

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 374**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 21/27** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2009 PCT/US2009/059239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10062472**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09740783 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2352838**

54 Título: **Procedimiento de medición del contenido microbiológico en medios acuosos**

30 Prioridad:

**26.05.2009 US 472024**

**03.11.2008 US 263829**

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

**06.06.2018**

73 Titular/es:

**GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)**

**1 River Road**

**Schenectady, NY 12345, US**

72 Inventor/es:

**BOYETTE, SCOTT, M.;**

**CAI, HONG;**

**JIN, YAN;**

**LI, JIE;**

**YANG, KECHAO;**

**XU, RONG;**

**WANG, YU;**

**HIRST, PAUL, RONALD y**

**JIANG, JUAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 671 374 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de medición del contenido microbiológico en medios acuosos

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para cuantificar el contenido microbiológico en medios acuosos y más particularmente, a ensayos que se basan en fluorescencia para medir el contenido microbiológico total.

### Antecedentes de la invención

10 La presencia de actividad microbiana en los sistemas de agua públicos puede causar riesgos para la salud. Además, la detección y el control de microorganismos en los sistemas industriales son fundamentales para diversas empresas, ya que la presencia de dichos organismos contribuye significativamente a la corrosión, la deposición y el ensuciamiento del sistema e impacta directamente en los costes de operación de los sistemas. Monitorizar las concentraciones microbianas en los sistemas industriales y los sistemas públicos de agua, y el tratamiento de estos sistemas, como al aplicar biocidas, es una parte importante del mantenimiento de estos sistemas.

15 Los sistemas de monitorización convencionales para la detección microbiana usan procedimientos que se basan en cultivo o procedimientos que se basan en bioquimioluminiscencia. Ambos procedimientos cuantifican la población microbiana; sin embargo, existen defectos y defectos intrínsecos asociados con ambos procedimientos. El procedimiento que se basa en cultivo requiere un largo tiempo de incubación y, a menudo, subestima el número de microbios debido a la composición del medio de incubación. El procedimiento de bioquimioluminiscencia es rápido, pero tiene una precisión pobre y con frecuencia se obtienen resultados falsos positivos y falsos negativos.

20 Las biopelículas presentan preocupaciones adicionales para controlar las concentraciones microbianas. Las biopelículas son grupos de microbios que crecen en agregaciones complejas y se adhieren a superficies inertes o vivas. Las células en una biopelícula se mantienen fuertemente unidas entre sí mediante una matriz de compuestos poliméricos, tales como exopolisacáridos, lipopolisacáridos o glicoproteínas. Además de las incrustaciones, los problemas de corrosión y los problemas de salud que se mencionan anteriormente, las biopelículas pueden reducir la transferencia de calor y la presión hidráulica en los sistemas de agua de enfriamiento industrial, taponar los  
25 inyectores de agua y obstruir los filtros de agua, y dar como resultado una corrosión microbiana. Las biopelículas se protegen mediante capas de expolímeros y son extremadamente resistentes a los desinfectantes y otros biocidas.

Lo que se necesita es un sistema y un procedimiento preciso y rápido que tenga un alto grado de sensibilidad para cuantificar el contenido microbiológico, incluida la cuantificación del contenido de biopelícula, en medios acuosos.

30 El documento US 2007/196884 describe un procedimiento de detección de coliformes que se basa en el uso de una mezcla de aminoácidos para promover la expresión de enzimas inducibles en ausencia de crecimiento celular.

### Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a un procedimiento para medir el contenido microbiológico total en un medio acuoso. Las diversas realizaciones proporcionan procedimientos mejorados para medir el contenido microbiológico total en medios acuosos, que son fáciles de usar, baratos y precisos con un alto grado de sensibilidad y se pueden completar en un corto período de tiempo.

### Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 representa un gráfico de un gráfico de regresión del LOG delta RLU frente a la concentración de células LOG (ufc/ml) para *Pseudomonas fluorescens* que se diluye en solución salina tamponada con fosfato (PBS) tratada en autoclave.

La Figura 2 representa un gráfico de un gráfico de regresión del LOG delta RLU frente a la concentración celular (ufc/ml) para *Pseudomonas fluorescens* que se diluye en agua de torre de enfriamiento filtrada.

La Figura 3 representa un gráfico de lecturas de ensayo para concentración celular (ufc/ml) que se basa en el contenido microbiológico total y recuento de placa y bioluminiscencia del ATP frente a diluciones celulares para *Pseudomonas fluorescens* que se diluye en solución salina tamponada con fosfato (PBS) tratada en autoclave.

45 La Figura 4 representa un gráfico de lecturas de ensayo para concentración celular (ufc/ml) que se basa en el ensayo bacteriano total y recuento de placa y bioluminiscencia del ATP frente a diluciones celulares para *Pseudomonas fluorescens* que se diluye en agua de torre de enfriamiento filtrada.

50 La Figura 5 representa un gráfico de un gráfico de regresión del LOG delta delta RLU frente al LOG de la concentración de células (cfu/ml) para *Pseudomonas fluorescens* que se diluye en agua de torre de enfriamiento tratada en autoclave.

La Figura 6 representa un gráfico de un gráfico de regresión del LOG delta RLU frente al LOG de la concentración de células (ufc/ml) para la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* que se suspende en un tampón salino al 0,85 %.

La Figura 7 es un dibujo esquemático de un sistema para controlar el contenido bacteriano total en un medio acuoso.

5 La Figura 8 es una unidad de medición óptica del sistema de monitorización total de bacterias de la Figura 7.

### Descripción detallada de la invención

Las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los puntos finales de todos los rangos que enumeran la misma característica se pueden combinar de forma independiente e incluyen el punto final mencionado.

10 El modificador "aproximadamente" que se usa en relación con una cantidad incluye el valor que se indica y tiene el significado dictado por el contexto (por ejemplo, incluye los intervalos de tolerancia que se asocian con la medición de la cantidad particular).

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente puede o no ocurrir, o que el material que se identifica posteriormente puede o no estar presente, y que la descripción incluye 15 instancias donde ocurre el evento o circunstancia o donde el material está presente, y los casos donde el evento o circunstancia no ocurre o el material no está presente.

"En el texto posterior dondequiera que se use la expresión "aspecto", "realización" o "ejemplo", no se debe entender como de acuerdo con la presente invención, excepto cuando se indique explícitamente que es la invención de acuerdo con la presente solicitud". En una realización, un proceso para medir el contenido microbiológico total en un medio acuoso que incluye añadir un colorante fluorescente al medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio 20 acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, liberar el contenido intracelular de la materia microbiológica en el medio acuoso por calor o lisis química de la materia microbiológica, medir la señal fluorescente en el medio acuoso con el contenido intracelular que se libera de la materia microbiológica para obtener una segunda señal fluorescente, sustraer la señal de referencia de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta e igualar la señal fluorescente neta con un contenido microbiológico.

El proceso mide el contenido microbiológico total en un medio acuoso. La materia microbiológica puede ser microbios, como las bacterias. Los ejemplos no limitantes de bacterias incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Klebsiella*, *Comamonas terrigena*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter vulgaris*, *Sphaerotilus natans*, especies de *Gallionella*, *Mycobacterium terrae*, *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium breve*, *Salmonella enterica*, *Enterica serovar Typhimurium*, espora de *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter aerogenes*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Candida albicans* y *Escherichia coli*. 30

El medio acuoso puede ser cualquier tipo de medio acuoso que pueda contener materia microbiológica, que incluyan medios acuosos en los que los microbios de la biopelícula se han desplazado o dispersado. En una realización, el medio acuoso es agua. En una realización, el agua puede ser agua municipal o agua industrial, tal como agua de torre de enfriamiento. En otra realización, el medio acuoso puede ser soluciones acuosas para fabricación de productos de cuidado personal o procesamiento de alimentos y bebidas o farmacéutico. En una realización, los medios acuosos pueden ser una solución salina. En otra realización, el medio acuoso puede ser una solución tampón de fosfato. 35

Se agrega un colorante fluorescente al medio acuoso. El colorante fluorescente puede ser cualquier tipo de colorante que cambie su señal fluorescente en presencia de materia microbiológica. En una realización, el colorante fluorescente es un fluorocromo, que es un colorante microbiológico que se une con componentes celulares biológicos, tales como ácidos nucleicos, proteínas, componentes citoplasmáticos y componentes de membrana. 40

Los ejemplos de fluorocromos incluyen, pero no se limitan a, colorantes de naranja de acridina, bromuro de etidio, Hoechst 33258, Hoechst 33342, yoduro de propidio, 4',6-diamidino-2-fenilindol y ácidos nucleicos disponibles comercialmente, tales como PicoGreen®, SYTO® 16, SYBR® Green I, SYBR® Green II, SYBR® Gold, YOYO™, TOTO™, TO-PRO®, YO-PRO®, Texas Red®, Redmond Red®, Bodipy® Dyes u Oregon Green®. Los fluorocromos están disponibles en el mercado en Molecular Probes (Eugene, OR), Sigma Chemical (St Louis, MO), Amersham (Arlington Heights, IL), Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA) o Synthetic Genetics (San Diego, CA). En otra 45 realización, el colorante de fluorocromo puede ser un colorante de cianina, que está disponible comercialmente como PicoGreen® TOTO™, SYBR® Green I, SYBR® Green II, SYBR® Gold o SYBR® Green I. En otra realización, el fluorocromo es un colorante asimétrico de cianina, como SYBR® Green I.

