

F.C. 26 - I - 76



C12 K

10409

Como divisional de la solicitud de patente n.º. 387.045 del 5 de enero de 1971.

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: "UN PROCEDIMIENTO DE ACELERACION DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CONFINADOS EN CONDICIONES ESTERILES EN UN MEDIO DE CULTIVO".

Prioridad: Patente estadounidense n.º 4818 del 22-1-70.

es



415409

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 controlados, adecuados para dar altas
5 velocidades de crecimiento.

 El cultivo de microorganismos se realiza actualmente
en muchas formas comerciales y para varios fines y produc-
tos de gran importancia. El resultado deseado puede ser un
aumento rápido o grande en el número de organismos, como es
10 el caso frecuente cuando los organismos de las enfermedades
son desarrollados como cultivos en un laboratorio médico.
Las mayores cantidades producidas son utilizadas con frecuen-
cia para diagnosis o para realizar otros estudios relativos
a la enfermedad.

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 produc-
20 ción de enzimas, que son excretados en grandes cantidades
por ciertos microorganismos; la producción de ácido láctico
a partir del suero y la producción de alcohol etílico a par-
tir de hidratos de carbono.

 En el caso de muchas de estas actividades de produc-
25 ción, más que la compensación económica, ha sido el conoci-
miento el factor limitativo en cuanto a la realización de
adiciones a los medios de cultivo de agentes nutritivos, fer-
tilizantes u otras sustancias promotoras del crecimiento y
en cuanto a la suplementación del proceso con otras etapas
30 con objeto de aumentar la producción. Las razones económicas



415409

1 no limitarían estas adiciones y suplementos en 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 producto. En cier-
5 tas aplicaciones médicas, por ejemplo diagnóstico, el coste
no debe considerarse una limitación básica. En otras apli-
caciones, como la elaboración de cerveza, el coste del mate-
rial añadido de la nueva etapa del proceso adicional puede
ser con más frecuencia un factor limitativo, pero en circuns-
10 tancias en que se aumentara suficientemente la producción
mediante una mejora dada, esta adición tendría el correspon-
diente valor para el proceso.

Los microorganismos son cultivados actualmente en
medios estériles, muy controlados, que contienen cantidades
15 mínimas de impurezas y que habitualmente contienen cantida-
des totalmente suficientes de agentes nutritivos y fertili-
zantes deseables conocidos, que pueden comprender, por ejem-
plo, licor de infusión de maíz, azúcar y otras sustancias
en formas asequibles para los organismos. También es corrien-
20 te airear bien muchas de estas mezclas con gases conteniendo
oxígeno.

Un objeto general de esta invención es proporcionar
medios para mejorar el proceso de crecimiento de los micro-
organismos.

25 Otro objeto de esta invención es proporcionar medios
para aumentar el crecimiento y la productividad de los cul-
tivos de microorganismos.

Un objeto más específico de esta invención es pro-
porcionar un aditivo para dichos cultivos para conseguir
30 una economía global mayor.

415409

- 4 -



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

5 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 aire de composición sustancialmente igual a la atmosférica, después de que el aire ha sido sometido a una descarga
10 eléctrica y llevado después a un estado sustancialmente exento de ozono. Los procesos metabólicos son significativamente incrementados. Finalmente, los productos deseados resultantes del cultivo de los microorganismos son separados del medio. En sus aspectos más específicos, esta invención
15 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 adelante.
25 Puede decirse con certeza que las mejoras de acuerdo con esta invención son aplicables a las bacterias, hongos y otros microorganismos en general.

30 En la patente estadounidense nº 3.344.061, relativa

415409

- 5 -

30



1 a la invención de uno de los inventores del objeto de esta
solicitud, se describe el aparato utilizado de acuerdo con
la realización preferida de esta invención y también se
describe la puesta en práctica de un sistema para el trata-
5 miento de aguas residuales convencionales. Estas aguas re-
siduales, naturalmente, son una mezcla incontrolada que
contiene cantidades relativamente importantes de nitrógeno
biológicamente utilizable, pero generalmente no en un sis-
tema que contenga nutrientes en cantidades bien equilibra-
das y suficientes.

10 Parece probable que el aire activado contiene canti-
dades significativas de óxidos de nitrógeno gaseosos. Se
cree que probablemente es de cierta significación que el
aire activado contenga los óxidos superiores de nitrógeno
15 incluidos N_2O_3 , N_2O_4 , NO_3 , N_2O_6 y N_2O_5 , además de los óxi-
dos de nitrógeno gaseosos como NO , NO_2 y N_2O .

