



30 MAY 1971

Int. Cl.:

C12A

415410

COMO DIVISIONAL DE LA SOLICITUD DE PATENTE  
Nº 387 044 del 5-1-71

## 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 PARA OBTENER UN PRODUCTO FORMADO POR EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN UN MEDIO DE CULTIVO QUE CONTIENE DICHOS MICROORGANISMOS.

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

415410

30



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  
10 médico. Las mayores cantidades producidas son utilizadas con frecuencia para diagnosis 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.

20 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,  
25  
30

415410



1 fertilizantes u otras sustancias promotoras del crecimen-  
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-  
25 miento de aguas residuales, el medio no es muy controlado,  
pero el crecimiento de los organismos purificadores es es-  
timulado mediante varias técnicas conocidas.

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

30



**415410**

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

415410

30



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  
10 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  
15 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.

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  
25 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  
30 los mismos resultados por introducción del nitrógeno en forma de sales y los resultados indicaron claramente que

415410



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

415410



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-  
seguir un nivel de crecimiento por lo menos tan alto como  
5 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 diluido 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  
y la jeringa propiamente dicha es lavada con cada gas de  
30 ensayo nuevo en una zona bien ventilada, durante varios

415410



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 óxi-  
do de nitrógeno gaseoso.

5 Los gases y las mezclas utilizados son de la cali-  
dad más pura asequible y todos ellos son analizados después  
de la preparación para comprobar la pureza y la concentra-  
ción de los óxidos de nitrógeno. Todos los tubos se colo-  
can en un aparato mecánico que los voltea continuamente du-  
10 rante los periodos pertinentes de cultivo. La turbidez, las  
cuentas en placa o ambos valores, según el ensayo, se re-  
gistran 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 pro-  
duce en forma de tamaño mayor de los organismos individua-  
15 les o en forma de reproducción de los organismos o como am-  
bos efectos.

20 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 pa-  
ra los óxidos de nitrógeno (como el NO), expuestos a descom-  
posición cuando son diluidos con oxígeno o aire normal. En  
la misma serie de ensayos, los óxidos de nitrógeno estables  
25 (como  $N_2O$  y  $NO_2$ ) son diluidos análogamente con helio en  
muchos casos, con objeto de asegurarse de que los resulta-  
dos son correspondientes y pueden ser sometidos inmedia-  
tamente a una comparación directa.

30 El helio no realiza ninguna función activa en la mez-  
cla y se utiliza solamente para preservar los óxidos de ni-  
trógeno específicos. De hecho, en muchos casos, el helio

415410

30/11/51



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 esta  
            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 mchos y hongos, y en un medio de agar extra-  
            cto 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:

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

415410



- 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 <sub>2</sub> , bal. He	136	136	152	222	340
	B 0,5 ml 22 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	136	138	156	228	340
	C 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	137	136	266	300	355
	D 0,5 ml 9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	135	139	270	305	375
10	E 0,5 ml 4,9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	135	136	264	298	360
	F 0,5 ml 0,9 ppm NO <sub>2</sub> , 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.

415410



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 <sub>2</sub> , bal. He	180.000	9.600.000	53
5	B 0,5 ml 22 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	120.000	7.800.000	65
	C 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	160.000	12.000.000	75
	D 0,5 ml 9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	180.000	13.000.000	72
	E 0,5 ml 4,9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	190.000	13.000.000	68
	F 0,5 ml 0,9 ppm NO <sub>2</sub> , 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:

25

- 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.

30



415410

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

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

415410



CUENTAS EN PLACA

1

5

10

15

20

25

30

<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 <sub>2</sub> , bal. He	150.000	6.600.000	44
B 0,5 ml 22 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	80.000	5.400.000	67
C 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	200.000	6.600.000	33
D 0,5 ml 9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	90.000	5.400.000	60
E 0,5 ml 4,9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	100.000	5.400.000	54
F 0,5 ml 0,9 ppm NO <sub>2</sub> , bal. He	180.000	10.000.000	55,5
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.

La Figura 6 es una representación gráfica de estos resultados.

EJEMPLO 3

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:

- 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.