El colorante fluorescente se agrega al medio acuoso en una cantidad adecuada para la fluorescencia de la materia microbiológica en el medio acuoso. En una realización, el colorante fluorescente se agrega en una cantidad de 55 aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg de colorante fluorescente por litro de medio acuoso. En otra realización, el colorante fluorescente se agrega en una cantidad de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10

mg por litro de medio acuoso. En otra realización, el colorante se agrega en una cantidad de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1,0 mg por litro de medio acuoso.

5 En una realización, se retira una porción del medio acuoso para analizar. Porciones del medio acuoso se pueden eliminar manualmente o se pueden eliminar sistemáticamente mediante un dispositivo de prueba en línea. El colorante fluorescente se agrega al medio acuoso y se dispersa mezclando. En otra realización, se inyecta una solución del colorante fluorescente en la muestra del medio acuoso y se combina.

10 Cuando se usa un fluorocromo, el pH del medio acuoso se mantiene dentro de un intervalo adecuado para optimizar la fluorescencia del colorante. En una realización, el pH del medio acuoso se mantiene de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,5. En otra realización, el pH del medio acuoso se mantiene desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.

15 En una realización, se agrega un tampón al medio acuoso para mantener el pH del medio acuoso dentro de un intervalo adecuado. El tampón puede ser cualquier tipo de tampón que no afecte a la materia microbiológica o las mediciones de fluorescencia en el medio acuoso. En una realización, el tampón es un tampón inorgánico, tal como solución salina tamponada con fosfato o tampón de borato. En otra realización, el tampón es un tampón orgánico, tal como tris(hidroximetil)aminometano, ácido etilendiaminotetraacético. Ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico o mezclas de los mismos. En una realización, el tampón es una mezcla de tris(hidroximetil)aminometano y ácido etilendiaminotetraacético. En otra realización, una mezcla de tris(hidroximetil)aminometano en un intervalo de concentración de aproximadamente 1 mol/L a aproximadamente 30 mmol/L y el ácido etilendiaminotetraacético en un intervalo de concentración de aproximadamente 100 mmol/L a aproximadamente 3 mmol/L se encuentra en una relación molar de aproximadamente 10: 1.

20 El tampón se puede añadir antes o después de añadir el fluorocromo al medio acuoso. En una realización, el fluorocromo y el tampón se mezclan previamente y se agregan juntos al medio acuoso.

25 En una realización, el tampón se agrega al medio acuoso en una cantidad de aproximadamente 1 por ciento en volumen a aproximadamente 30 por ciento en volumen que se basa en el volumen del medio acuoso. En otra realización, el tampón se agrega al medio acuoso en una cantidad de aproximadamente 1 por ciento en volumen a aproximadamente 15 por ciento en volumen que se basa en el volumen del medio acuoso. En otra realización, el tampón se agrega al medio acuoso en una cantidad de aproximadamente 5 por ciento en volumen a aproximadamente 10 por ciento en volumen que se basa en el volumen del medio acuoso.

30 Se obtiene una señal fluorescente de referencia midiendo la fluorescencia del medio acuoso con el colorante fluorescente. Como se usa en este documento, "fluorescente" significa la luz que emite un compuesto cuando se excita por una luz de longitud de onda más corta. Las longitudes de onda de excitación y emisión dependen del colorante fluorescente que se selecciona. En una realización, la longitud de onda de excitación es de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 600 nm y la longitud de onda de emisión es de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm.

35 La fluorescencia se puede medir con cualquier tipo de detector de fluorescencia. En una realización, la señal fluorescente se mide mediante espectroscopía de fluorescencia, microscopía de fluorescencia, detección de matriz de diodos de fluorescencia, lectura de fluorescencia de microplacas o citometría de flujo. En una realización, el detector de fluorescencia es un dispositivo de detección portátil que se basa en fluorescencia o un instrumento de monitorización en línea de la condición del agua que tiene espectroscopía de fluorescencia. En una realización, el dispositivo de detección portátil que se basa en fluorescencia tiene una luz de excitación LED y un detector de emisión PMT. En una realización, el dispositivo portátil de detección que se basa en fluorescencia tiene una luz de excitación LED y un detector de emisión de fotodiodos.

45 La medición se realiza rápidamente y se puede tomar y promediar varias mediciones. La materia microbiológica se puede detectar a una concentración tan baja como  $10^4$  unidades formadoras de colonia (ufc) por mililitro de medio acuoso que se prueba sin requerir un proceso de concentración previo a la prueba.

La medición de referencia se puede registrar manualmente o medir y almacenar en un instrumento de monitorización en línea.

50 El colorante fluorescente tiñe los componentes celulares microbiológicos, pero no puede penetrar las membranas celulares intactas de las células microbiológicas. Para medir el contenido microbiológico total, el contenido intracelular de la materia microbiológica se libera en el medio acuoso donde se puede poner en contacto con el colorante fluorescente. En una realización, los contenidos intracelulares de materia microbiológica se liberan por lisis de células de la materia microbiológica, que rompe la membrana celular. La lisis se realiza usando calor o procedimientos químicos. En contraste con el calor o la lisis química que se usan en la presente invención, se puede usar la lisis mecánica. La lisis mecánica rompe físicamente las barreras celulares, como por corte, vibración o fuerza. 55 Los ejemplos de procedimientos mecánicos incluyen, pero no se limitan a, flujo de celda que se impulsa por presión a través de estructuras parecidas a filtros o barras de pequeña escala en canales fluidicos, células que se tensionan osmóticamente con mezcla rápida por difusión de agua de fuerza iónica baja, sometiendo a las células a fuerzas de corte mientras entran a una región especial con estructuras agudas de pequeña escala, ruptura de las barreras

celulares con un batidor minicuentas o un molino de cuentas o aplicación de energía ultrasónica a las células en el medio acuoso.

La lisis química se produce cuando se usan productos químicos para romper las barreras celulares y permitir que se libere el contenido intracelular. Se puede usar cualquier sustancia química que pueda romper las barreras celulares. En una realización, se usan detergentes, enzimas, disolventes de extracción o tampones de lisis. Los detergentes incluyen, pero no se limitan a, dodecil sulfato, 3-[(3-colamidopropil)dimetil]amonio]-1-propanosulfonato, detergente TWEEN™ 20, detergentes TRITON™ serie X, colato de sodio, desoxicolato de sodio, cloruro de guanidinio. Las enzimas incluyen, pero no se limitan a, lisozimas, mutanolisina, labiasa, lisostafina, lítica, proteinasa K, endolisina o acromopeptidasas. Los disolventes de extracción incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona, fenol, triclorotrifluoroetano o una mezcla de fenol y tiocianato de guanidinio o cloruro de guanidinio. Los tampones de lisis incluyen, entre otros, cloruro de amonio, compuestos de amonio cuaternario, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, dodecilsulfato de sodio, hexametáfosfato, pirofosfato de sodio, Zap-oglobin™, un tampón de lisis disponible comercialmente en Coulter Diagnostics o tampón de lisis celular CyQUANT™, disponible comercialmente en Molecular Probes.

El reactivo se puede agregar en cualquier cantidad adecuada para lisar la materia microbiológica y se puede agregar en exceso. En una realización, el reactivo se agrega en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10.000 mg por litro de medio acuoso. En otra realización, el reactivo se agrega en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por litro de medio acuoso. En otra realización, el reactivo se agrega en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg por litro de medio acuoso. La lisis celular se puede lograr térmicamente calentando el medio acuoso, tal como con un bloque térmico o placa caliente. En una realización, el medio acuoso se calienta a una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 100 °C. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C. En una realización, el medio acuoso se calienta desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 1 hora. En otra realización, el medio acuoso se calienta desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos, que incluye desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 15 minutos. En otra realización, el medio acuoso se calienta desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 3 minutos.

En contraste con el calor o la lisis química que se usan en la presente invención, las células se pueden lisar eléctricamente con una serie de pulsos eléctricos, mediante mezcla difusa y captura dielectroforética o mediante radiación de microondas. Los radicales libres también se pueden usar para la lisis celular. El procedimiento incluye aplicar un campo eléctrico a una mezcla de un ion metálico, peróxido y la materia microbiológica en el medio acuoso para generar radicales libres, que atacan las barreras celulares.

Las señales fluorescentes del medio acuoso se miden antes y después de que el contenido intracelular de la materia microbiológica se haya extraído y liberado en el medio acuoso para proporcionar una señal fluorescente de referencia y una segunda señal fluorescente, respectivamente. Estas señales fluorescentes se pueden registrar manualmente o se pueden medir y almacenar en un instrumento de monitorización en línea.

La señal fluorescente de referencia se sustrae de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta.

La señal fluorescente neta se puede igualar con un contenido microbiológico total. Se puede preparar una curva de calibración para un colorante fluorescente que se selecciona a partir de concentraciones que se conocen de materia microbiológica y mediciones de fluorescencia de la concentración. En una realización, las concentraciones de materia microbiológica se determinan mediante el procedimiento de recuento de placa. En una realización, se miden varias muestras que contienen contenidos microbiológicos totales que se conocen y el colorante fluorescente que se selecciona para obtener señales fluorescentes. Los números de registro de estas señales se trazan en un gráfico y el análisis de regresión se puede realizar para obtener una curva de calibración que iguale el contenido microbiológico total con señales fluorescentes.