20 Sin embargo, los resultados conseguidos no indican
claramente que el nitrógeno añadido actúe como un alimento
ordinario. No ha podido encontrarse nada que relacione di-
rectamente las cantidades de nitrógeno metabolizado con las
cantidades aplicadas en forma gaseosa de acuerdo con esta
invención. Los medios de cultivo utilizados con cada orga-
nismo específicamente ensayado fueron obtenidos de fuen-
tes comerciales y recomendados por estas fuentes como ade-
25 cuados para conseguir un nivel de crecimiento por lo menos
tan alto como el normalmente conseguible. Estos medios con-
tienen nitrógeno totalmente adecuado en una forma asequi-
ble para el organismo y también contienen todos los nutrien-
tes necesarios para un buen crecimiento en cantidades y pro-
30 porciones apropiadas. Pero aún el tratamiento de estos me-

415409 - 6 -



1 dios durante el cultivo con el aire activado produce unos resultados significativamente mejorados.

5 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 ensayos) 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 con las sales de nitrógeno no se producía ninguna potenciación o activación correspondiente a la observada con los gases.

15 Otros objetos, características y ventajas de esta invención se pondrán en evidencia en la siguiente descripción de los ejemplos de la invención.

20 Las Figuras 1-6 son representaciones gráficas de los resultados conseguidos de acuerdo con los siguientes ejemplos.

La Figura 1 se refiere al Ejemplo 1.

Las Figuras 2 y 3 se refieren al Ejemplo 30.

Las Figuras 4 y 5 se refieren al Ejemplo 31.

25 La Figura 6 se refiere al Ejemplo 32.

En cada uno de los siguientes ejemplos, fue seleccionado específicamente un medio de cultivo individual conocido por producir un buen crecimiento del microorganismo individual que estaba siendo cultivado. Todos los medios de cultivo se obtuvieron comprándolos normalmente en fuentes

30

415409⁷



1 comerciales y estaban recomendados por dichas fuentes como
adecuados para conseguir un nivel de crecimiento por lo me-
nos tan elevado como el normalmente conseguible. Se cum-
plieron estrictamente las instrucciones de uso de los me-
5 dios suministradas. Todos los organismos utilizados en los
siguientes ejemplos fueron confirmados por una agencia es-
tatal calificada.

Unos tubos de ensayo de 15 ml y adecuados para uso
en un turbidímetro fueron esterilizados en autoclave a
10 118-121°C. Los medios fueron sembrados o inoculados con los
cultivos mediante técnicas normales.

El aire activado fue generado con el aparato descri-
to en la patente estadounidense nº 3.344.061 antes mencio-
nada. El aparato suministra 500 pies³ por minuto (14,1 m³)
15 de aire activado, pero, naturalmente, gran parte del mismo
es desviado y perdido cuando se trabaja con los pequeños
medios de cultivo. El aire se admite en el dispositivo y
se somete en una cámara a una descarga eléctrica de 15.000
voltios entre electrodos de aluminio en forma de relleno
20 de rejilla groseramente tejida o expandida. El aire trata-
do es pasado a otra cámara donde, sin nueva intervención,
el contenido de ozono desciende prácticamente a cero. El
aire es utilizado después inmediatamente en los medios de
cultivo.

25 La mayor turbidez que aparece en los ejemplos está
estrechamente relacionada con el mayor tamaño y también
está influenciada por la cantidad de reproducción de los
organismos individuales. El turbidímetro funciona midiendo
la luz transmitida a través de los tubos de ensayo. Las me-
30 didas se realizaron con un aparato convencional comercial.



415409

1 El aumento de las cuentas en la placa está directa-
mente relacionado con el mayor número de organismos produ-
cidos por reproducción. Para realizar el recuento en las
5 placas, salvo indicación en contrario, se introduce 1 ml
del medio en agar dextrosa de Sabouraud, en el caso de los
mohos y hongos y en un agar extracto de glucosa trip-
ticasa en los restantes casos. Todos los recuentos de la
placa se realizaron de acuerdo con procedimientos aproba-
dos por el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos.

10 EJEMPLOS 1-29

En los ensayos descritos en los Ejemplos 1 a 29,
se utilizan dos probetas graduadas de 1000 ml: una para el
aire activado de acuerdo con esta invención y otra para el
mismo aire no tratado. El exceso de aire activado generado
15 de acuerdo con esta invención por el aparato utilizado se
pierde al exterior.

En los ensayos, las dos probetas graduadas se in-
troducen en compartimientos aislados de una gradilla para
evitar la contaminación mútua de los gases aplicados. La
20 zona de ensayo se mantiene a una temperatura muy uniforme
de 80°F (26,7°C), siendo la variación inferior a $\pm 2^\circ\text{F}$
(-16,6°C y -18,9°C). En la zona de ensayo el aire está totalmente
acondicionado y la humedad se mantiene bastante constante,
no variando más del 10 % en cualquier momento y afectando
25 por igual a los tres compartimientos.

