

3777

184323

MODELO DE UTILIDAD

Ref. N° 4786.

REGION TECNICA
ASOCIACION I.P.C.
CLASE <u>C.12</u>
SUBCLASE <u>K</u>



Memoria Descriptiva

sobre: **184323**

RECIPIENTE PARA EL ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y DE
LA FISILOGIA DE LAS BACTERIAS.

Solicitante COMPAGNIE GENERALE D'AUTOMATISME, entidad francesa,
residente en 12, rue de la Baume, Paris 8e, Francia.

El presente Modelo de Utilidad se
refiere a un recipiente para el estudio del cre-
cimiento y de la fisiologia de las bacterias en
presencia de productos quimicos bien definidos y de
5 los efectos de este crecimiento o en sustancias dadas,

3 7 7 7 7

184323



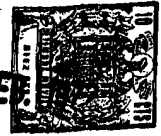
en presencia o en ausencia de aire.

Se conocen ya dispositivos que permiten el estudio de las actividades enzimáticas de las bacterias. Estos métodos bioquímicos estudian sólo-
5 mente las enzimas bacterianas y emplean para esto bacterias que no tienen necesidad de desarrollarse, incluso bacterias trituradas, siendo el principio activo entonces la sustancia química enzimática
10 contenida en las células. Estos micro-métodos descritos no permiten la medida del desarrollo bacteriano, característica importante, útil para un conocimiento más completo.

En efecto, la observación de los crecimientos permite informaciones complementarias, a
15 saber que entre las bacterias que poseen una cierta capacidad de degradación de la urea por ejemplo, algunas pueden bastarse de la urea para su desarrollo, y otras tendrán necesidad de diferentes factores de crecimiento (vitaminas, ácidos aminados); además,
20 entre estas bacterias, algunas se desarrollan en ausencia de oxígeno, mientras que otras necesitan la presencia del oxígeno del aire. El estudio de los crecimientos aporta por consiguiente más informaciones que el método enzimático.

25 Los métodos enzimáticos conocidos necesitan además un gran número de bacterias, a fin de disponer de una cantidad suficiente de enzimas, para detectar en excelentes condiciones y de un modo rápido la degradación de los productos químicos;
30 necesitan por consiguiente cultivos previos, de ahí

16 FEB



que haya una pérdida de tiempo que puede ser de varios días según las especies bacterianas.

Los métodos enzimáticos necesitan reactivos especiales, que ocasionan las modalidades de registro específicas a casi cada uno de estos reactivos; por el contrario, la medida del crecimiento es un mismo fenómeno que se puede poner claramente de manifiesto con ayuda de un solo aparato registrador, cualquiera que sea el número de reactivos químicos utilizados. En resumen, las ventajas del método de medidas del crecimiento de las bacterias se caracteriza con respecto a los métodos bioquímicos por un mayor número de informaciones obtenidas, y una simplicidad particular de la instalación.

Se conocen técnicas de medidas del crecimiento bacteriano. Estas técnicas emplean habitualmente dos tipos de recipientes de cultivo: las cajas de Petri y los tubos de ensayos, y utilizan dos tipos de medio de cultivos:

Los medios líquidos y los medios sólidos que son fluidos en caliente, se solidifican refrigerando (gelatina).

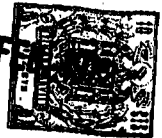
Las cajas de Petri son particularmente utilizadas para medios de cultivos sólidos y los tubos de ensayos para los medios líquidos.

Las bacterias que se desarrollan en la superficie de un medio sólido lo hacen en presencia de oxígeno del aire, desarrollándose su crecimiento y su fisiología en aerobiosis. Por otra parte se desarrollan superficialmente formando

3 7 7 7

184323

16 F



amontonamientos o "colonias".

Las bacterias que son cultivadas en un medio líquido, no forman colonias y se reparten en el medio; las que se encuentran en la superficie están en aerobiosis, y las que se desarrollan lejos de la superficie, en la profundidad del tubo, están en anaerobiosis; no están sometidas al oxígeno atmosférico. La fisiología de las bacterias es completamente modificada según que se desarrollan en aerobiosis o en anaerobiosis.

El estudio del crecimiento de las bacterias debe por tanto efectuarse a la vez en aerobiosis y en anaerobiosis, en medio líquido y en medio sólido. El material generalmente utilizado es de vidrio, voluminoso y relativamente costoso. Impone además la utilización de 100 a 150 cm³ de medios. Este material además debe ser recuperado, y necesita por consiguiente trabajos de limpieza y entretenimiento.

