



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE C12
SUBCLASE D

Nº 387.044 **387044**

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: GRIFFIN POLLUTION CONTROL CORP.

RESIDENCIA: 881 East 141st Street, NEW YORK- N.Y.

ESTADOS UNIDOS.

ENUNCIADO: MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE ACELERACION DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 4860 del 22-1-70

IN.-

387044

1 Esta invención se refiere al crecimiento y cultivo de microorganismos. Más específicamente, esta invención se refiere a la potenciación o activación de microorganismos en medios de cultivo .

5 El cultivo de microorganismos se realiza actualmente en muchas formas comerciales y para varios fines y productos de gran importancia. El resultado deseado puede ser un aumento rápido o grande en el número de organismos, como es el caso frecuente cuando los organismos de las enfermedades son desarrollados como cultivos en un laboratorio médico. Las mayores cantidades producidas son utilizadas con frecuencia para diagnóstico o para realizar otros estudios relativos a la enfermedad. El cultivo puede realizarse simplemente para cambiar la forma de los medios, por ejemplo, el caso muy común de realizar un cultivo para purificar las aguas residuales y otros desperdicios mediante microorganismos.

15 Se obtienen numerosos e importantes productos como subproductos del crecimiento controlado de microorganismos. Entre los ejemplos típicos se encuentran la producción de antibióticos, algunos de los cuales son productos naturales del metabolismo de microorganismos específicos; la producción de enzimas, que son excretados en grandes cantidades por ciertos microorganismos; la producción de ácido láctico a partir del suero y la producción del alcohol etílico a partir de hidratos de carbono.

25 En el caso de muchas de estas actividades de producción, más que la compensación económica, ha sido el conocimiento el factor limitativo en cuanto a la realización de adiciones a los medios de cultivo de agentes nutritivos,

387044

1 fertilizantes u otras sustancias promotoras del crecimien-
to y en cuanto a la suplementación del proceso con otras
etapas con objeto de aumentar la producción. Las razones
económicas no limitarían estas adiciones y suplementos en
5 el caso de muchos procesos en los que el coste adicional
constituiría una pequeña parte del gasto global y, por lo
tanto, sería reembolsado por el mayor rendimiento de pro-
ducto. En ciertas aplicaciones médicas, por ejemplo diagno-
sis, el coste no debe considerarse una limitación básica.
10 En otras aplicaciones, como la elaboración de cerveza, el
coste del material añadido de la nueva etapa del proceso
adicional puede ser con más frecuencia un factor limitati-
vo, pero en circunstancias en que se aumentara suficientemen-
te la producción mediante una mejora dada, esta adición
15 tendría el correspondiente valor para el proceso.

Los microorganismos son cultivados actualmente en
medios estériles, muy controlados, que contienen cantidades
mínimas de impurezas y que habitualmente contienen cantida-
des totalmente suficientes de agentes nutritivos y fertili-
zantes deseables conocidos, que pueden comprender, por
20 ejemplo, licor de infusión de maíz, azúcar y otras sustan-
cias en formas asequibles para los organismos. También es
corriente airear bien muchas de estas mezclas con gases
conteniendo oxígeno. En otras aplicaciones, como el trata-
miento de aguas residuales, el medio no es muy controlado,
pero el crecimiento de los organismos purificadores es es-
25 timulado mediante varias técnicas conocidas.

Un objeto general de esta invención es proporcionar
medios para mejorar el proceso de crecimiento de los mi-
croorganismos.
30

387044

1 Otro objeto de esta invención es proporcionar medios para aumentar el crecimiento y la productividad de los cultivos de microorganismos.

5 Un objeto más específico de esta invención es proporcionar un aditivo para dichos cultivos para conseguir una economía global mayor.

Otro objeto más específico de esta invención es proporcionar un sistema que opere sobre estos cultivos para conseguir una economía global mayor.

10 De acuerdo con esta invención, un medio de cultivo conteniendo microorganismos, que en muchas aplicaciones puede ser estéril, especialmente adecuado para el crecimiento de los microorganismos y de contenido adecuado en nutrientes y otros factores de crecimiento, se pone en contacto con uno o más óxidos de nitrógeno gaseosos. Los procesos metabólicos son significativamente incrementados. Finalmente, los productos deseados resultantes del cultivo de los microorganismos pueden ser separados del medio. En sus aspectos más específicos, esta invención incluye la operación sobre los cultivos que inicialmente contienen por lo menos nutrientes bien equilibrados y totalmente suficientes y otros factores de crecimiento.

20 No se conoce ningún mecanismo satisfactorio de la forma en que ocurre la potenciación o activación o de la forma en que los compuestos adicionados actúan realmente durante el cultivo y crecimiento. La confirmación de esta invención se ha realizado fundamentalmente por observación y por operaciones efectivas y ensayos. Muchos de los procedimientos de laboratorio que sirven como resultados de los ensayos más tangibles se describen con detalle más adelan-

25

30

387044

1 te. Puede decirse con certeza que las mejoras de acuerdo con esta invención son aplicables a las bacterias, hongos y otros microorganismos en general.

5 Los resultados conseguidos no indican claramente que el nitrógeno añadido actúe como un alimento ordinario. No ha podido encontrarse nada que relacione directamente las cantidades de nitrógeno metabolizado con las cantidades aplicadas en forma gaseosa de acuerdo con esta invención. Los medios de cultivo utilizados con cada organismo específicamente ensayado fueron obtenidos de fuentes comerciales y recomendados por estas fuentes como adecuados para conseguir un nivel de crecimiento por lo menos tan alto como el normalmente conseguible. Estos medios contienen nitrógeno totalmente adecuado en una forma asequible para el organismo y también contienen todos los nutrientes necesarios para un buen crecimiento en cantidades y proporciones apropiadas. Pero aún el tratamiento de estos medios durante el cultivo con el aire activado produce unos resultados significativamente mejorados.

15
20 Con fines de confirmación, un organismo que fue cultivado con uno de los mayores grados de éxito de acuerdo con esta invención, fue cultivado también de forma esencialmente idéntica con la excepción de que se introdujo ión nitrato (en un grupo de ensayos) y ión nitrito (en un segundo grupo de ensayo) en solución, en cantidades estequiométricamente equivalentes a otras remesas que habían sido dosificadas con óxidos de nitrógeno gaseosos. Los ensayos estaban adaptados para establecer si podían obtenerse los mismos resultados por introducción del nitrógeno en forma de sales y los resultados indicaron claramente que

25
30

387044

1 con las sales de nitrógeno no se producía ninguna potencia-
ciación o activación correspondiente a la observada con
los gases.

5 Otros objetos, características y ventajas de esta
invención se pondrán en evidencia en la siguiente descrip-
ción de los ejemplos de la invención.

Las Figuras 1-29 son representaciones gráficas de
los resultados conseguidos de acuerdo con los siguientes
ejemplos.

10 Las Figuras 1-3 se refieren al Ejemplo 1.

Las Figuras 4-6 se refieren al Ejemplo 2.

La Figura 7 se refiere al Ejemplo 3.

La Figura 8 se refiere al Ejemplo 4.

La Figura 9 se refiere al Ejemplo 5.

15 La Figura 10 se refiere al Ejemplo 6.

La Figura 11 se refiere al Ejemplo 7.

La Figura 12 se refiere al Ejemplo 8.

Las Figuras 13 y 14 se refieren al Ejemplo 9.

Las Figuras 15 y 16 se refieren al Ejemplo 10.

20 Las Figuras 17 y 18 se refieren al Ejemplo 11.

Las Figuras 19 y 20 se refieren al Ejemplo 12.

Las Figuras 21 y 22 se refieren al Ejemplo 13.

Las Figuras 23 a 25 se refieren al Ejemplo 14.

Las Figuras 26 y 27 se refieren al Ejemplo 15.

25 La Figura 28 se refiere al Ejemplo 16.

La Figura 29 se refiere al Ejemplo 17.

GENERALIDADES

30 En cada uno de los siguientes ejemplos, se selecciona
específicamente un medio de cultivo individual conocido por
producir un buen crecimiento del microorganismo individual

- 7 -
387044

1 que está siendo cultivado. Todos los medios de cultivo se
obtienen por adquisición normal en fuentes comerciales y
son recomendados por estas fuentes como adecuados para con-
5 seguir un nivel de crecimiento por lo menos tan alto como
el normalmente conseguible. Se siguen estrictamente las
instrucciones de uso de los medios proporcionadas con los
mismos. Todos los organismos utilizados en los siguientes
ejemplos son confirmados por una agencia estatal califica-
da.

10 Unos tubos de ensayo de 15 ml y adecuados para uso
en un turbidímetro, se esterilizan a 118-121°C en un auto-
clave. Los medios son sembrados o inoculados con los cul-
tivos mediante técnicas normales.

15 Según los requisitos de los ensayos, se introducen
en cada tubo 6 ó 7 ml del medio conteniendo el microorga-
nismo. Cuando se realizan recuentos iniciales en placa, nor-
malmente se hacen en este momento. Los tubos se cierran her-
méticamente con tapones de látex de goma. En todos los
ejemplos, los gases inoculados se expresan en partes por
20 millón de los gases separadamente aplicados. En todos los
casos, este valor es diluído de nuevo por los gases atmos-
féricos contenidos en los tubos de ensayo.

25 Los gases agregados se introducen utilizando una je-
ringa hermética a los gases a través del tapón de goma. Se
saca de los tubos una cantidad de los gases contenidos en
los mismos igual a la cantidad de los gases de ensayo y a
continuación se introducen estos últimos. Para cada gas de
ensayo y tubo de cultivo se utiliza una nueva aguja estéril
30 y la jeringa propiamente dicha es lavada con cada gas de
ensayo nuevo en una zona bien ventilada, durante varios

387044

1 minutos, antes de su aplicación. Los tubos de control son sometidos a una aplicación de gas esencialmente idéntica, a excepción de que los gases aplicados no contienen un óxido de nitrógeno gaseoso.

5 Los gases y las mezclas utilizados son de la calidad más pura asequible y todos ellos son analizados después de la preparación para comprobar la pureza y la concentración de los óxidos de nitrógeno. Todos los tubos se colocan en un aparato mecánico que los voltea continuamente durante los periodos pertinentes de cultivo. La turbidez, las cuentas en placa o ambos valores, según el ensayo, se registran a intervalos seleccionados antes y después de la dosificación, para observar el efecto de los gases sobre el crecimiento. El crecimiento de los microorganismos se produce en forma de tamaño mayor de los organismos individuales o en forma de reproducción de los organismos o como ambos efectos.

15 En muchos ejemplos en los que se agrega un óxido de nitrógeno, los gases se diluyen con helio. El helio se selecciona para proporcionar una atmósfera no reactiva para los óxidos de nitrógeno (como el NO), expuestos a descomposición cuando son diluidos con oxígeno o aire normal. En la misma serie de ensayos, los óxidos de nitrógeno estables (como N_2O y NO_2) son diluidos análogamente con helio en muchos casos, con objeto de asegurarse de que los resultados son correspondientes y pueden ser sometidos inmediatamente a una comparación directa.

25 El helio no realiza ninguna función activa en la mezcla y se utiliza solamente para preservar los óxidos de nitrógeno específicos. De hecho, en muchos casos, el helio

30

387044

1 aparentemente disminuye el crecimiento en un medio en el
grado en que desplaza al oxígeno. Se observará que la com-
binación con helio es una alternativa que puede ser evita-
5 da, por ejemplo, mediante un sistema de aplicación que di-
rectamente suministre los óxidos de nitrógeno procedentes
de un depósito sin diluir.

La mayor turbidez que se produce en los ejemplos está
estrechamente relacionada con el mayor tamaño de los orga-
nismos individuales y también está influenciada por la can-
10 tidad de reproducción. El turbidímetro opera por medida de
la luz transmitida a través de los tubos de ensayo. Las me-
didas se realizan en un aparato convencional comercial.

El aumento en las cuentas en placa está directamente
relacionado con el mayor número de organismos producido por
15 reproducción. Para realizar el recuento en placa, se in-
troduce 1 ml del medio en agar dextrosa de Sabouraud, en
el caso de los mohos y hongos, y en un medio de agar extrac-
to de glucosa tripticasa en los otros casos.

Todos los recuentos en placa se realizan de acuerdo
20 con procedimientos aprobados por el Servicio de Salud Pú-
blica de Estados Unidos.

EJEMPLO 1

El organismo Streptococcus sp (alfa-hemolítico) se
siembra en un medio de tioglicolato específico para el
25 Streptococcus. El medio se divide en porciones de 7 ml y
cada porción se deposita en un tubo de ensayo individual.
Las lecturas turbidimétricas se realizan a intervalos, de
la forma siguiente:

30 Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
Columna 2 - 4 horas después de la inoculación;

387044

- 1 Columna 3 - 24 horas después de la inoculación;
- Columna 4 - 34 horas después de la inoculación;y
- Columna 5 - 52 horas después de la inoculación.

TURBIDIMETRO

5	<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
	A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ , bal. He	136	136	152	222	340
	B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ , bal. He	136	138	156	228	340
	C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ , bal. He	137	136	266	300	355
	D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ , bal. He	135	139	270	305	375
10	E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ , bal. He	135	136	264	298	360
	F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ , bal. He	137	137	154	197	315
	G 0,5 ml helio solamente (control)	136	136	146	183	296

15 En lo que antecede, por inadvertencia se agregaron otros 0,5 ml de helio puro en lugar de la misma cantidad del gas a aquellos tubos dosificados con óxidos de nitrógeno. Esta adición, naturalmente, privó al organismo contenido en los tubos de la correspondiente cantidad de oxígeno molecular. No obstante, los resultados indican un crecimiento significativamente mayor en comparación con el del control, aunque la cantidad de oxígeno era relativamente menor.

20 La Figura 1 es una representación gráfica de estos resultados.

25 La Figura 2 es un gráfico de la turbidez en función del tiempo, comparando la mezcla a 9 ppm con el control y mostrando la considerablemente mayor velocidad de crecimiento resultante del óxido de nitrógeno gaseoso.

