(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 659 535**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/18 (2006.01)
G01N 35/02 (2006.01)
G01N 35/10 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2013** **PCT/IB2013/053911**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013** **WO13171667**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013** **E 13731919 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2850427**

(54) Título: **Dispositivo y método para la determinación y monitorización de la toxicidad del agua**

(30) Prioridad:

15.05.2012 IT RM20120218

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2018

(73) Titular/es:

MOSCETTA, POMPEO (100.0%)
Via Anoia, 81
00128 Roma, IT

(72) Inventor/es:

MOSCETTA, POMPEO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 659 535 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

Dispositivo y método para la determinación y monitorización de la toxicidad del agua

La presente invención se refiere a un dispositivo para el análisis y la monitorización de la toxicidad en aguas. El aparato de la presente invención se diseña específicamente para determinar la toxicidad en aguas en varias muestras al mismo tiempo y en tiempo rápido con un alto grado de exactitud y precisión. El dispositivo de la presente invención tiene aplicación en el campo de controlar y monitorizar los recursos hídricos y en el campo de los análisis ecotoxicológicos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La monitorización de la calidad en las aguas representa un problema fundamental para la protección de la seguridad y la salud en todo el mundo. Una de las tecnologías, muy difundida en todo el mundo para el análisis toxicológico del agua, es un producto de laboratorio vendido bajo el nombre comercial de MicroTOX®, comercializado por Strategic Diagnostics Inc. Este sistema está constituido por un luminómetro utilizado para medir las variaciones de bioluminiscencia de bacterias rehidratadas de lotes liofilizados antes de las pruebas analíticas. Las pruebas analíticas se realizan en modo totalmente manual por operadores especializados.

En lo que respecta al control de la toxicidad en aguas a través de sistemas automatizados, solo los analizadores basados en tecnologías de flujo están disponibles comercialmente. Algunos de los analizadores de toxicidad a través de organismos bacterianos basados en tecnologías de flujo son el Sistema de Biomonitores en línea TOXcontrol®, producido por microLAN B.V. y el Biomonitor de Contaminación Continua CCB-TOX®, producido por CheckLight Ltd. En resumen, la muestra y las bacterias luminiscentes se transportan por separado y se introducen conjuntamente en una cámara para medir la luminiscencia para determinar el efecto de toxicidad de la muestra. Inmediatamente antes y después de esto, las bacterias luminiscentes se transportan por separado y se introducen junto con la muestra de referencia en una cámara para medir la luminiscencia para determinar el blanco, paralelo a la cámara para medir la muestra. La comparación entre el blanco y la muestra muestra la medición de toxicidad.

Incluso en lo que respecta a la monitorización de la toxicidad en aguas con microalgas a través de sistemas automatizados, solo los analizadores basados en tecnologías de flujo están disponibles comercialmente. El analizador Algae Toximeter® está muy extendido, producido por bbe-Moldaenke GmbH, donde las microalgas se cultivan continuamente en un fermentador. Al igual que para los sistemas de flujo basados en sustratos bacterianos, el procedimiento analítico se basa en el transporte hidráulico del biosustrato en la cámara de medición alternativamente con blancos y muestras y se obtiene resultado de la comparación de las mediciones del blanco y la muestra. El fenómeno monitorizado es el retraso de las algas en la emisión de luz, más conocido como fluorescencia retardada, causado por sustancias interferentes fitotóxicas.

Un analizador en línea producido recientemente es VibrioTox® de AppliTek, derivación comercial de la patente EP1883808 (A2) de Gibson y Jones. Esta tecnología patentada se basa en la monitorización de la toxicidad en aguas mediante el uso de bacterias bioluminiscentes que se cultivan continuamente mediante un biorreactor que funciona en condiciones de estado estacionario. Posteriormente, las bacterias se toman del biorreactor para permitir realizar el análisis en modo de flujo continuo.

Jang-cheon Cho y otros (Biosensors and bioelectronics, vol. 20, nr. 2, 2004) describen un dispositivo en el que se usan bacterias bioluminiscentes recombinantes en microplacas para analizar la toxicidad de muestras acuosas. El dispositivo descrito en este documento no se basa en la tecnología de acceso aleatorio (Journal of Automatic Chemistry, vol. 10, Nr. 4 (octubre-diciembre de 1988), p. 167-170). Eberhard Kuster et al. (Biosensors y bioelectronics, vol. 19, nr. 12, 2004) describen un dispositivo para medir la toxicidad en muestras acuosas a través de la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri*, este dispositivo tampoco se basa en la tecnología de acceso aleatorio, sino en la tecnología de flujo ya descrita anteriormente para el analizador Algae Toximeter®. El documento US 6,190,617 divulga un sistema analítico automatizado continuo y de acceso aleatorio.

Principales desventajas de la técnica anterior

Uno de los principales límites de los analizadores de la técnica anterior es la imposibilidad de analizar varias muestras simultáneamente y obtener varias mediciones de la misma muestra con una alta precisión y nivel de precisión. Además, los analizadores disponibles en la técnica anterior implican tiempo para realizar el análisis que no es compatible con la necesidad de intervención rápida, como en el caso de eventos de contaminación inesperada de obras hidráulicas.

Los analizadores automáticos existentes en la técnica anterior se basan en la manipulación hidráulica de microorganismos (algas y bacterias) y, por lo tanto, están sujetos a la contaminación cruzada y al ensuciamiento.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un dispositivo, basado en tecnología de acceso aleatorio con lectura directa, para monitorizar de forma autónoma y continua la calidad de las aguas y analizar de forma automatizada muestras, lixiviados y extractos acuosos, incluidas las partes componentes de estos, asociadas a métodos analíticos que permiten determinar la contaminación en aguas y detectar la presencia de contaminantes en muestras, lixiviados y extractos acuosos.

El dispositivo de la presente invención se aplica en el campo del control y la monitorización de los recursos hídricos, incluyendo obras hidráulicas y subterráneas, aguas para el uso industrial de entradas y salidas de plantas, aguas de reflujo civiles e industriales, pretratadas y postratadas, aguas subterráneas y aguas superficiales, incluyendo arroyos, fuentes, riachuelos, canales, cuencas hidrográficas, ríos, lagos e incluso aguas de mar. Análogamente, la invención se puede usar en el campo de los análisis ecotoxicológicos en muestras, lixiviados y extractos acuosos de cualquier origen y/o derivación, incluidos residuos, suelos, sedimentos y materiales.

El objeto de la presente invención es resolver los diversos problemas que aún quedan abiertos por la técnica conocida y esto se obtiene a través de un dispositivo como se define en la reivindicación 1.

Las características adicionales de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes correspondientes.

Ventajas de la invención

La presente invención, superando los problemas mencionados de la técnica conocida, implica varias y evidentes ventajas:

1. Posibilidad de la monitorización continua.

2. Posibilidad de muestrear y procesar decenas de muestras simultáneamente.

3. Tiempo muy reducido para muestreo, preparación y medición.

4. Completa autonomía analítica con salvaguarda de costos y mano de obra.

5. Exactitud y precisión más experimentales.

6. Señalización en tiempo casi real, incluso remotamente, de los eventos inesperados de contaminación y la consiguiente posibilidad de garantizar de forma oportuna el recurso hídrico supervisado, el cuerpo de agua, la sustancia de reflujo, el efluente u obras hidráulicas.

7. Posibilidad de evaluar simultáneamente los efectos de toxicidad sobre bacterias y algas, es decir, organismos procariotas y eucariotas, con tiempo de uso, estabilidad y duración de los sustratos microbianos que pueden cuantificarse en un rango comprendido entre 25 y 35 días.

Mientras que los dispositivos (analizadores) con tecnologías de flujo de la técnica conocida permiten analizar una sola muestra o un número muy limitado de muestras a la vez, el dispositivo de la presente invención permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras, igual a las posiciones disponible en la bandeja de reacción. Por lo tanto, también existe la posibilidad de realizar repeticiones simultáneas de la misma muestra, analizando al mismo tiempo la misma muestra con diferentes diluciones y realizando contemporáneamente mediciones de blanco y calibración con compuestos puros y/o matrices reales con toxicidad conocida.

El dispositivo de la presente invención permite analizar una muestra cada 10-30 segundos, frente a los 15-30 minutos para cada muestra de las tecnologías de flujo.