415410

1

TURBIDIMETRO

5

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



415410

TURBIDIMETRO

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

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

EJEMPLO 5

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:

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



# 415410

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 <sub>2</sub> O, bal. He	400	11.400.000	28.500
B 0,5 ml 60 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	200	6.600.000	33.000
C 0,5 ml 31 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	500	12.600.000	25.200
D 0,5 ml 12 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	200	12.000.000	60.000
E 0,5 ml 5,1 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	200	900.000	4.500
F 0,5 ml 1,5 ppm N <sub>2</sub> 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

415410

80 MAY



- 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 <sub>2</sub> O, bal. He	80	80	99
	B 0,5 ml 60 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	81	77	100
	C 0,5 ml 31 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	79	79	95
	D 0,5 ml 12 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	82	80	93
10	E 0,5 ml 5,1 ppm N <sub>2</sub> O, bal. He	83	78	94
	F 0,5 ml 1,5 ppm N <sub>2</sub> 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 unas porciones 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.

415410 30



	<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 <sub>2</sub> O + 65 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	60/ml	6.600.000	110.000
5	C-1 70,4 ppm N <sub>2</sub> O + 65 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	2.100.000	52.500
	A-2 40,6 ppm N <sub>2</sub> O + 40 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	4.200.000	105.000
	C-2 40,6 ppm N <sub>2</sub> O + 40 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	3.300.000	82.500
10	A-3 32 ppm N <sub>2</sub> O + 21 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	60/ml	360.000	6.000
	B-3 32 ppm N <sub>2</sub> O + 21 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	80/ml	740.000	9.250
	C-3 32 ppm N <sub>2</sub> O + 21 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	20/ml	6.200.000	310.000
	A-4 7,5 ppm N <sub>2</sub> O + 10 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	80/ml	210.000	2.625
15	B-4 7,5 ppm N <sub>2</sub> O + 10 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	4.800.000	120.000
	C-4 7,5 ppm N <sub>2</sub> O + 10 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	3.400.000	85.000
	A-5 4,4 ppm N <sub>2</sub> O + 3,3 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	5.400.000	135.000
20	B-5 4,4 ppm N <sub>2</sub> O + 3,3 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	40/ml	2.400.000	60.000
	C-5 4,4 ppm N <sub>2</sub> O + 3,3 ppm NO <sub>2</sub> (aire) <sup>2</sup>	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

415410



1

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

5

10

15

20

25

30

<u>Mezcla de inoculación</u>	<u>Cuentas en placa antes del gas</u>	<u>Cuentas en placa después del gas</u>	<u>Rendimiento</u>
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
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
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

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

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

415410



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 inoculación	Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
		1	2	3	4	5	6	
15	A 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	50	75		720	780.000		1082
	B 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> + He	50	76		780	660.000		847
	F 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + He	52		72	840		780.000	939
25	G 0,5 ml helio solamente (control)	50	72		840	720.000		856
	H 0,5 ml helio solamente (control)	52		65	760		660.000	869
	I 70,4 ppm NO <sub>2</sub> + 65 ppm N <sub>2</sub> O	52		78	660		1.080.000	1635

30



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 NO<sub>2</sub> 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

415410



	Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
		1	2	3	4	5	6	
1	A 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	46	60		780	770.000		988
5	B 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	49		66	760		480.000	633
	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
	E 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + He	51	75		960	280.000		292
10	F 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + He	49		70	840		660.000	775
	G 0,5 ml helio solamente (control)	50	63		900	210.000		231
	H 0,5 ml helio solamente (control)	50		60	880		370.000	420
15	I 70,4 ppm NO <sub>2</sub> + 65 ppm N <sub>2</sub> 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