Todos los gases desprendidos en los ensayos son
conducidos a través de tubos de plástico inerte (habitual-
mente Tygon). En ambos tipos de aplicaciones se utilizó
aire embotellado previamente purificado, el aire "respira-
30 ble" convencionalmente vendido, que es una mezcla de gases



1 prácticamente igual a la del aire atmosférico. El aire em-
botellado previamente purificado se pasa también a través
de un filtro constituido por un trozo de 8 pulgadas (20,3
cm) de longitud de algodón estéril. Después de este filtro
5 se encuentra una caja de 12 pulgadas (30,5 cm) de altura
por 12 pulgadas (30,5 cm) de anchura y 8 pies (244 cm) de
longitud, provista de tabiques para mezclar el aire y en
la que también se emplean 2 lámparas esterilizantes de ul-
travioleta de 30 wattios, colocadas a lo largo de la caja.
10 En el extremo de descarga de la caja, un trozo de 12 pul-
gadas (30,5 cm) de longitud de algodón estéril absorbente
filtra también los posibles contaminantes.

El aire que ha de ser aplicado sin tratamiento y el
aire que ha de ser aplicado después de su activación de
15 acuerdo con esta invención, se dirigen desde la caja a un
compresor, que está desmultiplicado para reducir el aumen-
to de temperatura. A la salida del compresor se encuentra
un ventilador de jaula de ardilla que dirige el aire a un
tubo de plástico de 100 pies (30,5 m) que permite mantener
20 la temperatura constante mediante las condiciones ambien-
tales.

El aire que ha de ser activado es tratado con el
aparato de descarga eléctrica. Los gases son aplicados a
los medios de cultivo líquidos en las probetas graduadas
de 1000ml a través de un tubo de vidrio que se prolonga
dentro de las probetas. Cada tubo de vidrio está provisto
de una aguja hipodérmica de acero inoxidable próxima al
fondo de las probetas. Las agujas son las nº 14825 del ca-
tálogo de Fisher, de 2 pulgadas (50,8 mm) de longitud y
30 con una punta de calibre 20. El caudal de gas para todos



1 los ensayos es de 0,15 litros por-minuto. (Este caudal re-
lativamente alto es para facilitar las medidas y las com-
paraciones y no es necesariamente el preferido en las ope-
raciones comerciales de acuerdo con esta invención). Se to-
5 man muestras después de cada periodo de ensayo y se prepa-
ran placas con el medio para el recuento. Se incuban las
placas y se realiza el recuento.

Los tubos aplicadores de vidrio, los espaciadores
utilizados para sujetar los tubos en el centro de las pro-
10 betas y las agujas son tratados en autoclave a una presión
de 20 libras (1,4 kg/cm²). Todo el trabajo se realiza en
condiciones estériles. Las muestras se toman con pipetas
estériles que después se tiran.

EJEMPLO 1 - PENICILLIUM SP

15 Un cultivo conocido de Penicillium
sp. se siembra en 3 litros de medio líquido de Sabouraud
y se divide en lotes diluïdos iguales para su exposición
al aire activado de acuerdo con esta invención y al aire
no tratado.

20 Cada probeta se trata individualmente con aire o
aire activado. Inicialmente, los tubos son iguales en to-
dos sus aspectos significativos. Los gases son burbujeados
en el interior de los tubos desde el fondo.

25 Transcurridas algunas horas, el fondo de las pro-
betas tratadas con el aire activado desarrolla un material
visible algodonoso. Se produce un desarrollo similar en la
probeta tratada con aire sin activar pero transcurre a una
velocidad sustancialmente menor.

30 Todos los recuentos de placa en este ejemplo son
tomados utilizando agar maltosa de Sabouraud. Las pruebas



1 se realizan cada hora y se registran las cuentas. Los resultados de las 15 primeras horas son los siguientes:

<u>PENICILLIUM SP.</u>			
	<u>Aire normal</u> (Cuentas en placa)	<u>Aire activado</u> (Cuentas en placa)	
5	1 hora	980	1140
	2 horas	1040	1260
	3 horas	1160	1400
	4 horas	1280	1680
10	5 horas	1400	1800
	6 horas	1680	2400
	7 horas	1800	2860
	8 horas	1960	3000
	9 horas	2400	3600
15	10 horas	2680	4200
	11 horas	2800	4800
	12 horas	3000	5100
	13 horas	3280	5280
	14 horas	2800	5400
20	15 horas	2600	5460

La Figura 1 es una ilustración gráfica de estos resultados.

25 Transcurridas 15 horas, ambos cultivos tratados con aire presentan un descenso del recuento. Parece que los nutrientes de ambos cultivos han sido consumidos. También parece que el aire activado, además de excitar la actividad de los organismos en crecimiento, proporciona también parte del nutriente utilizado.

30 En otro ensayo comparativo, similar al anterior, el nutriente parece ser demasiado bajo para mantener el creci-

415409

-12-



1 miento después de 4 días. En ese ensayo, un control que no
había sido sometido a ningún tratamiento con gas, contenía
menos de 10 ml de moho, mientras que otros cultivos por lo
demás sustancialmente idénticos, uno tratado en la forma
5 antes discutida con aire normal, y uno tratado en la forma
descrita con aire activado, contenían 120 ml de moho y
260 ml de moho respectivamente.