El paso continuo de suspensiones bacterianas o de algas a lo largo de todo el recorrido de los analizadores de flujo aumenta el riesgo de incrustaciones y bioincrustaciones, especialmente en tubos y conductos. Por lo tanto, uno o más procedimientos de lavado y esterilización de todo el sistema entre una muestra y la otra son necesarios, para evitar las incrustaciones ya mencionadas o cualquier tipo de interferencia con el análisis posterior. Por el contrario, en el dispositivo descrito aquí, la aguja de recogida y las cubetas de reacción están expuestas a contaminación potencial y, por lo tanto, están sujetas a lavado. Esto permite garantizar un nivel muy alto de limpieza y fiabilidad del sistema.

Los analizadores de flujo pueden realizar mediciones en cinética simultánea de blancos, calibradores y muestras solo si están equipados con detectores múltiples, en un número igual a los blancos, calibradores y muestras que se deben medir contemporáneamente. Sin embargo, realizar mediciones de blancos, calibradores y muestras en diferentes períodos de tiempo causa errores que pueden volverse significativos, dado que el efecto de toxicidad se

calcula por la disminución o variación de la señal observada con respecto a una prueba realizada en ausencia de contaminación. En consecuencia, el resultado obtenido está estrictamente relacionado con la actividad metabólica ideal de la población activa que puede expresarse en ese intervalo de tiempo preciso. Dada la transitoriedad innata del estado metabólico del mismo, tanto la bacteria como las microalgas pueden estar sujetas a variaciones de señal y sensibilidad incluso muy significativas con el tiempo transcurrido. Por el contrario, el dispositivo de la presente invención puede realizar simultáneamente mediciones en cinética de blancos, calibradores y muestras, eventos a intervalos muy reducidos, tales como cada 10-30 segundos, durante todo el tiempo deseado, mediante el uso de un único detector de bioluminiscencia y un único detector de fluorescencia, ya que es la bandeja de reacción para rotar y colocar en la posición correspondiente al detector solicitado. Esto resulta ser un valor agregado esencial, que permite realizar, en paralelo al análisis de muestras reales, ciclos de blancos y calibraciones con soluciones conocidas de diferentes tipos de analitos tóxicos y/o matrices reales con toxicidad conocida.

Con respecto al analizador VibrioTox® de AppliTek, el dispositivo objeto de la presente invención tiene las siguientes ventajas adicionales:

1. El reactivo biológico contenido en pequeñas ampollas desechables se controla mediante operaciones de blancos y contaminantes. En caso de pérdida de eficiencia, el reactivo simplemente puede ser reemplazado. Por el contrario, en el dispositivo VibrioTox®, el quimiostato es un fermentador con una gestión muy crítica y fácilmente susceptible de contaminación externa y requiere, para mantenerse en funcionamiento de una manera eficiente, controles complejos de innumerables parámetros, como la densidad de microorganismos, el volumen total, la adición y eliminación de reactivos, la aireación y la turbidez. En caso de contaminación de falla simple o inconveniencia, la reactivación del ciclo de fermentación es un procedimiento largo y complicado o al menos no tan inmediato como la sustitución de una ampolla pequeña.

2. Al estar sujeto a la formación de pequeñas burbujas de aire difíciles de eliminar, lo que puede influir sensiblemente en la medición analítica, el sistema hidráulico de los analizadores de flujo necesita trampas de aire o sistemas análogos para eliminar tales burbujas.

3. La medición de luminiscencia o fluorescencia en un analizador de flujo continuo tiene necesariamente un tiempo muy acelerado ya que los analitos biológicos se suspenden en un fluido en movimiento. Además, la cantidad de fotones medidos varía según la velocidad del flujo. Teniendo en cuenta que en el dispositivo descrito en este documento la lectura tiene lugar en condiciones estáticas, resulta ser más robusto y repetible.

4. En un analizador con flujo continuo, la sensibilidad analítica es menor debido a los volúmenes reducidos que el detector puede leer. Este problema es fisiológico para el tipo de analizador, ya que, para aumentar los volúmenes, sería esencial reducir la velocidad de flujo, con los consiguientes desequilibrios inaceptables en el flujo mismo y las fluctuaciones en el número de fotones medidos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La Figura 1 es una representación esquemática de una realización del dispositivo según la presente invención.

Figura 2. La Figura 2 es un detalle del módulo 8 de medición luminométrico de la realización mostrada en la FIG. 1.

Figura 3. La Figura 3 es un detalle del módulo 9 de medición fluorimétrico de la realización mostrada en la FIG. 1.

Figura 4. La Figura 4 es una representación esquemática de una realización del módulo de rehidratación de microorganismos.

Figura 5. La Figura 5 es una representación esquemática de una realización del reactor termostatizado e iluminado para el soporte de soluciones de algas.

Figura 6. La Figura 6 muestra la cinética inhibidora de fenol obtenida por vía experimental, como se describe en el Ejemplo 1.

Figura 7. La Figura 7 muestra el cálculo de IC50 obtenido con los datos de la Figura. 6.

Figura 8. La Figura 8 muestra la cinética inhibidora de zinc obtenida por vía experimental, como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 9. La Figura 9 muestra el cálculo de IC50 obtenido con los datos de la Figura. 8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención tiene como objeto un dispositivo 1 para el análisis y la monitorización de la toxicidad en aguas con base a la tecnología conocida como acceso aleatorio descrita en Journal of Automatic Chemistry, vol. 10, Nr. 4 (octubre-diciembre de 1988), p. 167-170, e incorporado aquí como referencia que comprende:

a) un módulo 2 de almacenamiento de muestra acuosa;

b) un módulo 3 de almacenamiento de tampón acuoso;

c) un módulo 4 de suministro;

d) una bandeja 5 de reacción apta para acomodar cubetas 6 de reacción;

e) un módulo 7 de lavado de dichas cubetas 6 de reacción;

f) uno o más módulos 8 de medición luminométrica y/o módulos 9 fluorimétricos dispuestos en posiciones predefinidas de dicha bandeja 5 de reacción.

El módulo 4 dispensador es principalmente un módulo para recoger, transferir y agregar reactivos y muestras y podría comprender un brazo mecánico preferiblemente equipado con 3 grados de libertad, sensor con nivel capacitivo, precalentamiento de reactivos con temperatura programable, aguja con lavado interno y externo automático, predilución automática de reactivos y muestras con intervalo de muestreo preferiblemente comprendido entre 3 y 330 microlitros y paso comprendido entre 0,25 y 1,00 microlitros.

La bandeja 5 de reacción es una bandeja equipada con alojamiento para las cubetas 6 de reacción que contiene la muestra a analizar. La bandeja podría estar dispuesta para alojar una gran cantidad de cubetas, tales como los ejemplos 50, 60, 70, 80, 100 con diferente volumen, por ejemplo, 500 microlitros. En una realización preferida, la bandeja está equipada con la posibilidad de ajustar la temperatura de reacción, por ejemplo, en un rango comprendido entre 10 y 50ºC, por medio de un líquido circulante en un canal adecuado implementado en el cuerpo de la bandeja.

El módulo de lavado de las cubetas 7 de reacción se conectará preferiblemente a recipientes que contienen soluciones de lavado y programables para realizar de forma autónoma el número de ciclos de lavado y esterilización solicitados por el operador. El módulo de lavado se colocará, por ejemplo, en la periferia de la bandeja de reacción y accederá a las cubetas de la bandeja a través de una traslación vertical. El módulo de lavado preferiblemente también será un módulo de esterilización; en este caso, se usarán soluciones de esterilización adecuadas. El módulo de lavado 7 preferiblemente comprenderá una línea de drenaje específica para drenar el lavado.

El módulo 2 de almacenamiento de muestra acuosa es un módulo que contiene las muestras, lixiviados o extractos acuosos a analizar. En una realización, el módulo está estructurado para poder albergar preferiblemente al menos 4 cestas manejadas por 15 posiciones, cada una conteniendo 3 ml, y 8 recipientes fijos, cada uno conteniendo 3 ml.

El módulo 3 de almacenamiento de tampón acuoso es un compartimento para almacenar los tampones de dilución y las soluciones de rehidratación adecuadas para rehidratar o diluir los microorganismos utilizados para el análisis toxicológico. En una realización, el módulo incluye preferiblemente al menos dos cestas motorizadas con 16 posiciones para ampollas de 20 ml y preferiblemente al menos 4 recipientes cilíndricos fijos de 50 ml. El módulo de almacenamiento podría contener un termostato para ajustar la temperatura de este.

El dispositivo 1 podría comprender uno o más módulos de medición luminométrico 8 y/o fluorimétrico 9.