387044

1 CUENTAS EN PLACA

	<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas ini- ciales en placa</u>	<u>Cuentas en placa des- pués de 24 h.</u>	<u>Rendi- miento</u>
	A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ , bal. He	180.000	9.600.000	53
5	B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ , bal. He	120.000	7.800.000	65
	C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ , bal. He	160.000	12.000.000	75
	D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ , bal. He	180.000	13.000.000	72
	E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ , bal. He	190.000	13.000.000	68
	F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ , bal. He	190.000	6.600.000	35
10	G 0,5 ml helio solamente (control)	130.000	5.400.000	42

Las diversas muestras son sustancialmente idénticas a las utilizadas en la medida de la turbidez, incluida la sobredosis de 0,5 ml de helio.

15 La Figura 3 es una representación gráfica de estos resultados.

EJEMPLO 2

20 El organismo Paracolon se siembra en un medio de peptona coloide, específico para el Bacillus. El medio se divide en porciones de 7 ml y cada porción se deposita en tubos de ensayo individuales. Se realizan lecturas turbidimétricas a intervalos, de la siguiente forma:

- Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
- Columna 2 - 24 horas después de la inoculación;
- 25 Columna 3 - 36 horas después de la inoculación; y
- Columna 4 - 52 horas después de la inoculación.

387044

1

TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ , bal. He	79	204	202	210
B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ , bal. He	80	188	198	208
C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ , bal. He	82	190	196	206
D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ , bal. He	78	170	190	210
E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ , bal. He	81	172	197	214
F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ , bal. He	82	250	260	260
G 0,5 ml helio solamente (control)	82	150	185	200

5

10

En lo que antecede, por inadvertencia se agregaron otros 0,5 ml de helio puro en lugar de la misma cantidad del gas a los tubos dosificados con óxidos de nitrógeno. Esta adición, naturalmente, priva al organismo contenido en los tubos de una cantidad correspondiente de oxígeno molecular. No obstante, los resultados indican un crecimiento significativamente mayor en comparación con el del control, incluso aunque la cantidad de oxígeno es relativamente menor.

15

20

La Figura 4 es una representación gráfica de estos resultados.

25

La Figura 5 es un gráfico del tiempo y la turbidez en los dos ejes, comparando la mezcla a 0,9 ppm con el control y mostrando la considerablemente mayor velocidad de crecimiento de la mezcla que contiene el óxido de nitrógeno gaseoso.

30

387044

1 CUENTAS EN PLACA

	<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas iniciales en placa</u>	<u>Cuentas en placa después de 24 h.</u>	<u>Rendimiento</u>
	A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ , bal. He	150.000	6.600.000	44
5	B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ , bal. He	80.000	5.400.000	67
	C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ , bal. He	200.000	6.600.000	33
	D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ , bal. He	90.000	5.400.000	60
	E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ , bal. He	100.000	5.400.000	54
	F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ , bal. He	180.000	10.000.000	55,5
10	G 0,5 ml helio solamente (control)	150.000	5.400.000	36

Las diversas muestras son sustancialmente idénticas a las empleadas para observar la turbidez, incluida la sobredosis de helio.

15 La Figura 6 es una representación gráfica de estos resultados.

EJEMPLO 3

20 El organismo Staphilococcus aureus (hemolítico) se siembra en caldo de soja tripticasa. El caldo se divide en porciones de 7 ml y cada una de ellas se introduce en tubos individuales adecuados para lecturas turbidimétricas. Las lecturas se realizan a intervalos durante 30 horas, de la forma siguiente:

25 Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
Columna 2 - 20 horas después de la inoculación; y
Columna 3 - 30 horas después de la inoculación.

387044

1

TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ , bal. He	130	138	148
B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ , bal. He	133	145	152
5 C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ , bal. He	132	143	158
D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ , bal. He	132	140	150
E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ , bal. He	133	138	140
F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ , bal. He	132	143	144
G 0,5 ml helio solamente (control)	133	141	141

10

La Figura 7 es una representación gráfica de estos resultados al final del periodo de 30 horas.

EJEMPLO 4

15

El organismo Streptococcus sp (alfa-hemolítico) (un estreptococo gram-positivo) se siembra en caldo de tioglicolato, específico para el Streptococcus. El caldo se divide en porciones de 7 ml y cada una de ellas se introduce en tubos individuales adecuados para lecturas turbidimétricas. Las lecturas se realizan durante un periodo de 30 horas, a intervalos, de la forma siguiente:

20

- Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
- Columna 2 - 20 horas después de la inoculación; y
- Columna 3 - 30 horas después de la inoculación.

25

30

387044

1 TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ , bal. He	158	160	166
B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ , bal. He	156	156	162
5 C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ , bal. He	155	160	164
D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ , bal. He	157	175	186
E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ , bal. He	155	166	168
F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ , bal. He	157	164	165
G 0,5 ml helio solamente (control)	157	158	162

10 La Figura 8 es una representación gráfica de estos resultados al final del periodo de 30 horas.

EJEMPLO 5

15 El organismo Staphilococcus aureus (hemolítico) se siembra en caldo de soja tripticasa. El caldo se divide en porciones de 7 ml y cada una de ellas se introduce en tubos individuales adecuados para lecturas turbidimétricas. Las lecturas se realizan durante un periodo de 48 horas, de la forma siguiente:

- 20 Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
Columna 2 - 24 horas después de la inoculación; y
Columna 3 - 48 horas después de la inoculación.

TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
25 A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O, bal. He	78	75	250
B 0,5 ml 60 ppm N ₂ O, bal. He	78	110	230
C 0,5 ml 31 ppm N ₂ O, bal. He	76	74	254
D 0,5 ml 12 ppm N ₂ O, bal. He	75	73	240
E 0,5 ml 5,1 ppm N ₂ O, bal. He	76	71	228
F 0,5 ml 1,5 ppm N ₂ O, bal. He	75	70	200
30 G 0,5 ml helio solamente (control)	77	74	78

1 La Figura 9 es una representación gráfica de estos resultados. Obsérvese el intenso efecto durante el segundo periodo de crecimiento de 24 horas.

EJEMPLO 6

5 El organismo Staphilococcus aureus (hemolítico) se siembra en agar extracto de glucosa tripticasa. Las cuentas en placa se registran antes de la dosificación con gas y después de 48 horas, en la forma siguiente:

CUENTAS EN PLACA

10

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Antes del gas</u>	<u>48 h. después del gas</u>	<u>Rendimiento</u>
A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O, bal. He	400	11.400.000	28.500
B 0,5 ml 60 ppm N ₂ O, bal. He	200	6.600.000	33.000
C 0,5 ml 31 ppm N ₂ O, bal. He	500	12.600.000	25.200
D 0,5 ml 12 ppm N ₂ O, bal. He	200	12.000.000	60.000
E 0,5 ml 5,1 ppm N ₂ O, bal. He	200	900.000	4.500
F 0,5 ml 1,5 ppm N ₂ O, bal. He	100	720.000	7.200
G 0,5 ml helio solamente (control)	300	8.400	28

15

20 Los rendimientos se calculan a partir de las cuentas en placa después de 48 horas para las diversas muestras esencialmente idénticas a las del Ejemplo 5.

La Figura 10 es una representación gráfica de estos resultados.

EJEMPLO 7

25 El organismo Micrococcus albus se siembra en caldo de soja tripticasa. El caldo se divide en porciones de 7 ml y cada una de ellas se introduce en tubos individuales adecuados para lecturas turbidimétricas. Las lecturas se realizan durante un periodo de 48 horas, de la forma siguiente:

30

387044

- 1 Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
- Columna 2 - 24 horas después de la inoculación; y
- Columna 3 - 48 horas después de la inoculación.

TURBIDIMETRO

5	<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
	A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O, bal. He	80	80	99
	B 0,5 ml 60 ppm N ₂ O, bal. He	81	77	100
	C 0,5 ml 31 ppm N ₂ O, bal. He	79	79	95
	D 0,5 ml 12 ppm N ₂ O, bal. He	82	80	93
10	E 0,5 ml 5,1 ppm N ₂ O, bal. He	83	78	94
	F 0,5 ml 1,5 ppm N ₂ O, bal. He	85	80	97
	G 0,5 ml helio solamente (control)	83	81	90

La Figura 11 es una representación gráfica de los resultados.

15

EJEMPLO 8

Un cultivo de reserva de Staphilococcus aureus (hemolítico, coagulasa positiva) se siembra en caldo de soja tripticasa. En unos tubos individuales se pipetea una porción de 7 ml. Los tubos se tapan y se refrigeran durante la noche para interrumpir el crecimiento. A continuación se sacan los tubos del refrigerador y se aplican 0,5 ml de mezclas de óxidos de nitrógeno en aire previamente purificado de composición sustancialmente atmosférica. El recuento se realiza antes de gasificar y después de transcurridas 24 horas de acuerdo con el método de recuento de placas normal U.S.P.H., utilizando agar extracto de glucosa tripticasa.

25

Las muestras que llevan la misma letra de prefijo proceden de la misma remesa de cultivo.

30

387044

	<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas en placa antes del gas</u>	<u>Cuentas en placa después del gas</u>	<u>Rendimiento</u>
1	A-1 70,4 ppm N ₂ O + 65 ppm NO ₂ (aire) ²	60/ml	6.600.000	110.000
5	C-1 70,4 ppm N ₂ O + 65 ppm NO ₂ (aire) ²	40/ml	2.100.000	52.500
	A-2 40,6 ppm N ₂ O + 40 ppm NO ₂ (aire) ²	40/ml	4.200.000	105.000
	C-2 40,6 ppm N ₂ O + 40 ppm NO ₂ (aire) ²	40/ml	3.300.000	82.500
10	A-3 32 ppm N ₂ O + 21 ppm NO ₂ (aire) ²	60/ml	360.000	6.000
	B-3 32 ppm N ₂ O + 21 ppm NO ₂ (aire) ²	80/ml	740.000	9.250
	C-3 32 ppm N ₂ O + 21 ppm NO ₂ (aire) ²	20/ml	6.200.000	310.000
	A-4 7,5 ppm N ₂ O + 10 ppm NO ₂ (aire)	80/ml	210.000	2.625
15	B-4 7,5 ppm N ₂ O + 10 ppm NO ₂ (aire)	40/ml	4.800.000	120.000
	C-4 7,5 ppm N ₂ O + 10 ppm NO ₂ (aire) ²	40/ml	3.400.000	85.000
	A-5 4,4 ppm N ₂ O + 3,3 ppm NO ₂ (aire)	40/ml	5.400.000	135.000
20	B-5 4,4 ppm N ₂ O + 3,3 ppm NO ₂ (aire) ²	40/ml	2.400.000	60.000
	C-5 4,4 ppm N ₂ O + 3,3 ppm NO ₂ (aire) ²	40/ml	3.300.000	82.500
	C-6 1/2 ml aire solamente (control)	40/ml	240.000	6.000

25 La Figura 12 es una representación gráfica de los resultados, realizada en escala logarítmica para cubrir la amplia gama de resultados.

EJEMPLO 9

30 Se cultiva Staphilococcus aureus y se observan los resultados en la forma descrita en el Ejemplo 8, a excepción de que se aplica NO en helio. Las muestras que llevan

387044

1 la misma letra de prefijo proceden de la misma remesa de cultivo.

	<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas en placa antes del gas</u>	<u>Cuentas en placa después del gas</u>	<u>Rendimiento</u>
5	A-1 75 ppm NO, bal. He	40/ml	3.000.000	75.000
	B-1 75 ppm NO, bal. He	60/ml	420.000	7.000
	C-1 75 ppm NO, bal. He	40/ml	2.400.000	60.000
	A-2 50 ppm NO, bal. He	60/ml	3.000.000	50.000
10	B-2 50 ppm NO, bal. He	40/ml	2.400.000	60.000
	C-2 50 ppm NO, bal. He	20/ml	370.000	18.500
	A-3 25 ppm NO, bal. He	40/ml	270.000	6.750
	B-3 25 ppm NO, bal. He	40/ml	130.000	3.250
	C-3 25 ppm NO, bal. He	40/ml	260.000	6.500
15	A-4 1/2 ml helio solamente (control)	40/ml	60.000	1.500
	B-4 1/2 ml helio solamente (control)	60/ml	110.000	1.833

20 La Figura 13 es una representación gráfica de los rendimientos resultantes.

La Figura 14 es un gráfico del rendimiento en función de la cantidad relativa de NO para las muestras de dos remesas diferentes: la remesa A y la remesa C. Obsérvese el aumento de rendimiento al aumentar la concentración.

EJEMPLO 10

25 El organismo Streptococcus sp (alfa-hemolítico) se siembra en un medio de tioglicolato específico para Streptococcus. El medio se divide en porciones de 7 ml y cada una de ellas se pipetea en tubos estériles adecuados para lecturas turbidimétricas. Se realiza un recuento antes y después

30

1 de gasificar de acuerdo con el método de recuento en placa normal U.S.P.H., utilizando agar extracto de glucosa tripti- casa. Las lecturas se realizan a periodos de 22 y 26 horas, de la forma siguiente:

- 5 Columna 1 infra - lectura turbidimétrica antes de la inoculación del gas;
- Columna 2 - lectura turbidimétrica 22 horas después de gasificar;
- Columna 3 - lectura turbidimétrica 26 horas después de gasificar;
- 10 Columna 4 - cuentas en placa antes de la inoculación del gas;
- Columna 5 - cuentas en placa 22 horas después de gasificar; y
- Columna 6 - cuentas en placa 26 horas después de gasificar.

	Mezcla de ino- culación	Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendi- miento
		1	2	3	4	5	6	
15	A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	50	75		720	780.000		1082
	B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	49		70	760		780.000	1025
	C 0,5 ml 75 ppm NO + He	50	77		780	810.000		1030
20	D 0,5 ml 75 ppm NO + He	51		75	760		660.000	869
	E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	50	76		780	660.000		847
	F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	52		72	840		780.000	939
25	G 0,5 ml helio solamente (con trol)	50	72		840	720.000		856
	H 0,5 ml helio solamente (con trol)	52		65	760		660.000	869
	I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	52		78	660		1.080.000	1635

30

387044

1 La Figura 15 es una representación gráfica de las turbideces relativas observadas.

5 La Figura 16 es un gráfico de los rendimientos observados en las cuentas en placa. Obsérvese que al cabo de 22 horas, la aplicación de 15 ppm de NO₂ todavía no presenta ningún efecto.