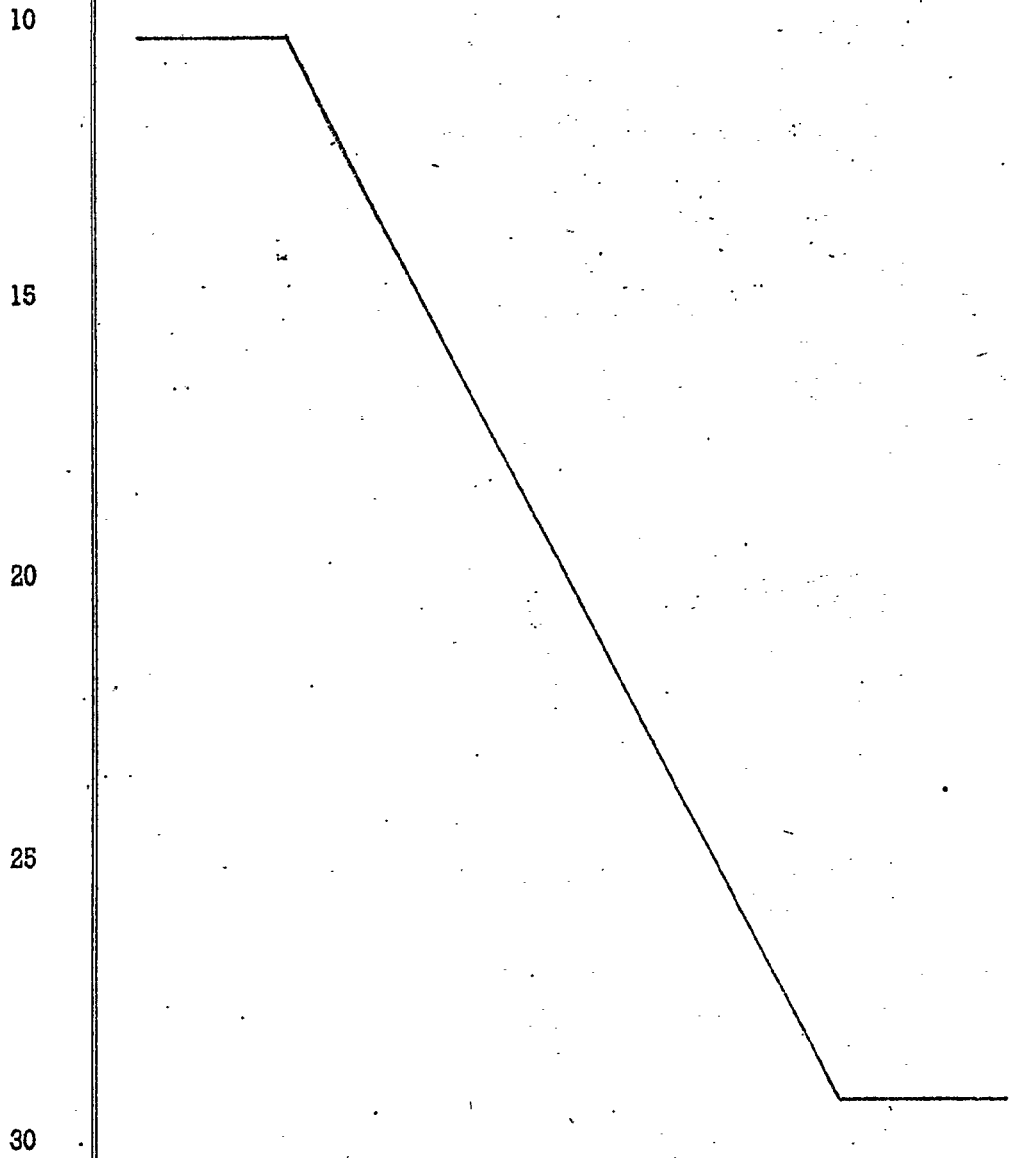
El organismo Neisseria (un organismo gram-positivo) se siembra en un medio de tioglicolato y después se pipetea unas porciones de 7 ml en tubos estériles adecuados para lecturas turbidimétricas. Se realiza un recuento antes y después de gasificar, de acuerdo con el método de recuento en placa normal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

30



# 415410

- 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.



415410

- 24 -

415410  
415410



Rendimiento

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

15

20

25

50

415410

	Mezcla de inoculación	Turbidímetro		
		1	2	3
1	A 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	51	200	
	B 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	52		212
	C 0,5 ml 75 ppm NO + He	51	230	
5	D 0,5 ml 75 ppm NO + He	53		234
	E 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + He	59	222	
	F 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + He	52		228
	G 0,5 ml helio solamente (control)	55	212	
10	H 0,5 ml helio solamente (control)	56		214
	I 70,4 ppm NO <sub>2</sub> + 65 ppm N <sub>2</sub> O	55		22

15

20

25

30

415410

415410



Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
1	2	3	4	5	6	
51	200		760	126.000.000		166.000
52		212	840		114.000.000	135.800
51	230		760	108.000.000		142.000
53		234	760		138.000.000	181.500
59	222		800	120.000.000		150.000
52		228	760		120.000.000	157.900
55	212		720	84.000.000		116.800
56		214	880		96.000.000	108.900
55		226	760		114.000.000	150.000

20



415410

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

10

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:

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;
- 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