En una realización, el módulo de medición luminométrico 8 comprende un fotomultiplicador 18 y un haz de fibras ópticas 19 dispuesto en una posición predefinida de dicha bandeja 5 de reacción. El haz 19 de fibra óptica tiene una sección rectangular y una superficie que corresponde sustancialmente a la superficie de dichas cubetas 6 de reacción desde el lado de dicha bandeja 5 de reacción y una sección circular desde el lado de dicho fotomultiplicador 18; esta realización permite obtener mejores resultados analíticos, en particular cuando las fibras ópticas tienen tamaños comprendidos entre 100 y 150 mm^2 y preferiblemente aproximadamente 130 mm^2.

En una realización, el módulo de medición fluorimétrica 9 comprende al menos 3 fuentes de luz de excitación 20 con diferente longitud de onda y los respectivos detectores 21 están colocados a aproximadamente 90º con respecto a dichas fuentes de luz.

En una realización, el dispositivo 1 comprende un módulo para rehidratar microorganismos. Haciendo referencia a la FIG. 4, el módulo de rehidratación en una realización preferida se basa en una cesta 11 para albergar ampollas que contienen los microorganismos liofilizados; las ampollas, por ejemplo, podrían tener un volumen de aproximadamente 20-25 ml para permitir la entrada del tampón de rehidratación. La cesta 11 está contenida dentro

de un manto refrigerado 12 con temperatura controlada, por ejemplo, 4ºC, y se contrae en un árbol pequeño motorizado que puede permitir la rotación de las ampollas con el fin de mezclar la suspensión de microorganismos y el posicionamiento lo mismo debajo del dispositivo de extracción 13 del tapón de cierre de goma y permitir entonces la rehidratación automática de los microorganismos. El dispositivo de extracción 13 podría tener la forma de un gatillo para penetrar en el tapón de caucho con una traslación hacia abajo y la extracción de este con una traslación hacia arriba. Una vez retirado el tapón, la cesta 11 de mantenimiento de la ampolla se gira apropiadamente para colocar la ampolla debajo del módulo 4 de dispensar. El módulo 4 dispensador podría estar equipado entonces con una cánula de suministro conectado a una minibomba 17 adecuada para la transferencia del tampón de rehidratación desde el recipiente específico a la ampolla a rehidratar.

En una realización, el dispositivo comprende un reactor termostatizado e iluminado para el soporte de soluciones de algas. Haciendo referencia a la FIG. 5, el reactor termostatizado e iluminado para el soporte de soluciones de algas en una realización preferida comprende un tubo de ensayo 14 con grandes tamaños, por ejemplo, de vidrio, con un volumen de aproximadamente 100 ml, en el que la suspensión de algas se reconstituye para mantenerse aquí por un período de aproximadamente 30 días. El tubo de ensayo de vidrio se inserta dentro de un manto termostatizado a una temperatura de aproximadamente 25ºC. En la pared del manto se implementa una serie de orificios para albergar tantos diodos LED para iluminar la solución constantemente. Se coloca un tapón en el extremo superior del tubo de ensayo donde se sujeta un motor pequeño para la rotación de un eje pequeño sobre el que se encoge un mezclador helicoidal, necesario para mantener a las microalgas en suspensión. Desde el mismo tapón de cierre es posible acceder dentro del tubo de ensayo con la aguja de succión/dispensación existente en el módulo dispensador, tanto para recoger la suspensión de algas necesaria para el análisis como para introducir periódicamente una solución nutritiva, que se mantiene en el departamento de reactivos.

La presencia del reactor termostatizado e iluminado permite el uso de soluciones de algas para medir sustancias tóxicas, como herbicidas, metales pesados, etc. Las soluciones de algas deben mantenerse vivas a temperatura controlada, aligerándolas con longitudes de onda específicas y proporcionando sustancia nutritiva todos los días.

En una realización, el dispositivo 1 comprenderá incluso uno o más módulos 10 de medición colorimétrica, dispuestos en posiciones predefinidas de dicha bandeja de reacción 5. El módulo 10 de medición colorimétrica podría comprender, por ejemplo, un colorímetro, un espectrofotómetro, un espectrofotómetro con monocromador.

En una realización, el dispositivo 1 comprenderá medios uniformes para controlar las operaciones de los diferentes módulos tales como, por ejemplo, una plataforma electrónica que permite controlar todos los dispositivos operativos, el diálogo con el software de interfaz de usuario y la señalización oportuna remota a través de la web o teléfono móvil de los datos obtenidos y de cualquier anomalía analítica o instrumental registrada. Dichos medios para controlar las operaciones podrían comprender software y hardware para programar y ejecutar en forma totalmente automática los ciclos analíticos definidos por el operador, tales como, por ejemplo, para ejecutar análisis de punto final, cinética, tiempo fijo, multiestándar y diferenciales con las muestras del blanco, bajo luminiscencia y fluorescencia, con la posibilidad de poder asociarlo incluso a la medición espectrofotométrica de la colometría. Los diversos módulos que constituyen el dispositivo podrían controlarse mediante un sistema con un microprocesador central que controle las diversas fases de las secuencias analíticas. En particular, los diversos detectores (Espectrofotómetro, Colorímetro, Luminómetro, Fluorímetro) estarán dispuestos a lo largo de la periferia de la bandeja de reacción 5, que podría equiparse con un sistema de manipulación con motor paso a paso, permitiendo un posicionamiento preciso de cada cubeta delante de cada detector.

En una realización adicional, el dispositivo 1 podría comprender un módulo de muestreo con medios para la filtración, digestión UV, digestión ácida, destilación, diálisis, dilución y/o concentración de las muestras acuosas analizadas. Para monitorizar o analizar las aguas de suministro o drenaje o provenientes de un cuerpo de agua ambiental subterránea o de superficie, lixiviados de vertederos o extractos acuosos de suelos, sedimentos y materiales continuos, se necesita un módulo de muestreo. Algunas de estas matrices, entre las aguas de la red y las sustancias refluentes del efluente, no siempre se pueden analizar directamente, ya que están sujetas a tratamientos desinfectantes, como cloración, cloroaminación, ozonización y peroxidación. Por ejemplo, el nivel residual de cloro libre disuelto, generalmente comprendido entre 0,5 y 1,0 mg/l, que se mantiene con el fin de proteger el agua potable de la contaminación bacteriana durante las transferencias, debe demolerse preliminarmente con un agente eliminador adecuado.

Una opción utilizable en el pretratamiento de la muestra y proporcionada, bajo la forma preferible pero no necesaria, proporciona la prefiltración de las muestras a analizar. Es útil para eliminar sólidos suspendidos y, genéricamente, sustancias que pueden interferir con las mediciones analíticas. Además, podrían comprender medios para integrar un módulo para la preconcentración de la muestra, en el que es necesario aumentar la sensibilidad analítica y, por lo tanto, disminuir el umbral de toxicidad medible. En una versión de “laboratorio” del dispositivo, se proporciona un compartimento, en serie, en el que el operador puede albergar un gran número de muestras, procedentes de diferentes puntos de muestreo, y que pueden haber sido pretratadas (filtradas, destiladas, etc.). De antemano por el operador. En la versión “en línea”, es necesario llevar la muestra al analizador o de forma continua o con motivo de realizar un nuevo ciclo de análisis. Dado que las características físicas de la muestra (turbidez, presencia de sustancia orgánica, etc.) podrían no ser adecuadas para una transferencia directa de las mismas en el reactor

analítico, es necesario interponer entre la muestra y el analizador uno o más módulos de muestreo y pretratamiento, que podría permitir la preparación de la muestra para el análisis posterior. La muestra pretratada con uno o más de los modos descritos se hace fluir en tantos pozos pequeños con desbordamiento con volumen constante, que se tomarán del dispositivo en el momento adecuado.

En una realización adicional, el dispositivo 1 comprenderá medios para ajustar la temperatura del módulo 3 de almacenamiento de tampón acuoso y/o de la bandeja de reacción 5. El enfriamiento podría obtenerse mediante el paso continuo de agua refrigerada a la temperatura solicitada, dentro de un canal específico implementado en el cuerpo de la bandeja de reacción; el agua refrigerada será bombeada, por ejemplo, por un enfriador externo. El calentamiento podría obtenerse interrumpiendo la circulación de agua refrigerada y alimentando una banda de calentamiento con potencia térmica adecuada colocada en la base del cuerpo metálico de la bandeja de reacción.