En un ensayo utilizando tubos de ensayo normales,
dos tubos, conteniendo cada uno de ellos cultivos de Penici-
10 llium sp en la forma antes descrita, son expuestos a cada
uno de los dos tratamientos con gases, sustancialmente en
la forma descrita. Cada tubo contenía 10 ml de medio, que
había sido sembrado con un cultivo conocido de Penicillium
sp de cuentas conocidas. Después de 2 minutos de exposi-
15 ción, se tapan los tubos y después se cuentan las placas,
obteniéndose los siguientes resultados: aire normal - 265
cuentas/ml y aire activado - 345 cuentas/ml. Un ensayo si-
milar con una exposición de 3 minutos da los siguientes re-
sultados: aire normal - 150 cuentas/ml y aire activado -
20 250 cuentas/ml.

Naturalmente, de acuerdo con esta invención el creci-
miento de la especie Penicillium sp se realiza en un cul-
tivo que contiene nutrientes suficientes en equilibrio ade-
cuado para proporcionar un rendimiento sustancial del pro-
ducto deseado, la penicilina, que es un subproducto del me-
25 tabolismo del microorganismo de la especie Penicillium sp.
Este subproducto es aislado después en condiciones sustan-
cialmente incontaminadas para uso como antibiótico.

30

415409



EJEMPLOS 2-29

Varios organismos diferentes

Dieciseis cultivos diferentes, mostrados en la lista siguiente, algunos patógenos y algunos no patógenos, son sembrados en medios específicos para su cultivo adecuado. Los cultivos se encuentran en tubos de ensayo, siendo las cuentas en placa originales en todos los casos inferiores a 500/ml. El tratamiento se realiza burbujeando desde el fondo del tubo durante 5 minutos. El recuento en placa normal se realiza al cabo de 3 horas, encontrándose los resultados en la Tabla inmediatamente siguiente. Debido a la naturaleza peligrosa de algunos de los cultivos, el trabajo sobre los mismos estuvo confinado totalmente en tubos de ensayo tapados. En todos los demás aspectos, los ensayos se realizaron prácticamente en la forma antes descrita.

RESULTADOS

Ej.		Aire normal (Cuentas en placa)	Aire activado (Cuentas en placa)
2	<u>Micrococcus albus</u> (hemolítico, coagulasa negativa)	540/ml	1560/ml
3	<u>Achromobacter</u>	1860	3720
4	<u>Lactobacillus</u> sp	7200	19200
5	<u>Proteus</u> sp	12600	24600
6	<u>Staphilococcus aureus</u> (hemolítico, coagulasa positiva)	10800	27600
7	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	12600	22200
8	<u>Streptococcus</u> sp (gamma, no hemolítico)	13200	21600
9	<u>Listeria monocytogenes</u> (facultativamente anaerobio)	420	2520

415409



RESULTADOS (continuación)

<u>Ej.</u>	<u>Aire normal (Cuentas en placa)</u>	<u>Aire activado (Cuentas en placa)</u>	
10	<u>Diplococcus pneumoniae</u> y <u>Hemophilus</u> sp	1860	2520
11	<u>Micrococcus citreus</u>	960	1440
12	<u>Escherichia coli</u>	2220	2820
13	<u>Paracolon bacillus</u>	1860	3180
14	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	9000	10800
15	<u>Streptococcus</u> sp (alfa-hemolítico) en este caso anaerobio	500	900
16	<u>Diphtheroids</u>	1800	2280
17	<u>Diplococcus</u> y levadura	2820	3060

NOTA: Listeria fue el mejor bajo el aire activado y es facultativamente anaerobio. El medio específico utilizado para cultivar los bacilos gram-negativos fue peptona coloide; para los cocos gram-positivos como Staphilococcus, caldo de soja tripticasa; para anaerobios y estreptococos, el medio utilizado fue medio de tioglicolato.

En otro ensayo, se sembraron 12 bacterias diferentes en medios específicos muy adecuados para provocar su crecimiento y después se midieron cantidades iguales en tubos de ensayos estériles, utilizando pipetas estériles para cada una de ellas. Se destinaron dos tubos de cada una de las bacterias para aire normal y para aire activado. Los gases se dejaron pasar por cada tubo durante tiempos iguales de 2 minutos. Después se llevaron al laboratorio y se realizó el recuento normal en placa en cada uno de ellos. En cada



1 placa se utilizó 1 ml de bacterias en suspensión junto con
20 ml de agar extracto de glucosa tripticasa, agar nutritivo normal APHA para recuento.

5 Los recuentos con aire normal y aire activado se realizaron en diluciones de 1:100, 1:1000 y en algunos casos 1:10.000. Todas las placas fueron incubadas durante 24 horas y contadas. De nuevo los resultados establecen que el aire activado estimula el crecimiento de las bacterias sobre el aire normal, como se indica a continuación.