La concentración bacteriana total se puede medir rápidamente y, dependiendo del procedimiento que se selecciona para liberar los contenidos extracelulares de la materia biológica, los ensayos se pueden completar en 5 minutos. Los ensayos rápidos son adecuados para el uso en el laboratorio, aplicaciones de campo, sistemas de lotes automatizados en línea o sistemas de monitorización fuera de línea. En otra realización, los ensayos se pueden automatizar y realizar de forma continua.

En una realización de acuerdo con la presente solicitud, se puede obtener una señal fluorescente de fondo para eliminar la interferencia de fondo y mejorar la precisión de la medición del contenido microbiológico en un medio acuoso. Se puede obtener una señal de fondo midiendo la fluorescencia de cualquier componente adicional orgánico o no celular. En una realización, se sustrae una señal de fondo de la señal fluorescente neta. En una realización, un proceso para medir el contenido microbiológico total en un medio acuoso incluye añadir un colorante fluorescente a una porción de medio acuoso, obtener una porción de medio acuoso adicional para una porción de medio acuoso de fondo, tratar la porción de medio acuoso de fondo para eliminar materia microbiológica, añadir un colorante fluorescente a la porción de fondo acuosa que se trata, medir una señal fluorescente en la porción de medio acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, medir una señal fluorescente en la porción de fondo acuosa que

- se trata para obtener una señal de fondo fluorescente, liberar contenido intracelular de la materia microbiológica en la porción de medio acuoso en el medio acuoso por calor o lisis química de la materia microbiológica, repetir el calor o procedimiento de lisis química en la porción de medio acuoso de fondo, medir la señal fluorescente en la porción de medio acuoso con el contenido intracelular microbiológico que se libera para obtener una segunda señal fluorescente, medir la señal fluorescente en la parte del medio acuoso de fondo que se simula para obtener una segunda señal fluorescente de fondo, sustraer la señal de referencia de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta, sustraer la señal fluorescente de referencia a partir de la segunda señal fluorescente de fondo para obtener una señal de fondo neta que ajusta la señal fluorescente neta con la señal de fondo neta e igualar la señal fluorescente neta que se ajusta con un contenido microbiológico.
- 5 El medio acuoso se describe anteriormente. Se pueden obtener señales de fondo para cualquier tipo de medio acuoso, pero son más útiles para medios acuosos con altas cantidades de compuestos orgánicos o no celulares que emiten fluorescencia en presencia del colorante fluorescente, tal como agua de proceso del procesamiento de petróleo crudo. En una realización, la porción de medio acuoso y la porción de medio acuoso de fondo tienen el mismo volumen.
- 10 Se describieron anteriormente la adición del colorante fluorescente y los pasos para obtener la señal fluorescente de referencia, la liberación del contenido intracelular de la materia microbiológica, la obtención de una segunda señal fluorescente y la obtención de una señal fluorescente neta.
- 15 El medio acuoso se trata para eliminar la materia microbiológica. La materia microbiológica se puede eliminar del medio acuoso para obtener una señal de fondo calentando el medio acuoso o tratando el medio acuoso con biocidas, tales como lejía, cloro, otros biocidas comerciales o combinaciones de los mismos. En una realización, el cloro se usa en una cantidad de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 30 ppm. En otra realización, se usa cloro en una cantidad de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 20 ppm, que incluye de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 10 ppm. El biocida se puede usar en una cantidad de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 200 ppm. En otra realización, el biocida se usa en una cantidad de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 100 ppm, que incluye de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 50 ppm. Cuando se usa cloro, puede ser necesario neutralizar el cloro después de que se minimice el efecto microbiológico de fondo. En una realización, el metabisulfito de sodio se usa para neutralizar el cloro. En una realización, se añade metabisulfito de sodio al medio acuoso en una cantidad de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 500 ppm. En otra realización, se añade metabisulfito de sodio al medio acuoso en una cantidad de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 300 ppm, que incluye de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 200 ppm.
- 20 En otra realización, los componentes de la materia microbiológica se pueden eliminar calentando el medio acuoso, tal como con un bloque térmico o placa caliente. En una realización, el medio acuoso se calienta a una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 100 °C. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C. En una realización, el medio acuoso se calienta desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 1 hora. En otra realización, el medio acuoso se calienta desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos, que incluye desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 15 minutos. En otra realización, el medio acuoso se calienta desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 3 minutos.
- 25 Se obtiene una señal fluorescente de referencia de fondo midiendo la fluorescencia de la porción de medio acuoso que se trató para eliminar la materia microbiológica. Las longitudes de onda de excitación y emisión dependen del colorante fluorescente que se selecciona. En una realización, la longitud de onda de excitación es de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 600 nm y la longitud de onda de emisión es de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm. La fluorescencia se puede medir mediante un detector de fluorescencia como se describió anteriormente. La señal de referencia de fondo se puede registrar manualmente o medir y almacenar en un instrumento de monitorización en línea.
- 30 El procedimiento de lisis se repite en la porción de medio acuoso de fondo que se trata. El proceso para liberar el contenido microbiológico intracelular en la porción de medio acuoso se repite en la porción de medio acuoso de fondo en la que se ha eliminado la materia microbiológica. En contraste con el calor o la lisis química que se usan en la presente invención, la lisis se puede realizar usando procedimientos mecánicos, físicos, eléctricos, ultrasónicos o de microondas o cualquier combinación de estos procedimientos, como se describió anteriormente.
- 35 Se obtiene una segunda señal fluorescente de fondo midiendo la fluorescencia del medio acuoso de fondo que se lisa. Las longitudes de onda de excitación y emisión dependen del colorante fluorescente que se selecciona. En una realización, la longitud de onda de excitación es de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 600 nm y la longitud de onda de emisión es de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm. La fluorescencia se puede medir mediante un detector de fluorescencia, que se describe anteriormente. La segunda señal fluorescente de fondo se puede registrar manualmente o medir y almacenar en un instrumento de monitorización en línea.
- 40
- 45
- 50
- 55

La señal fluorescente de referencia de fondo se sustrae de la segunda señal fluorescente de fondo para obtener una señal de fondo neta. La señal fluorescente neta se ajusta sustrayendo la señal de fondo neta de la señal fluorescente neta para obtener una señal fluorescente neta ajustada.

5 La señal fluorescente neta ajustada se iguala con un contenido microbiológico total. Se puede preparar una curva de calibración para un colorante fluorescente que se selecciona a partir de concentraciones conocidas de materia microbiológica y mediciones de fluorescencia. En una realización, se miden varias muestras que contienen contenidos microbiológicos totales que se conocen y el colorante fluorescente que se selecciona para obtener señales fluorescentes. Los números de registro de estas señales se trazan en un gráfico y el análisis de regresión se realiza para obtener una curva de calibración que iguale el contenido microbiológico total con señales fluorescentes.

10 Porciones del medio acuoso se pueden eliminar manualmente o se pueden eliminar sistemáticamente mediante un dispositivo de prueba en línea.

15 En otra realización, se puede cuantificar la concentración de biopelícula. Las biopelículas se adhieren a las superficies, que incluyen, entre otros, vidrio, plástico, metal o pintura, y se pueden desprender de las superficies y distribuir en un medio acuoso para medir el contenido microbiológico total de la biopelícula. En una realización, un proceso para medir el contenido de biopelícula en un medio acuoso incluye distribuir la biopelícula en el medio acuoso, añadir un colorante fluorescente al medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, liberar el contenido intracelular de la materia microbiológica en el medio acuoso por calor o lisis química de la materia microbiológica, medir la señal fluorescente en el medio acuoso con el contenido intracelular que se libera de la materia microbiológica para obtener una segunda señal fluorescente, sustraer la señal fluorescente de referencia de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta e igualar la señal fluorescente neta con un contenido microbiológico.

20 Las biopelículas o microbios sésiles se deben separar de las superficies y distribuir en un medio acuoso para cuantificar la concentración microbiana de las biopelículas. El medio acuoso puede ser cualquier tipo de medio acuoso en el que los microbios de la biopelícula se hayan desplazado o dispersado. En una realización, las biopelículas se dispersan en una solución salina. En otra realización, las biopelículas se dispersan en una solución salina tamponada. En otra realización, el medio acuoso puede ser una solución tampón de fosfato. En otra realización, el medio acuoso es agua. En otra realización, el agua puede ser agua municipal o agua industrial, tal como agua de torre de enfriamiento.

30 Las células microbianas se pueden pelar o desprender de la superficie de crecimiento y distribuir en el medio acuoso de cualquier manera adecuada que no rompa la estructura celular individual y se puede lograr mediante un procedimiento físico, mecánico, químico o una combinación de estos procedimientos. Los ejemplos de procedimientos físicos para separar y distribuir células de biopelícula incluyen, pero no se limitan a, agitación, agitación en vórtice, agitación y lavado con fuerte tensión de corte. En una realización, la biopelícula se dispersa con agitación en vórtice. En una realización, un cupón de biopelícula se sumerge en un líquido y las células se desalojan del cupón creando un flujo de fluido que se agita en vórtice o se arremolina rápidamente como en un ciclón durante un tiempo que se adecúa para liberar las células del agregado. En una realización, la biopelícula se agita en vórtice durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos. En otra realización, la biopelícula se agita en vórtice de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 3 minutos. En otra realización, la biopelícula se agita en vórtice desde aproximadamente 15 segundos hasta aproximadamente 1 minuto. En otra realización, la biopelícula se agita en vórtice durante aproximadamente treinta segundos.