También es objeto de la presente invención el uso del dispositivo en todas las formas de realización posibles descritas anteriormente en un proceso para analizar y controlar la toxicidad de una muestra acuosa usando bacterias y/o microalgas bioluminiscentes y dichos procedimientos.

Preferiblemente, el proceso para analizar la toxicidad aguda de acuerdo con la invención proporciona el uso de bacterias bioluminiscentes que pertenecen a la cepa de referencia Vibrio fischeri NRRL B-11177. Las bacterias se cultivan, estabilizan y liofilizan para garantizar el uso continuado de las mismas después de la rehidratación en un tampón salino adecuado. De esta forma, mantienen durante 25-30 días una señal de bioluminiscencia medible y una sensibilidad inalterada a los diferentes tipos de compuestos tóxicos, que se pueden agrupar en dos grandes macrocategorías: contaminantes orgánicos, pesticidas e hidrocarburos entre ellos, y contaminantes inorgánicos entre los metales pesados y aniones como el cianuro.

Preferiblemente, el proceso para determinar rápidamente la toxicidad de las algas de acuerdo con la invención proporciona el uso de microalgas que, preferiblemente pero no necesariamente, pertenecen a la especie Chlamydomonas reinhardtii. Las microalgas se cultivan, estabilizan e inmovilizan de manera original para garantizar el uso continuo de las mismas una vez resuspendidas en un tampón salino adecuado. De esta forma, conservan durante 30-35 días una fluorescencia relativa variable excitable y cuantificable y una sensibilidad inalterada a los diferentes tipos de compuestos tóxicos, que pueden agruparse en dos macrocategorías de oferta: contaminantes orgánicos, entre los herbicidas y contaminantes inorgánicos, entre los metales pesados.

La medición continua de los blancos y muestras con concentraciones crecientes e intervalos de tiempo predefinidos, básicamente de 30 segundos, da como resultado la generación de cinéticas de inhibición que permiten obtener información preliminar sobre la naturaleza y la concentración del contaminante que influye en la bioluminiscencia bacteriana y/o la señal de fluorescencia relativa variable de las algas.

Al usar el dispositivo de la invención también es posible realizar repeticiones inmediatas, con concentraciones de muestra iguales o mayores, para confirmar una toxicidad identificada o aclarar, en sentido positivo o negativo, una toxicidad dudosa.

Como se mencionó anteriormente, el parámetro comúnmente usado para definir una medición de toxicidad aguda es el porcentaje de inhibición. Representa la variación en la luz emitida por los microorganismos en puntos porcentuales causados por la presencia de la muestra. La emisión de luz del blanco realizada usando agua o matriz con toxicidad nula en lugar de la muestra se usa como valor de referencia.

Para las bacterias bioluminiscentes, el porcentaje de inhibición ($IC_{b(t)}$ (%)) podría determinarse como se muestra a continuación:

$$IC_{b(t)}(\%) = [1 - (RLU_{S(t)} / RLU_{B(t)})] \times 100,$$

donde $IC_{b(t)}$ (%) es la inhibición del porcentaje de bioluminiscencia en el tiempo t inducido por la muestra S, $RLU_{S(t)}$ es la medición de luminiscencia de la muestra S en el tiempo t expresada en unidades relativas de luminiscencia RLU y $RLU_{B(t)}$ es la medición de luminiscencia del blanco B en el tiempo t expresado en unidades relativas de luminiscencia RLU.

Para las microalgas:

$$IC_{f(t)}(\%) = [1 - (RVF_{S(t)} / RVF_{B(t)})] \times 100,$$

donde $IC_{f(t)}$ (%) es el porcentaje de inhibición en el tiempo t, $RVF_{S(t)}$ es la medida adimensional de la fluorescencia relativa variable calculada para la muestra S en el tiempo t y $RVF_{B(t)}$ es la medida adimensional de la fluorescencia relativa variable calculada para el blanco B en el tiempo t.

Las muestras acuosas se mezclan adecuadamente con dichos microorganismos en modo completamente automático por medio de tecnología discreta y dichas estaciones de medición pueden medir los fotones emitidos por

dichos microorganismos bajo bioluminiscencia y/o fluorescencia, por lo tanto cuando, después del contacto con dichas muestras acuosas, dichas estaciones de medición registran una variación significativa en el número de fotones emitidos, las señales oportunas del analizador de que dichas muestras acuosas están contaminadas.

Las sustancias añadidas (tampones de reacción) en los procedimientos descritos aquí alteran la fuerza iónica de dichas muestras acuosas, para hacerlas isotónicas para dichos microorganismos. Además, dichos tampones de reacción pueden usarse para alterar la concentración iónica de al menos un ion seleccionado y, más preferiblemente, para eliminar compuestos tóxicos generados después de la cloración, cloroaminación, ozonización o peroxidación de dicha red de suministro o drenaje de agua o de dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos.

Dichos microorganismos son una población de bacterias bioluminiscentes y una población de microalgas almacenadas en compartimentos separados. Dichas bacterias bioluminiscentes y dichas microalgas se pueden usar cada vez en serie o en paralelo, tanto para monitorizar las aguas como para analizar dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos. Más típicamente, dichos microorganismos se seleccionan de modo que la sensibilidad de este a los contaminantes se exprese a través de una variación significativa en las capacidades de foto emisión de estos. En el caso de las bacterias, esto se debe específicamente a la disminución o muerte de una porción o de toda la población considerada, mientras que en el caso de las microalgas esto se debe específicamente a una interferencia en el proceso normal de la fotosíntesis de la clorofila.

En una realización alternativa de la invención, es posible que se utilicen bacterias que muestren una emisión de luz aumentada, en respuesta a la presencia de contaminantes particulares. En este caso, la población bacteriana puede detectar la presencia de bionutrientes.

En una realización, en cada posición de la bandeja de reacción 5, dichos microorganismos, alternativamente bacterias o microalgas bioluminiscentes, se combinan con uno o más de dichos tampones acuosos y con una o más de dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos, para determinar la presencia de posibles contaminantes en dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos y todas las operaciones para agregar y mezclar dichos microorganismos, dichos tampones acuosos y dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos se realizan automáticamente mediante el módulo dispensador basándose en la tecnología robótica. Un luminómetro y un fluorímetro están asociados a posiciones fijas fuera de la bandeja de reacción; la bandeja de reacción 5 gira automáticamente para colocar alternativamente cada cubeta de reacción que contiene dichos microorganismos, dichos tampones acuosos y dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos a la altura del luminómetro o del fluorímetro, para medir automáticamente la luz emitida por la suspensión de reacción. Después de realizar las mediciones a intervalos de tiempo preestablecidos y durante la duración preestablecida, todas las suspensiones contenidas en dichas cubetas de reacción se retiran y se eliminan por medio de una línea de drenaje adecuada. Las posiciones usadas son lavadas y esterilizadas automáticamente por dicho módulo de lavado.

El proceso de acuerdo con una realización comprende los siguientes pasajes que definen un proceso para analizar y controlar continuamente muestras acuosas:

i. transferir muestras acuosas desde un suministro de agua o red de drenaje o desde un cuerpo de agua natural o artificial a un dispositivo del tipo acceso aleatorio

ii. rehidratar una o más ampollas de microorganismos;

iii. dosificar alícuotas de agua dentro de una o más cubetas colocadas en una bandeja de reacción;

iv. dosificar alícuotas de dichas muestras acuosas, en cantidades análogas a dichas alícuotas de agua añadidas en dichas cubetas de blanco, o en volúmenes menores, seguido de adiciones de volúmenes complementarios de agua, dentro de una o más cubetas de muestra colocadas en dicha bandeja de reacción;

v. dosificar alícuotas de uno o más tampones acuosos dentro de dichas cubetas de blanco y dichas cubetas de muestra;

vi. dosificar alícuotas de dichos microorganismos dentro de dichas cubetas de blanco y dichas cubetas de muestra;

vii. medir a tiempos preestablecidos, durante un intervalo de tiempo determinado en bioluminiscencia y/o fluorescencia, los fotones emitidos por dichas cubetas de blanco y por dichas cubetas de muestra;

viii. detectar, cuando se ha registrado un cambio significativo en la emisión de luz como resultado del contacto de dichas alícuotas de dichos microorganismos con dichas alícuotas de dichas muestras acuosas, la presencia de contaminantes en dichas muestras acuosas;

ix. extraer y descargar dichas alícuotas de dichos microorganismos, dichas alícuotas de dichos tampones acuosos, dichas alícuotas de agua y dichas alícuotas de dichas muestras acuosas de dichas cubetas de blanco y de dichas cubetas de muestra;

en el que dicho proceso se caracteriza porque la manipulación de dichas alícuotas de dichos microorganismos, dichas alícuotas de dichos tampones acuosos, dichas alícuotas de agua y dichas alícuotas de dichas muestras acuosas se gestiona de forma autónoma y automática mediante un brazo mecánico equipado preferiblemente con 3 grados de libertad equipado con aguja de recolección con sensor de nivel capacitivo.