EJEMPLO 11

10 El organismo Escherichia coli (un organismo gram-negativo) se siembra en un medio de peptona coloide y después se pipetea en unas porciones de 7 ml en tubos estériles adecuados para lecturas turbidimétricas. Se realiza un recuento antes y después de gasificar de acuerdo con el método de recuento en placa normal U.S.P.H., utilizando agar extracto de glucosa tripticasa. Las lecturas se realizan a periodos de 22 y 26 horas, de la forma siguiente:

- 15
- Columna 1 infra - lectura turbidimétrica antes de la inoculación del gas;
 - Columna 2 - lectura turbidimétrica 22 horas después de gasificar;
 - Columna 3 - lectura turbidimétrica 26 horas después de gasificar;
 - 20 Columna 4 - cuentas en placa antes de la inoculación del gas;
 - Columna 5 - cuentas en placa 22 horas después de gasificar; y
 - Columna 6 - cuentas en placa 26 horas después de gasificar.

25

30

	Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
		1	2	3	4	5	6	
1	A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	46	60		780	770.000		988
5	B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	49		66	760		480.000	62
	C 0,5 ml 75 ppm NO + He	48	66		780	690.000		885
	D 0,5 ml 75 ppm NO + He	50		68	1080		660.000	612
10	E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	51	75		960	280.000		292
	F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	49		70	840		660.000	775
	G 0,5 ml helio solamente (control)	50	63		900	210.000		231
15	H 0,5 ml helio solamente (control)	50		60	880		370.000	420
	I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	50		68	960		480.000	500

La Figura 17 es una representación gráfica de las turbideces relativas observadas.

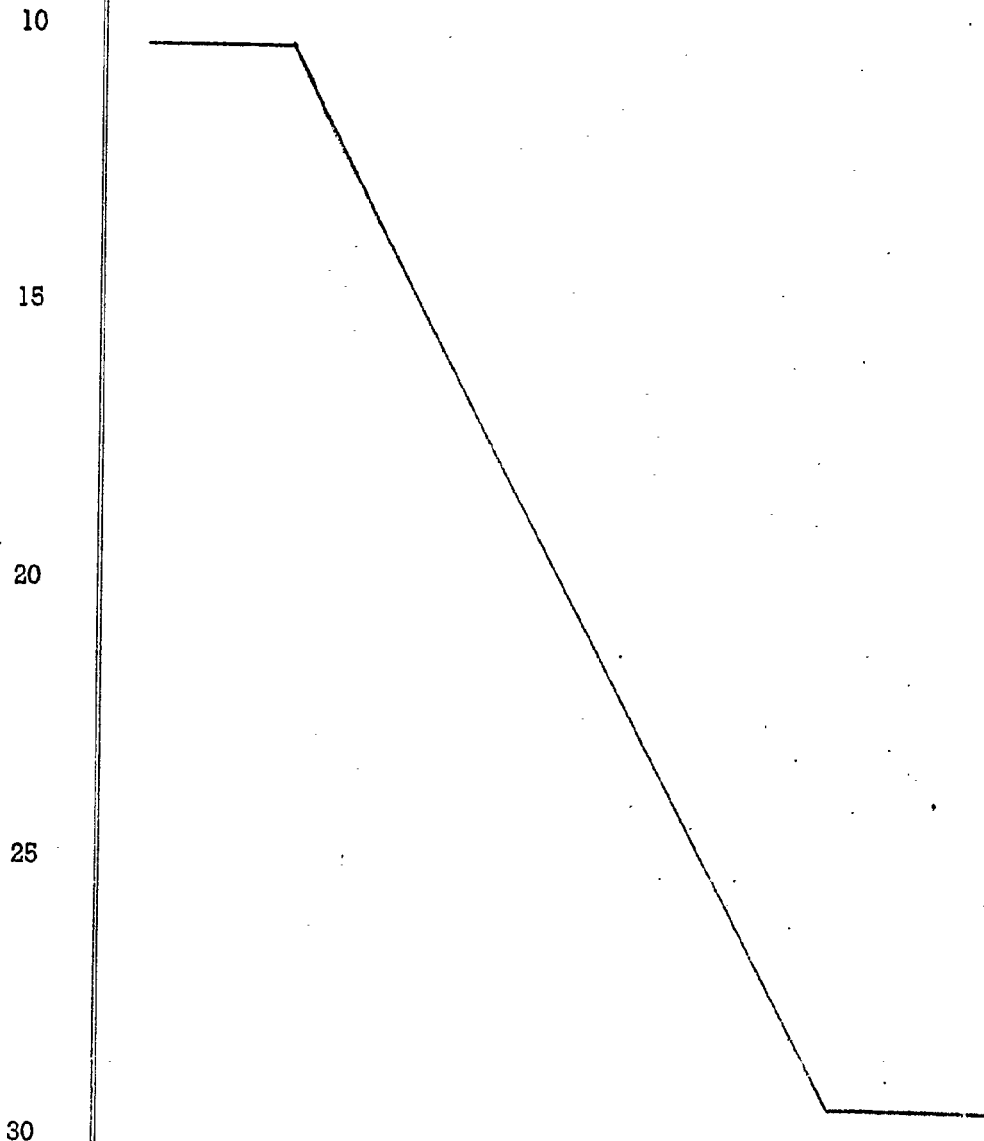
La Figura 18 es un gráfico de los rendimientos obtenidos por cuentas en placa.

EJEMPLO 12

El organismo Neisseria (un organismo gram-positivo) se siembra en un medio de tioglicolato y después se pipetea unas porciones de 7 ml en tubos estériles adecuados para lecturas turbidimétricas. Se realiza un recuento antes y después de gasificar, de acuerdo con el método de recuento en placa normal U.S.P.H. utilizando agar extracto de glucosa tripticasa. Las lecturas se realizan a periodos de 22 y 26 horas, de la forma siguiente:

387044

- 1 Columna 1 infra - lectura turbidimétrica antes de la inoculación del gas;
- Columna 2 - lectura turbidimétrica 22 horas después de gasificar;
- Columna 3 - lectura turbidimétrica 26 horas después de gasificar;
- 5 Columna 4 - cuentas en placa antes de la inoculación del gas;
- Columna 5 - cuentas en placa 22 horas después de gasificar; y
- Columna 6 - cuentas en placa 26 horas después de gasificar.



387044

387044

Mezcla de inoculación	Turbidímetro			4	Cuentas en placa		Rendimiento
	1	2	3		5	6	
A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	51	200		760	126.000.000		166.000
B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	52		212	840		114.000.000	135.800
C 0,5 ml 75 ppm NO + He	51	230		760	108.000.000		142.000
D 0,5 ml 75 ppm NO + He	53		234	760		138.000.000	181.500
E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	59	222		800	120.000.000		150.000
F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	52		228	760		120.000.000	157.900
G 0,5 ml helio solamente (control)	55	212		720	84.000.000		116.800
H 0,5 ml helio solamente (control)	56		214	880		96.000.000	108.900
I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	55		226	760		114.000.000	150.000

1

5

10

15

20

25

30

387044

	Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cu	
		1	2	3		4
1	A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	51	200		760	1
	B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	52		212	840	
	C 0,5 ml 75 ppm NO + He	51	230		760	1
5	D 0,5 ml 75 ppm NO + He	53		234	760	
	E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	59	222		800	1
	F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	52		228	760	
	G 0,5 ml helio solamente (control)	55	212		720	
10	H 0,5 ml helio solamente (control)	56		214	880	
	I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	55		226	760	

15

20

25

30

044

387044

odímetro		Cuentas en placa			Rendimiento
<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	
200		760	126.000.000		166.000
	212	840		114.000.000	135.800
230		760	108.000.000		142.000
	234	760		138.000.000	181.500
222		800	120.000.000		150.000
	228	760		120.000.000	157.900
212		720	84.000.000		116.800
	214	880		96.000.000	108.900
	226	760		114.000.000	150.000

387044

1 La Figura 19 es una representación gráfica de las turbideces relativas observadas.

La Figura 20 es un gráfico de los rendimientos calculados por cuentas en placa.

5

EJEMPLO 13

El organismo Listeria se siembra en un medio de tioglicolato y después se pipetea en unas porciones de 7 ml en tubos estériles adecuados para lecturas turbidimétricas. El cultivo se realiza en condiciones anaerobias. Se realiza un recuento antes y después de gasificar, de acuerdo con el método de recuento en placa normal U.S.P.H., utilizando agar extracto de glucosa tripticasa. Las lecturas se realizan a periodos de 22 y 26 horas, de la forma siguiente:

10

15

20

25

30

Columna 1 infra - lectura turbidimétrica antes de la inoculación del gas;

Columna 2 - lectura turbidimétrica 22 horas después de gasificar;

Columna 3 - lectura turbidimétrica 26 horas después de gasificar;

Columna 4 - cuentas en placa antes de la inoculación del gas;

Columna 5 - cuentas en placa 22 horas después de gasificar; y

Columna 6 - cuentas en placa 26 horas después de gasificar.

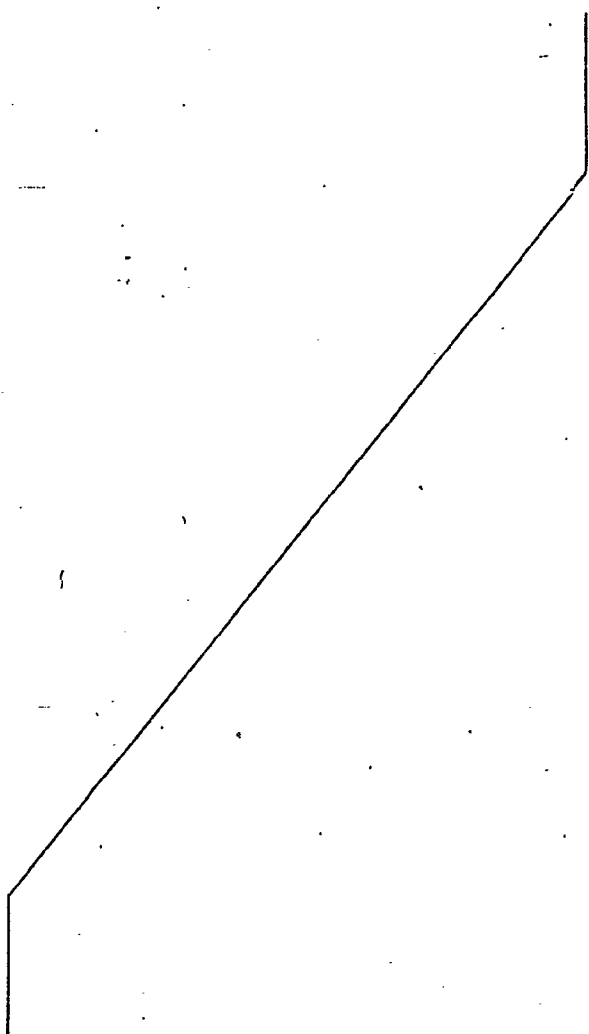
387044

387044

Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
	1	2	3	4	5	6	
A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	60	160		540	11.000.000		21.100
B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	62	166		720		12.600.000	17.500
C 0,5 ml 75 ppm NO + He	62	150		600	12.600.000		21.000
D 0,5 ml 75 ppm NO + He	65	155		540		14.800.000	27.400
E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	65	146		720	10.800.000		15.000
F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	66	153		540		19.600.000	36.250
G 0,5 ml helio solamente (control)	65	132		660	9.000.000		13.680
H 0,5 ml helio solamente (control)	67	152		720		11.400.000	15.830
I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	68	160		600		13.200.000	30.350

La Figura 21 es una representación gráfica de las turbideces relativas observadas.

La Figura 22 es un gráfico de los rendimientos calculados por las cuentas en placa.



1

5

10

15

20

25

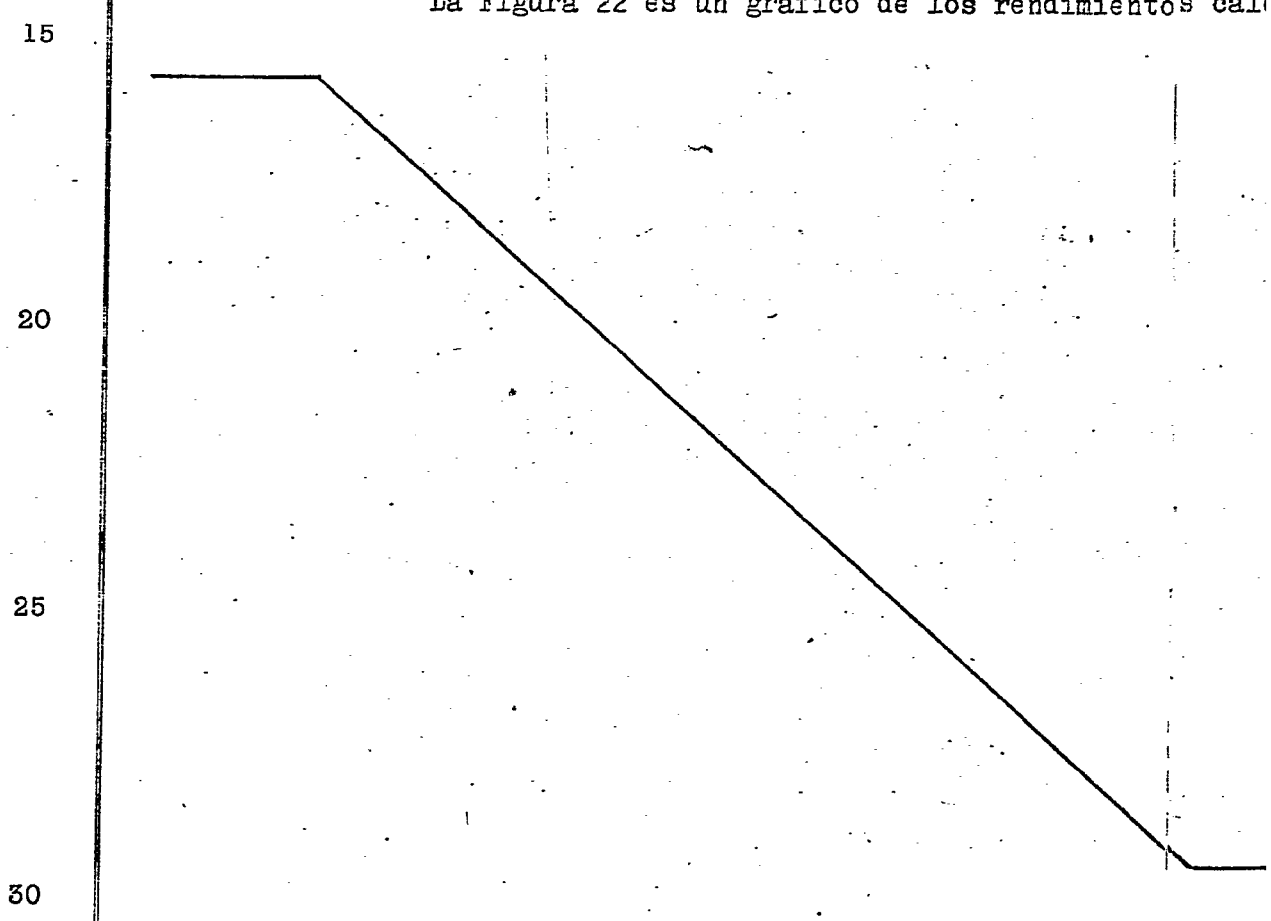
30

387044

1	Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cue	
		1	2	3		4
	A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	60	160		540	1
	B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	62		166	720	
5	C 0,5 ml 75 ppm NO + He	62	150		600	1
	D 0,5 ml 75 ppm NO + He	65		155	540	
	E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	65	146		720	1
	F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	66		153	540	
	G 0,5 ml helio solamente (control)	65	132		660	
10	H 0,5 ml helio solamente (control)	67		152	720	
	I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	68		160	600	

