Q_c \times L}{\nu \times A}$$

- 20 en la que Q_c es el caudal volumétrico (3/s); L es el radio hidráulico del conducto a través del cual fluye el fluido (cm); A es el área **transversal** del flujo (cm²); ν es la viscosidad cinemática (cm²/s).

A este respecto, se observa que un flujo a través de un conducto recto, un número de Reynolds de menos de 2000 se considera generalmente de tipo laminar, en el que los números de Reynolds de más de 2000 indican flujo turbulento.

- 25 Un flujo laminar, en el contexto de la presente divulgación, significa la formación de una capa de fluido que fluye sobre el biosensor, con una profundidad esencialmente uniforme sobre el biosensor, siendo la profundidad entre 0,5 mm y 10 mm, incluso entre 1 mm y 5 mm e incluso 1 mm-3 mm.

30 Por consiguiente, para una cámara de amortiguación que tiene un volumen de 92,16 cm³ (altura 1,8 cm, longitud 4,0 cm y anchura 12,8 cm); y un flujo laminar caracterizado por una profundidad de fluido sobre el biosensor de aproximadamente 0,3 cm, se obtuvo un número de Reynolds de 718.

La entrada del aparato (18) y la salida del aparato (22) están en comunicación fluida. Específicamente, la entrada (18) puede transferir el fluido analizado a la cámara biosensora (16) para reaccionar con el biosensor (24) y la salida (22) puede transferir el fluido analizado de la cámara biosensora (16) a un colector de residuos (no mostrado) o recircular el fluido en la entrada (18).

- 35 En algunas realizaciones, el aparato puede comprender una bomba (28) que puede facilitar el flujo de fluido dentro del aparato o puede utilizarse para recircular el fluido desde la salida (22) a la entrada (18) ("*bomba de circulación*").

40 El aparato puede comprender también un depósito de fluido (30) para contener fluido antes de su introducción y analizar en la cámara biosensora (16). El depósito (30) recibe fluido de una fuente de fluido a través de la línea de entrada de fluido (32) y descarga fluido a través de la línea de descarga de fluido (34). El control del fluido entrante y saliente a través de la línea de entrada de fluido (32) y la línea de descarga de fluido (34) puede ser controlado por válvulas (36) y (38), respectivamente.

En algunas realizaciones, el aparato puede ser parte de un sistema biosensor, que comprende una o más de las siguientes unidades:

- 45 - una unidad de control de temperatura para controlar la temperatura dentro de al menos la cámara biosensora, por ejemplo para apoyar el crecimiento de microorganismos
- una unidad de detección de señal. La unidad de detección de señales puede comprender un microscopio equipado con detector de color o detector UV o similar, que se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- escáner para escanear imágenes de uno o más biosensores, por ejemplo, escaneado óptico del color.
- 50 - Una unidad de procesamiento para recibir los datos de entrada desde el detector o el escáner y emitir

parámetros indicativos de la intensidad de la señal del biosensor. La unidad de procesamiento puede ser parte de un módulo de usuario final, tal como un ordenador que lleva una base de datos de diversos biosensores, e índices de bioincrustación de diversos fluidos.

- 5 - La unidad de control para controlar el funcionamiento del aparato biosensor, incluyendo el caudal, la temperatura etc. La unidad de control puede estar equipada con un sistema de alarma para notificar un nivel de bioincrustación por encima de un umbral predeterminado, para notificar un fallo de funcionamiento, etc.

El aparato de acuerdo con la presente invención puede accionarse automáticamente. Cuando se utiliza un sistema de alarma, la intervención directa de un operador humano puede minimizarse.

La unidad de control puede accionarse mediante un microprocesador y puede controlarse mediante software.

- 10 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para detectar microorganismos viables en una muestra de ensayo de fluido, que comprende

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo de fluido acuoso con un biosensor como se describe en el presente documento;
 15 (b) detectar una intensidad de señal del biosensor, siendo la intensidad de señal indicativa de la presencia de microorganismos viables en la muestra de ensayo de fluido acuoso.

En algunas realizaciones, el fluido es un fluido acuoso, tal como agua. El agua puede ser agua de transpiración natural (por ejemplo, de manantiales, lagos, estanques, ríos, etc.) o agua salada natural, por ejemplo, agua de mar, o agua tratada, por ejemplo, agua purificada, agua desalinizada, agua en proceso de desalación, etc., o aguas residuales.

- 20 El "*contacto*" es en la medida en que se proporciona un flujo laminar del fluido acuoso sobre el biosensor, para asegurar un contacto íntimo del fluido acuoso y el complejo de colorante.

Como se ha descrito anteriormente, la señal en el biosensor es el resultado de una formación de productos metabólicos de microorganismo que depende de la presencia de microorganismos viables en el fluido que circula en un flujo laminar sobre el biosensor.

- 25 Como se ilustra a continuación, un cambio en la señal (color) aparece sobre la superficie del biosensor solo cuando el fluido que fluye sobre el biosensor contenía una combinación de microorganismos y nutrientes adecuados. Si uno de estos elementos faltaba o se eliminaba del fluido circulante, no apareció ninguna señal en comparación con el control (por ejemplo, con solución salina circulante). En otras palabras, el crecimiento de microorganismos en el biosensor, es decir, la bioincrustación, se atribuiría únicamente a la actividad metabólica en presencia de los
 30 materiales alimenticios que existen originalmente en el fluido analizado.

En algunas realizaciones, el fluido analizado se trata con agua en una planta de destino, por ejemplo, agua en cualquier etapa de la filtración de RO. Con este fin, se desea hacer uso del biosensor desvelado en el presente documento para predecir la bioincrustación en un sistema de flujo de fluido, tal como sistemas de RO en plantas de desalinización.

- 35 En consecuencia, se proporciona un procedimiento que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra de fluido acuoso del sistema de flujo de fluido acuoso, con un biosensor como se define en el presente documento,
 (b) detectar la intensidad de la señal en el biosensor (estando la señal producida en respuesta a los productos metabólicos del microorganismo si está presente en la muestra), siendo la intensidad de la señal correlativa al
 40 potencial del sistema de flujo de fluido para formar bioincrustación.

En el contexto de este procedimiento, se debe entender que un potencial de un fluido significa la probabilidad debida a la presencia de microorganismos en el fluido que son capaces de adherirse al biosensor, incluso si ya no se ha producido bioincrustación.

- 45 De acuerdo con el procedimiento anterior, se ha descubierto que hay una correlación positiva lineal entre la intensidad de la señal en el biosensor y el fluido, por ejemplo, la calidad del agua medida por el volumen de la biopelícula (biovolumen) que ha crecido en, por ejemplo, membranas de RO en instalaciones de desalinización.

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar una concentración de desinfectante requerida para desinfectar un fluido acuoso, comprendiendo el procedimiento:

- 50 (a) poner en contacto una o más muestras del fluido acuoso con una o más concentraciones diferentes de un desinfectante;
 (b) poner en contacto cada una de una o más muestras que contienen el desinfectante con un biosensor como se define en el presente documento;
 (c) para cada una de las una o más muestras, detectar una intensidad de señal del biosensor;

(d) seleccionar una muestra para la cual la intensidad de la señal está entre un intervalo determinado que es un tratamiento eficaz para dicho fluido acuoso o para dicho desinfectante;

en el que la concentración del desinfectante añadido a la muestra seleccionada es la concentración requerida para desinfectar el fluido acuoso.

5 En general, las aguas residuales urbanas tratadas en la planta de purificación contienen una concentración de amoníaco (NH₃) a valores que varían entre aproximadamente 2-10 mg / l. Cuando se añade a este agua un desinfectante, tal como, por ejemplo, hipoclorito de sodio (NaOCl), se crean los enlaces de cloro al amoníaco y las cloraminas (NCl₃, NHCl₂, NH₂Cl).