Los ejemplos de procedimientos mecánicos para separar y distribuir células de biopelícula incluyen, pero no se limitan a, el uso de un baño de sonicación o una corriente eléctrica.

45 Los ejemplos de procedimientos químicos para separar y distribuir células de biopelícula incluyen, pero no se limitan a, adicionar un tensoactivo, dispersante o enzima digestiva. Los ejemplos de tensoactivos incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de óxido de etileno y/o óxido de propileno (EO/PO), polímero de dimetilamida, biocida Ultra-Kleen™, que está disponible comercialmente en Sterilex (Owings Mills, MD), octano sulfonato de sodio o alquilpoliglicósido. Los ejemplos de enzimas incluyen, pero no se limitan a, combinaciones de celulasa, alfa-amilasa y proteasa. En una realización, el dispersante puede ser polietilenimina.

50 Después de que la biopelícula se ha desprendido y dispersado en el medio acuoso, se realiza un ensayo microbiano total. Se describen anteriormente los pasos para agregar un colorante fluorescente al medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, liberar el contenido intracelular de la materia microbiológica en el medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio acuoso con la liberación el contenido intracelular de la materia microbiológica para obtener una segunda señal fluorescente, obtener una señal fluorescente neta e igualar la señal fluorescente neta con un contenido microbiológico.

55 En otra realización, la cantidad total de microbiología (ufc) se puede obtener multiplicando la concentración por el volumen que se conoce de medio acuoso en el que se extrajo la biopelícula. En otra realización, la cantidad de microbiología por área de unidad superficial (ufc/cm<sup>2</sup>) se puede obtener dividiendo la cantidad de microbiología por el área unitaria de la superficie a la que se fijó la biopelícula.

5 La biopelícula se puede medir directamente muestreando la biopelícula de las superficies que se seleccionan del sistema de dimensión que se conoce. Alternativamente, se puede usar un cupón para cultivar y medir la propensión de un sistema para cultivar la biopelícula. Algunas áreas de los sistemas de agua son inaccesibles para el muestreo práctico, y las pruebas de cupones proporcionan una medida de la propensión del sistema para cultivar la biopelícula. Este procedimiento puede proporcionar también evidencia de que un programa de tratamiento ha reducido con éxito la propensión del sistema que se trata para cultivar la biopelícula.

En otra realización, se puede obtener una señal fluorescente de fondo para eliminar la interferencia de fondo y mejorar la precisión de la medición del contenido de biopelícula en un medio acuoso.

10 Para que los expertos en la materia puedan practicar mejor la presente divulgación, los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Curva de calibración en solución salina de tampón de fosfato (PBS):

15 Las células de *Pseudomonas fluorescens* se cultivaron durante la noche en un medio de cultivo líquido y se añadieron a 10 ml de PBS para formar una muestra inicial. Se prepararon diluciones en serie a partir de la muestra inicial. Se añadieron 0,1 ml de la muestra inicial a 9,9 ml de PBS para obtener una solución al 1 % ( $10^{-2}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 1 % a 9 ml de PBS para obtener una solución al 0,1 % ( $10^{-3}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 0,1 % a 9 ml de PBS para obtener una solución al 0,01 % ( $10^{-4}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 0,01 % a 9 ml de PBS para obtener una solución al 0,001 % ( $10^{-5}$ ). Se usaron 10 ml de PBS para un blanco libre de células.

20 Se tomaron muestras de 170  $\mu$ l de cada una de las muestras diluidas y el blanco libre de células y cada muestra se mezcló con 20  $\mu$ l de colorante SYBR® Green I 10X y 10  $\mu$ l de tampón de lisis celular CyQUANT™ 20X (disponible comercialmente en Molecular Probes). Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras (blanco libre de células,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm mediante un espectrómetro de luminiscencia LS55 (PerkinElmer). La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal de Intensidad I de Fluorescencia.

25 Las muestras se calentaron a 60° Celsius durante 2 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras diluidas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal de Intensidad II de Fluorescencia.

30 Se obtuvo una intensidad de fluorescencia delta ( $\Delta$ ) sustrayendo la señal de Intensidad I de Fluorescencia de la señal de Intensidad II de Fluorescencia.

Se obtuvieron las concentraciones totales de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* para cada muestra (blanco libre de células,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) usando un procedimiento de recuento de placa estándar.

35 Se realizó el análisis de regresión entre el valor logarítmico de la intensidad de fluorescencia delta (unidad de luz relativa (RLU)) y el valor logarítmico del recuento de placa (cfu/ml) para obtener una curva de calibración como se muestra en la Figura 1. La ecuación de regresión es  $y = -1,37 + 0,855x$  (R-Sq = 97,6 %).

### Ejemplo 2

Curva de Calibración:

40 Se preparó una curva de calibración como en el Ejemplo 1, excepto que, en lugar de PBS, se usó agua filtrada de una torre de enfriamiento.

Se filtraron aproximadamente 50 ml de agua de una torre de enfriamiento a través de un filtro PVDF (Millipore SLGV033RB) para eliminar los microorganismos residuales. Se usaron 10 ml de agua filtrada para un blanco libre de células.

45 Se obtuvieron las concentraciones totales de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* para cada muestra (blanco libre de células,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) mediante el procedimiento de recuento en placa.

Se realizó el análisis de regresión entre el valor logarítmico de la intensidad de fluorescencia delta (RLU) y el valor logarítmico del recuento de placas (ufc/ml) para obtener una curva de calibración como se muestra en la Figura 2. La ecuación de regresión es  $y = 0,383 + 0,576x$  (R-Sq = 90,7 %).

### Ejemplo 3

Las células de *Pseudomonas fluorescens* se cultivaron durante la noche en una placa de cultivo y se añadieron a varias muestras de 170 µl de solución salina tamponada con fosfato. Cada muestra se mezcló con 20 µl de colorante SYBR® Green I 10X (de Molecular Probes) y 10 µl de tampón de lisis celular CyQUANT™ 20X.

5 Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal fluorescente de referencia.

10 Las muestras se calentaron a 60° Celsius durante 2 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una segunda señal fluorescente.

15 Se obtuvo una intensidad de fluorescencia delta ( $\Delta$ ) sustrayendo la señal de referencia fluorescente de la segunda señal fluorescente. El valor logarítmico de las mediciones de intensidad de fluorescencia delta se igualó con una concentración celular (ufc/ml) de la curva de calibración que se prepara en el Ejemplo 1 y se muestra como Muestra 1 en la Figura 3. La Figura 3 representa un gráfico de lecturas de ensayo para concentración celular (ufc/ml) y bioluminiscencia del ATP frente a diluciones celulares para *Pseudomonas fluorescens* que se diluyen en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

20 Se prepararon también pruebas comparativas en cada muestra por conteo de placa y Bioscan™ del ATP. Se prepararon cuatro mediciones para cada prueba y se promediaron, y se muestran en la Figura 3. Los resultados del Recuento de Placa y la Muestra 1 se informan en concentraciones logarítmicas y los resultados del ATP se informan en las concentraciones originales. Los resultados del ATP tenían varianza I-log para el mismo estándar y los resultados eran demasiado ruidosos como para usarse para comparaciones cuantitativas.

25 La muestra 1 se realizó en 5 minutos o menos y puede medir con buena precisión concentraciones tan bajas como  $10^4$  ufc/ml. Tiene una variación similar (desviación estándar/media) y buena correlación con los procedimientos tradicionales que se basan en cultivo, y tiene un límite de detección mucho mejor y una variación menor en comparación con el procedimiento industrial Bioscan™ del ATP.

#### Ejemplo 4

Las células de *Pseudomonas fluorescens* se cultivaron durante la noche en una placa de cultivo y se añadieron a varias muestras de 170 µl de agua de campo que se trataron en autoclave para eliminar los microorganismos residuales.

30 Cada muestra se mezcló con 20 µl de colorante SYBR® Green 1 10X (de Molecular Probes) y 10 µl de tampón de lisis celular CyQUANT™ 20X.

Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal fluorescente de referencia.

35 Las muestras se calentaron a 60° Celsius durante 2 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una segunda señal fluorescente.

40 Se obtuvo una intensidad de fluorescencia delta ( $\Delta$ ) sustrayendo la señal de referencia fluorescente de la segunda señal fluorescente. Los valores logarítmicos de las mediciones de intensidad de fluorescencia delta se igualaron con una concentración celular (ufc/ml) de la curva de calibración que se prepara en el Ejemplo 2 y se muestran como Muestra 2 en la Figura 4. La Figura 4 representa un gráfico de lecturas de ensayo para concentración celular (ufc/ml) y bioluminiscencia del ATP frente a diluciones celulares para *Pseudomonas fluorescens* que se diluyen en agua de campo.

45 Se prepararon también pruebas comparativas en cada muestra por conteo de placa y Bioscan™ del ATP. Se prepararon cuatro mediciones para cada prueba y se promediaron y se muestran en la Figura 4. Los resultados del Recuento de Placas y de la Muestra 2 se informan en concentraciones logarítmicas y los resultados del ATP se informan en las concentraciones originales. Los resultados del ATP tuvieron varianza I-log para el mismo estándar y los resultados fueron demasiado ruidosos como para usarse para comparaciones cuantitativas.

50 La muestra 2 se realizó en 5 minutos o menos y puede medir con buena precisión concentraciones tan bajas como  $10^4$  ufc/ml. Tiene una variación similar (desviación estándar/media) y buena correlación con los procedimientos tradicionales que se basan en cultivo, y tiene un límite de detección mucho mejor y una variación menor en comparación con el procedimiento industrial Bioscan™ del ATP.