La Figura 21 es una representación gráfica de las

La Figura 22 es un gráfico de los rendimientos cal

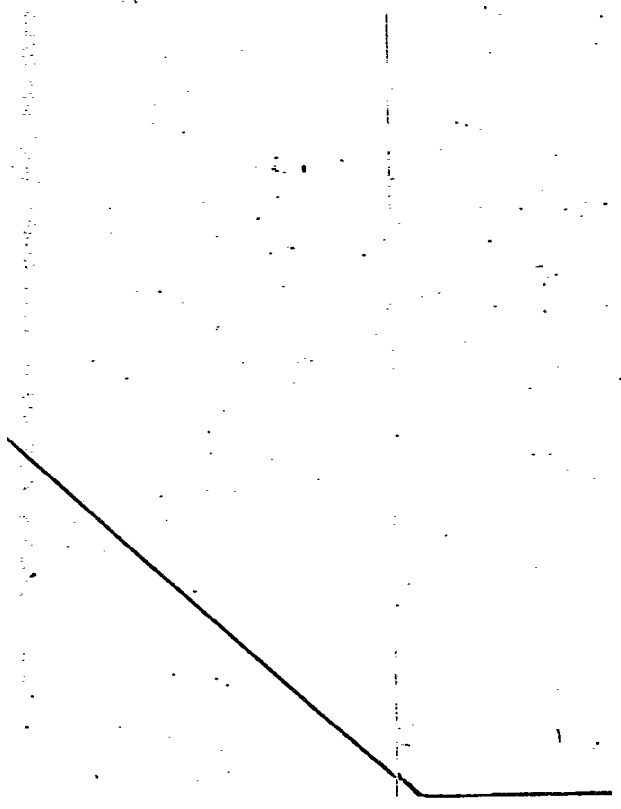


144

387044

ímetro	Cuentas en placa		Rendimiento
	4	5	
10	540	11.000.000	21.100
166	720	12.600.000	17.500
10	600	12.600.000	21.000
155	540	14.800.000	27.400
16	720	10.800.000	15.000
153	540	19.600.000	36.250
12	660	9.000.000	13.680
152	720	11.400.000	15.830
160	600	13.200.000	30.350

presentación gráfica de las turbideces relativas observadas.
fico de los rendimientos calculados por las cuentas en placa.



EJEMPLO 14

387044

1 El organismo Penicillium sp se siembra en 600 ml de un medio líquido de Sabouraud, utilizando un alambre de platino muy pequeño insertado en el medio en posición inclinada. El medio es especialmente adecuado para la detección de mohos y levaduras contaminantes de los productos farmacéuticos.

5 La observación del crecimiento de Penicillium es estorbada por la formación de grumos o colonias. Sin embargo, ha sido posible la obtención de resultados generalmente concordantes y útiles mediante la dilución liberal del cultivo durante las lecturas de las cuentas en placa por métodos por lo demás normales. Para todos los recuentos, se depositó 1 ml del medio de cultivo en un disco Petri estéril y después se vertieron sobre el medio 9 ml de agar dextrosa de Sabouraud en tubos y se mezcló. (Este medio es excelente para la propagación de mohos y levaduras). A continuación la mezcla se diluyó hasta 1:100. Todos los recuentos en placa se realizaron al azar con objeto de no estar influenciados por el gas aplicado o por el tubo utilizado.

15 Inicialmente se realizaron cinco recuentos en placa de muestras seleccionadas al azar de los 600 ml de medios sembrado. Estos recuentos de pretratamiento fueron los siguientes:

25	Recuento previo 1	Cuentas en placa 270
	Recuento previo 2	Cuentas en placa 240
	Recuento previo 3	Cuentas en placa 300
	Recuento previo 4	Cuentas en placa 270
	Recuento previo 5	Cuentas en placa 240

30 Esto da un promedio de 264/ml, que puede ser consi-

387044

1 derado el estado inicial o de partida.

5 Se sembraron asépticamente cada uno de 36 tubos de ensayo con 6 ml de los 600 ml de medio sembrado inicial. Los tubos se cerraron herméticamente con tapones de goma estériles. Cuando más adelante se indica tratamiento con aire, el tratamiento se realiza con aire previamente purificado de composición sustancialmente atmosférica.

10 Los tubos se dividen en tres series, A, B y C, y se numeran del 1 al 12. Cada uno de los tubos se trata de acuerdo con el número atribuido al mismo, en la forma siguiente:

- | | | |
|----|-------------|--|
| 1 | - 1/2 ml | 75 ppm N ₂ O bal. He |
| 2 | - 1/2 ml | 75 ppm N ₂ O bal. He |
| 3 | - 1/2 ml | 75 ppm NO bal. He |
| 4 | - 1/2 ml | 75 ppm NO bal. He |
| 15 | 5 - 1/2 ml | 65 ppm NO ₂ bal. He |
| | 6 - 1/2 ml | 65 ppm NO ₂ bal. He |
| | 7 - 1 ml | 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O bal. Aire |
| | 8 - 1 ml | 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O bal. Aire |
| 20 | 9 - 1 ml | Aire (control) |
| | 10 - 1 ml | Aire (control) |
| | 11 - 1/2 ml | He (control) |
| | 12 - 1/2 ml | He (control) |

25 Las muestras son después volteadas durante los periodos indicados a continuación. Los resultados observados son los siguientes:

30

387044

1

GRUPO A - 70 HORAS

Cuentas en placa

5

A-1	4600
A-2	4800
A-3	4800
A-4	5200
A-5	4800
A-6	4600
A-7	5600
A-8	6700
A-9	2100
A-10	2300
A-11	2100
A-12	2400

10

15

Los resultados están ilustrados gráficamente en la Figura 23.

GRUPO B - 96 HORAS

Cuentas en placa

20

B-1	5700
B-2	4300
B-3	3700
B-4	5900
B-5	5200
B-6	6100
B-7	4700
B-8	4800
B-9	2700
B-10	2600
B-11	2900
B-12	2700

25

30

387044

1 Los resultados están ilustrados gráficamente en la
Figura 24.

GRUPO C - 118 HORAS

Cuentas en placa

5	C-1	6700
	C-2	6700
	C-3	5200
	C-4	4800
	C-5	4200
10	C-6	6100
	C-7	5600
	C-8	5200
	C-9	2900
	C-10	2700
15	C-11	1900
	C-12	2200

Los resultados están ilustrados gráficamente en la
Figura 25.

EJEMPLO 15

20 El organismo F. Mucor, un moho de lento crecimiento,
se siembra en un medio líquido de Sabouraud y después se pi-
petean unas porciones de 7 ml en tubos estériles adecuados
para lecturas turbidimétricas. Se realiza un recuento antes
y después de gasificar, de acuerdo con el método de recuen-
25 to en placa normal U.S.P.H., utilizando agar dextrosa de
Sabouraud. Las lecturas se realizan a periodos de 22 y 26
horas, de la forma siguiente:

- 30 Columna 1 infra - lectura turbidimétrica antes de la ino-
culación del gas;
Columna 2 - lectura turbidimétrica 22 horas después
de gasificar;

387044

- 1 Columna 3 - lectura turbidimétrica 26 horas después de gasificar;
- Columna 4 - cuentas en placa antes de la inoculación del gas;
- Columna 5 - cuentas en placa 22 horas después de gasificar; y
- 5 Columna 6 - cuentas en placa 26 horas después de gasificar.

	Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
		1	2	3	4	5	6	
	A 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	125	135		20	1560		.78
10	B 0,5 ml 75 ppm N ₂ O + He	125		135	30		1220	40,7
	C 0,5 ml 75 ppm NO + He	125	135		20	960		48,5
	D 0,5 ml 75 ppm NO + He	124		137	40		1320	33
15	E 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	126	137		20	1200		60
	F 0,5 ml 15 ppm NO ₂ + He	(muestra contaminada)						
	G 0,5 ml helio solamente(control)	126	130		40	960		24
20	H 0,5 ml helio solamente(control)	126		132	20		800	40
	I 70,4 ppm NO ₂ + 65 ppm N ₂ O	128		140	40		2200	55

25 La Figura 26 es una representación gráfica de las turbideces relativas observadas, que indica un aumento significativo del crecimiento.

30 La Figura 27 es un gráfico de los rendimientos calculados por cuentas en placa. Se incluye este gráfico porque se disponen de los datos pertinentes, pero el organismo se reproduce tan lentamente que el rendimiento no puede ser significativo.

387044

1

EJEMPLO 16

El organismo Rhodotorula (una levadura) se siembra en un medio líquido de Sabouraud. El medio se divide en porciones de 7 ml y cada una de ellas se introduce en tubos individuales adecuados para lecturas turbidimétricas. Las lecturas se realizan durante un periodo de 30 horas, a intervalos, de la forma siguiente:

5

- Columna 1 infra - antes de la inoculación del gas;
- Columna 2 - 20 horas después de la inoculación; y
- Columna 3 - 30 horas después de la inoculación.

10

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Turbidímetro</u>		
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
A 0,5 ml 65 ppm NO ₂ bal. He	78	192	218
B 0,5 ml 22 ppm NO ₂ bal. He	78	187	216
C 0,5 ml 15 ppm NO ₂ bal. He	79	208	220
D 0,5 ml 9 ppm NO ₂ bal. He	74	218	230
E 0,5 ml 4,9 ppm NO ₂ bal. He	77	175	200
F 0,5 ml 0,9 ppm NO ₂ bal. He	78	173	200
G 0,5 ml helio solamente (control)	78	174	195

15

20

La Figura 28 es una representación gráfica de estos resultados al final del periodo de 30 horas.

EJEMPLO 17

El organismo Staphilococcus aureus (hemolítico, coagulasa positiva) se siembra en caldo de soja triptícaso diluido. El caldo diluido se utiliza para mantener en un valor bajo las cuentas originales en placa. El caldo se separa en porciones de 6 ml y cada una de ellas se introduce en 48 tubos adecuados para lecturas turbidimétricas. Al mismo tiempo se coloca 1 ml del caldo en cada uno de 48 discos Petri para el recuento en placa antes de la aplicación del

25

30

387044

1 gas.

Para los recuentos en placa se utiliza extracto de glucosa tripticasa. Se tratan 24 muestras con 15 ppm de NO₂ gaseoso y otras 24 se tratan como controles. Los controles se ponen en contacto con 0,5 ml de helio. Las muestras se ponen en contacto con el NO₂ en helio para llevar el gas aplicado a 0,5 ml.

En los datos siguientes, las muestras de control se designan por números pares. Los números impares representan las muestras tratadas con NO₂.

10

Muestra n°	Cuentas iniciales en placa	Tiempo	Cuentas finales en placa	Rendimiento
1	600	1 hora	1.080	1,64
2	660	1 hora	996	1,45
15	720	2 horas	1.220	1,68
4	600	2 horas	1.040	1,73
5	600	3 horas	13.200	21,7
6	660	3 horas	10.800	15,3
7	780	4 horas	13.200	29,3
20	720	4 horas	19.200	26,5
9	480	5 horas	21.600	45,1
10	540	5 horas	19.200	35,6
11	660	6 horas	620.000	940
12	720	6 horas	480.000	667
25	570	7 horas	540.000	945
14	540	7 horas	400.000	741
15	720	8 horas	560.000	778
16	600	8 horas	420.000	700
17	690	9 horas	540.000	784
30	720	9 horas	680.000	944

387044

	<u>Muestra nº</u>	<u>Cuentas ini- ciales en placa</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Cuentas finales en placa</u>	<u>Rendimiento</u>
1	19	480	10 horas	540.000	1.125
	20	600	10 horas	580.000	968
5	21	540	11 horas	540.000	1.000
	22	660	11 horas	620.000	938
	23	480	12 horas	980.000	2.042
	24	540	12 horas	1.020.000	1.890
	25	720	13 horas	1.220.000	1.695
10	26	780	13 horas	1.500.000	1.920
	27	660	14 horas	1.620.000	2.455
	28	840	14 horas	2.600.000	3.098
	29	660	15 horas	1.800.000	2.730
	30	780	15 horas	2.400.000	3.070
15	31	720	16 horas	24.000.000	33.300
	32	690	16 horas	18.000.000	26.020
	33	600	17 horas	18.000.000	30.000
	34	660	17 horas	21.000.000	31.750
	35	660	18 horas	126.000.000	190.800
20	36	720	18 horas	132.000.000	183.300
	37	480	19 horas	174.000.000	363.000
	38	540	19 horas	182.000.000	337.000
	39	570	20 horas	194.000.000	340.500
	40	840	20 horas	182.000.000	216.500
25	41	780	21 horas	1.860.000.000	2.382.000
	42	720	21 horas	1.620.000.000	2.250.000
	43	660	22 horas	1.980.000.000	3.000.000
	44	600	22 horas	1.820.000.000	3.035.000
	45	660	23 horas	2.340.000.000	3.550.000
	46	540	23 horas	1.980.000.000	3.670.000
30	47	600	24 horas	(demasiado elevada para ser contada, se estima en unos 5000 a 6000 millones)	
	48	720	24 horas	1.980.000.000	2.730.000

387044

1 La Figura 29 es un gráfico de este estudio de tiempos. Obsérvese que el primer aumento sustancial sobre el control se produce al cabo de unas 24 horas y el aumento es muy grande.