10 De acuerdo con este aspecto, el desinfectante puede ser cualquier agente convencional para el tratamiento del agua.

El cloro es el desinfectante químico más utilizado para su uso en el tratamiento del agua y se comercializa en muchas formas. El cloro que se añade al agua reacciona con el material orgánico e inorgánico, así como con microorganismos. La cantidad de cloro que consume el agua tratada se llama "*demanda de cloro*". La cantidad de cloro que queda en el agua después de que se ha satisfecho la demanda de cloro se denomina "*cloro residual*".

15 Los compuestos de tratamiento de agua a base de cloro convencionales incluyen cloro elemental (empleado como gas cloro), hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, dicloruro de sodio, dicloro-isocianurato sódico (NaDCC), dicloroisocianurato sódico dihidrato (NaDCC.2H₂O), dicloroisocianurato de potasio (KDCC) ácido tricloroisocianúrico (TCCA), cloraminas, dióxido de cloro, clorito de sodio, clorato de sodio, clorato de potasio, peróxido de hidrógeno, ozono y mezclas de los mismos,

20 El desinfectante también puede incluir plata, cobre, compuestos de bromo, ácido periódico, un fotocatalizador y combinaciones de los mismos.

En una realización, el desinfectante es hipoclorito de sodio.

25 Para preparar soluciones de tratamiento de agua, los desinfectantes químicos sólidos se disuelven preliminarmente en un recipiente separado y la mezcla resultante que constituye la solución de tratamiento de agua se extrae luego con bombas dosificadoras adecuadas y se introduce en agua a tratar.

30 Es importante señalar a este respecto que las membranas de ósmosis inversa son resistentes a las cloraminas pero no son resistentes al cloro, que oxida la superficie de las membranas y provoca una disminución del flujo de producto y un aumento de la presión de entrada. Por lo tanto, es muy importante reducir la dosis de inyección del hipoclorito sódico, con el fin de evitar que el cloro libre permanezca en el agua de entrada y, de este modo, dañar las membranas.

Descripción detallada sobre algunos ejemplos no limitantes

Materiales

En los siguientes ejemplos se usaron los materiales siguientes

Material	Fuente
Agar Bacto	Difco, EE.UU.
Violeta de tetrazolio	Sigma-Aldrich, Austria
Caolín (polvo de arcilla de china)	Spectrum, EE.UU.
Solución de HCl (0,1 M)	Frutarom, Israel
Etanol (EtOH, 96 %),	Biolab, Israel
Caldo de nutrientes	Difco, Francia
Hipoclorito	Amgal, Israel
Instrumento de ensayo de cloro total	Hach Lange, Alemania

Sistema

35 En la Figura 1 se proporciona una ilustración esquemática de un aparato biosensor.

Aspectos generales

Antes de cada experimento, el aparato se desinfectó con solución de cloro y se aclaró varias veces con agua destilada para eliminar los restos que quedan sobre el cloro.

Ejemplo 1: Desarrollo del biosensor y análisis

Sitio de obtención de muestras y calidad del agua:

Se obtuvieron muestras de agua para los siguientes ejemplos no limitantes de la planta de purificación de Shafdan (Shafdan, Israel), a menos que se indique lo contrario. La planta de purificación de Shafdan es responsable de la purificación de las aguas residuales de las ciudades de la región de Dan, en Israel, y hace funcionar una instalación de desalinización de agua que comprende:

- Un pre-filtro de 130 micrómetros.
- Un sistema de pretratamiento de ultrafiltración (UF) que comprende membranas de poros de 0,02 micrómetros.
- Un sistema de ósmosis inversa (RO) que comprende tres etapas de desalinización (cada etapa desaliniza la salmuera de la etapa anterior), con una tasa de recuperación del 90%.

Los parámetros del agua a diferentes tiempos y ubicaciones de obtención de muestras ("Punto de obtención de muestras") se determinaron mediante protocolos estándar llevados a cabo por AminoLab, Israel y se resumen en la **Tabla 3**.

El *Carbono Orgánico Total* (TOC) fue determinado por el procedimiento estándar 5310B Procedimiento de combustión a alta temperatura.

El *recuento de bacterias totales* (TBC) se determinó mediante el procedimiento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)

La *Demanda Bioquímica de Oxígeno* (DBO) se determinó mediante el procedimiento estándar 5210B – Prueba de DBO de 5 días

La *conductividad* se determinó mediante el analizador multiparamétrico Consort C532, Bélgica.

Tabla 3: Calidad del agua en los puntos de obtención de muestras de Shafdan*

Punto obtención muestras	de de Descripción	TOC (mg/l)	TBC (CFU/ml)	BOD (mg/l)	Conductividad (µmho)
1	Agua buruta tras cribado 130 micro	9,0-12,1	10 ⁵ - 10 ⁶	35	1.600-1.850
2	Agua tratada después de pretratamiento con UF	8,0-11,5	3x10 ² - 10 ³	>5	1.600-1.850
3	Agua de alimentación a la etapa I de la RO	8,0-14,2	3x10 ² - 10 ³	>6	1.600-1.850
4	Agua de alimentación a la etapa II de la RO	23-39	6x10 ² - 10 ⁴	14,5-25	3.900-4.700
5	Agua de alimentación a la etapa III de la RO	38,1-68,5	10 ³ - 10 ⁵	24-103	5.800-6.740
6	Salida del concentrado de RO	80-115	6x10 ³ - 10 ⁵	50	12.000-14.000

*Intervalo en los parámetros se debe a los cambios en la calidad del agua durante el periodo de medición

Preparación de material biosensor:

Se disolvió violeta de tetrazolio (0,15 mg) en 30 ml de DDW (para obtener una concentración de la solución madre de 0,5 %) mientras se agitaba vorticalmente (es decir, mezclando en un vórtex). A continuación, la solución se esterilizó después por filtración a través de papel de filtro de 0,45 µ. La solución filtrada se mantuvo a una temperatura de 4 °C en un tubo de ensayo cerrado envuelto en papel de aluminio.

Se disolvió caolín (1,5 gramos) en 60 ml de agua destilada para obtener una solución de caolín, a una concentración de 2,5 % y el pH se ajustó a aproximadamente pH de 4,5 utilizando HCl 0,1 M. La solución de caolín se esterilizó en un autoclave a 120 °C durante 17 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 3 ml de solución madre de violeta de tetrazolio para obtener una concentración de 0,025 %. La solución se agitó durante 24 horas en un matraz Erlenmeyer, que se envolvió en papel de aluminio para mantener la luz fuera.

El (21,6 gramos) se disolvió en 240 ml de agua destilada y la solución se mezcló en un agitador magnético durante 5

minutos, a temperatura ambiente, para obtener una solución de agar a una concentración de 9,0 %. La solución de agar se esterilizó en un autoclave a 120 °C durante 17 minutos, después, la solución de agar se dejó enfriar hasta aproximadamente 65 °C. A continuación, la solución de caolín-violeta de tetrazolio de 60 ml se añadió a la solución de agar, de tal manera que la solución de agar se diluyó con la solución de violeta de caolín-violeta de tetrazolio en una proporción de 1:5 (4 partes de solución de agar y 1 parte de solución de caolín) para obtener una concentración final de 7,2 % de agar, 0,5 % de caolín y 0,005 % de violeta de tetrazolio.

Después de mezclar las dos soluciones durante 10 minutos a una temperatura constante de 65 °C (la temperatura constante obtenida utilizando un baño de agua caliente) se obtuvo una solución homogénea y después se añadieron 3 ml de etanol (EtOH) a la solución homogénea, mientras se mezcla, hasta alcanzar una concentración de etanol de 1 % en la solución. A Esta solución final se hace referencia en los siguientes ejemplos como medio biosensor.