10

RESULTADOS

<u>Ej.</u>	<u>Aire normal (Cuentas en placa)</u>	<u>Aire activado (Cuentas en placa)</u>
18 <u>Micrococcus albus</u> (hemolítico, coagulasa negativa)	3000	4200
15 19 <u>Staphilococcus aureus</u> (hemolítico, coagulasa positiva)	7200	15600
20 <u>Streptococcus</u> sp (gamma, no hemolítico)	22200	25200
21 <u>Diplococcus pneumoniae</u> y <u>Hemophilus</u> sp	10800	17400
22 <u>Micrococcus citreus</u>	4200	7800
20 23 <u>Escherichia coli</u>	1800	3600
24 <u>Flavobacterium</u>	1200	1800
25 25 <u>Listeria monocytogenes</u> (facultativamente anaerobio)	25800	38400
26 <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	6000	8100
27 <u>Paracolon bacillus</u>	10200	19200
28 <u>Streptococcus</u> sp (alfa-hemolítico) en este caso anaerobio	5800	13200
29 <u>Lactobacillus</u> sp	7800	20500

30

Naturalmente, de acuerdo con esta invención, el crecimiento de los diversos microorganismos se realiza en un

415409



1 cultivo que contiene suficientes nutrientes en equilibrio
adecuado para proporcionar un rendimiento sustancial del
producto deseado, que en algunos casos es el propio micro-
5 organismo. Este producto es aislado después en condiciones
sustancialmente incontaminadas para su uso o estudio poste-
riores.

EJEMPLOS 30-33

10 En los Ejemplos 30 a 33, unas porciones de 7 ml del
medio conteniendo el microorganismo se introducen en tubos
de ensayo de 15 ml, adecuados para uso en un turbidímetro.
Los tubos son esterilizados a 118-121°C en un autoclave.
Los medios se siembran o inoculan con los cultivos por téc-
nicas normales. Cuando se realiza un recuento en placa ini-
15 cial, normalmente se hace en este momento. Los tubos se
cierran herméticamente con tapones de goma para suero. Em-
pleando una jeringa hermética a los gases, a través del ta-
pón de goma se introducen 0,5 ml de los gases activados.
Para cada gas de ensayo se utiliza una nueva aguja estéril.
Los tubos de control son sometidos a una aplicación de gas
20 esencialmente idéntica, a excepción de que el aire utilizado
no está activado. En el control, se insertan 0,5 ml de gas
inerte (helio) en lugar de 0,5 ml de gases activados, de-
jando en el tubo una atmósfera que fundamentalmente es aire
normal. A las muestras con aire activado se agrega la misma
25 cantidad de gas inerte (0,5 ml de helio) de forma que la
cantidad de aire en la atmósfera de las muestras y de los
controles es la misma.

30 Todos los tubos se colocan en un aparato mecánico
que los voltea continuamente durante todo el periodo perti-



1 nente de cultivo. La turbidez, las cuentas en placa o am-
 5 bos valores, según el ensayo, se registran a intervalos
 seleccionados antes y después de la dosificación para ob-
 10 servar el efecto de los gases sobre el crecimiento. El cre-
 cimiento de los microorganismos se produce en forma de ma-
 15 yor tamaño de los organismos individuales o en forma de
 reproducción de los organismos o como ambos efectos.

EJEMPLO 30

10 El organismo de la especie Streptococcus (alfa-hemo-
 lítico) se siembra en un medio de tioglicolato específico
 para Streptococcus. El medio se divide en porciones de
 7 ml y cada porción se deposita en tubos de ensayo indivi-
 duales. Se realizan lecturas turbidimétricas a intervalos,
 de la siguiente forma:

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

20 TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
0,5 ml de aire tratado	130	130	160	242	325
Control con aire normal	136	136	146	183	296

25 La Figura 2 es una representación gráfica de estos
 resultados, representándose la turbidez en función del tiem-
 po.



1973

1

CUENTAS EN PLACA

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas iniciales en placa</u>	<u>Cuentas en placa después de 24 horas</u>	<u>Rendimiento</u>
0,5 ml de aire tratado	190.000	10.200.000	53
Control con aire normal	130.000	5.400.000	42

5

Las diversas muestras son sustancialmente idénticas a las empleadas para observar la turbidez.

La Figura 3 es una representación gráfica de estos resultados.

10

EJEMPLO 31

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 forma siguiente:

15

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

20

TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
0,5 ml de aire tratado	80	226	226	240
Control con aire normal	82	150	185	200

25

La Figura 4 es una representación gráfica de estos resultados, representando la turbidez en función del tiempo.

30



1

CUENTAS EN PLACA

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas iniciales en placa</u>	<u>Cuentas en placa después de 24 horas</u>	<u>Rendimiento</u>
0,5 ml de aire tratado	180.000	9.600.000	53
Control con aire normal	150.000	5.400.000	36

5

Las diversas muestras son sustancialmente idénticas a las empleadas para observar la turbidez.