5 De lo que antecede resultará evidente que esta invención tiene una amplia aplicación a diversos productos y organismos y probablemente a otros óxidos gaseosos distintos de los ensayados específicamente, incluidos N_2O_3 , N_2O_4 y N_2O_5 y que las realizaciones descritas, aunque significativas por sí mismas, no deben ser consideradas como límite del alcance de la patente sino que la protección debe estar definida según la ley teniendo en cuenta las reivindicaciones del apéndice.

10

 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
15 deberá recaer sobre las siguientes:

20

25

30



387044

REIVINDICACIONES

1

1. Mejoras introducidas en un procedimiento de aceleración del crecimiento de microorganismos, que consisten en poner en contacto un medio de cultivo conteniendo dichos microorganismos con un material seleccionado entre el grupo formado por óxidos de nitrógeno gaseosos y mezclas de los mismos, en cantidad suficiente para producir un aumento significativo en el crecimiento de dichos microorganismos.

5

10

2. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

3. Mejoras según la Reivindicación 2, en las que dicho material comprende NO_2 .

4. Mejoras según la Reivindicación 2, en las que dicho material comprende N_2O .

15

5. Mejoras según la Reivindicación 2, en las que dicho material comprende NO .

6. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que dicho material comprende una mezcla de óxidos de nitrógeno.

20

7. Mejoras según la Reivindicación 6, en las que dicho material es una mezcla de NO_2 y N_2O .

8. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que dichos microorganismos son bacterias.

25

9. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

10. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dicho material comprende una mezcla de óxidos de nitrógeno.

30

11. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente

M

387044



15 NOV 1954

1 por Streptococcus.

12. Mejoras según la Reivindicación 11, en las que dicho material es NO_2 .

5 13. Mejoras según la Reivindicación 11, en las que dicho material es N_2O .

14. Mejoras según la Reivindicación 11, en las que dicho material es NO .

15. Mejoras según la Reivindicación 11, en las que dicho material es una mezcla de N_2O y NO_2 .

10 16. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Paracolon.

17. Mejoras según la Reivindicación 16, en las que dicho material es NO_2 .

15 18. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Staphilococcus aureus (hemolítico).

19. Mejoras según la Reivindicación 18, en las que dicho material es NO_2 .

20 20. Mejoras según la Reivindicación 18, en las que dicho material es N_2O .

21. Mejoras según la Reivindicación 18, en las que dicho material es NO .

25 22. Mejoras según la Reivindicación 18, en las que dicho material es una mezcla de N_2O y NO_2 .

23. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Micrococcus albus.

30 24. Mejoras según la Reivindicación 23, en las que dicho material es N_2O .

[Handwritten mark]

387044



1

25. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Escherichia coli.

5

26. Mejoras según la Reivindicación 25, en las que dicho material es NO_2 .

27. Mejoras según la Reivindicación 25, en las que dicho material es N_2O .

28. Mejoras según la Reivindicación 25, en las que dicho material es NO .

10

29. Mejoras según la Reivindicación 25, en las que dicho material es una mezcla de N_2O y NO_2 .

30. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Neisseria.

15

31. Mejoras según la Reivindicación 30, en las que dicho material es NO_2 .

32. Mejoras según la Reivindicación 30, en las que dicho material es N_2O .

20

33. Mejoras según la Reivindicación 30, en las que dicho material es NO .

34. Mejoras según la Reivindicación 30, en las que dicho material es una mezcla de N_2O y NO_2 .

25

35. Mejoras según la Reivindicación 8, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Listeria.

30

36. Mejoras según la Reivindicación 35, en las que dicho material es NO_2 .

37. Mejoras según la Reivindicación 35, en las que dicho material es N_2O .

38. Mejoras según la Reivindicación 35, en las

387044



1 que dicho material es NO.

39. Mejoras según la Reivindicación 35, en las que dicho material es una mezcla de N_2O y NO_2 .

5 40. Mejoras según la Reivindicación 1, en las que dichos microorganismos son mohos.

41. Mejoras según la Reivindicación 40, en las que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

10 42. Mejoras según la Reivindicación 40, en las que dicho material comprende una mezcla de óxidos de nitrógeno.

43. Mejoras según la Reivindicación 40, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Penicillium.

15 44. Mejoras según la Reivindicación 43, en las que dicho material es NO_2 .

45. Mejoras según la Reivindicación 43, en las que dicho material es N_2O .

46. Mejoras según la Reivindicación 43, en las que dicho material es NO.

20 47. Mejoras según la Reivindicación 43, en las que dicho material es una mezcla de NO_2 y N_2O .

48. Mejoras según la Reivindicación 40, en las que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por F. Mucor.

25 49. Mejoras según la Reivindicación 48, en las que dicho material es NO_2 .

50. Mejoras según la Reivindicación 48, en las que dicho material es N_2O .

30 51. Mejoras según la Reivindicación 48, en las que dicho material es NO.

M

387044



1 52. Mejoras según la Reivindicación 48, en las
que dicho material es una mezcla de N_2O y NO_2 .

 53. Mejoras según la Reivindicación 1, en las
que dichos microorganismos son levaduras.

5 54. Mejoras según la Reivindicación 53, en las
que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

 55. Mejoras según la Reivindicación 53, en las
que dichos microorganismos están constituidos esencialmente
por Rhodotorula.

10 56. Mejoras según la Reivindicación 55, en las
que dicho material es NO_2 .

 57. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE ACELERACION DEL
15 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de cuarenta páginas
mecanografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 5 de Enero de 1.971

BERNARDO UNGRIA

p.p.

20

25

30

FIG. 1

Vertical line with three dots

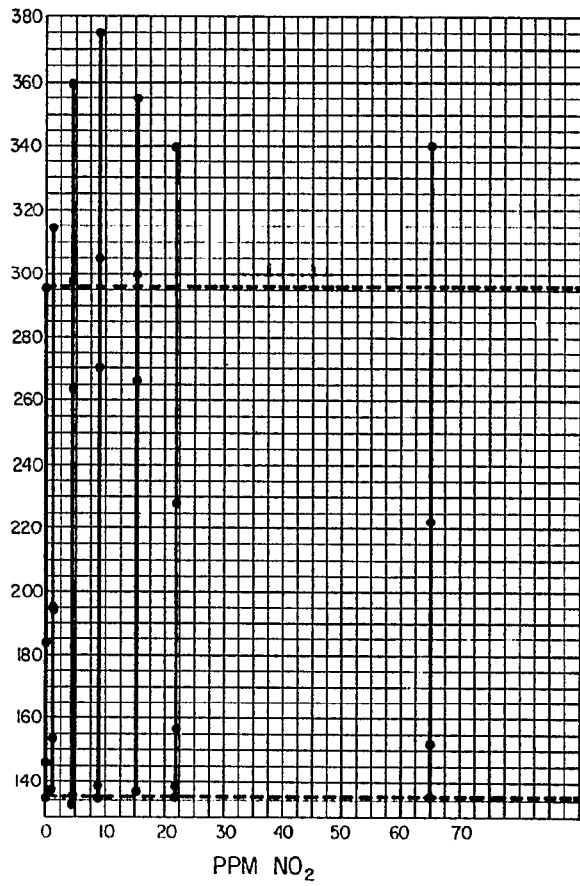
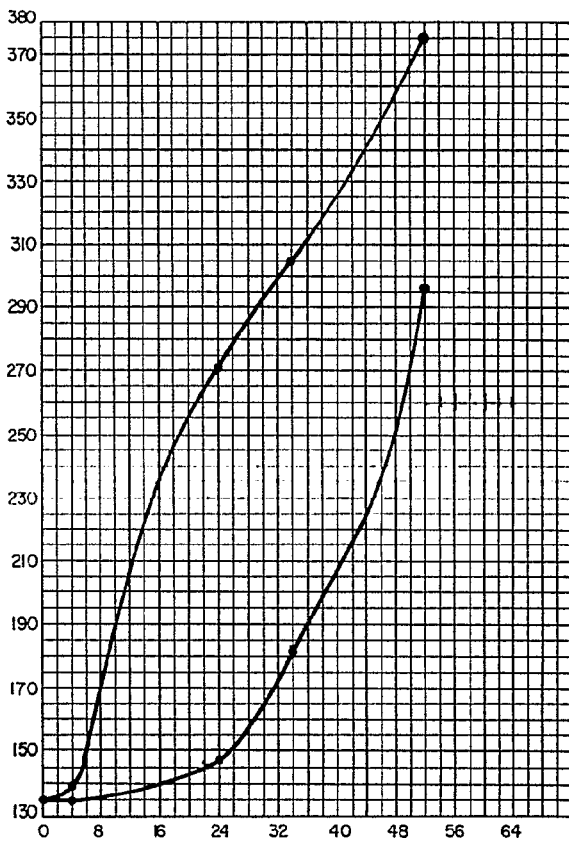
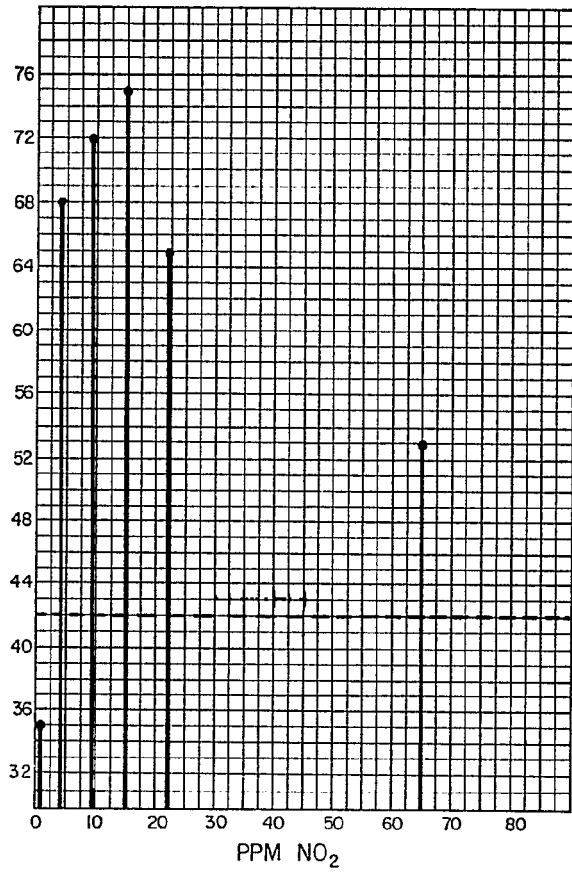


FIG. 2



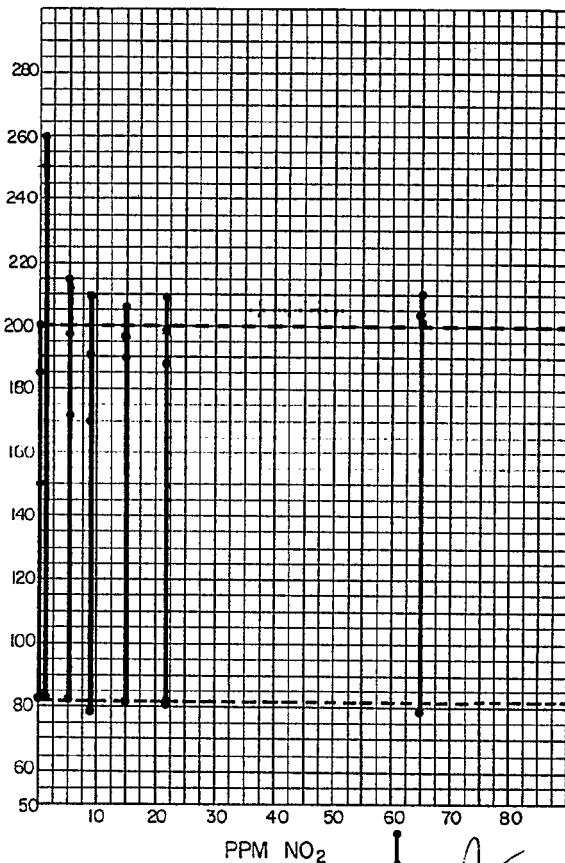
ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE ~~Sept~~ ~~1970~~ DE 19 71
BERNARDO UNGRÍA
P. C.

FIG. 3



1971

FIG 4



ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE Mayo DE 1971
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

387044

FIG. 5

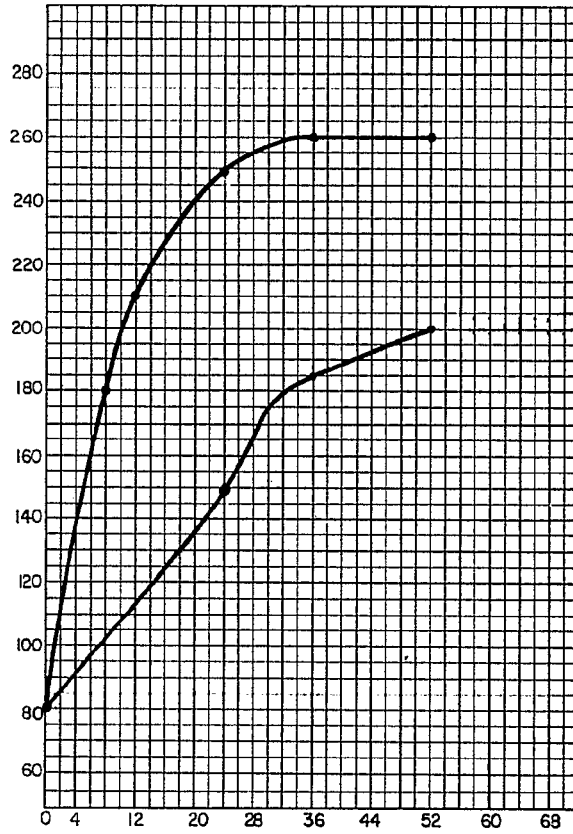
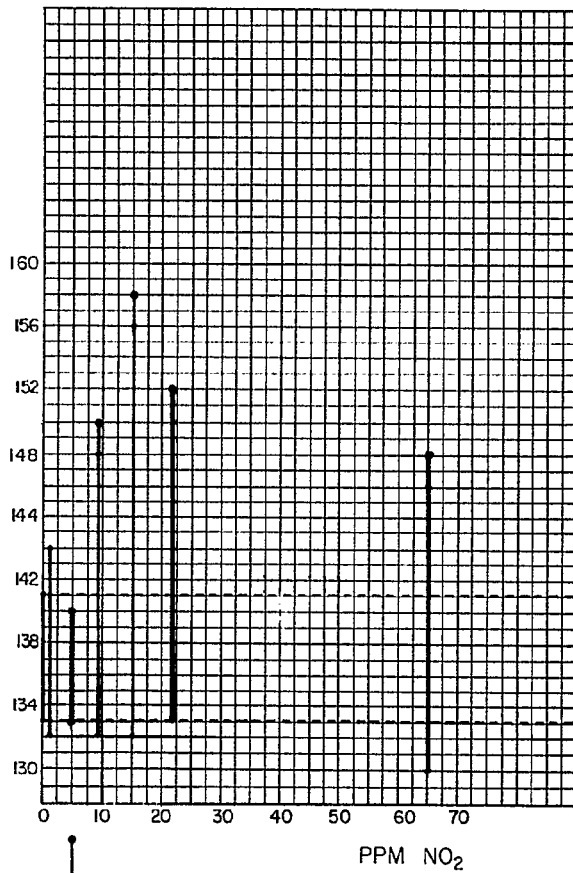


FIG. 7



ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE Enero DE 1971
BERNARDO JUNGRA
P. P.