El medio biosensor, a una temperatura de 65 °C, se vertió en una placa de 96 pocillos. Las placas se cubrieron inmediatamente con papel de aluminio mientras se producía solidificación, para evitar la exposición a la luz.

Evaluación preliminar de detección del color:

Se colocó una placa de 96 pocillos en un recipiente grande, con pesos en los lados de la placa para evitar que fluyera. La placa se cubrió con una solución de agua obtenida del punto de obtención de muestras 1 hasta una altura de 1 cm por encima de la superficie superior de la placa (para cubrir completamente la placa).

Para el control se utilizaron dos placas de Petri: una con agua destilada estéril y la otra con el agua analizada.

La placa y los dos platos se envolvieron en papel de aluminio y se colocaron en una incubadora a una temperatura de 35 °C.

La placa de 96 pocillos se fotografió después de 48 horas y después de 72 horas. El color púrpura se detectó en la placa ya después de 24 horas y fue más intenso después de 72 horas, lo que indica que la intensidad del color se ve afectada por el aumento de la presencia de los microorganismos. Las placas de control (con solución salina solamente) se fotografiaron después de 72 horas.

En todos los experimentos, se mantuvieron las siguientes condiciones:

- a. A lo largo de todos los experimentos no se añadieron nutrientes y el crecimiento de cualquier microorganismo resultó de los nutrientes en los diversos líquidos utilizados.
- b. Antes de la operación, la desinfección se realizó utilizando una solución de cloro que se hizo circular en el biosensor durante dos horas, después de lo cual el biosensor se enjuagó varias veces con agua destilada para eliminar los restos del desinfectante.
- c. Las muestras de control incluyeron el mismo número de pocillos con: (i) solución estéril, o (ii) agua obtenida del punto de obtención de muestras 1; (iii) agua obtenida del punto de obtención de muestras 1, desde el cual se filtraron los microorganismos; y (iv) solución salina con microorganismos que se filtraron del agua desde el punto de obtención de muestras 1.
- d. El biosensor se realizó en la oscuridad, tanto como sea posible, con el fin de prevenir el daño a los materiales fluorescentes atrapados en las capas de agar.

Experimentos de validación:

Experimentos para determinar la actividad y sensibilidad del biosensor:

A. En primer lugar, se verificó el crecimiento de microorganismos en las placas, en condiciones de incubación. Con este fin, se colocó una solución salina estéril o agua del punto de obtención de muestras 1 en una placa Petri y se mantuvo en la incubadora.

B. A continuación, se llevaron a cabo experimentos de ensayo de la muestra para confirmar la aparición o falta de apariencia de un color violeta en diferentes muestras, como se especifica en la **Tabla 4**, a diferentes temperaturas en el material biosensor dentro de la placa de 96 pocillos. Cada muestra se hizo circular en el aparato biosensor como se describe en el presente documento (véase también la Figura 1). Los Experimentos se llevaron a cabo en lotes, cada lote numerado como número de muestra / número de lote. El tiempo de circulación fue 48, 72 o 96 horas y, durante la circulación, se tomaron imágenes de las placas. Además, para todas las muestras, el flujo de fluido en el aparato fue de 90 ml / min y el volumen de una muestra analizada fue de 2 l. Las muestras analizadas se hicieron circular dentro del aparato, en el que la cámara biosensora llevaba una placa de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo el material biosensible.

Tabla 4: Muestras y condiciones analizadas para cada experimento

N.º de lote	Muestra analizada	Horas ⁽¹⁾	Temp. (°C)
1/1	Solución salina que contiene microorganismos extraídos	72	35
2/1	Muestra del punto de obtención de muestras 1, aunque diluida 1:1 con solución salina	72	35
3/1	Muestra del punto de obtención de muestras 1	72	35
1/2	Muestra del punto de obtención de muestras 1 mezclada con 50 ml de 1,8 % de caldo nutriente;	96	35
2/2	Muestra del punto de obtención de muestras 1	96	35
3/2	Muestra del punto de obtención de muestras 1	96	24
1/3	Solución salina que contiene microorganismos extraídos	48	35
2/3	Muestra del punto de obtención de muestras n.º 1, de la que cualquier microorganismo existente se eliminó por filtración	48	35
3/3	Muestra del punto de obtención de muestras 1	48	35
1/4	○Muestra del punto de obtención de muestras 1 mezclada con 15 ml de 1,8 % de caldo nutriente	72	35
2/4	Muestra del punto de obtención de muestras 1, de la que se eliminó por filtración todos los microorganismos existentes y, después, se añadió la muestra n.º 2 a una relación de 1,5:0,5	72	35
3/4	Muestra del punto de obtención de muestras 1	72	35
1/5	Agua de mar desde el punto de entrada de agua a la instalación de desalinización de agua marina en Palmahim, Israel	72	35
2/5	Agua de mar desde el punto de entrada de agua a la instalación de desalinización de agua marina en Palmahim, Israel	72	35
3/5	Muestra del punto de obtención de muestras 2	72	35

ResultadosCrecimiento de microorganismos en condiciones de incubadora:

- 5 El cambio de color del medio se detectó visualmente. Las imágenes obtenidas con una cámara (PowerShot A95, Canon) se escanearon con un escáner Perfection 10 (Epson, Japón), con una resolución de escaneo de 300 dpi.

Los resultados de la primera placa Petri de control (con agua destilada estéril) mostraron que no se había producido cambio de color del medio, mientras que en la segunda placa Petri (con agua del punto de obtención de muestras 1) se produjo la actividad metabólica de los microorganismos, que produjo un cambio significativo (visible) de color del medio, es decir, la aparición de un fuerte color violeta.

10 Examen de los cambios de color con varias muestras y condiciones:

- En los experimentos de validación siguientes, se permitió que varias soluciones (como se indica en la Tabla 4) circularan sobre la superficie del biosensor para examinar la reacción del indicador de color en diversas situaciones, incluyendo situaciones extremas de las soluciones circulantes: soluciones estériles sin nutrientes sin microorganismos, soluciones sin nutrientes que contienen microorganismos, soluciones que contienen nutrientes pero no contienen microorganismos y soluciones de agua Shafdan. Además, se analizaron diferentes temperaturas.

Los resultados obtenidos para los diferentes experimentos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5 - Aparición de la señal del biosensor en diferentes experimentos.

N.º de lote	Muestra analizada	Horas ⁽¹⁾	T (°C)	Color ⁽²⁾
Control	Solución salina estéril	96	35	-
1/1	Solución salina que contiene microorganismos extraídos	72	35	-
2/1	Muestra del punto de obtención de muestras 1, aunque diluida 1:1 con solución salina	48	35	+
3/1	Muestra del punto de obtención de muestras 1	24, 72	35	+, +
1/2	○Muestra del punto de obtención de muestras 1 mezclada con 50 ml de 1,8 % de caldo nutriente	24,96	35	+, +
2/2	Muestra del punto de obtención de muestras 1	96	35	+
3/2	Muestra del punto de obtención de muestras 1	24,96	24	-, +

(continuación)

N.º de lote	Muestra analizada	Horas(1)	T (°C)	Color(2)
1/3	Solución salina que contiene microorganismos extraídos	48	35	-
2/3	Muestra del punto de obtención de muestras n.º 1, de la que cualquier microorganismo existente se eliminó por filtración	48	35	-
3/3	Muestra del punto de obtención de muestras 1	48	35	+
1/4	o Muestra del punto de obtención de muestras 1 mezclada con 15 ml de 1,8 % de caldo nutriente	48	35	+
2/4	Muestra del punto de obtención de muestras 1, de la que se eliminaron por filtración todos los microorganismos existentes y a la que se añadió solución salina con microorganismos extraídos en una relación de 1,5:0,5	48	35	+
3/4	Muestra del punto de obtención de muestras 1	72	35	+
1/5	Agua de mar desde el punto de entrada de agua a la instalación de desalinización de agua marina en Palmahim, Israel	72	35	+
2/5	Agua de mar desde el punto de entrada de agua a la instalación de desalinización de agua marina en Palmahim, Israel	72	35	+
(1) Tiempo de la adquisición de imágenes del sistema circulante				
(2) (+) indicativo de la aparición de color violeta, (-) indicativo de ausencia de cambio de color				

5 Los resultados del experimento anterior muestran que el color violeta apareció en la superficie del biosensor solo cuando había una combinación de microorganismos y nutrientes. Si faltaba uno de estos elementos en la solución de circulación, el color permanecía como el original. Además, cuanto más larga es la duración de la circulación, mayor es la intensidad y la cobertura de la superficie del color violeta en la superficie del biosensor.