El procedimiento de acuerdo con una realización adicional de la invención comprende los siguientes pasajes que definen un método analítico en lotes para detectar la presencia de contaminantes en muestras, lixiviados y extractos acuosos:

i. introducir una o más muestras, lixiviados y extractos acuosos dentro de un dispositivo de tipo acceso aleatorio;

ii. rehidratar una o más ampollas de microorganismos;

iii. dosificar alícuotas de agua dentro de una o más cubetas de blanco colocadas en una bandeja de reacción;

iv. dosificar alícuotas de dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos, en cantidades análogas a dichas alícuotas de agua añadidas en dichas cubetas de blanco, o en volúmenes menores, seguido de adiciones de volúmenes complementarios de agua, dentro de una o más cubetas de muestra colocadas en dicha bandeja de reacción;

v. dosificar alícuotas de uno o más tampones acuosos dentro de dichas cubetas de blanco y dichas cubetas de muestra;

vi. dosificar alícuotas de dichos microorganismos dentro de dichas cubetas de blanco y dichas cubetas de muestra;

vii. medir a tiempos preestablecidos, durante un intervalo de tiempo determinado en bioluminiscencia y/o fluorescencia, los fotones emitidos por dichas cubetas de blanco y por dichas cubetas de muestra;

viii. detectar, cuando se ha registrado un cambio significativo en la emisión de luz como resultado del contacto de dichas alícuotas de dichos microorganismos con dichas alícuotas de dichas muestras acuosas, lixiviados o extractos acuosos, la presencia de contaminantes en dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos;

ix. retirar y descargar dichas alícuotas de dichos microorganismos, dichas alícuotas de dichos tampones acuosos, dichas alícuotas de agua y dichas alícuotas de dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos de dichas cubetas de blanco y de dichas cubetas de muestra y repetir desde el principio el proceso descrito anteriormente;

caracterizado porque:

la manipulación de dichas alícuotas de dichos microorganismos, dichas alícuotas de dichos tampones acuosos, dichas alícuotas de agua y dichas alícuotas de dichas muestras, lixiviados o extractos acuosos se gestionan de forma autónoma y automática mediante un brazo mecánico equipado con 3 grados de libertad preferiblemente equipados con aguja de recogida con sensor de nivel capacitivo.

Preferentemente, pero no necesariamente, en ambas realizaciones de los procesos descritos anteriormente, para cada medición de dicha muestra, lixiviado o extracto acuoso, corresponde una medición de la pieza en bruto correspondiente, realizada añadiendo una cantidad igual o análoga de agua en lugar de la muestra, lixiviado o extracto mismo. Esto es posible gracias a las potencialidades intrínsecas del dispositivo basado en la tecnología RA, que tiene éxito en preparar y medir espacios y muestras en secuencia en pocos segundos. Además, es posible asociar a la misma medición del blanco una serie de mediciones de muestra con diferentes diluciones para determinar, con la máxima precisión, el nivel de toxicidad inducida por la muestra sobre los microorganismos seleccionados, es decir, la cantidad de muestra necesaria para reducir significativamente la luminiscencia de las bacterias y/o condicionan significativamente la emisión de fluorescencia después de una excitación adecuada por las microalgas, en un intervalo de tiempo determinado. Además, incluso el intervalo proporcionado entre una medición y la otra del mismo blanco y muestra puede programarse con precisión para realizar mediciones de tipo cinético y calcular el tiempo necesario para que los contaminantes causen una reducción significativa de la luminiscencia bacteriana y/o un cambio significativo en la emisión de fluorescencia de algas, que es causar un efecto de toxicidad medible. El uso de la tecnología discreta permite al usuario acumular simultáneamente y en tiempo casi real, información que correlaciona los tiempos de acción, las concentraciones y los efectos de toxicidad de los contaminantes tanto en organismos procariotas como eucarióticos, permitiendo tanto una monitorización continua en línea de una misma matriz como un cribado en lotes con alto rendimiento de diferentes muestras, lixiviados o extractos.

Típicamente, en la prueba bacteriana, se observa una reducción de la bioluminiscencia cuando los contaminantes con efecto tóxico están contenidos en la muestra acuosa y esta reducción se define como el porcentaje de inhibición. El resultado analítico se expresa como IC 50 en un tiempo de incubación determinado, que es la concentración de muestra, lixiviado o extracto acuoso o contaminante necesario para causar una reducción de bioluminiscencia igual al 50 por ciento de la bioluminiscencia emitida por el blanco después de ese mismo tiempo de incubación.

Típicamente en la prueba de algas, se observa una reducción en la fluorescencia relativa variable, cuando los contaminantes con efecto tóxico están contenidos en la muestra acuosa y esta reducción se define como el porcentaje de inhibición. El resultado analítico se expresa como IC 50 en un tiempo de incubación determinado, que es la concentración de muestra, lixiviado o extracto acuoso o contaminante necesario para causar una reducción en la fluorescencia relativa variable igual al 50% de la fluorescencia relativa variable emitida por el blanco después de ese mismo tiempo de incubación

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las bacterias bioluminiscentes se proporcionan en forma liofilizada, se rehidratan automáticamente y se mantienen en una solución conservante conveniente para ellas en dicho módulo para la rehidratación y el almacenamiento de microorganismos.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las microalgas se proporcionan en forma inmovilizada y se resuspenden automáticamente en un tampón acuoso adecuado y se mantienen en una solución conservante conveniente para el mismo en dicho módulo para la rehidratación y el almacenamiento de microorganismos.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, las bacterias bioluminiscentes se mantienen en condiciones de crecimiento extremadamente lento para mantener a un nivel máximo la reproducibilidad de las prestaciones analíticas. Esto se obtiene al refrigerar a 4ºC un compartimento dedicado de dicho módulo para la rehidratación y el almacenamiento de microorganismos por medio de un circuito de refrigeración.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, las microalgas se mantienen en condiciones óptimas de crecimiento con el fin de mantener a un nivel máximo la reproducibilidad de las prestaciones analíticas. Esto se obtiene acondicionando a 24ºC un compartimiento dedicado de dicho módulo para la rehidratación y el almacenamiento de microorganismos por medio de un circuito de acondicionamiento.

Ejemplos

Por medio del dispositivo objeto de la presente invención, se realizaron los ensayos descritos en los ejemplos, de acuerdo con uno de los procesos descritos anteriormente. Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no limitan la invención.

Ejemplo 1 - Medición de la toxicidad del fenol como compuesto orgánico de referencia

Se resuspendió una bacteria liofilizada de Vibrio fischeri NRRL B-11177 en 5 ml de tampón de solución salina estéril y se usó para probar la toxicidad de 11 muestras estándar de fenol con concentraciones que aumentaban de 1 a 25 ppm, con respecto a un blanco de referencia. La luminiscencia en cada muestra se midió cada 30 segundos durante 16 minutos. Al final del análisis, las cubetas se lavaron y esterilizaron automáticamente. Todo el ciclo analítico, incluido el lavado, se realizó en 30 minutos. La IC 50 calculada por el analizador resultó ser de 18.5 ppm, en perfecto acuerdo con lo reportado en la literatura, que está comprendida entre 13.0 y 26.0 ppm. La Figura. 6 muestra las lecturas luminométricas en cinéticas a la izquierda y la cinética de inhibición al aumentar la concentración de fenol a la derecha. La Figura. 7 muestra el cálculo de IC 50.