FIG. 6

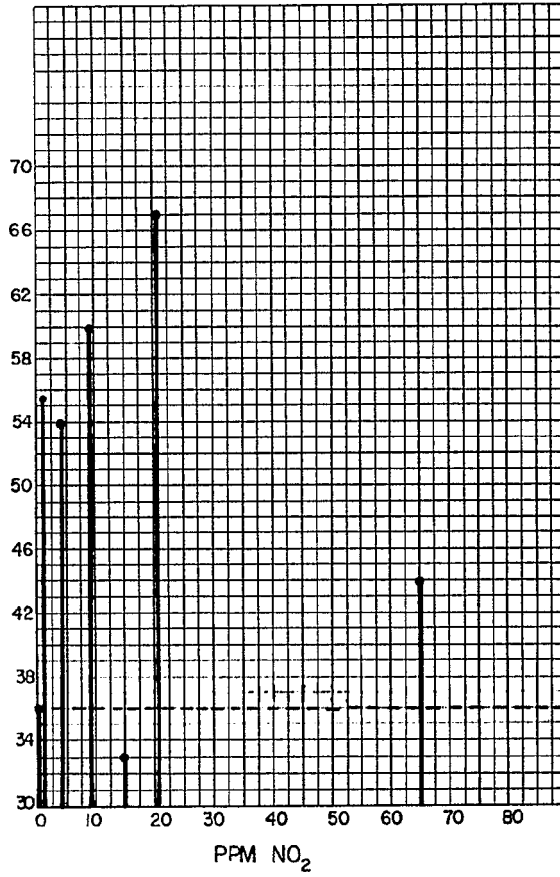
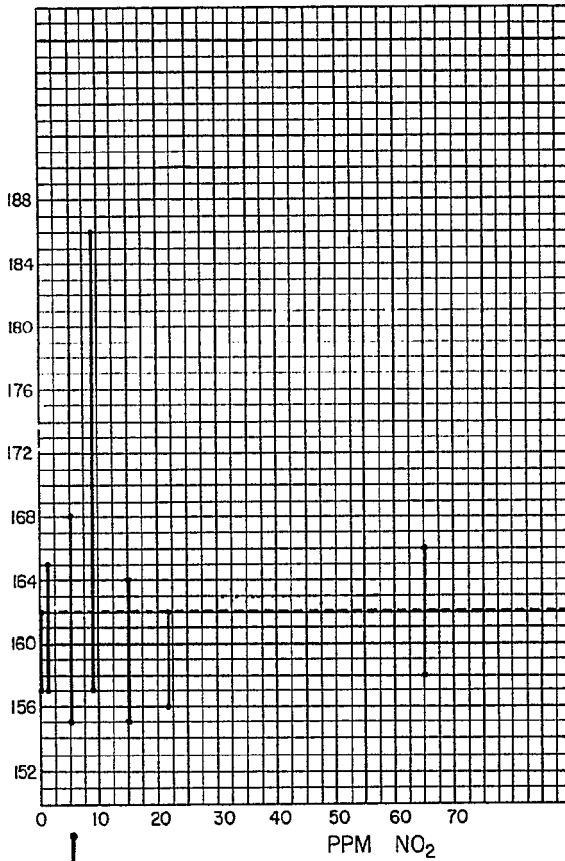
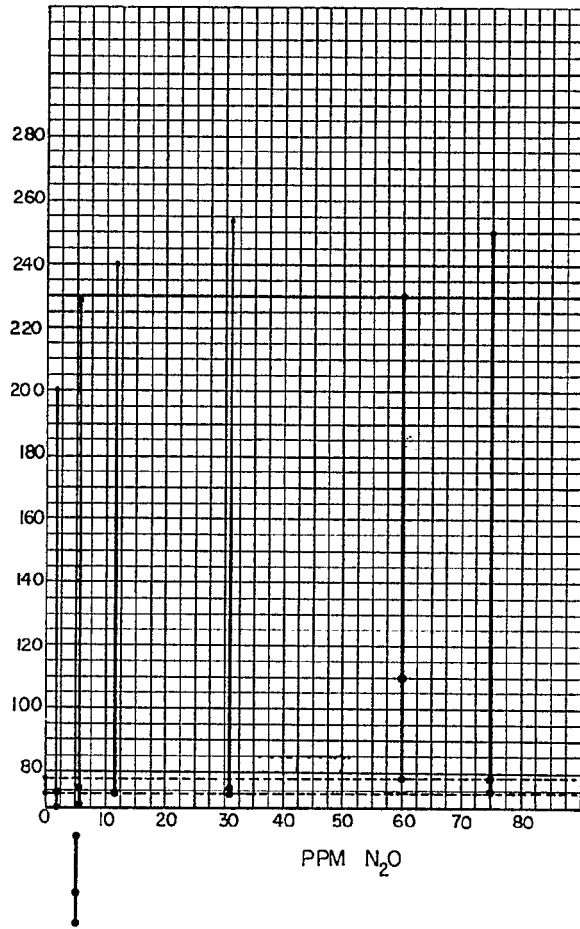


FIG. 8



ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE Enero DE 1971
BERNARDI UNGRÍA
P.P.

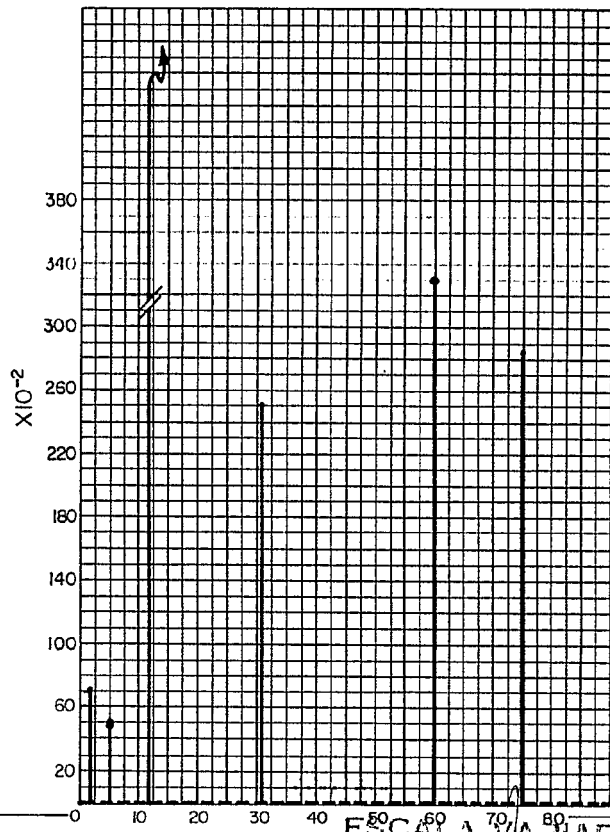
FIG. 9



1971

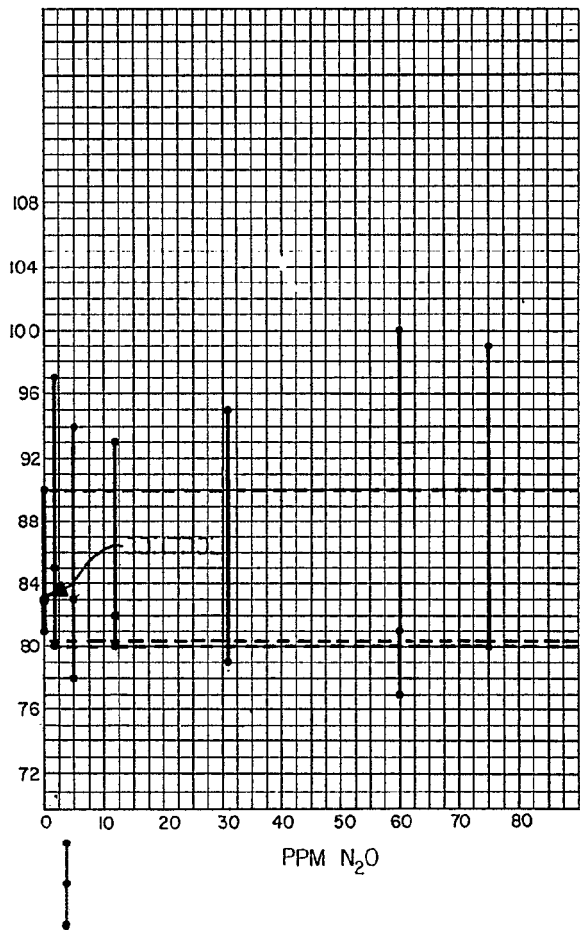
387044

FIG. 10



ESCALA VARIABLE
RPM Nº 5 DE Mayo DE 19 71
BERNARD UNGRÍA
P. P.

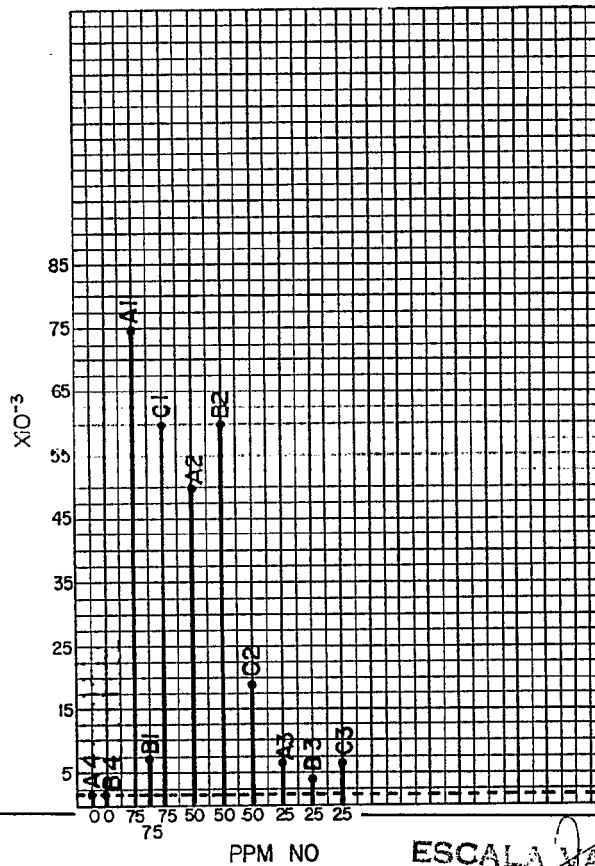
FIG. II



1971

387044

FIG. 13



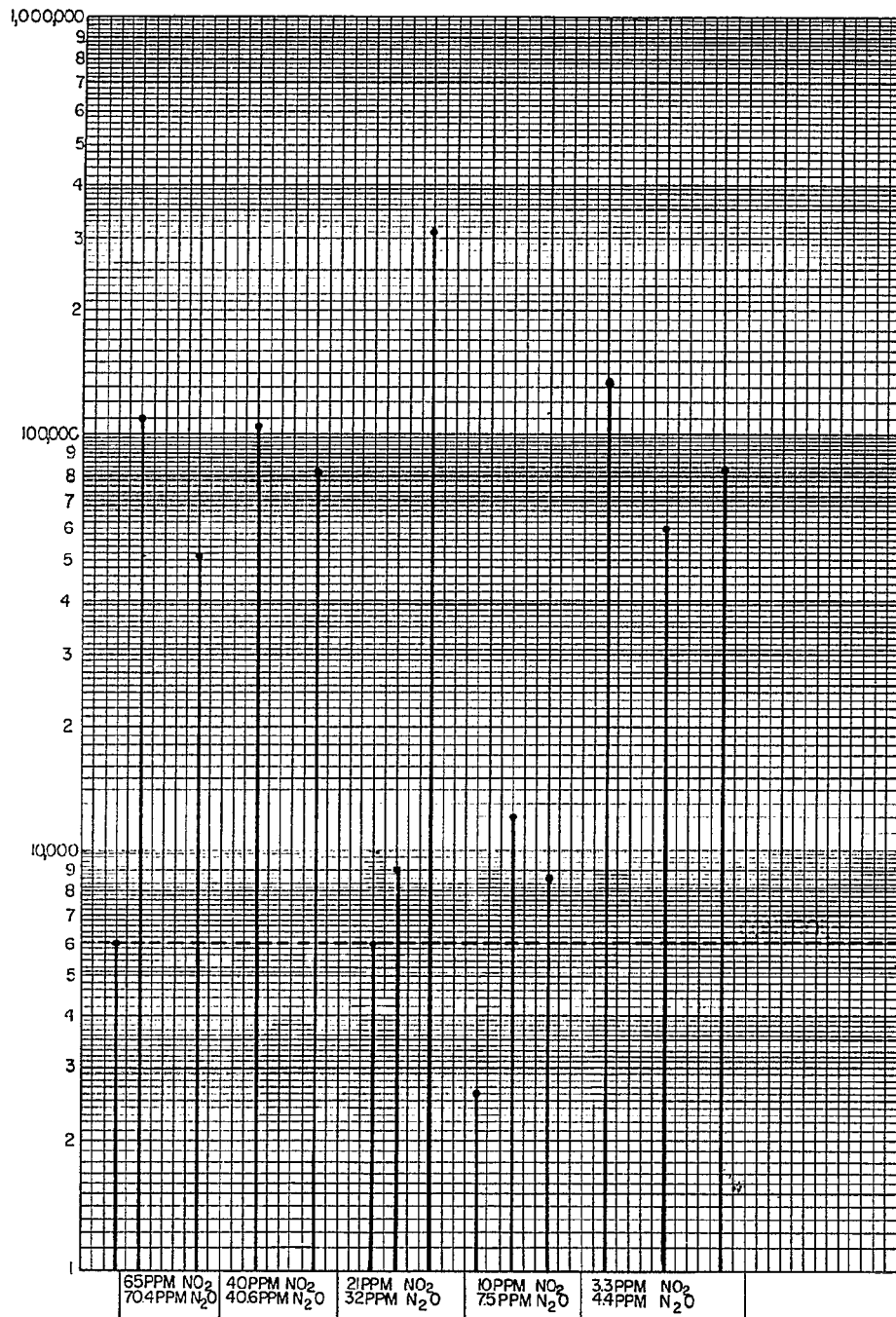
ESCALA VARIABLE
 MADRID, 5 DE Mayo DE 19 71
 BERNARDO UNGRIA