10 De este modo, los resultados del experimento muestran que existe una dependencia lineal entre la cantidad de microorganismos que crecen en la superficie del biosensor y la cantidad e intensidad del color violeta que apareció en el medio biosensor. En todos los experimentos, el color violeta, si aparecía en la superficie del biosensor, era uniforme. Además, después de cuatro días de circulación, el color no se eliminó del medio biosensor al fluido circulante.

15 El último experimento por lotes (Lote 5), que involucró la circulación de agua de mar, que se utiliza para la entrada a la instalación de desalinización de agua de mar, mostró que el color también aparecía con este tipo de agua, aunque solo después de un tiempo de circulación de más de 72 horas. El largo tiempo requerido para la aparición del color violeta puede explicarse por los bajos valores de TOC del agua de mar. Estos resultados muestran que será posible utilizar el biosensor para diversos tipos de fluidos.

Ejemplo 2: Indexación y estudios de bioincrustación

El fin de estos experimentos era definir un Índice de bioincrustación y el uso del mismo para determinar la correlación entre el color / intensidad del biosensor en línea con el índice de bioincrustación y la cantidad de biopelícula que ha crecido en la superficie de las membranas de RO, utilizando diferentes fuentes de agua.

20 Para ello, se distribuyeron tres soluciones de entrada, puntos de obtención de muestras n.º 3, 4 y 5, tal como se definen en la Tabla 3, se hicieron circular en la cámara biosensora durante 24 horas o a través de membranas miniatura de RO en la instalación de Shafdan durante 15 días y se midió el crecimiento real de la biopelícula a partir de estas soluciones sobre la superficie de las membranas de RO en comparación con el crecimiento en el biosensor.

Crecimiento de bioincrustación en el biosensor:

25 El cambio de color en el biosensor se determinó para cada muestra de agua en seis repeticiones, como se ha descrito anteriormente.

Condiciones de circulación: flujo de circulación: 90 ml / min; volumen del recipiente de circulación: 2 l; duración de la circulación: 24 horas, temperatura de 35 °C.

Crecimiento de bioincrustación en membranas de RO:

30 Se dejó crecer la biopelícula sobre la superficie de membranas miniatura de RO (ESNA1-LF, Hydranautics, EE.UU.), equipadas dentro de un dispositivo que tenía la membrana retenida dentro de una cámara cerrada, comprendiendo la cámara una entrada de alimentación, una salida para la salmuera y una salida para el permeado para fluidos, donde fluye la presión obtenida por el piloto de desalinización presurizado.

35 La superficie de la membrana era de 33,44 cm² (38 x 88 mm). Para cada muestra de agua, se realizaron tres repeticiones.

Durante el experimento, se registraron parámetros tales como presiones, caudales de agua, conductividad, temperatura y pH, con el fin de monitorizar y registrar posibles cambios en la producción de membrana como resultado del crecimiento de la biopelícula.

5 Después de completar los experimentos de circulación (circulación de 15 días), se retiraron las membranas de la cámara y se almacenaron en una solución salina esterilizada a una temperatura de 4 °C.

Para el análisis de la biopelícula se tomó un segmento de membrana de 5 x 5 mm de cada una de las membranas analizadas. Cada segmento se insertó en un tubo de ensayo Eppendorf que comprendía 2 ml de solución de TRIS al 0,24 % esterilizada (pH 7,2) y se dio la vuelta a los tubos de ensayo varias veces.

10 A continuación, se llevó a cabo el aclarado de la membrana reemplazando tres veces una porción de la solución (1 ml) con un volumen nuevo de solución TRIS (1 ml). Entre cada sustitución de la porción, se dio la vuelta al tubo de ensayo suavemente varias veces.

15 Las membranas aclaradas se tiñeron a continuación con colorante basado en SYTO (Molecular Probes, EE.UU., preparación descrita más adelante) que se usó para teñir el microorganismo y con tetrametilrhodamina (Molecular Probes, EE.UU., descrita más adelante) que se usó para teñir la superficie polimérica extracelular (EPS) de los organismos y, por lo tanto, utilizada como marcador para la formación de biovolumen.

En la **Tabla 6** se muestran los tonos de color y las longitudes de onda de estas tinciones en excitación y emisión.

Tabla 6: Tipo de colorante para células y colorante EPS

Tipo de colorante	Color	Excitación	Emisión
SYTO9	Verde	ADN: 485 ARN: 486	ADN: 498 ARN: 501
Tetrametilrodamina (C-860)	Rojo	555	580

Para la tinción, el colorante SYTO comercial se diluyó con TRIS-HCl a una concentración de 0,3 % (v / v) y se mantuvo en alícuotas de 70 µl en el tubo de ensayo Eppendorf, a -20 °C hasta su uso posterior.

20 El colorante comercial de tetrametilrhodamina se disolvió en 5 ml de bicarbonato sódico 0,1 M (NaHCO₃) para obtener una concentración de 2 mg / ml. Esta solución madre se mantuvo a -20 °C hasta su uso posterior.

Para la tinción, la solución madre de tetrametilrhodamina se diluyó con TRIS-HCl 0,24 % para obtener una concentración de 0,2 mg/ml. Las soluciones diluidas se mantuvieron en alícuotas pequeñas de 70 µl a -20 °C.

25 Los segmentos enjuagados de la membrana se colocaron en una placa de Petri grande y se añadieron 35 µl de SYTO9 a los segmentos de membrana, para permitir una distribución uniforme. La placa de Petri se cerró y se cubrió con papel de aluminio para mantener un ambiente oscuro durante 25 minutos.

Tras 25 minutos, cada segmento de membrana teñido se insertó en un tubo de ensayo Eppendorf que comprendía 2 ml de solución de TRIS al 0,24 % esterilizada (pH 7,2) y se dio la vuelta a los tubos de ensayo varias veces.

30 A continuación, se llevó a cabo el aclarado de la membrana reemplazando tres veces una porción de la solución (1 ml) con un volumen nuevo de solución TRIS (1 ml). Entre cada sustitución de la porción, se dio la vuelta al tubo de ensayo suavemente varias veces.

Después del aclarado, los segmentos se colocaron en una placa de Petri grande y se añadieron a la membrana 35 µl de SYTO9, para permitir una distribución uniforme. La placa de Petri se cerró y se cubrió con papel de aluminio para mantener un ambiente oscuro durante 25 minutos.

35 Después de 25 minutos, los segmentos de membrana teñidos se aclararon como se ha descrito anteriormente.

Los segmentos de membrana aclarados, teñidos con los dos materiales colorantes, se colocaron en una placa de Petri grande y se añadieron 50 µl de solución TRIS a las membranas.

Antes del análisis con microscopio, se añadió una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos de vidrio.