La presente invención tiene por objeto paliar los inconvenientes citados.

La presente invención tiene por objeto un recipiente para el estudio del crecimiento y de la fisiología de las bacterias, caracterizado porque se realiza de materia transparente y comprende una primera parte abierta al aire que forma una cúpula y una segunda parte cerrada que comunica con la primera parte por una abertura dispuesta en la base de esta última.

La presente invención incluye también



un procedimiento de fabricación de un recipiente tal como se ha definido más arriba caracterizado porque se realizan las partes laterales superiores de dicho recipiente por termodeformación de una lámina de materia plástica y porque se reúne por pegadura o soldadura la estructura obtenida a una placa que constituye el fondo de dicho recipiente.

La invención será mejor comprendida con ayuda de la descripción que sigue de una forma de realización de la invención, dada a título de ejemplo no limitativo y con referencia al dibujo adjunto, en el que:

La figura 1, representa una primera forma de ejecución del recipiente objeto de la invención, según una vista en perspectiva.

La figura 2, representa el mismo recipiente según una vista en sección longitudinal.

La figura 3, muestra una serie de estos recipientes en una banda para análisis en continuo.

La figura 4, representa una variante del dispositivo según la cual el recipiente es circular.

La figura 5, representa una placa que comprende un número elevado de estos recipientes, para un análisis en serie.

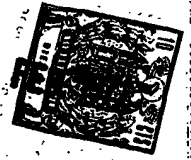
Las figuras 6 y 7, representan en perspectiva otras dos formas de realización del recipiente de la invención.

3 7 7 7 7 7

184323

-6-

16



Con referencia a la figura 1, se observa que el recipiente 1 se compone esencialmente de dos partes: una parte 2 que se abre ampliamente al aire libre y que permite abundantes cambios gaseosos, y una parte 3 cuya superficie está recubierta de una película de materia plástica transparente, que impide todo cambio gaseoso o con el medio exterior. Este recipiente 3 en forma de tubo debe ser utilizado en posición horizontal, a fin de disminuir al máximo los cambios gaseosos entre el tubo 3 y la atmósfera.

Estos dos recipientes tienen una base común, y comunican por el paso 4 que se verá mejor con referencia a la figura 2. Este recipiente está constituido por una placa de materia plástica 5, en la que se puede disponer una lámina que comprende una serie de elementos, 6, 6', 6'' (ver figura 3) de materia plástica transparente, que representan las paredes laterales de los recipientes, así como la parte superior del tubo 3.

En el fondo de estos dos recipientes comunicantes 1 y 3, se dispone una capa 8 que comprende el reactivo químico que se desea estudiar, dispersado en una sustancia protectora. Este producto puede ser dispuesto en uno u otro o incluso en los dos recipientes 1 y 3 después de su fabricación y almacenarse en ellos.

Las dimensiones de este dispositivo son reducidas con respecto a las cajas de Petri y a los tubos utilizados normalmente en bacteriología.



5 permiten el estudio de una cantidad de medio de cultivo aproximadamente 50 veces inferior a las utilizadas en los procedimientos ordinarios. Sin embargo, son suficientes para que la manipulación del dispositivo sea fácil y que la introducción de los reactivos y de las bacterias pueda efectuarse sin dificultad, por medio de pipetas Pasteur, o de jeringas. Las superficies ocupadas por la cúpula 2 y por el tubo 3 son preferentemente idénticas, pero sin embargo pueden ser diferentes.

10 Son suficientes para que las observaciones puedan efectuarse a simple vista, así como con ayuda de aparatos registradores.

15 El volúmen de líquido que puede ser contenido en la cúpula 2 debe ser más grande que el contenido en el tubo 3, con preferencia el doble. De este modo, la altura del líquido contenido en la cúpula es siempre superior a la altura del líquido presente en el tubo, a fin de que no pueda realizarse ningún cambio gaseoso entre el tubo 3 y el medio exterior.

20 A título indicativo, el volúmen de la cúpula 2 existente en 4 mm de altura es de aproximadamente $0,45 \text{ cm}^3$; el volúmen del tubo es de $0,20 \text{ cm}^3$. La capacidad total del recipiente es así inferior a 1 cm^3 .