#### Ejemplo 5

Se prepararon curvas de calibración para las bacterias *Pseudomonas fluorescens* en agua de torre de enfriamiento y en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se trataron en autoclave aproximadamente 50 ml de agua de una torre de enfriamiento para eliminar los microorganismos residuales.

5 Las células de *Pseudomonas fluorescens* se cultivaron durante la noche en un medio de cultivo líquido y se añadieron a 10 ml del agua de la torre de enfriamiento tratada en autoclave para formar una muestra inicial. Se prepararon diluciones en serie a partir de la muestra inicial. Se añadieron 0,1 ml de la muestra inicial a 9,9 ml de agua de la torre de enfriamiento tratada en autoclave para obtener una solución al 1 % ( $10^{-2}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 1 % a 9 ml de agua de enfriamiento tratada en autoclave para obtener una solución al 0,1 % ( $10^{-3}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 0,1 % a 9 ml de agua de enfriamiento tratada en autoclave para obtener una solución al 0,01 % ( $10^{-4}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 0,01 % a 9 ml de agua de la torre de enfriamiento tratada en autoclave para obtener una solución al 0,001 % ( $10^{-5}$ ). Se usaron 10 ml del agua de la torre de enfriamiento tratada en autoclave para un blanco.

15 Se añadieron células de *Pseudomonas fluorescens* a 10 ml de PBS para formar una muestra inicial. Se prepararon diluciones en serie a partir de la muestra inicial como para el agua de la torre de enfriamiento para preparar soluciones de PBS de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . Se usaron 10 ml de PBS para un blanco.

Se reservó una muestra de cada dilución en serie de agua y PBS para medir el ruido de fondo en las muestras de agua. Cada muestra de fondo se trató durante 30 minutos con un biocida compuesto de 1 ppm de cloro y 20 ppm de Bellacide® 350. Se añadieron 200 ppm de bisulfito de sodio para neutralizar el cloro residual.

20 Se tomaron muestras de 170  $\mu$ l de cada una de las muestras diluidas de PBS de agua de la torre de enfriamiento y muestras de fondo. Cada muestra se mezcló con 20  $\mu$ l de colorante SYBR® Green I 10X (de Molecular Probes) y 10  $\mu$ l de tampón de lisis celular CyQUANT™ 20X.

25 Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras de agua de la torre de enfriamiento y PBS a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal Fluorescente I. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras de agua de fondo de torre de enfriamiento a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal de Fondo fluorescente I.

30 Las muestras se calentaron a 60° Celsius durante 2 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. La intensidad de fluorescencia se midió de nuevo para cada una de las muestras de agua de la torre de enfriamiento y PBS a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal Fluorescente II. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras de agua de fondo de la torre de enfriamiento a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una señal de Fondo fluorescente II. Se obtuvo una intensidad neta de fluorescencia sustrayendo la señal Fluorescente I de la señal Fluorescente II. Se obtuvieron mediciones netas fluorescentes para cada agua de torre de enfriamiento y muestra de PBS.

35 Se obtuvo una intensidad fluorescente de fondo neto sustrayendo la señal de Intensidad I Fluorescente I de Fondo de la señal de Intensidad II Fluorescente de Fondo. Se obtuvieron mediciones fluorescentes de fondo neto para cada muestra de fondo.

40 Se obtuvieron señales fluorescentes netas ajustadas sustrayendo la señal fluorescente de fondo neto de la señal fluorescente neta para cada muestra.

Se obtuvieron concentraciones totales de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* para cada muestra de agua de torre de enfriamiento y PBS usando un procedimiento de recuento de placa estándar.

45 Se realizó el análisis de regresión entre el valor logarítmico de la señal fluorescente neta ajustada (RLU) y el valor logarítmico del recuento de placas (cfu/ml) para obtener curvas de calibración para el agua de la torre de enfriamiento y el PBS, como se muestra en la Figura 5. La ecuación de regresión para la curva de calibración de PBS es  $y = -1.47 + 0,847x$  (R-Sq = 92,2 %). La ecuación de regresión para el agua de la torre de enfriamiento es  $y = -1,29 + 0,741x$  (R-Sq = 73,7 %). Se eliminaron tres valores atípicos de 165 puntos de datos.

### Ejemplo 6

50 Se preparó una curva de calibración como en el Ejemplo 1 excepto que las bacterias fueron células de *Pseudomonas aeruginosa* que se cultivaron durante la noche en un caldo tripticasa de soya (TSB) y se añadieron a 10 ml de tampón salino al 0,85 % para formar una muestra inicial.

55 Se prepararon diluciones en serie a partir de la muestra inicial. Se añadieron 0,1 ml de la muestra inicial a 9,9 ml de tampón salino al 0,85 % para obtener una solución al 1 % ( $10^{-2}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 1 % a 9 ml de tampón salino al 0,85 % para obtener una solución al 0,1 % ( $10^{-3}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 0,1 % a 9 ml de

tampón salino al 0,85 % para obtener una solución al 0,01 % ( $10^{-4}$ ). Se añadió 1 ml de la solución al 0,01 % a 9 ml de tampón salino al 0,85 % para obtener una solución al 0,001 % ( $10^{-5}$ ). Se usaron 10 ml del tampón salino al 0,85 % para un blanco libre de células.

- 5 Se tomaron 180  $\mu$ l de cada una de las muestras diluidas y el blanco libre de células y cada muestra se mezcló con 20  $\mu$ l de colorante SYBR® Green I 10X. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras (blanco libre de células,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm mediante un espectrómetro de luminiscencia LS55. (PerkinElmer). La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una medida fluorescente de referencia.
- 10 Las muestras se calentaron a 90°C durante 2 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. La intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm para obtener una medición de intensidad II fluorescente. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una medición de intensidad II fluorescente.
- 15 Se calculó una intensidad de fluorescencia delta sustrayendo la señal fluorescente de referencia de la señal de intensidad II fluorescente. Se obtuvieron las concentraciones totales de las células de *Pseudomonas aeruginosa* para cada muestra (blanco libre de células,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) usando un procedimiento de recuento de placa estándar.
- Se realizó el análisis de regresión entre el valor logarítmico de la intensidad de fluorescencia delta (RLU) y el valor logarítmico del recuento de placas (ufc/ml) para obtener una curva de calibración como se muestra en la Figura 6. La ecuación de regresión es  $y = -1,0185 + 0,7381 x$  (R-Sq = 98,97 %).
- 20 Las células de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* se cultivaron durante la noche en una superficie interna de acero inoxidable 316 proporcionando un flujo de reciclado de medio de crecimiento líquido, 30 % de medio TSB con inóculo de bacterias al 1 % (cultivo nocturno) a través del tubo en un circuito de reciclaje con un intervalo 135 ml/min.
- 25 Se retiró un segmento del tubo de acero inoxidable 316 del sistema de flujo después de un intervalo de tiempo deseado. La acumulación de la biopelícula se desprendió sumergiendo el segmento de tubo de acero inoxidable 316 en 10 ml de solución salina al 0,85 % y se agitó en vórtice durante 2 minutos a velocidad máxima.
- 30 Se mezclaron varias alícuotas de 180  $\mu$ l de la muestra agitada en vórtice con 20  $\mu$ l de colorante SYBR® Green I 10X. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada muestra a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una medición fluorescente de referencia.
- 35 Las muestras se calentaron a 90°C durante 2 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Se midió la intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras a una longitud de onda de excitación de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió cuatro veces para cada muestra y se promedió para obtener una medición de intensidad II fluorescente.
- 40 Se calculó una intensidad de fluorescencia delta sustrayendo la señal de referencia fluorescente de la señal de intensidad II fluorescente. El valor logarítmico de las mediciones de intensidad fluorescente delta (RLU) se trazó a lo largo de la curva de calibración en la Figura 6 como puntos de datos de la Muestra 3. El valor logarítmico de las mediciones de intensidad fluorescente delta para cada una de las muestras se puede igualar con una concentración celular (ufc/ml) a partir de la curva de calibración en la Figura 6.
- 45 En la Figura 6, se puede ver que todos los puntos de datos de las células de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* (Muestra 3) se alinearon bien con la curva de calibración que se obtiene de la suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* planctónica, lo que indica que este ensayo es adecuado para la cuantificación de la biopelícula después de la dispersión de la biopelícula desde la superficie sólida.
- 50 Con referencia ahora a la Figura 7, se ilustra un sistema para monitorizar el contenido bacteriano total en el medio acuoso de un sistema de agua de acuerdo con los procedimientos que se expusieron anteriormente y se refiere en general mediante el número de referencia 100. La realización que se muestra en la Figura 7 ilustra una apertura convencional recirculando el sistema 102 de agua de torre de enfriamiento que tiene un medio acuoso que fluye a través de un circuito 104 de circulación. El flujo del medio acuoso a través del circuito 104 de circulación se puede apoyar de una bomba 106 de circulación como se conoce en la técnica. Las válvulas 108 permiten alimentar el medio acuoso desde el circuito 104 de circulación al sistema 100 de monitorización bacteriano total. El sistema 100 de monitorización bacteriano total funciona como un analizador en línea para monitorizar la concentración de bacterias en el medio acuoso del sistema 102 de agua. Un experto en la técnica entenderá que el sistema 100 de monitorización bacteriano total se puede usar para proporcionar una detección rápida de bacterias viables totales a través de la medición de bacterias totales en cualquier sistema 102 de agua o de proceso municipal o industrial. Por consiguiente, no es necesario proporcionar aquí detalles adicionales del sistema 102 de agua.
- 55

El medio acuoso que entra en el sistema 100 de monitorización bacteriano total pasa primero a través de un módulo 110 de filtro. De forma deseable, el módulo 110 de filtro incluye un filtro 112 que tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 micrómetros de manera que se eliminan impurezas mayores del medio acuoso, pero el contenido bacteriano pasa a través en el filtrado. En una realización, el módulo 110 de filtro es un sistema de filtro de tipo basculante tal como el que se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos cedida comúnmente N° 12/193,198 presentada el 18 de agosto de 2008 con el título "Sistemas de filtración en línea", con un poro de filtro de tamaño de 10 micras. Sin embargo, el módulo 110 de filtro puede incluir otros diseños de filtrado sin apartarse del alcance de la invención.