Ejemplo 2 - Medición de toxicidad del zinc como metal pesado de referencia

Un liofilizado bacteriano de Vibrio fischeri NRRL B-11177, preparado según el procedimiento original realizado por el inventor, se resuspendió en 5 ml de tampón de solución salina estéril y se usó para probar la toxicidad de 11 muestras de sulfato de zinc con concentraciones que aumentaban de 1 a 12.5 ppm, con respecto a un blanco de referencia. La luminiscencia en cada muestra se midió cada 30 segundos durante 16 minutos. Al final del análisis, las cubetas se lavaron y esterilizaron automáticamente. Todo el ciclo analítico, incluido el lavado, se realizó en 30 minutos. La IC 50 calculada por el analizador resultó ser de 7.5 ppm, en perfecto acuerdo con lo informado en la literatura, que está comprendida entre 3 y 10 ppm. La Figura 8 muestra las lecturas luminométricas en cinética a la izquierda y la cinética de inhibición al aumentar la concentración de sulfato de zinc a la derecha. La Figura. 9 muestra el cálculo de IC 50.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (1) basado en acceso aleatorio y tecnología discreta con lectura directa para análisis y monitorización de toxicidad en aguas que utilizan bacterias y/o microalgas bioluminiscentes que comprende:

a) un módulo (2) de almacenamiento de muestra acuosa;

b) un módulo (3) de almacenamiento de tampón acuoso;

c) un módulo (4) dispensador;

caracterizado porque comprende:

d) una bandeja de reacción (5) apta para acomodar cubetas de reacción (6);

e) cubetas lavables y esterilizables alojadas en dicha bandeja de reacción;

f) un módulo (7) de lavado y esterilización de dichas cubetas de reacción (6), en el que el módulo de lavado incluye una línea de drenaje y una conexión a recipientes, teniendo los recipientes soluciones de lavado y esterilización;

g) uno o más módulos de medición luminométricos (8) dispuestos en posiciones predefinidas de dicha bandeja de reacción (5), en el que dicho módulo (8) de medición luminométrico comprende un fotomultiplicador (18) y un haz (19) de fibra óptica dispuesto en una posición predefinida de dicha bandeja de reacción (5), en el que dicho haz (19) de fibra óptica tiene una sección rectangular y una superficie que corresponde sustancialmente a la superficie de dichas cubetas de reacción (6) en el lado de dicha bandeja de reacción (5) y una sección redonda en el lado de dicho fotomultiplicador (18) y en el que la bandeja de reacción (5) gira automáticamente para colocar alternativamente cada cubeta de reacción para medir automáticamente la luz emitida por la suspensión de reacción, en donde las cubetas de reacción tienen posiciones en la bandeja de reacción, y el módulo dispensador está configurado para combinar bacterias bioluminiscentes con uno o más tampones acuosos y una o más muestras dentro de las cubetas en sus posiciones en la bandeja de reacción.

2. Dispositivo (1) según la reivindicación 1, que comprende además uno o más módulos de medición fluorimétricos.

3. El dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho módulo (9) de medición flourimétrica comprende al menos 3 fuentes (20) de luz de excitación a diferentes longitudes de onda, y los detectores (21) respectivos se establecen a aproximadamente 90ºC con respecto a dichas fuentes de luz, en donde dichas fuentes de luz de excitación se colocan en correspondencia con la parte inferior de la cubeta.

4. El dispositivo (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un módulo (11, 12, 13) de rehidratación de microorganismos.

5. El dispositivo (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un reactor termostatizado e iluminado para el soporte de soluciones de algas (14, 15, 16).

6. El dispositivo (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un módulo de muestreo.

7. El dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho módulo de muestreo comprende medios para la filtración, digestión UV, digestión ácida, destilación, diálisis, dilución y/o concentración de muestras acuosas.

8. Dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un módulo (10) de medición colorimétrico dispuestos en posiciones predefinidas de dicha bandeja de reacción (5).

9. Dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además medios para ajustar la temperatura de dicho módulo (3) de almacenamiento de tampón acuoso y/o de dicha bandeja de reacción (5).

10. El dispositivo (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que dichos microorganismos son bacterias que pertenecen al género *Photobacterium*, *Vibrio*, *Photorhabdus* y/o microalgas pertenecientes a la especie *Chlamydomonas reinhardtii*.

11. El dispositivo (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además medios para controlar operaciones de los módulos del dispositivo.

12. Uso de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en un proceso para el análisis y la monitorización de la toxicidad de una muestra acuosa utilizando bacterias y/o microalgas bioluminiscentes.