40 El examen de las membranas se realizó utilizando una microscopia confocal de barrido láser (CLSM) (Leica, Microsystems, Alemania), mientras que SYTO9 y tetrametilrhodamina se excitaron a una longitud de onda de 488 nm y 532 nm, respectivamente.

RESULTADOS:

Índice de bioincrustación:

Los resultados de las tres soluciones medidas, desde los puntos de obtención de muestras 3, 4 y 5, se utilizaron para obtener un índice de bioincrustación.

Caracterización del agua de alimentación antes de los experimentos de circulación:

- 5 **Punto de obtención de muestras 3 / alimentación I:** cantidad de microorganismos: unidad formadora de colonias (UFC) / ml - 588; Carbono orgánico total (TOC) - 14,2 mg / l; conductividad: 1,620 µmho; pH=6.7; Demanda biológica de oxígeno (BOD) =6 mg/l
- Punto de obtención de muestras 4 / alimentación II:** cantidad de microorganismos: unidad formadora de colonias (UFC) / ml - -18.000; Carbono orgánico total (TOC) - 39 mg / l; conductividad: 4,005 µmho; pH=7.19; Demanda biológica de oxígeno (BOD) =25 mg/l
- 10 **Punto de obtención de muestras 5 / alimentación III:** cantidad de microorganismos: unidad formadora de colonias (UFC) / ml - -48.000; carbono orgánico total (TOC) -68,5 mg/l ; conductividad: 6,740 µmho; pH=7,42; Demanda biológica de oxígeno (BOD) =103 mg/l.

El análisis de la intensidad de color de cada muestra analizadas de los tres puntos de obtención de muestras (denominadas Alimentación I, II y III) se cuantificó e indexó como Índice de bioincrustación.

- 15 El **Índice de bioincrustación** se determinó del siguiente modo:

$$\text{Índice de bioincrustación} = 100 \times PPP \times (1 - PPP) + (100 \text{ LL}) \times PPP$$

en la que:

- 18 *Índice de bioincrustación* - un valor numérico que define el nivel de bioincrustación
- 20 *PPP* (Porcentaje de píxeles púrpura) - el porcentaje de los píxeles que son púrpura (fracción decimal)
- LL* (nivel de claridad) - la intensidad

La **Figura 2** muestra la intensidad del color (promedio de cada 6 repeticiones) con el agua diferente.

Para simplificar, el Índice de bioincrustación se tradujo en una puntuación de bioincrustación, A, B, C, ... F, de acuerdo con los intervalos de bioincrustación, el menor intervalo de bioincrustación representa una baja bioincrustación identificada como puntuación A. La puntuación correlacionada se identifica en la **Tabla 7**.

Descripción	Índice de bioincrustación	Nivel de bioincrustación
Agua limpia	Índice de bioincrustación < 0,0002	A
Bioincrustación leve	Índice de bioincrustación < 6	B
Bioincrustación moderada	Índice de bioincrustación < 40	C
Bioincrustación moderada-intensa	Índice de bioincrustación < 48	D
Bioincrustación intensa	Índice de bioincrustación < 70	E
Bioincrustación extremadamente intensa	Índice de bioincrustación >= 70	F

- 25 Bioincrustación en membranas de RO

También se usaron muestras de fluidos de los puntos de obtención de muestras para determinar la bioincrustación en las membranas de RO.

- 30 La tinción de las membranas RO con SYTO9 y Tetrametilrhodamina proporcionó información sobre la presencia y cantidad de microorganismos y la sustancia polimérica extracelular (EPS), respectivamente. Las imágenes de CLSM se escanearon y analizaron con el software PHLIP (<http://sourceforge.net/projects/phlip/>), que permitió la cuantificación de los datos de CLSM con respecto al biovolumen de la biopelícula. La **Figura 3** proporciona el biovolumen obtenido para cada fluido, Alimentación I, Alimentación II y Alimentación III.

Fiabilidad de los resultados del biosensor

- 35 Aplicando una prueba t estadística sobre los resultados del índice de biopelícula obtenido después de 24 horas de circulación de agua (**Figura 2**), que condujo a la determinación del Índice de bioincrustación (**Tabla 7**) y del biovolumen (**Figura 3**) de la biopelícula que se desarrolló sobre la membrana de RP tras 15 días de circulación de agua indicó una correlación positiva significativa de más de 0,9.

Ejemplo 3: Determinación de las condiciones mínimas para la reacción del biosensor

Las muestras del punto de obtención de muestras N.º 2 (SP2) se diluyeron con solución salina (para obtener tres soluciones diluidas, Tabla 8) con el fin de determinar la sensibilidad del biosensor, a saber, el valor mínimo detectable de TOC y la concentración de microorganismos. En todas las muestras analizadas, el pH fue de 7,3 y la BOD <5 mg / l.

5

Tabla 8: Muestras analizadas

N.º	Muestra analizada	UFC (UFC/ml)	TOC (mg/l)	C* (µmho)
1	1 l de SP2 +1 l de solución salina	195	6,2	1.470
2	0.667 l de SP2 + 1,333 l de solución salina	130	4,4	1.467
3	0,400 l de SP2 + 1,6 l de solución salina	78	3,1	1.464
*Conductividad				

Se aplicaron las condiciones siguientes: flujo de circulación: 90 ml/min, volumen de circulación de 2 l; Duración de la circulación 24 h a una temperatura de 35 °C.

Resultados:

Después de 24 horas de circulación en el aparato biosensor, se determinó la intensidad de color (púrpura) que apareció en el biosensor y se clasificó usando el índice de bioincrustación a un nivel B. Por tanto, los resultados llevaron a la conclusión de que el biosensor de la invención es capaz de detectar bioincrustación a un nivel bajo de microorganismos, es decir, a un TOC bajo de aproximadamente 3 mg / l y a un recuento bajo de los microorganismos, de 78 UFC / ml.

10

Ejemplo 4: Aplicación del biosensor

El objeto de este ejemplo fue determinar la cantidad mínima de hipoclorito (desinfectante) requerida para prevenir la bioincrustación.

15

La fuente del agua analizada (el Shafdan) contiene amoníaco (NH₃) a valores que varían entre aproximadamente 2-10 mg / l. Cuando se añade hipoclorito sódico (NaOCl), se forman cloraminas, por ejemplo, NCl₃, NHCl₂, NH₂Cl, que se usan para prevenir la bioincrustación. El cloro residual daña la membrana del RO. Por lo tanto, es muy importante utilizar una cantidad mínima de hipoclorito sódico para prevenir, por un lado la bioincrustación, y, por otro, prevenir el daño a la membrana de RO.

20

Procedimientos:

Se disolvió hipoclorito para obtener una solución madre de 140 mg / l. Las diluciones de esta solución madre se detallaron en la **Tabla 9**. Las diluciones se inyectaron en el agua que circulaba en el aparato biosensor y se midió la concentración de cloro total para cada dilución. Como control, no se añadió hipoclorito.

25

Condiciones de circulación: flujo: 90 ml / min; volumen del recipiente de circulación: 2 l; duración de la circulación: 24 horas, a una temperatura de 35 °C.

Además, el agua del punto de obtención de muestras N.º 3 (SP3) se dejó fluir a través de instalaciones de membranas en miniatura (como se describió anteriormente) en paralelo, durante 15 días, con el fin de permitir el crecimiento de biopelícula en la superficie de las membranas. Después de 15 días, las membranas se trataron y analizadas como se ha descrito anteriormente para determinar el biovolumen resultante.

30

RESULTADOS

En la **Tabla 9** se presentan las cloraminas totales y el índice de bioincrustación en la muestra analizada después de 24 horas de circulación. En la **Figura 4** se proporciona el índice de bioincrustación en función del cloro total.