La Figura 5 es una representación gráfica de estos resultados.

10

EJEMPLO 32

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 lectura turbidimétrica. Las lecturas se realizan durante un periodo de 30 horas, a intervalos, de la forma siguiente:

15

- 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.

20

TURBIDIMETRO

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
0,5 ml de aire tratado	79	180	210
Control de aire normal	78	174	195

25

La Figura 6 es una representación gráfica de estos resultados, representando la turbidez en función del tiempo.

30

De toda lo que precede resultará evidente que esta invención tiene amplia aplicación a diversos productos y organismos y que las realizaciones descritas, aunque significativas por sí mismas, no deben ser consideradas como

415409

- 20 -



1 limitativas del alcance de la patente sino que la protec-
ción debe ser la definida por la ley en relación con las
reivindicaciones del apéndice.

5 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento de aceleración del crecimien-
to de microorganismos confinados en condiciones estériles
en un medio de cultivo que como mínimo tiene un contenido
en nutrientes adecuado y otros factores de crecimiento,
cuyo procedimiento comprende las etapas de hacer pasar aire
de una composición sustancialmente igual a la del aire
atmosférico a través de un elemento de descarga eléctrica
que forma gases activados en dicho aire, permitir después
15 que sustancialmente todo el ozono contenido en el aire sea
destruido y a continuación poner en contacto el aire así
tratado con dicho medio de cultivo.

20 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
en el que dicho aire tratado se pone en contacto haciéndolo
burbujear en dichos medios de cultivo, sustancialmente
por debajo de la superficie de dichos medios de cultivo.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
en el que dichos microorganismos son bacterias.

25 4. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Micrococcus albus (hemolítico, coagulasa
negativa).

30 5. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Achromobacter.

Handwritten signature in dark ink, consisting of stylized, overlapping letters.

30

715409

- 21 -

80



1 6. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Lactobacillus.

5 7. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Proteus.

10 8. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Staphilococcus aureus. (hemolítico, coagulasa
positiva).

 9. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Pseudomonas aeruginosa.

15 10. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Streptococcus (gamma, no hemolítico).

20 11. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Listeria monocytogenes, (facultativamente
anaerobio).

 12. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Diplococcus pneumoniae y Hemophilus.

25 13. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Micrococcus citreus.

 14. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Paracolon.

 15. Un procedimiento según la Reivindicación 3,


30

415409

- 22 -



1 en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Klebsiella pneumoniae.

5 16. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Streptococcus (alfa-hemolítico, anaerobio).

17. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Diphtheroids.

10 18. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Flavobacterium.

15 19. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
en el que dicho aire tratado se pone en contacto haciéndolo
burbujear por dichos medios de cultivo, sustancialmente
debajo de la superficie de los citados medios de cultivo.

20 20. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Micrococcus albus (hemolítico, coagulasa ne-
gativa).

21. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Achromobacter.

25 22. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Lactobacillus.

23. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Proteus.

30 24. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-

MS



1 cialmente por Staphilococcus aureus, (hemolítico, coagula-
sa positiva).

5 25. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Pseudomonas aeruginosa.

26. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Streptococcus (gamma, no hemolítico)

10 27. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Listeria monocytogenes (facultativamente
anaerobio).

15 28. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Diplococcus pneumoniae y Hemophilus.


29. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Micrococcus citreus.

20 30. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Paracolon.

31. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Klebsiella pneumoniae.

25 32. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Streptococcus (alfa-hemolítico, anaerobio).

33. Un procedimiento según la Reivindicación 19,
en el que dichos microorganismos están constituidos esen-
cialmente por Diphtheroids.


30

415409

- 24 -



1

34. Un procedimiento según la Reivindicación 19, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Flavobacterium.

5

35. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dichos microorganismos son mohos.

36. Un procedimiento según la Reivindicación 35, en el que dicho aire tratado se pone en contacto haciéndolo burbujear en dichos medios de cultivo, sustancialmente por debajo de la superficie de dichos medios de cultivo.

10

37. Un procedimiento según la Reivindicación 35, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Penicillium.

15

38. Un procedimiento según la Reivindicación 37, en el que dicho aire tratado se pone en contacto haciéndolo burbujear por dichos medios de cultivo, sustancialmente por

39. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dichos microorganismos son levaduras.

20

40. Un procedimiento según la Reivindicación 39, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Rhodotorula.

25

41. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
"UN PROCEDIMIENTO DE ACELERACION DEL CRECIMIENTO DE MICRO-ORGANISMOS CONFINADOS EN CONDICIONES ESTERILES EN UN MEDIO DE CULTIVO".

30

A handwritten signature in dark ink, consisting of several stylized, overlapping loops and lines.

415 409⁻²⁵⁻



1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de veinticinco páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

5

Madrid, 30 de mayo de 1973.

BERNARDO UNGRIA

P.P.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "M" or similar, written over the "P.P." text.