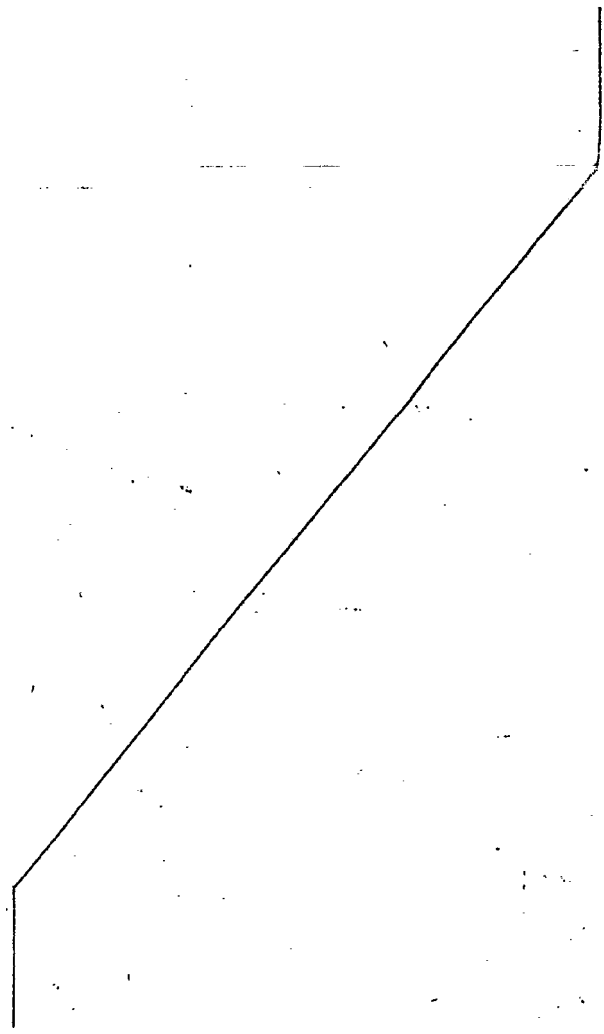
415410

415410



Mezcla de inoculación	Turbidímetro			Cuentas en placa		Rendimiento
	1	2	3	4	5	
A 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	60	160		540	11.000.000	21.100
B 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> O + He	62	150	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 <sub>2</sub> + He	65	146		720	10.800.000	15.000
F 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + 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 <sub>2</sub> + 65 ppm N <sub>2</sub> 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