El sistema 100 de monitorización bacteriano total incluye un módulo 120 de control, un módulo 130 de preparación de muestra, un módulo 140 de lisis celular y un módulo 150 de detección. El módulo 120 de control contiene un controlador 122 lógico programable o dispositivo similar y una unidad 124 electrónica que se usa para controlar la función de los otros módulos 130, 140, 150, y calcula adicionalmente la concentración total de bacterias como se describirá a continuación.

El módulo 130 de preparación de muestra se compone de una copa 132 de muestra con interruptor de nivel y una válvula 133 de solenoide que se usa para controlar el flujo del medio acuoso que se filtra en la copa 132 de muestra. En una realización, la copa 132 de muestra con interruptor de nivel se compone de un par de cables de plomo. Cuando la copa 132 de muestra está llena, o a un nivel alto designado, los dos cables se conectan electrónicamente, lo que desencadena el cierre de la válvula 133 de solenoide. Cuando la copa 132 de muestra está vacía, o en un nivel bajo designado, los dos cables se desconectan, lo que desencadena la apertura de la válvula 133 de solenoide. La zona muerta entre estos dos estados es de forma deseable de aproximadamente 1,5 ml. El módulo 130 de preparación de muestras disminuye la presión del medio acuoso desde la presión del colector en el circuito 104 de circulación hasta la presión atmosférica. De forma deseable, la copa 132 de muestra se abre a la atmósfera para permitir que cualquier burbuja de aire en el medio acuoso escape de la muestra a través del respiradero 134. Como entendería un experto en la técnica, las burbujas de aire en el medio acuoso causarían picos no deseados a partir de dispositivos de medición óptica que se usan en el módulo 150 de detección.

Una bomba 135 de muestra, tal como una bomba de desplazamiento micro positivo, extrae un medio acuoso de la copa 132 de muestra. Disminuyendo la presión, se protege la bomba 135 de muestra, ya que la bomba de muestra se puede clasificar solo para aproximadamente 0,3515 Kg/cm<sup>2</sup>. La velocidad de alimentación del medio acuoso a través del módulo 130 de preparación de muestra se controla usando la bomba 135 de muestra. El controlador 122 lógico programable establece la frecuencia de golpe de la bomba 135 de muestra para controlar con precisión el caudal. Las velocidades de flujo del medio acuoso están de forma deseable entre aproximadamente 100 µL y aproximadamente 250 µL, y de forma más deseable entre aproximadamente 150 µL y aproximadamente 200 µL. En una realización, la bomba 137 de muestra es un modelo 150SP-S2 fabricado por Beion Medical Technology Co. Sin embargo, se puede usar cualquier bomba que se conoce capaz de bombear con precisión volúmenes pequeños de medio acuoso.

En la realización que se ilustra, el reactivo de fluorocromo y el tampón se mezclan previamente y se añaden al medio acuoso a partir de un suministro 136 de reactivo. Alternativamente, un experto en la técnica comprenderá que el tampón se puede añadir antes o después de que se añada el fluorocromo al medio acuoso. El suministro 136 de reactivo alimenta el fluorocromo y el tampón por medio de una bomba 137 de alimentación de reactivo. La bomba 137 de alimentación de reactivo es de forma deseable también una bomba de desplazamiento micropositivo y el controlador 122 lógico programable establece su frecuencia de golpe para controlar con precisión el caudal. De forma deseable, la bomba 137 de alimentación de reactivo agrega el fluorocromo en una cantidad de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg de fluorocromo por litro de medio acuoso. El tampón se agrega al medio acuoso para mantener el pH del medio acuoso de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. En una realización, la bomba de reactivo es un modelo 120SP-S2 fabricado por Beion Medical Technology Co.

El medio acuoso que se bombea mediante la bomba 135 de muestra y el reactivo que se bombea mediante la bomba 137 de alimentación de reactivo se combinan usando una T mezcladora 138, en general un dispositivo mezclador, que proporciona una trayectoria de flujo turbulento para estimular la mezcla del medio acuoso y el reactivo fluorocromo y el tampón. También se pueden usar otros dispositivos de mezclado, tales como cruces de mezcla o impulsos, sin apartarse del alcance de la invención.

En la realización que se ilustra, el módulo 140 de lisis alcanza la lisis celular calentando el medio acuoso. El medio acuoso, el módulo 130 de preparación de muestra se dirige al módulo 140 de lisis o se dirige directamente al módulo 150 de detección, evitando así el módulo 140 de lisis, usando una válvula 141 de tres vías que se controla mediante el módulo 120 de control. En una realización, el módulo 140 de lisis incluye una unidad 142 de control de temperatura que aumenta y disminuye la temperatura del medio acuoso con el fin de lisar las células y liberar el contenido intracelular de la materia microbiológica. El módulo 142 de control de temperatura incluye un dispositivo 144 de calentamiento, tal como una placa semiconductor u otros elementos de calentamiento que se conocen, para calentar el medio acuoso. Se usa un ventilador u otro radiador 146 para promover el enfriamiento rápido de la muestra después de que se hayan lisado las células. Un termopar 148 mide la temperatura del medio acuoso durante los períodos de calentamiento y enfriamiento. El módulo 120 de control controla y suministra potencia a la unidad 142 de control de temperatura para calentar la muestra a una temperatura que se desea para lisar las

células, y luego enfriar la muestra hasta que alcanza la temperatura que se desea usando un programa de control predefinido. De forma deseable, la unidad 142 de control de la temperatura calienta el medio acuoso a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 100 °C, y de forma más deseable entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C. La unidad 142 de control de temperatura calienta de forma deseable el medio acuoso a la temperatura que se desea en un tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora, y de forma más deseable de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 minutos, para lisar las células. Un experto en la técnica entenderá que la unidad 142 de control de temperatura puede contener otros medios que se conocen para calentar y enfriar el medio acuoso según se desee. Adicionalmente, el módulo 140 de lisis puede, en contraste con la presente invención, usar otros procedimientos de lisis que se conocen, tales como procedimientos mecánicos, físicos, eléctricos, ultrasónicos o de microondas, para lisar las células. El medio acuoso que contiene el contenido biológico que se lisa se dirige luego al módulo 150 de detección a través de la válvula 149 de tres vías. El módulo 150 de detección incluye una unidad 152 de medición óptica. El uso de más de una unidad de medición óptica puede reforzar la precisión de la medición. La unidad 152 de medición óptica incluye una celda 154 de flujo de cristal de silicio y un fluorómetro 156 de longitud de onda única. La celda 154 de flujo de cristal de silicio tiene un tubo 158 de flujo de entrada y un tubo 159 de flujo de salida que se monta en la parte inferior y superior de la celda de flujo, respectivamente. Como se ve mejor en la realización esquemática que se ilustra en la Figura 8, el fluorómetro 156 incluye al menos un par de diodos emisores de luz (LED) 160 y los detectores 162 de emisión de fotodiodos se configuran alrededor de un tubo 163 de reacción. De forma deseable, la señal fluorescente se mide con un fluorómetro que tiene una longitud de onda de excitación de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 600 nm y una longitud de onda de emisión de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm. Adicionalmente, el fluorómetro 156 incluye lentes 164 ópticas y rellenos 165 en el tubo óptico que se sella para controlar la trayectoria e intensidad de la luz. En una realización, el fluorómetro 156 es un espectrómetro de luminiscencia LS55 de PerkinElmer.

En una realización que comprende tres pares de componentes foto-ópticos, se le instalan tres LED y tres fotodiodos en seis canales radiales perpendiculares al orificio pasante central. Los tres LED generan luz incidente a diferentes longitudes de onda, y los tres fotodiodos correspondientes detectan la transmitancia respectiva en los lados opuestos. Los LED que se usan incluyen un tricolor con luces de 467 nm (azul), 530 nm (verde) y 634 nm (rojo), un LED naranja con un máximo de 610 nm y un LED verde claro con una emisión máxima de 586 nm. Esta configuración simplifica el diseño y el mantenimiento de los componentes ópticos. Los tres pares de componentes ópticos proporcionan la capacidad de medir tres funciones a la vez. No hay un número máximo de pares de componentes ópticos que se pueden incluir; sin embargo, el número se verá afectado por limitaciones de tamaño que se basan en el uso previsto del sistema de monitorización.

El efluente de la unidad 152 de medición óptica, que comprende el agua de muestra que se mezcla y los reactivos, sale del módulo 150 de detección y se conecta a un drenaje o un tambor de recolección, dependiendo de los requisitos de permisos de cada planta. Como el efluente es un agua residual no peligrosa, se descarga comúnmente a un drenaje por gravedad.