25 En la variante de la figura 4, la base del conjunto de los dos recipientes 2 y 3, es circular; a fin de disminuir al máximo los cambios gaseosos entre la cúpula 3' y el exterior



184323

-8-



se disminuye la superficie de paso 4 produciendo un estrangulamiento 10.

En este caso, se ha observado que el llenado de la parte 3' del recipiente es más fácil que en el caso representado en la figura 1.

Los materiales empleados se eligen entre las materias plásticas transparentes y químicamente inertes: poliestireno, polipropileno, polivinilo. Se fabrica separadamente por una parte el fondo, que no es necesariamente transparente y, la parte superior que comprende las paredes laterales y la parte de recubrimiento 7 del recipiente 3.

Esta parte superior, conformada a partir de una lámina de materia plástica se realiza por cualquier procedimiento conocido, por ejemplo moldeado por aspiración, y después se une por soldadura o pegadura a la parte inferior 5.

El producto obtenido es mantenido estéril hasta su utilización, en envolturas selladas, pudiendo el conjunto ser así conservado durante varias meses.

En el caso en que el producto se presente bajo formas de placas que comprenden una serie de recipientes tales como se representan en las figuras 3 y 5, comprendiendo cada uno de estos recipientes una referencia a, b, c, d, a', b', c', d', que permiten así caracterizar cada una de las reacciones que tendrá lugar en estos recintos.



-9-184323

16 FEB



Las figuras 6 y 7 representan otras
dos formas de realización del recipiente. Difieren
de los representados en las figuras 1 a 5, por el
hecho de que para un mismo volumen a llenar, la
5 superficie de apertura de entrada ll es aumentada.

En estas formas de realización, se
esfuerza en dar al recipiente, para un volumen de
llenado determinado, la mayor dimensión transversal
posible, a fin de facilitar el llenado y evitar
10 las burbujas de aire. En la práctica, esto llega
hasta el límite de dar al recipiente dimensiones
transversales (línea x x) tan próximas como sea
posible a las dimensiones longitudinales (línea
y y).

15 Durante la utilización de tales reci-
pientes en curso de análisis bacteriológico, se
puede proceder de la siguiente forma:

1º) Se toma una cierta superficie
de la placa que comprende los recipientes 1, en
20 cada uno de los cuales se habían dispuesto previa-
mente las sustancias químicas que sirven para
observar el crecimiento de las bacterias, en can-
tidad estrictamente medida, dispersadas en sus-
tancias de elevado peso molecular, químicamente
25 inertes y solubles en los líquidos empleados en
bacteriología. Estas sustancias de elevado peso
molecular forman un excipiente que permite medidas
precisas para el producto químico útil, además
de que forman mediante secado películas contentivas
30 del producto químico, asegurando con ello la buena



conservación. En el momento del empleo, estas sustancias de elevado peso molecular y solubles, aseguran una buena dispersión de los productos contenidos, incluso en el caso en que estos productos químicos sean a su vez poco solubles. Las sustancias químicas activas pueden ser una serie de ácidos aminados, triptofano, fenilelanina, lisina, arginina.

La capa 8 representada en la figura 2, representa el reactivo y el excipiente después de la desecación.

2º) En cada dispositivo dispuesto horizontalmente se introduce la misma cantidad de líquido de dilución, por ejemplo 0,33 ml de agua destilada, ó 0,33 ml de gelosa fundida.

3º) En cada uno de estos recipientes 1, se introduce entonces una suspensión de bacterias en agua destilada, que contiene mil bacterias por litro; el volumen producido es de 0,05 ml.

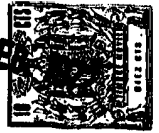
4º) Después de varias horas de incubación a una temperatura determinada (37°C), se registra la turbidez en cada una de las dos partes del dispositivo, ya sea con la vista simplemente refiriéndose a una escala turbidimétrica, o bien con ayuda de un turbidímetro registrador.

5º) Los resultados obtenidos son comparados a los resultados obtenidos anteriormente, ya sea con ayuda de claves de clasificación o bien por tratamiento matemático de la información de un ordenador.



184323

16 FEB



-11-

60) Accesoriamente, se estudian los efectos del crecimiento de las bacterias sobre las sustancias químicas estudiadas con ayuda de reactivos o después de la toma del medio de cultivo, partición química o física, o por cromatografía en fase gaseosa.