35

Tabla 9 - Concentración de cloro e índice de bioincrustación

Hipoclorito de sodio [mg/l]	Cloraminas totales [mg/l]	Índice de bioincrustación
Control		C
0,7	0,17	B
1,4	0,29	B
2,1	0,45	B
2,8	0,94	B
2,8	1,0	B

(continuación)

Hipoclorito de sodio [mg/l]	Cloraminas totales [mg/l]	Índice de bioincrustación
4,2	1,42	B
4,2	1,48	B
4,6	1,63	B
5,6	1,86	B

- 5 La adición de hipoclorito mostró una disminución del índice de bioincrustación (de C a B). Se obtuvo un índice de incrustación biológica más bajo para una concentración de cloro total de 1,4 y más [mg / l], en la cual el índice de bioincrustación fue cercano a cero (**Figura 4**). Por lo tanto, para una bioincrustación cercana a cero, una cantidad de 4,2 mg / l de hipoclorito sería suficiente para evitar la bioincrustación sin crear entidades perjudiciales de cloro.

Crecimiento de biopelícula en membranas de RO con agua de entrada que contiene cloraminas

Sobre la base de los resultados anteriores, se decidió utilizar una concentración total de cloraminas de 1,5 mg / l obtenida mediante inyección de hipoclorito 4,2 mg / l. La duración de la inyección de hipoclorito en el agua de entrada de la Etapa I (SP1) fue de 4 horas al día, todos los días.

- 10 Después de 15 días, se desmontaron las membranas fueron y se examinaron con microscopia CLSM. Se examinó un total de cuatro membranas, dos utilizadas como control (no se añadió hipoclorito). El procesamiento de datos se realizó de una manera similar a la descrita anteriormente.

- 15 La **figura 5** muestra el biovolumen de la biopelícula desarrollada en cada membrana cuando se inyectó hipoclorito en el agua de entrada para producir cloraminas a la concentración recomendada por el instrumento de predicción: 1,5 mg / l, en comparación con la biopelícula desarrollada en las membranas en la misma agua de entrada sin hipoclorito. Los resultados se calcularon como un promedio de 18 puntos escaneados y calculados.

- 20 Los resultados presentados en la **Figura 5** muestran que la creación de una dosis baja de 1,5 mg / l de cloraminas, obtenidas mediante la adición de 4,2 mg / l de hipoclorito, impidió el desarrollo de biopelícula en la membrana; el biovolumen fue de aproximadamente 1/5 del volumen de la biopelícula desarrollada sobre la membrana en las mismas condiciones de circulación sin la adición de hipoclorito.

La **Figura 6** proporciona el espesor de la biopelícula, lo que muestra que el espesor de la biopelícula después de 15 días en presencia de cloraminas (es decir, cuando se añadió hipoclorito) era aproximadamente 1/5 del espesor de la biopelícula desarrollada en ausencia de cloraminas.

- 25 También se examinó el efecto de la prevención del desarrollo de la biopelícula en la superficie de la membrana cuando se añadieron 4,2 mg / l de hipoclorito. Se ha descubierto que el flujo normalizado durante 320 horas no mostró ningún efecto y, en particular, no disminuyó en el flujo de permeado, ni en la Etapa I ni en la Etapa II ni la Etapa III (**Figura 7**). También se descubrió que el tratamiento con hipoclorito reducía la bioincrustación en las membranas (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor que comprende

(a) un armazón que comprende una matriz formada a partir de un material formador de armazón, comprendiendo dicho material formador de armazón uno o más polisacáridos que tienen una temperatura de transición de fase sólida a líquida a una temperatura superior a 35 °C y no superior a 95 °C y que se convierte en una estructura sólida o semisólida tras el enfriamiento;

(b) un complejo de colorantes que comprende minerales de arcilla asociados con un material colorante, en el que el material colorante proporciona una señal detectable en presencia de microorganismos;

en el que el complejo de colorante está embebido, al menos parcialmente, en el armazón y el armazón está **caracterizado por** poros y/o huecos.

2. El biosensor de la reivindicación 1, en el que el complejo de colorante está embebido, al menos parcialmente, en poros de dicho armazón, preferentemente mediante atrapamiento físico del complejo en los poros del armazón, de manera que al menos parte del material de colorante permanece expuesto fuera del armazón.

3. El biosensor de la reivindicación 1, en el que el material colorante se selecciona de un cromóforo o fluoróforo.

4. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, además, un alcohol, tal como etanol.

5. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material colorante pertenece a la familia de los compuestos de tetrazolio, tales como cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), bromuro de 5-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium (TTC), cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (rojo tetrazolio), cloruro de 2,5-difenil-3-[alfa-naftil]-1-tetrazolio (violeta tetrazolio), cloruro de 3,3'-(4,4'-bifenil)bis(2,5-difenil-2H-tetrazolio (cloruro de neotetrazolio), cloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)bis(2,5-difenil-2H-tetrazolio (cloruro de azul tetrazolio), cloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)bis[2-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio] (nitroazul tetrazolio) o cloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)bis[2,5-bis(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio] (tetranitroazul tetrazolio), preferentemente cloruro de 2,5-difenil-3-[alfa-naftil]-1-tetrazolio (violeta de tetrazolio).

6. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los minerales de arcilla se seleccionan del grupo que consiste en caolín, esmectita, clorito de illitem, sepiolita y atapulgita, y, preferentemente es caolín.

7. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el complejo de colorante tiene un peso molecular en el intervalo de 300 g / mol a 1500 g / mol.

8. El biosensor de la reivindicación 2, en el que el biosensor está en forma de un laminado que tiene una superficie superior y una superficie inferior, y el material colorante está expuesto, al menos en dicha superficie superior, o "2 - r en el que el biosensor está en forma de materia en partículas suspendida en un recipiente, y el material colorante está expuesto en la superficie exterior de la materia en partículas.

9. Un procedimiento de preparación de un biosensor, comprendiendo el procedimiento

(a) mezclar un complejo de colorante que comprende minerales de arcilla y un material colorante que proporciona una señal detectable en presencia de microorganismos con un material formador de armazón, que comprende uno o más polisacáridos que tienen una temperatura de transición de fase sólida a líquida a una temperatura por encima de 35 °C y no superior a 95 °C y que se convierte en una estructura sólida o semisólida al enfriarse, dicha mezcla se realiza a una temperatura a la cual el complejo de colorante y el material formador de armazón están en una mezcla acuosa fluida, tal como a una temperatura entre 35 °C y 95 °C;

(b) añadir a la mezcla fluida un reactivo no electrolítico; y

(c) enfriar la mezcla fluida con el reactivo no electrolítico a una temperatura a la cual la mezcla se convierte en un sólido o semisólido;

por medio de lo cual se forma un biosensor que comprende un armazón **caracterizado por** poros y / o huecos y estando el complejo de colorante incrustado, al menos parcialmente, en el armazón, siendo el biosensor según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la mezcla entre el material colorante y el mineral de arcilla está a un pH en el intervalo de 4 a 6, preferentemente a un pH de $4,5 \pm 0,5$.

11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la mezcla del material formador de armazón y el complejo de colorante se encuentra en una relación estequiométrica de 4:1.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el reactivo no electrolítico es un alcohol, tal como etanol.

13. Un aparato, que comprende:

al menos una entrada de fluido y al menos una salida de fluido en comunicación de fluido;
estando situada una cámara biosensora entre la al menos una entrada de fluido y la al menos una salida de fluido, configurada de tal modo que el fluido se libera a dicha cámara biosensora desde dicha entrada de fluido en un flujo laminar y es expulsado de dicha cámara a través de dicha salida de fluido, la cámara biosensora comprende un biosensor como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
opcionalmente, una cubeta de amortiguación de fluido después de dicha entrada y que precede a la cámara biosensora, estando la cubeta de amortiguación de fluido construida para permitir el flujo laminar de fluido sobre el biosensor.