El módulo 120 de control se programa de modo que las señales fluorescentes del medio acuoso se midan mediante el módulo 150 de detección antes y después de que el contenido intracelular de la materia microbiológica se haya extraído y liberado en el medio acuoso en el módulo 140 de lisis para proporcionar una señal fluorescente de referencia y una segunda señal fluorescente, respectivamente. Estas señales fluorescentes se miden mediante el módulo 150 de detección y se almacenan en el controlador 122 lógico programable. La señal fluorescente de referencia se sustrae de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta que es un resultado del contenido microbiológico de las células lisadas. Se usa una curva de calibración para obtener el contenido microbiológico total como se describió anteriormente. Como se explicó anteriormente, la curva de calibración se prepara midiendo las señales fluorescentes para concentraciones conocidas de materia microbiológica en medios acuosos con el fluorocromo, determinando la señal fluorescente neta para cada concentración, representando en un gráfico las cantidades de concentración frente a los valores logarítmicos de las señales fluorescentes netas y realizando análisis de regresión para obtener la curva de calibración. Con las características anteriores, el sistema puede monitorizar bacterias totales de una manera en línea.

Aunque las realizaciones típicas se han expuesto con fines de ilustración, las descripciones anteriores no se deben considerar como una limitación del alcance en este documento. De acuerdo con esto, el experto en la técnica puede tener varias modificaciones, adaptaciones y alternativas sin apartarse del alcance de la invención según las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de medición del contenido microbiológico total en un medio acuoso que comprende añadir un colorante fluorescente al medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, liberar el contenido intracelular de la materia microbiológica en el medio acuoso por calor o lisis química de la materia microbiológica, medir la señal fluorescente en el medio acuoso con el contenido intracelular liberado de la materia microbiológica para obtener una segunda señal fluorescente, sustraer la señal de referencia de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta e igualar la señal fluorescente neta con un contenido microbiológico; en el que el procedimiento comprende además ajustar la señal fluorescente neta con una señal de fondo neta, comprendiendo además dicho procedimiento obtener una porción de medio acuoso adicional para uso como una porción de medio acuoso de fondo, tratar la porción de medio acuoso de fondo para eliminar materia microbiológica, añadir un colorante fluorescente a la porción de medio acuoso de fondo tratada, medir una señal fluorescente en la porción de medio acuoso de fondo tratada para obtener una señal fluorescente de fondo de referencia repitiendo el calor o el procedimiento de lisis química en la porción de fondo del medio acuoso de fondo, medir la señal fluorescente en el calor o en la porción del medio acuoso de fondo lisado químicamente para obtener una segunda señal fluorescente de fondo, sustraer la señal fluorescente de fondo de referencia de la segunda señal fluorescente de fondo para obtener una señal de fondo neta, ajustar la señal fluorescente neta con la señal de fondo neta e igualar la señal fluorescente neta ajustada con un contenido microbiológico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los medios acuosos comprenden agua, una solución salina o una solución tampón de fosfato.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el colorante fluorescente está presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg de colorante fluorescente por litro de medio acuoso.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH del medio acuoso se mantiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que se agrega un tampón al medio acuoso para mantener el pH.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el tampón se selecciona del grupo que consiste en solución salina tamponada con fosfato, tampón de borato, tris(hidroximetil)aminometano, ácido etilendiaminotetraacético, ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico y mezclas de los mismos.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la señal fluorescente se mide con un espectrómetro fluorescente a una longitud de onda de excitación de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 600 nm y una longitud de onda de emisión de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la materia microbiológica se lisa químicamente con un reactivo de lisis para liberar material intracelular.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la materia microbiológica se lisa con un reactivo de lisis que comprende detergentes, enzimas, disolventes de extracción o tampones de lisis.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además ajustar la señal fluorescente neta con una señal de fondo.
11. El procedimiento de la reivindicación 1 para medir el contenido microbiológico total en un medio acuoso incluye añadir un colorante fluorescente a una porción de medio acuoso, obtener una porción de medio acuoso adicional para una porción de medio acuoso de fondo, tratar la porción de medio acuoso de fondo para eliminar materia microbiológica, añadir un colorante fluorescente a la porción de medio acuoso de fondo tratada, medir una señal fluorescente en la porción de medio acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, medir una señal fluorescente en la porción del medio acuoso de fondo tratada para obtener una señal fluorescente de fondo de referencia, liberar contenido intracelular de la materia microbiológica en la porción del medio acuoso por calor o lisis química de la materia microbiológica, repetir el calor o procedimiento de lisis química en la porción de medio acuoso de fondo, medir la señal fluorescente en el medio acuoso con el contenido microbiológico intracelular liberado para obtener una segunda señal fluorescente, medir de la señal fluorescente en la porción del medio acuoso de fondo caliente o lisado químicamente para obtener una segunda señal fluorescente de fondo, sustraer la señal de referencia de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta, sustraer la señal fluorescente de referencia de fondo de la segunda señal fluorescente de fondo para obtener una señal de fondo neta, ajustar la señal fluorescente neta con la señal de fondo neta e igualar la señal fluorescente neta ajustada con un contenido microbiológico; en el que el colorante fluorescente es un colorante de cianina asimétrico.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el contenido microbiológico comprende el contenido de biopelícula y en el que el procedimiento comprende además desprender y distribuir la biopelícula en el medio acuoso.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la biopelícula se desprende mediante uno de los siguientes procedimientos: físicamente agitando o al agitar en vórtice el medio acuoso; mecánicamente usando una sonda de sonicación que vibra en los medios acuosos; químicamente usando un tensoactivo, un biodispersante o una mezcla de los mismos; o en el que la biopelícula se desprende de una superficie cuando se expone a un campo eléctrico.
- 5 14. El procedimiento de la reivindicación 1, para medir el contenido de la biopelícula en un medio acuoso incluye distribuir la biopelícula en el medio acuoso, añadir un colorante fluorescente al medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio acuoso para obtener una señal fluorescente de referencia, liberar contenido intracelular de la materia microbiológica en el medio acuoso, medir la señal fluorescente en el medio acuoso con el contenido intracelular liberado de la materia microbiológica para obtener una segunda señal fluorescente, sustraer la señal fluorescente de referencia de la segunda señal fluorescente para obtener una señal fluorescente neta e igualar la
- 10 señal fluorescente neta con un contenido microbiológico; en el que el colorante fluorescente es un colorante de cianina asimétrico.