Primer ejemplo: utilización del dispositivo;

Se desea determinar el tipo respiratorio de una bacteria. El material utilizado comprende como producto químico la peptona de carne en disolución al 0,15 % en la pliacrilamida al 1 % en agua destilada.

Estos productos químicos son depositados en el fondo de la cúpula y en el fondo del tubo, y después desecados.

En el momento del empleo, se llena de agua destilada estéril el tubo y la cúpula, y se añade una gota de suspensión ligera de bacterias a estudiar. Igualmente se puede, para mayor simplicidad, poner la suspensión de bacterias en agua destilada y llenar con la mezcla el tubo 3 y la cúpula 2.

En el momento de la lectura se registra la opacidad debida al desarrollo de la bacteria en el tubo y en la cúpula. Se deduce la fisiología respiratoria de la bacteria.

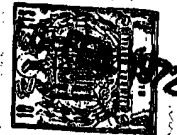
Las bacterias aerobias estrictas se desarrollan solamente en la cúpula.

Las bacterias aeroaneroobias se desarrollan

3777

184323

-12-



en la cúpula y en el tubo.

Las bacterias anaerobias se desarrollan solamente en el tubo.

Segundo ejemplo: cultivo en aerobiosis estricta:

El dispositivo listo para el uso contiene citrato de sodio como fuente de carbono y una fuente de nitrógeno mineral incluida en alcohol de polivinilo, el conjunto es desecado.

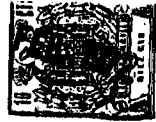
En el momento del empleo, se llena el dispositivo de gelosa al 15 % fundida. Después de la gelificación, se dispone una gota de suspensión de bacterias a estudiar. Si el desarrollo tiene lugar, forma una capa opaca en la superficie de la felosa, en la cúpula. Utilizando el mismo dispositivo en medio líquido, las bacterias pueden desarrollarse o no en el tubo y en la cúpula.

Se puede mostrar que ciertas especies bacterianas pueden fermentar el citrato en el tubo en anaerobiosis y oxidarlo en la cúpula en aerobiosis; otras especies no hacen mas que oxidarlo. El mismo dispositivo permite las dos observaciones simultáneas.

Tercer ejemplo: cultivo en anaerobiosis estricta:

Para estas bacterias, el oxígeno de la atmósfera es tóxico; no deben entrar en contacto con él.

Los cultivos se fección bajo nitrógeno, gas carbónico o gas inerte; son tomados con jeringa.



Se dispone el producto químico activo exclusivamente en el fondo del tubo.

Se llena el dispositivo con aceite de parafina estéril a fin de que el tubo esté lleno.

5 Se inocular en el tubo con ayuda de una jeringa agua destilada, desprovista de aire por ebullición. El agua, mas pesada que el aceite de parafina, ocupa todo el volumen disponible en el tubo y rechaza el aceite hacia la cúpula.

10 El aceite obstruye el orificio del tubo y mantiene una anaerobiosis completa. Se inoculan entonces las bacterias a estudiar con ayuda de una aguja montada en una jeringa, mediante este procedimiento se evita el empleo de estufas especiales para anaerobias estrictas.

15 La medida de la turbidez del medio de cultivo puede efectuarse ventajosamente por vía óptica, utilizando un haz luminoso que atraviesa la solución o que se refleja sobre la superficie de la solución y que cae sobre la célula de un fotómetro.

20 En el caso de utilización de reactivos coloreados para controlar la reacción, el haz luminoso puede ser monocromático o bicromático.

25

NOTA .-

30 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren

3:7:74

184323

16



-14-

su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de Patente, Presentada en Francia, con fecha de 22 de noviembre de 1968, bajo el número PV 174.997, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Modelo de Utilidad por 20 años en España por: Recipiente para el estudio del crecimiento y de la fisiología de las bacterias; caracterizándose por lo siguiente:

1º.- Recipiente para el estudio del crecimiento y de la fisiología de las bacterias, caracterizado porque se realiza de materia transparente y comprende una primera parte abierta al aire, formando una cúpula, y una segunda parte cerrada que comunica con la primera parte por una abertura colocada en la base de esta última.

2º. Recipiente según la reivindicación 1º, caracterizado porque la base de la primera parte es circular.

3º.- Recipiente según la reivindicación 1º, caracterizado porque la base de la primera parte es alargada.