387044



1971

FIG. 12



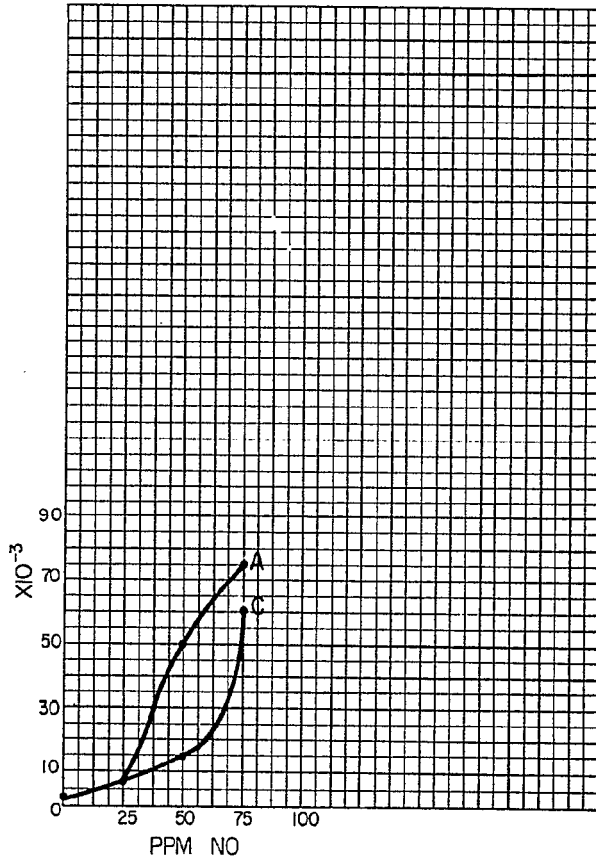
ESCALA VARIABLE

MADRID, 5 DE Enero DE 1971

BERNARDO URRUTIA
P. P.

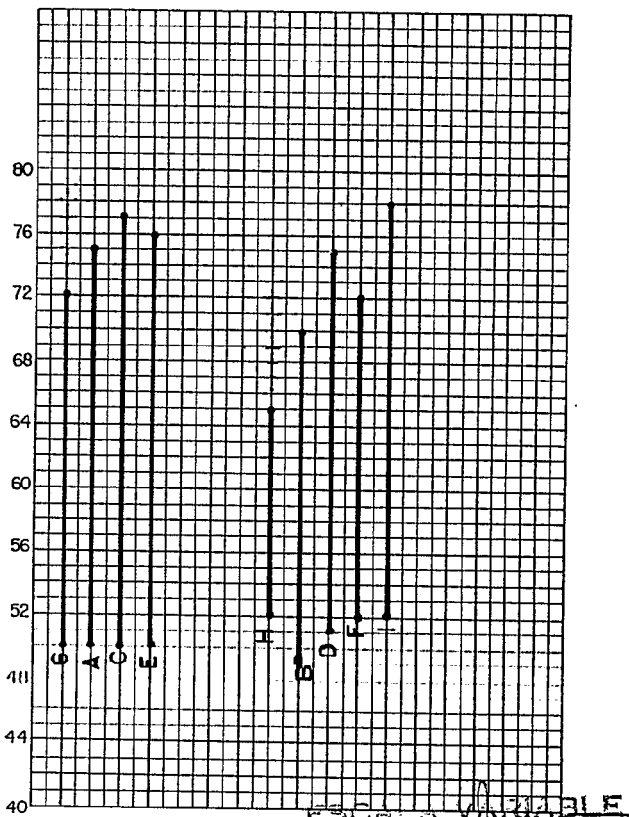
387044

FIG. 14



1071

FIG. 15



MADRID, 5 DE Enero DE 1971
BERNARDO UNGRÍA
P. P.



FIG. 16

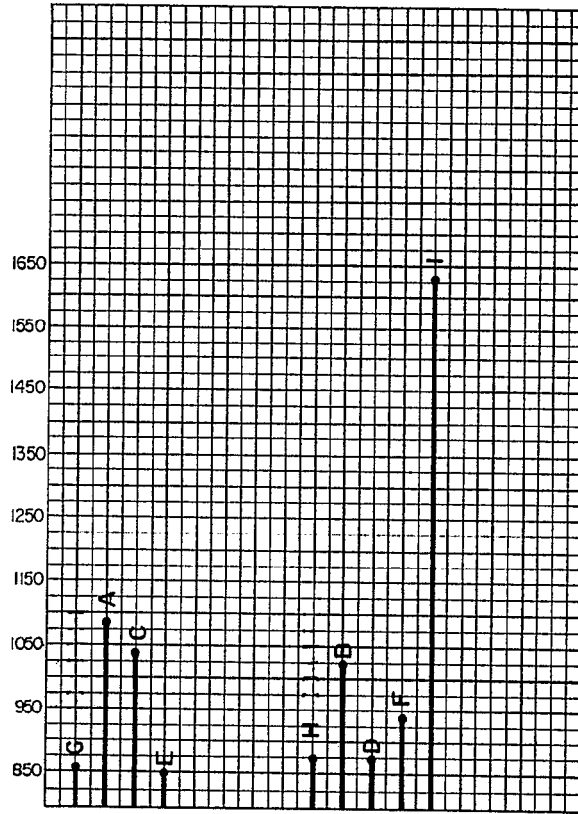
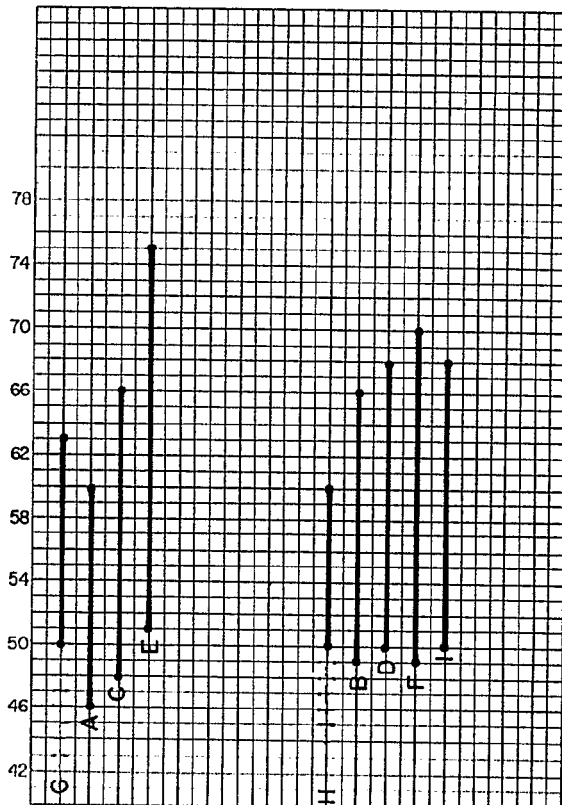
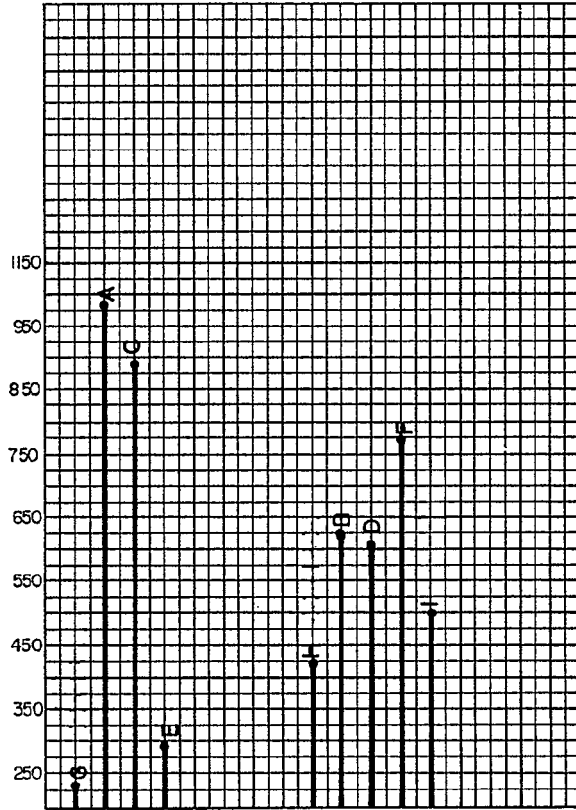


FIG. 17



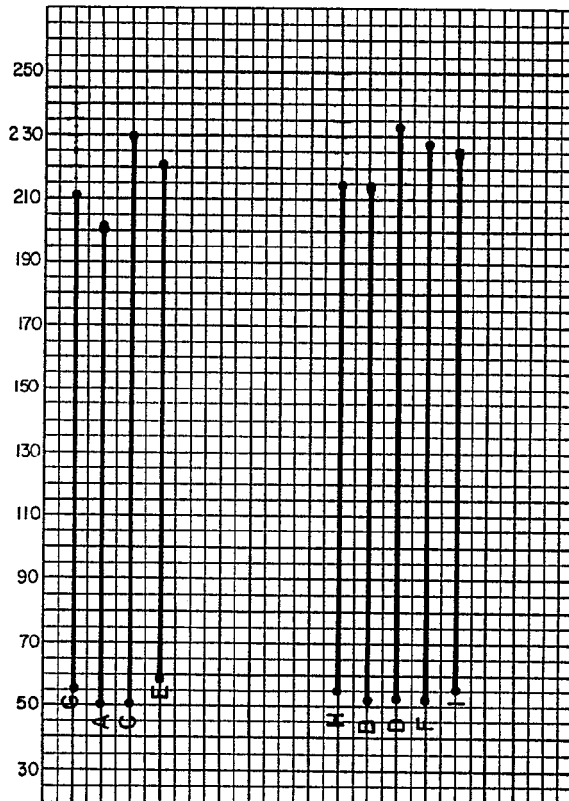
ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE Enero DE 1971
BERNARDO MARRÍA
P. P.

FIG. 18



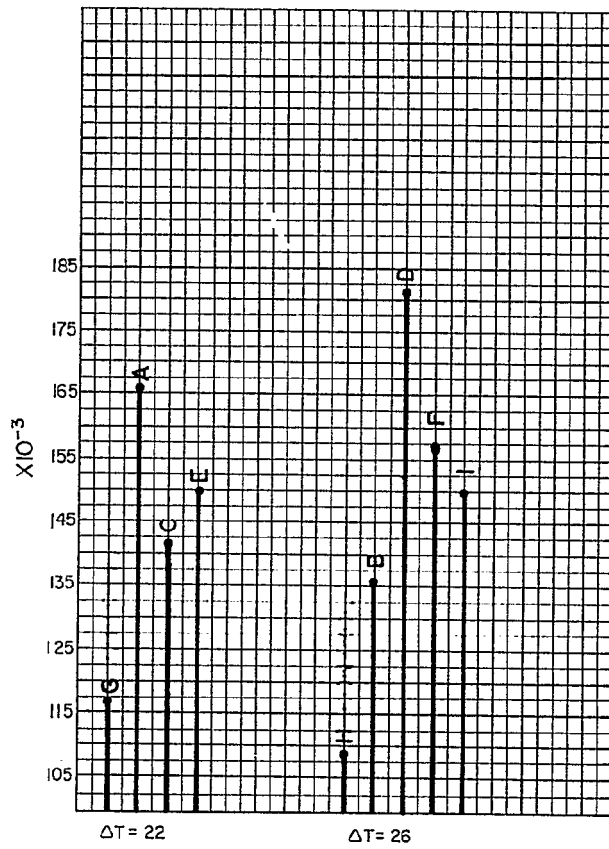
1971

FIG. 19



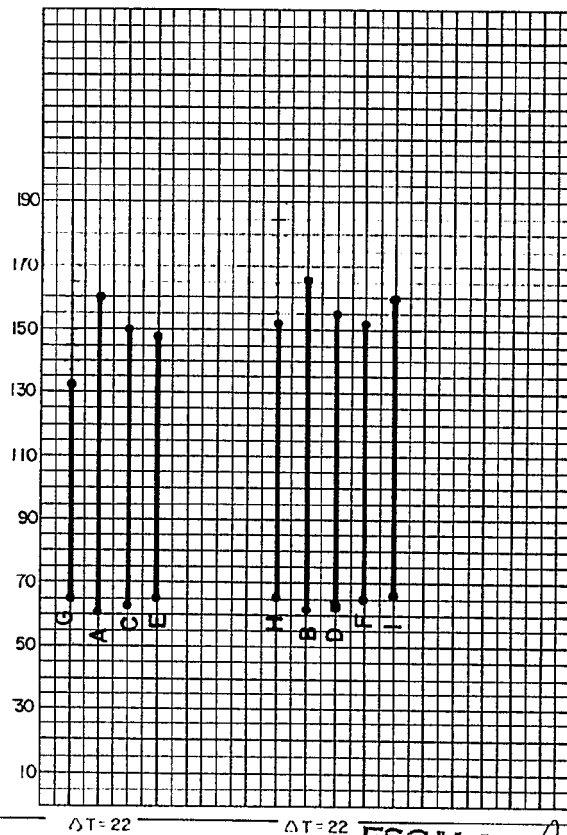
ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE Enero DE 1971
BERNARDO MEXGRÍA
P. P.