14. Un procedimiento para predecir la bioincrustación en un sistema de flujo de fluido, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra de fluido acuoso del sistema de flujo de fluido acuoso, con un biosensor como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, siendo dicho contacto preferentemente con un flujo laminar de la muestra de fluido acuoso sobre el biosensor

(b) detectar la intensidad de la señal en el biosensor asociado con la presencia de dichos

microorganismos, siendo la intensidad de la señal correlativa con el potencial del sistema de flujo de fluido para formar bioincrustación.

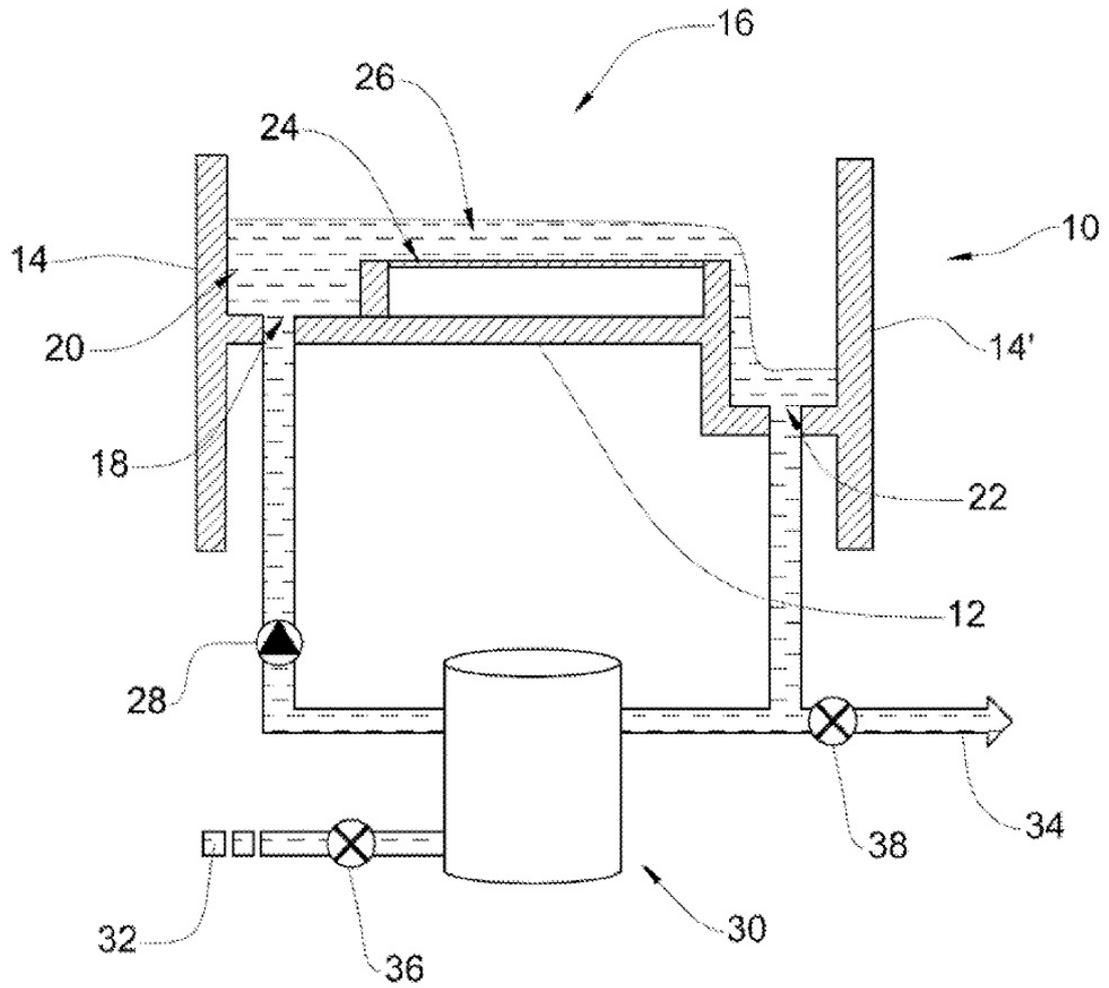


Figura 1

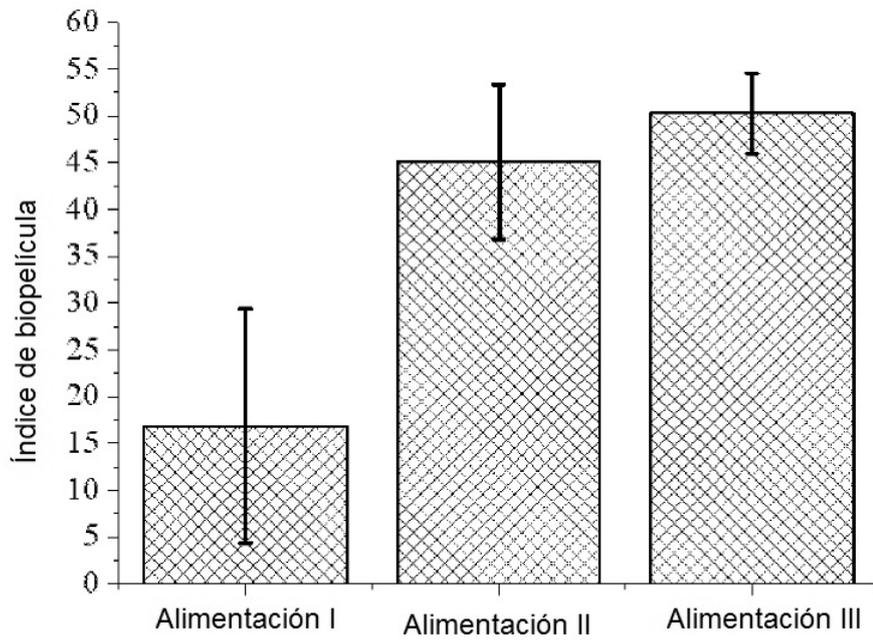


Figura 2

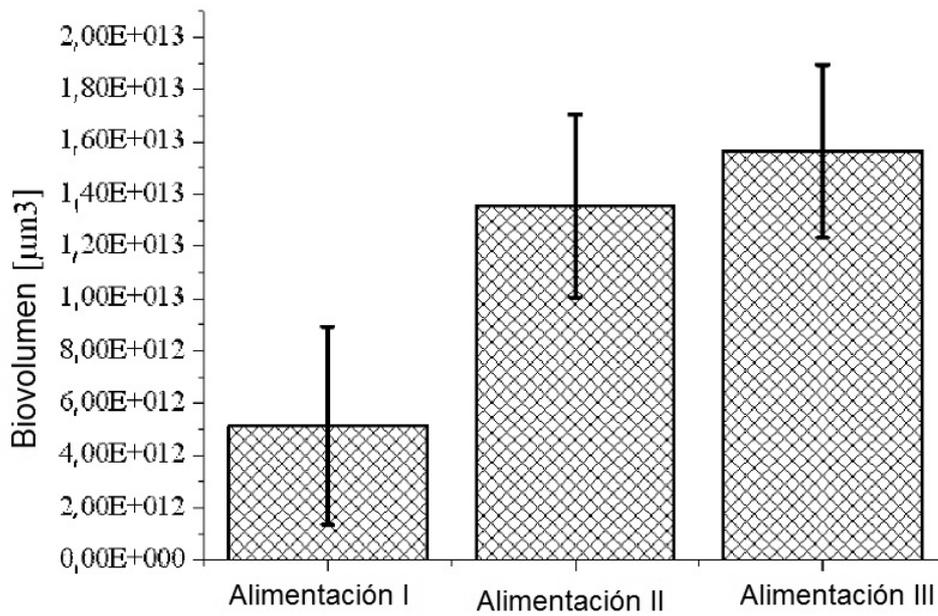


Figura 3

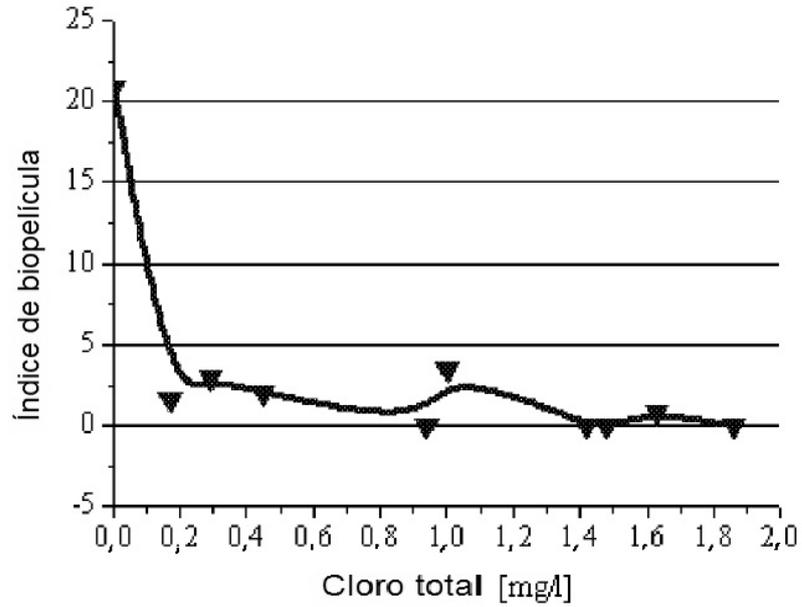


Figura 4

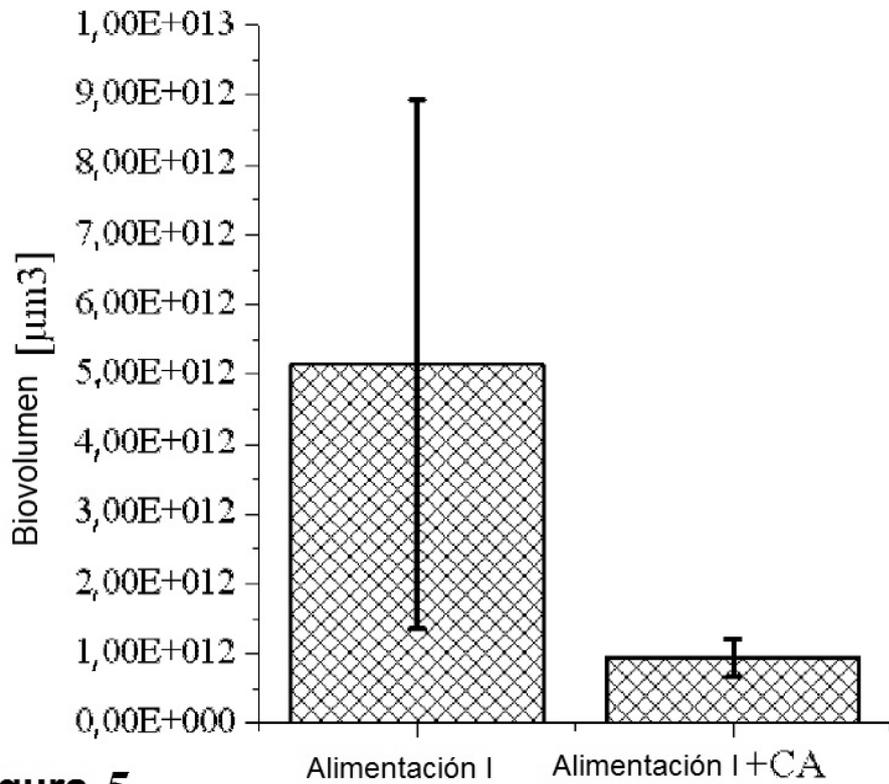


Figura 5

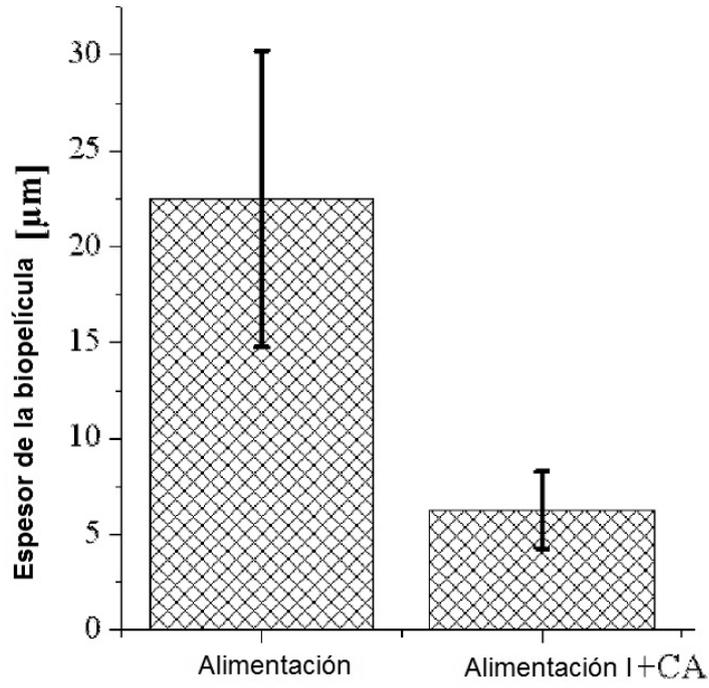


Figura 6

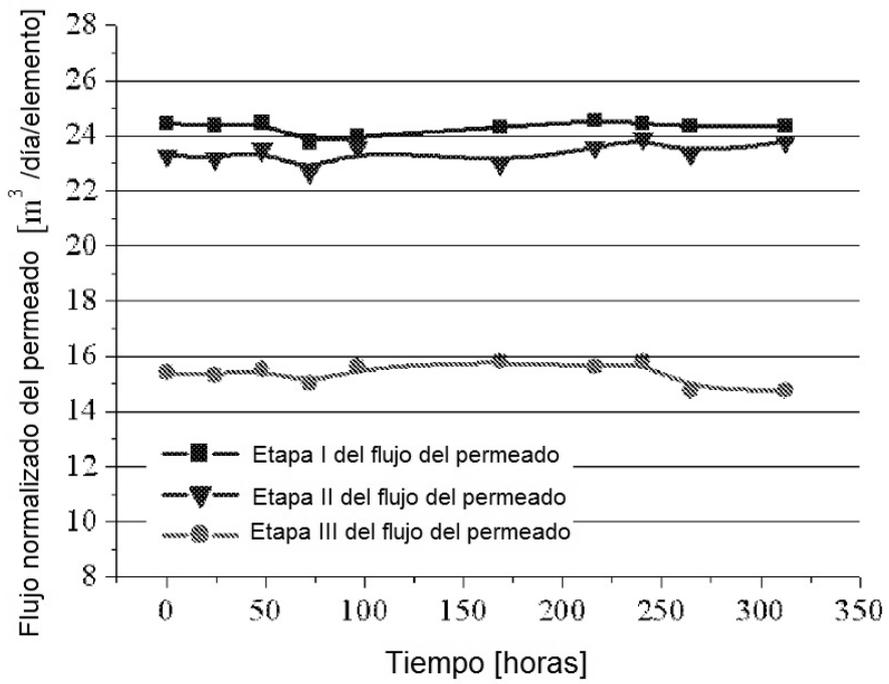


Figura 7