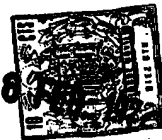
4º.- Recipiente según la reivindicación 1º, caracterizada porque el volumen total del recipiente es inferior a 1 cm^3 .

5º.- Recipiente según la reivindicación 1º, caracterizado porque se asocia a una pluralidad de recipientes idénticos por un soporte común.

3-7-74

-15-

184323



68.- Recipiente según la reivindicación
10, caracterizado porque comprende en su interior
sustancias químicas en forma de una capa desecada
depositada sobre el fondo.

5 79.- Recipiente para el estudio del cre-
cimiento y de la fisiología de las bacterias; tal
y como queda sustancialmente descrito en la presente
Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

10 Esta memoria consta de quince hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 16 FEB. 1972

COMPAGNIE GENERALE D'AUTOMATISME.

A. GOMEZ ACEBO Y MODOY
Firmado: F. Hernández Ruiz

FIG. 1

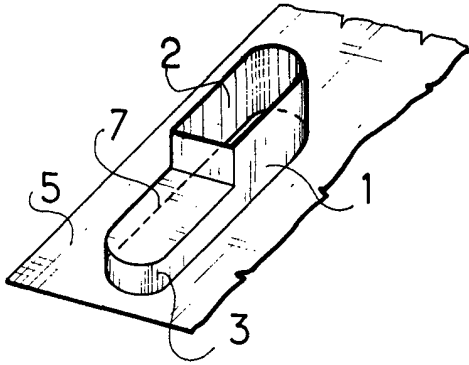


FIG. 2

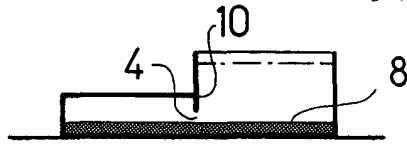


FIG. 3

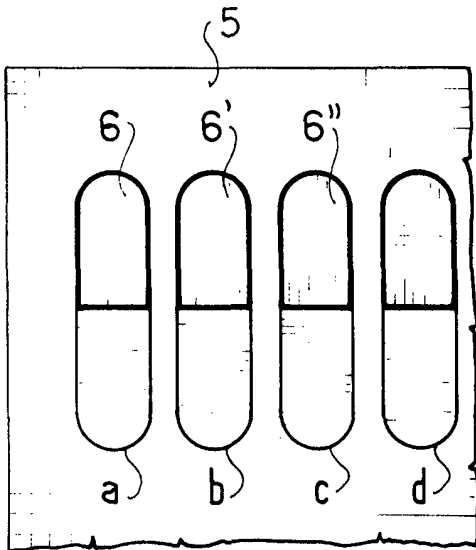


FIG. 4

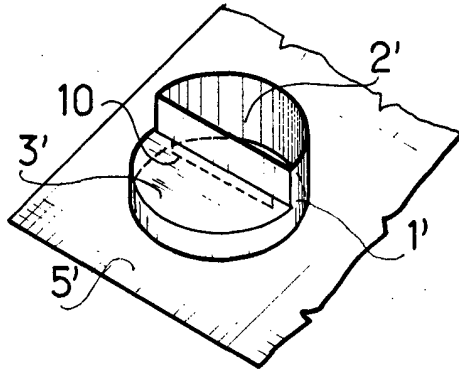
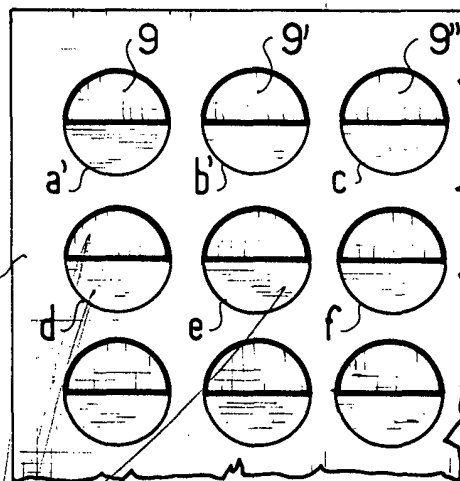