FIG. 1

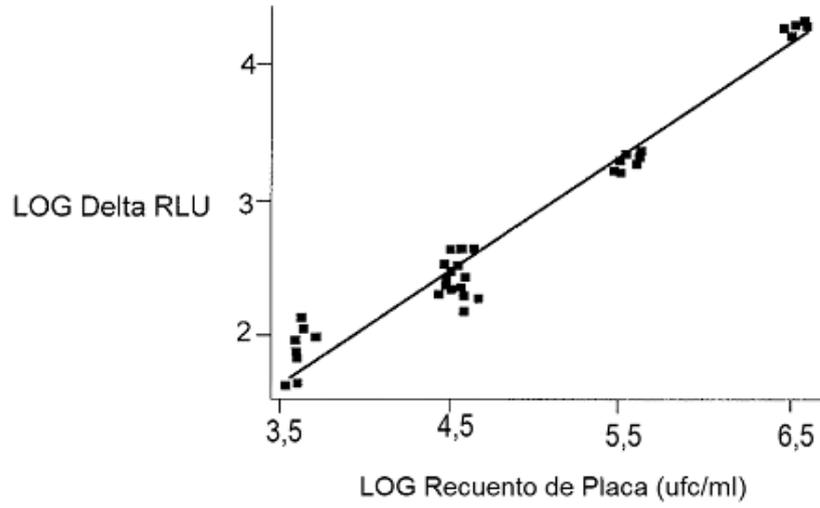


FIG. 2

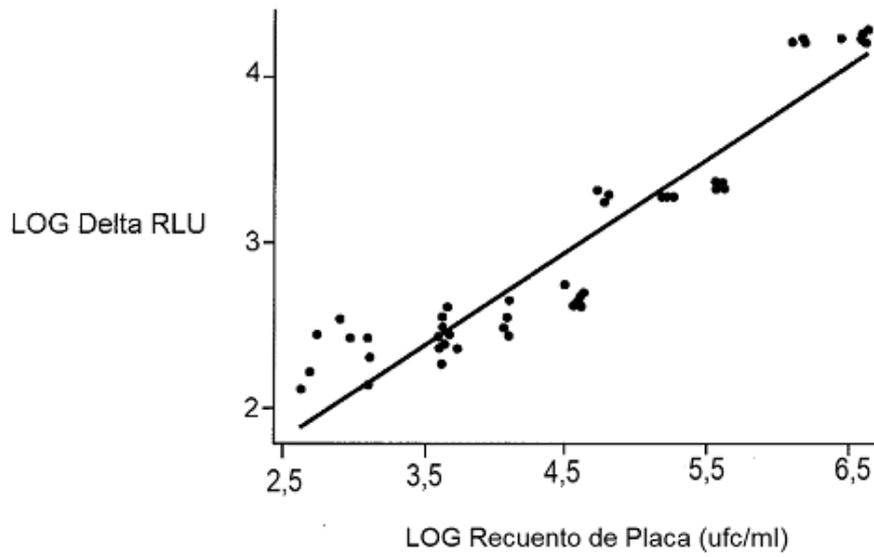


FIG. 3

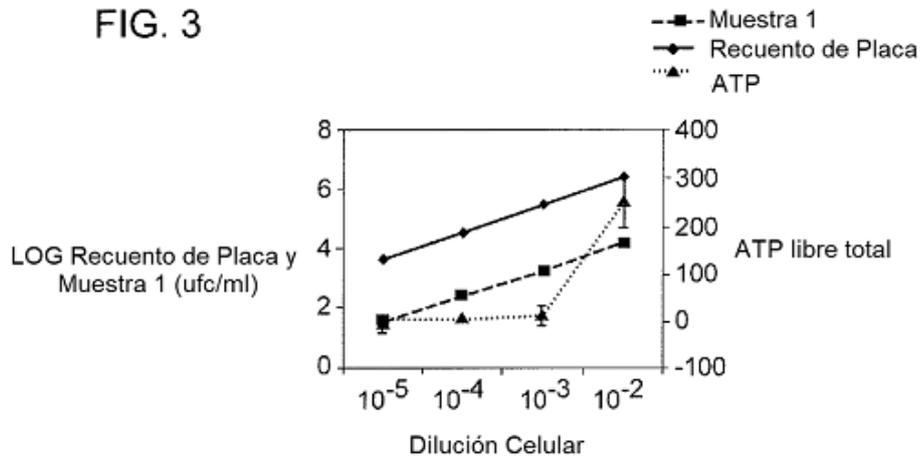


FIG. 4

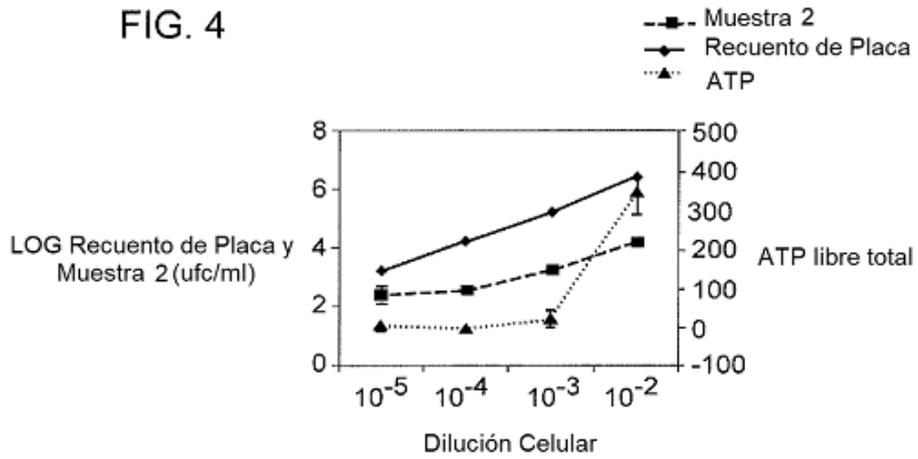


FIG. 5

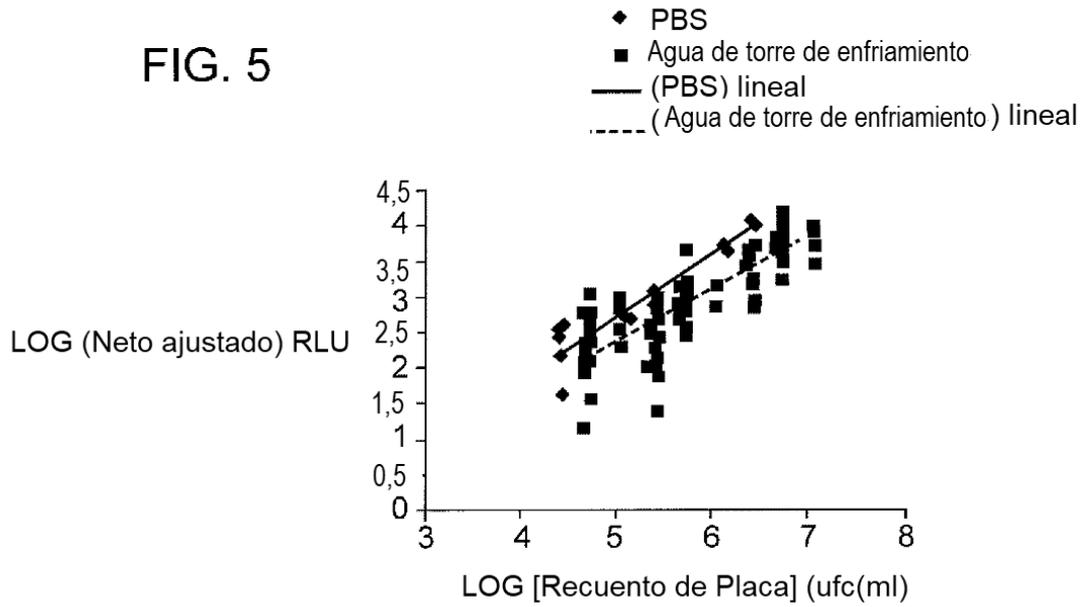
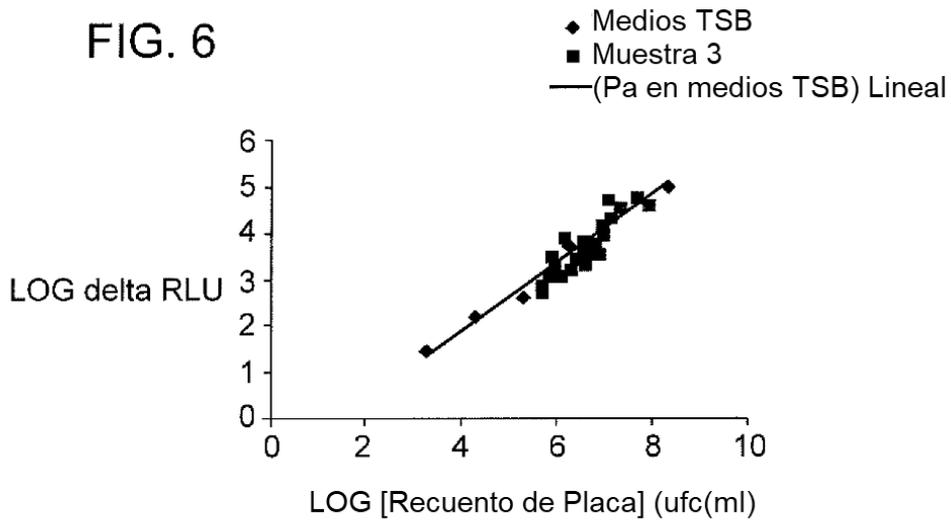


FIG. 6





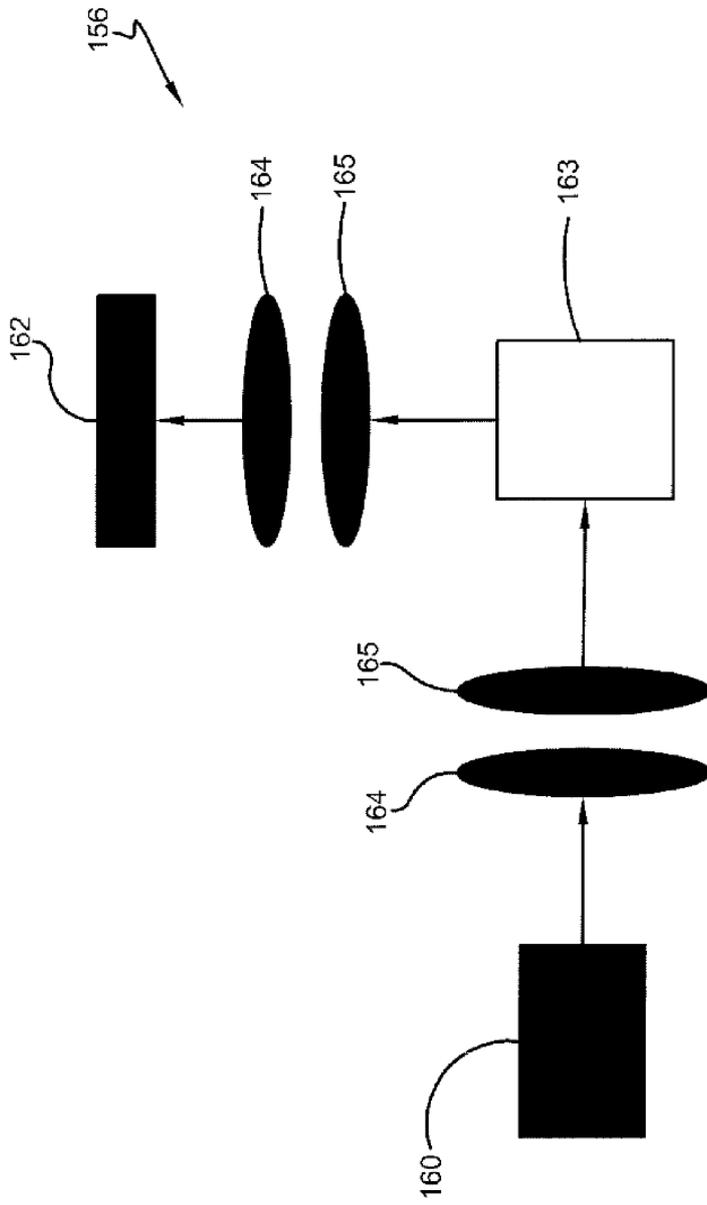


FIG. 8