FIG. 20



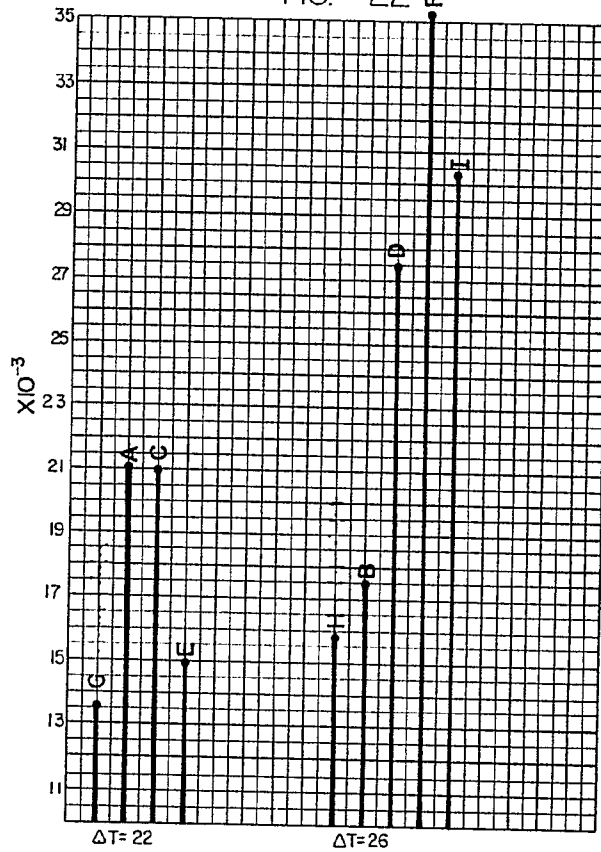
1971

FIG. 21



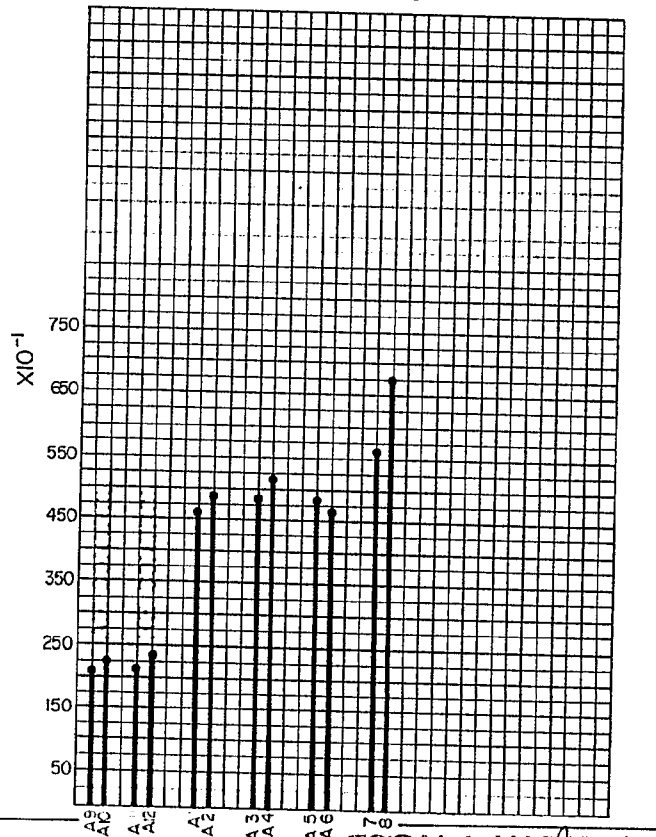
ESCALA VARIABLE
 MADRID, 5 DE Enero DE 1971
 BERNARDO MARIÁ
 P. P.

FIG. 22



1971

FIG. 23

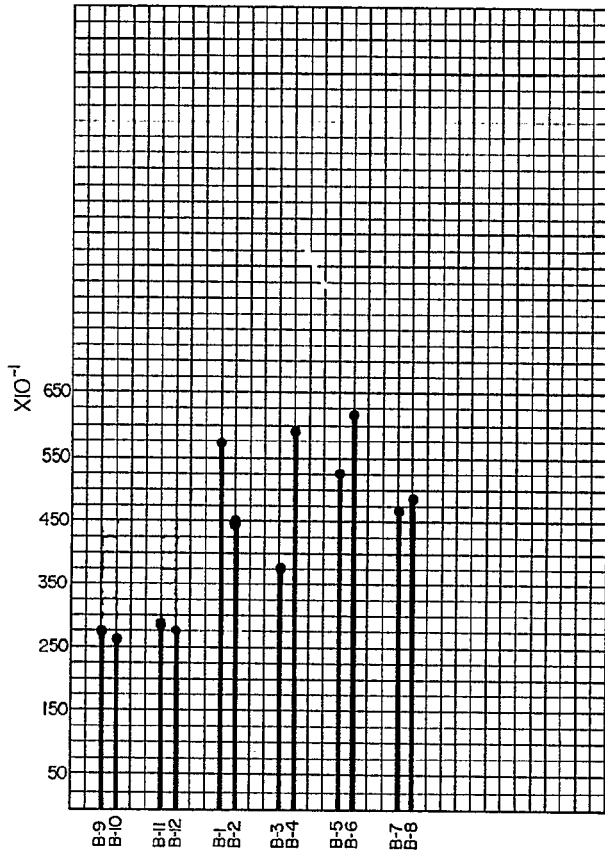


ESCALA VARIABLE

MADRID, 5, DE Enero DE 1971

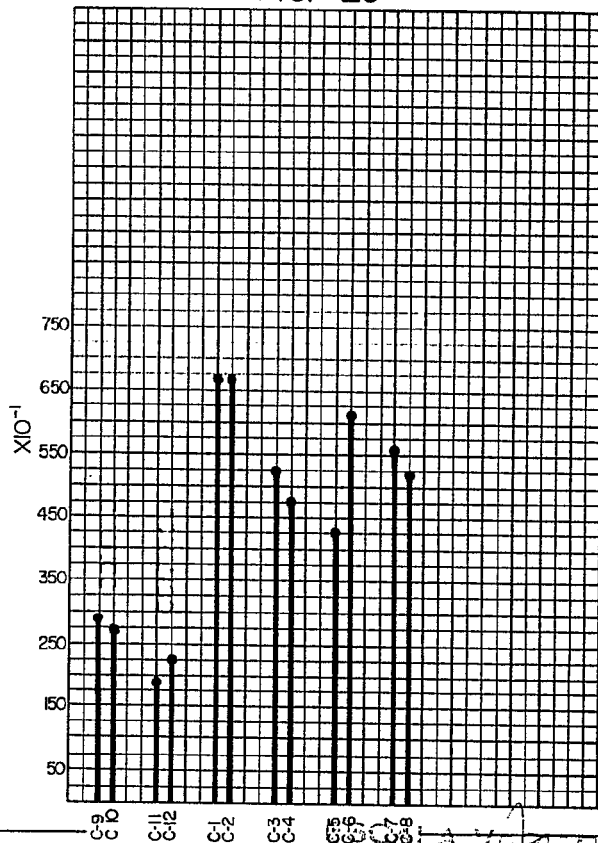
BERNARDO UYUJIA
P. P.

FIG. 24

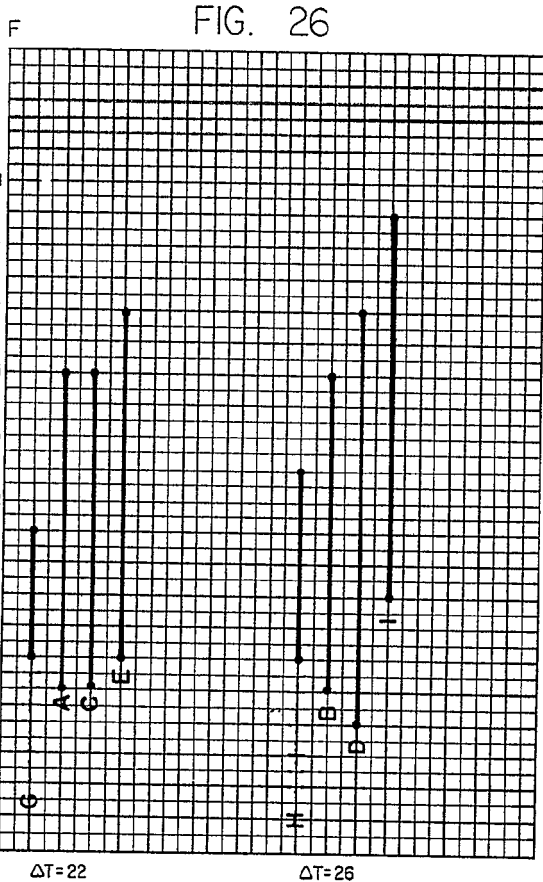


1971

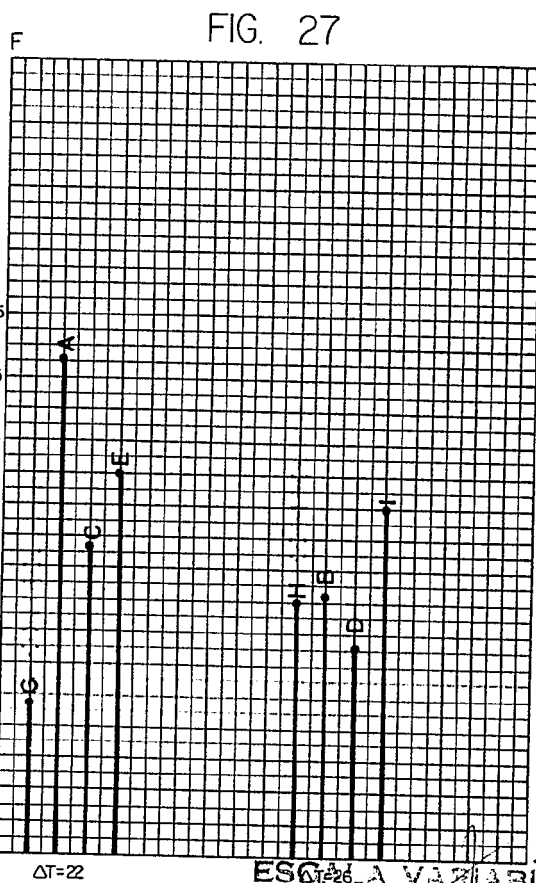
FIG. 25



MADRID, 5 DE Enero DE 1971
BERNARDO *[Signature]*
P. P.

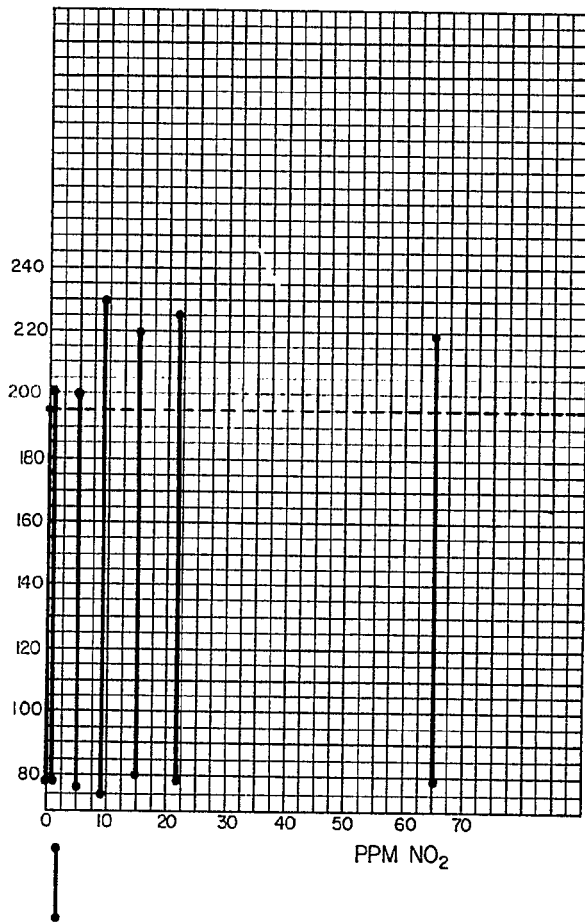


1971



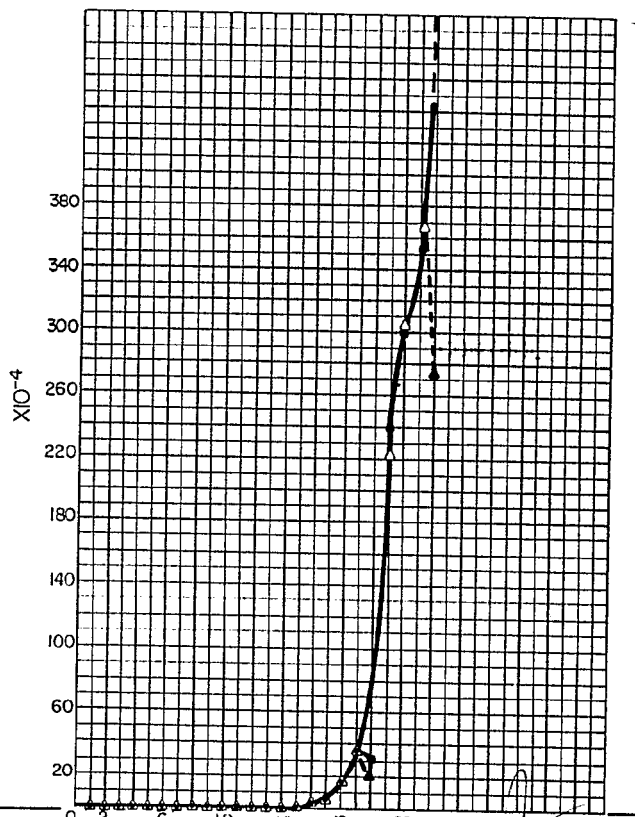
ESCALA VARIABLE
 MADRID, 5 DE Enero DE 19 71
 BERNABO Utrera
 P. P.

FIG. 28



1971

FIG. 29



ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE Enero DE 19 71
BERNARDO UNGRIA
P. P.