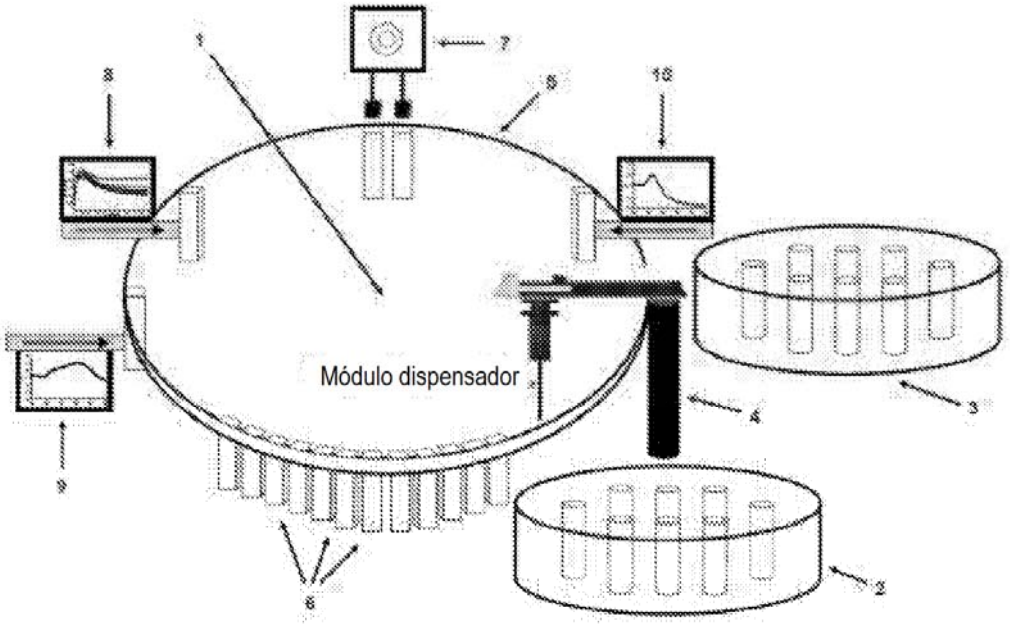

FIG.1

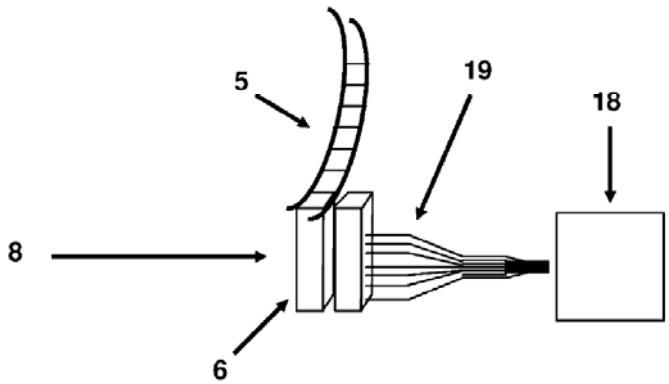

FIG.2

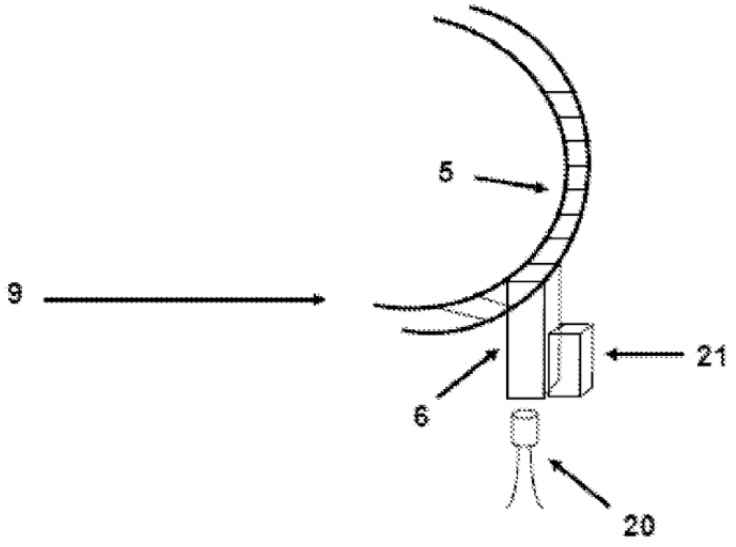

FIG.3

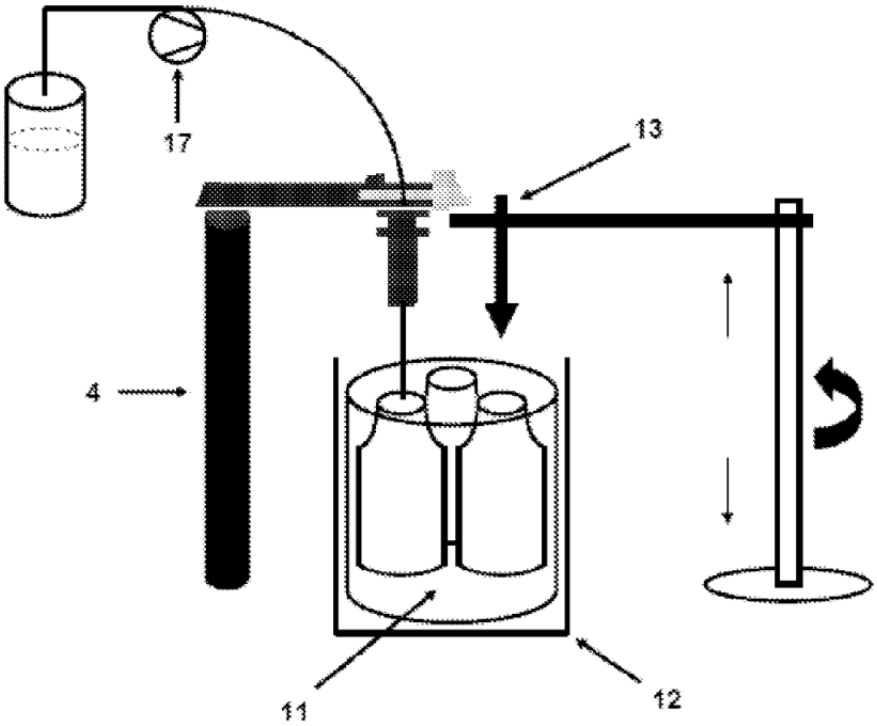

FIG.4

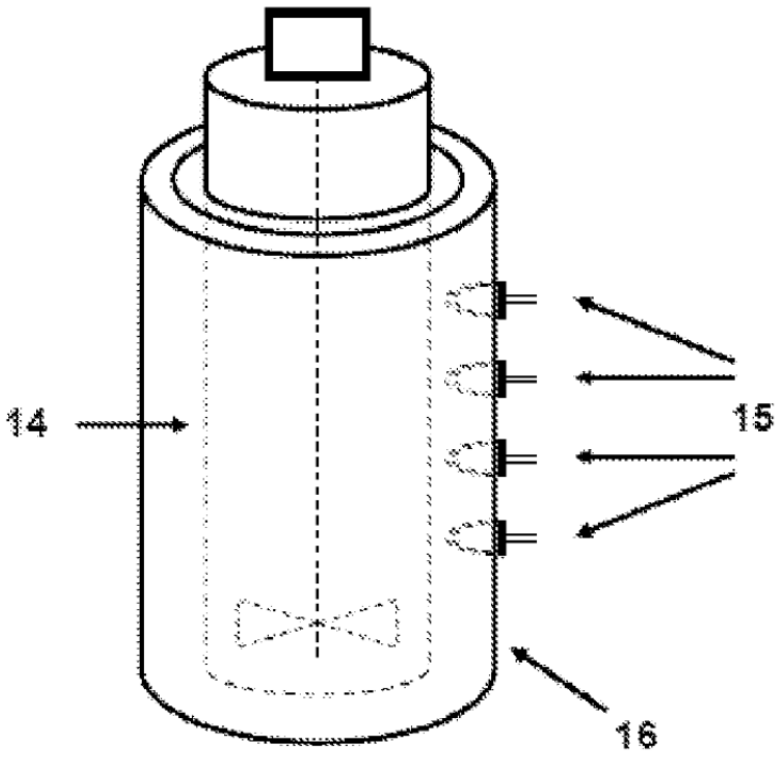

FIG.5

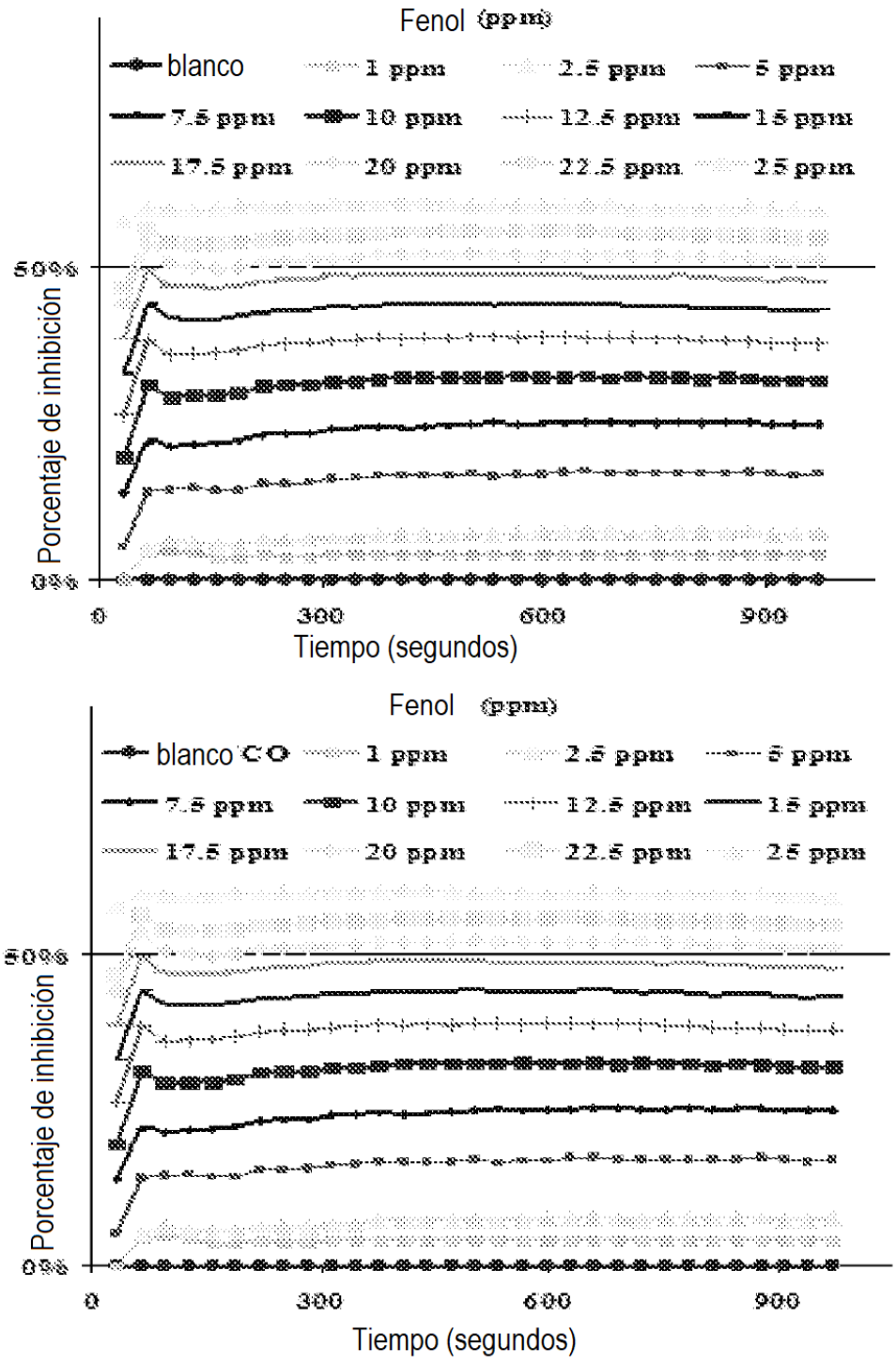
Fenol (ppm)
blanco
1 ppm
2.5 ppm
5 ppm
7.5 ppm
10 ppm
12.5 ppm
15 ppm
17.5 ppm
20 ppm
22.5 ppm
25 ppm
50%
0%
Porcentaje de inhibición
0
300
600
900
Tiempo (segundos)
Fenol (ppm)
blanco CO
1 ppm
2.5 ppm
5 ppm
7.5 ppm
10 ppm
12.5 ppm
15 ppm
17.5 ppm
20 ppm
22.5 ppm
25 ppm
50%
0%
Porcentaje de inhibición
0
300
600
900
Tiempo (segundos)