10

15

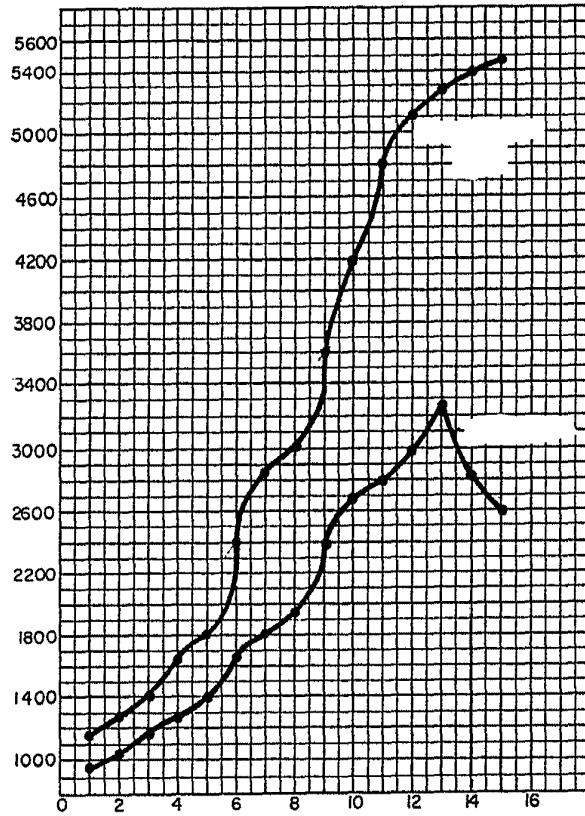
20

25

A large, stylized handwritten signature in dark ink, possibly "SLS", written over the number 30.

30

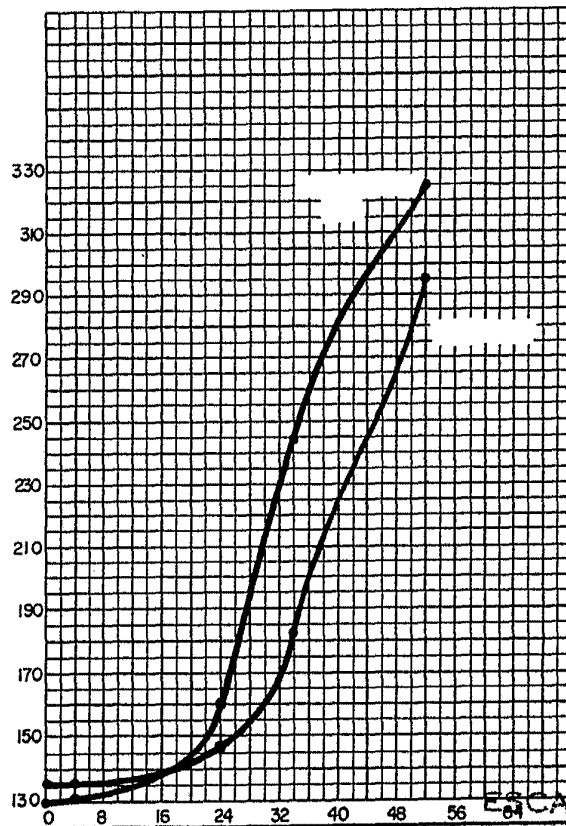
FIG. 1



23



FIG. 2



ESCALA VARIABLE

MADRID, 30 DE Mayo DE 1873

BERNABE ANGRIA

[Handwritten signature]