FIG. 5

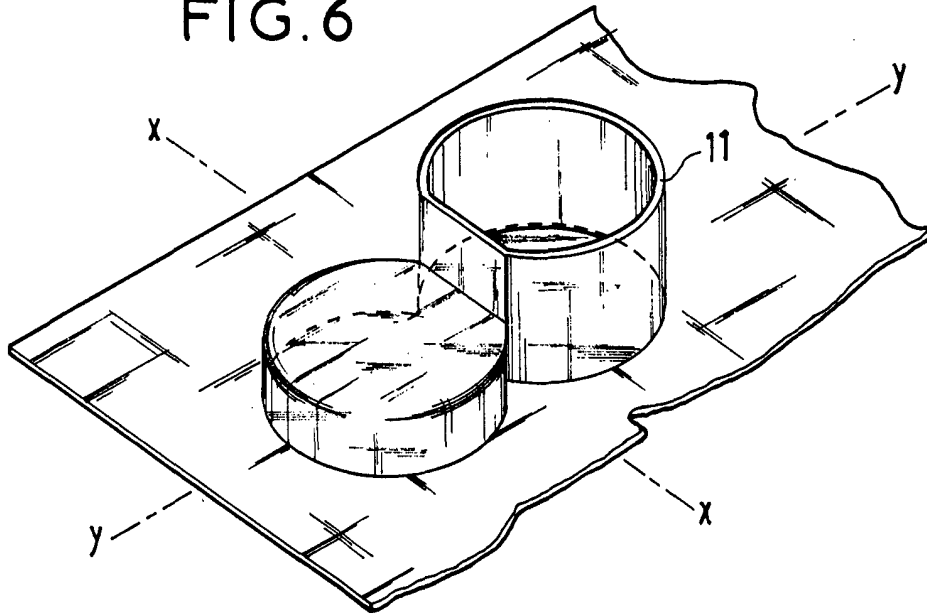


LA
VARIANTE

22 10 9 11

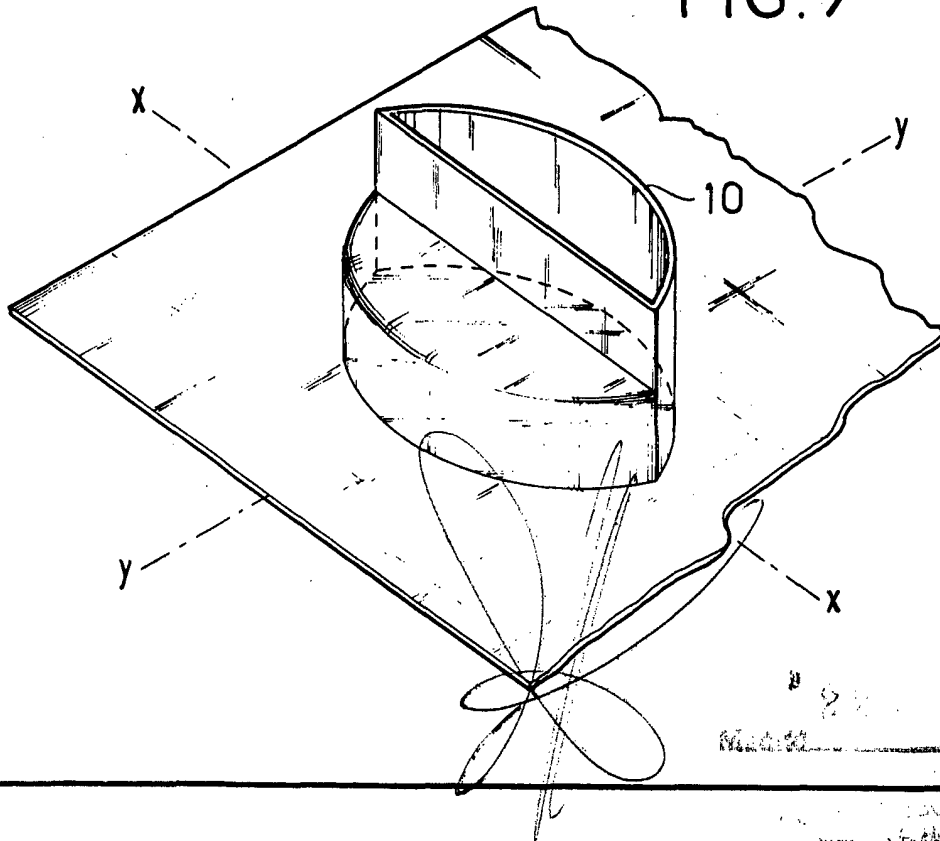


FIG. 6



ESCALA
VARIABLE

FIG. 7



[Scribbled signature]

[Faint, illegible text]