FIG.6

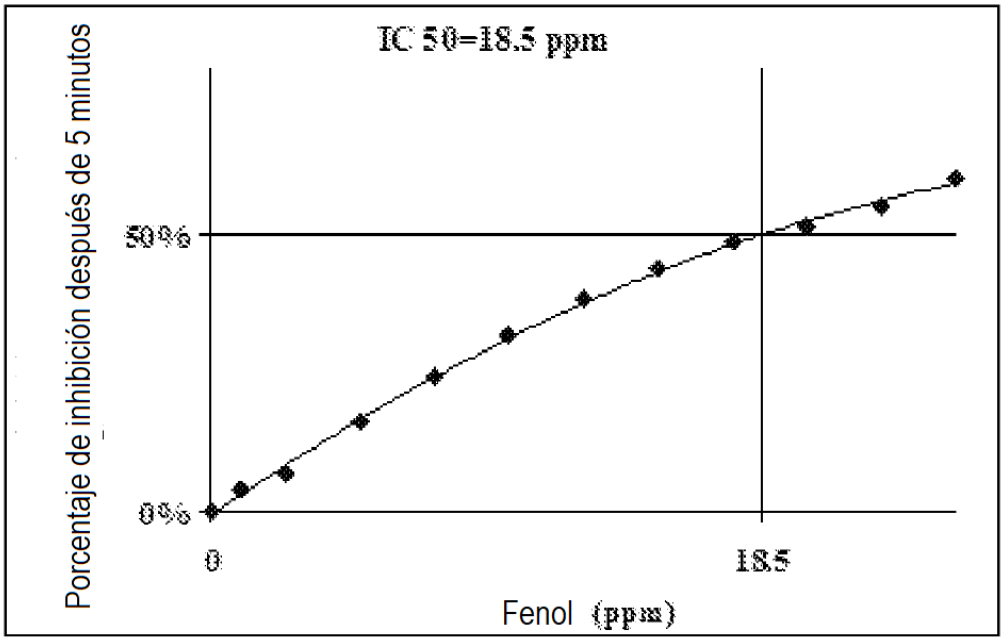
IC 50=18.5 ppm
Porcentaje de inhibición después de 5 minutos
50%
0%
0
18.5
Fenol (ppm)

FIG.7

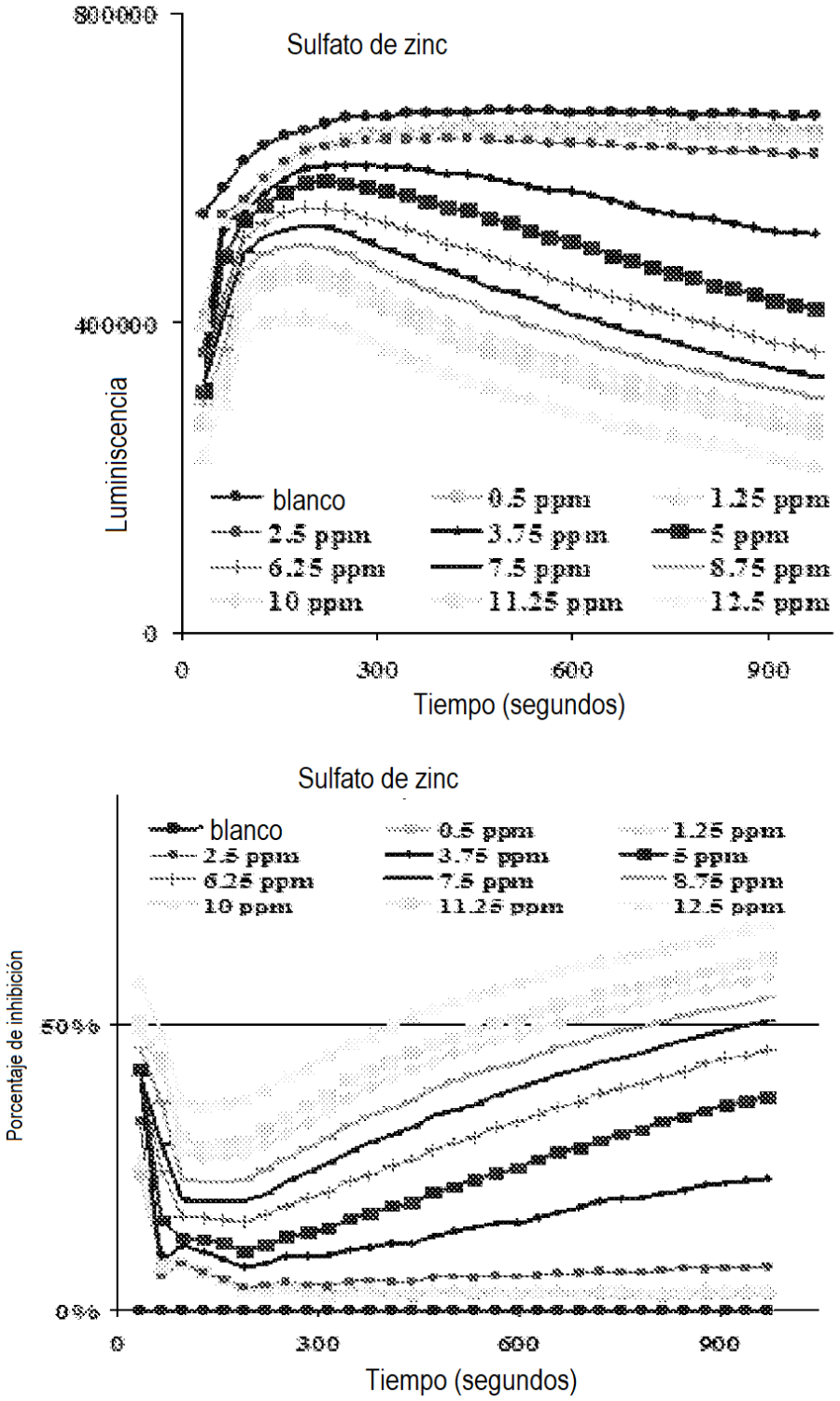
Sulfato de zinc
800000
400000
0
Luminiscencia
blanco
0.5 ppm
1.25 ppm
2.5 ppm
3.75 ppm
5 ppm
6.25 ppm
7.5 ppm
8.75 ppm
10 ppm
11.25 ppm
12.5 ppm
0
300
600
900
Tiempo (segundos)
Sulfato de zinc
blanco
0.5 ppm
1.25 ppm
2.5 ppm
3.75 ppm
5 ppm
6.25 ppm
7.5 ppm
8.75 ppm
10 ppm
11.25 ppm
12.5 ppm
Porcentaje de inhibición
50%
0%
0
300
600
900
Tiempo (segundos)

FIG.8

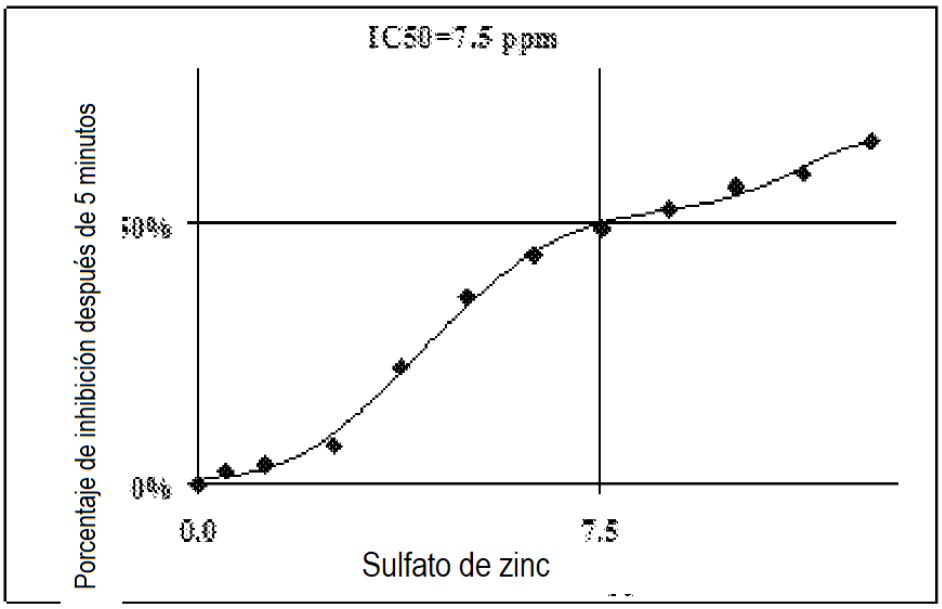
IC50=7.5 ppm
Porcentaje de inhibición después de 5 minutos
50%
0%
0.0
7.5
Sulfato de zinc

FIG.9