FIG. 3

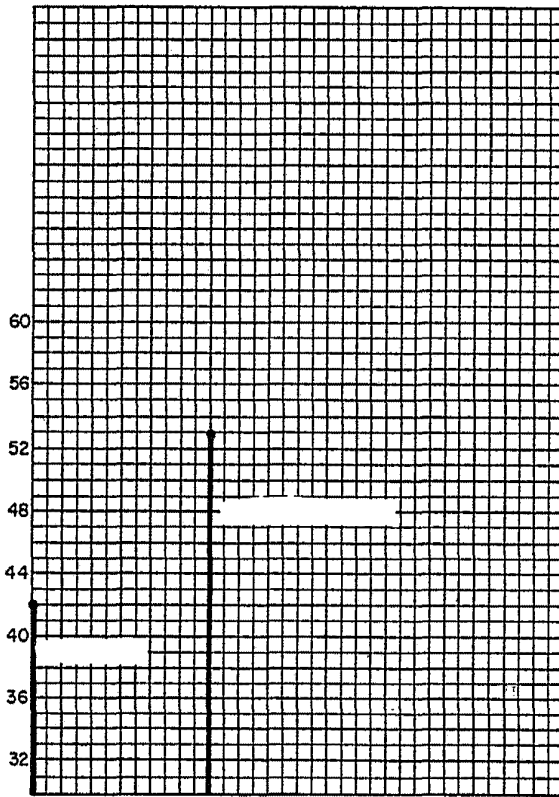
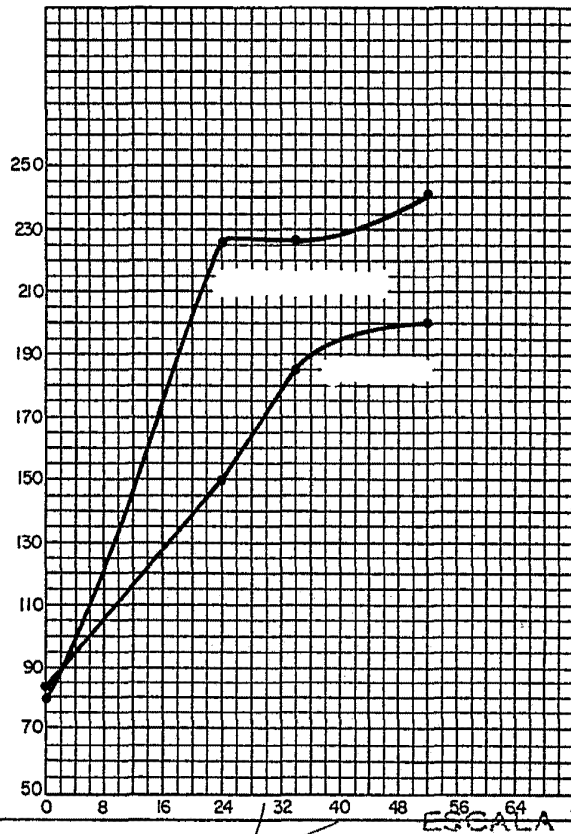


FIG 4



ESCALA VARIABLE

MADRID, 30 DE mayo DE 1973
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

415409

FIG. 5

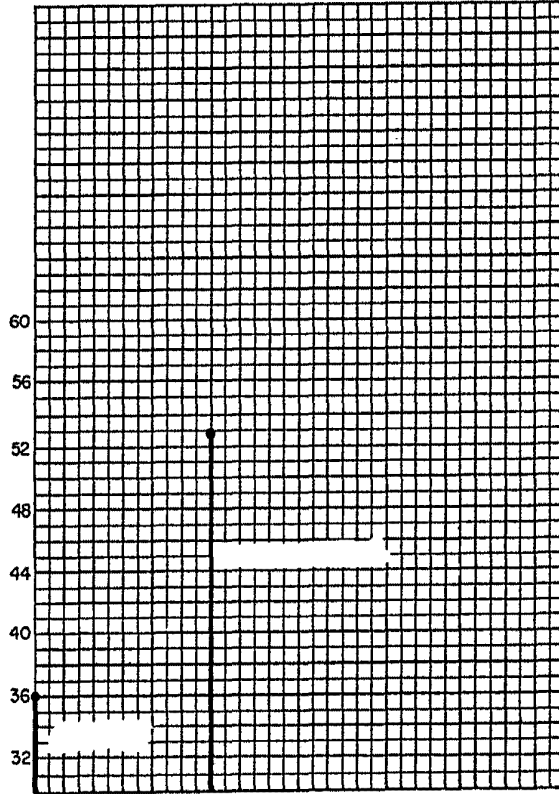
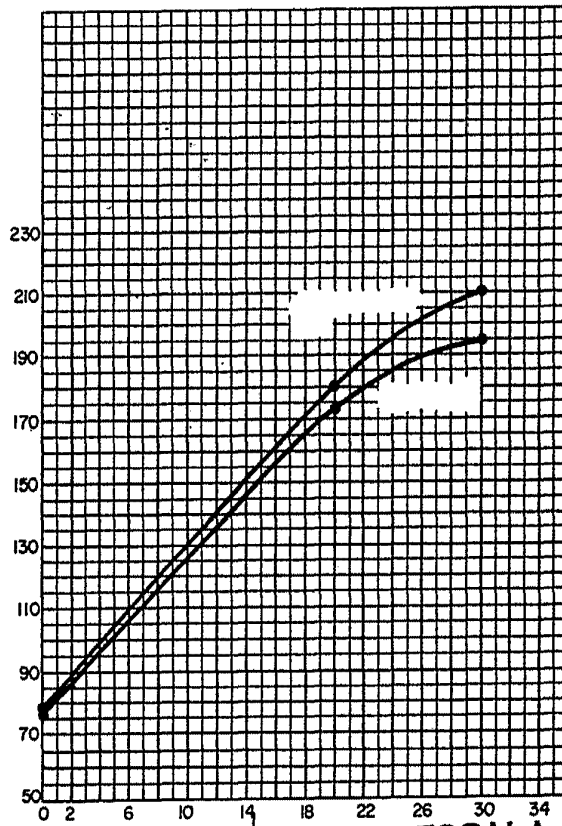


FIG. 6



ESCALA VARIABLE

MADRID, 30 DE Mayo DE 1973

BERNARDO UNGRIA
P. P.