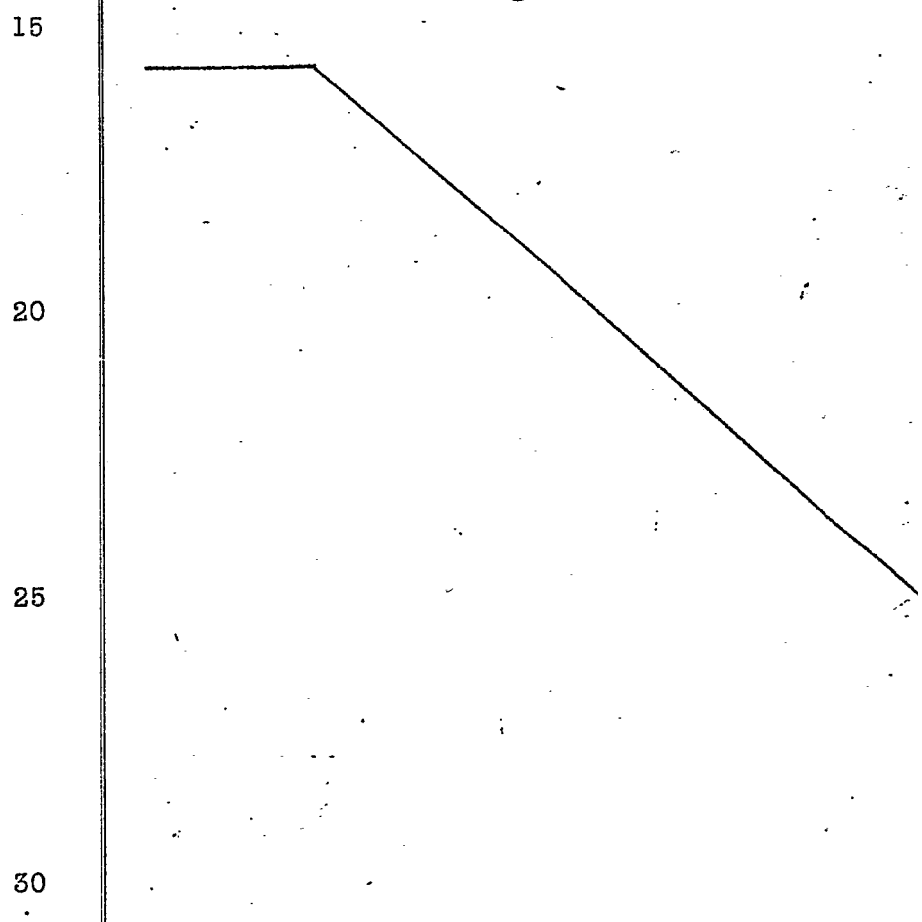
25

30

415410

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

La Figura 21 es una representa  
La Figura 22 es un gráfico de



415410

415410

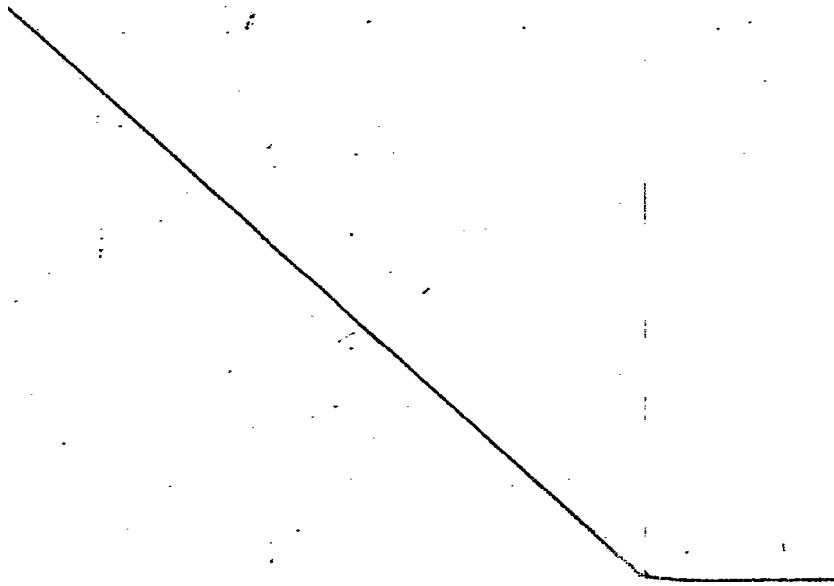


Turbidímetro			Cuentas en placa			Rendimiento
1	2	3	4	5	6	
60	160		540	11.000.000		21.100
62		166	720		12.600.000	17.500
62	150		600	12.600.000		21.000
65		155	540		14.800.000	27.400
65	146		720	10.800.000		15.000
66		153	540		19.600.000	36.250
65	132		660	9.000.000		13.680
67		152	720		11.400.000	15.830
68	160		600		13.200.000	30.350

20

a 21 es una representación gráfica de las turbideces relativas observadas.

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





415410

EJEMPLO 14

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

10

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

20

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-

415410

30



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:

15

- 1 - 1/2 ml            75 ppm N<sub>2</sub>O bal. He
- 2 - 1/2 ml            75 ppm N<sub>2</sub>O bal. He
- 3 - 1/2 ml            75 ppm NO bal. He
- 4 - 1/2 ml            75 ppm NO bal. He
- 5 - 1/2 ml            65 ppm NO<sub>2</sub> bal. He
- 6 - 1/2 ml            65 ppm NO<sub>2</sub> bal. He
- 7 - 1 ml              70,4 ppm NO<sub>2</sub> + 65 ppm N<sub>2</sub>O bal.  
Aire
- 8 - 1 ml              70,4 ppm NO<sub>2</sub> + 65 ppm N<sub>2</sub>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

29  
415410



GRUPO A - 70 HORAS

1  
  
  
  
5  
  
  
  
10  
  
  
  
15  
  
  
  
20  
  
  
  
25  
  
  
  
30

Cuentas en placa

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

Los resultados están ilustrados gráficamente en la  
Figura 23.

GRUPO B - 96 HORAS

Cuentas en placa

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

415410



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 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

25 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 inoculación del gas;
- Columna 2 - lectura turbidimétrica 22 horas después de gasificar;

415410



- 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 <sub>2</sub> O + He	125	135		20	1560		78
10	B 0,5 ml 75 ppm N <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> + He	126	137		20	1200		60
	F 0,5 ml 15 ppm NO <sub>2</sub> + 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 <sub>2</sub> + 65 ppm N <sub>2</sub> 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.



415410

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:

- 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.

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

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 tripticasa 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

415410



gas.

Para los recuentos en placa se utiliza extracto de glucosa tripticasa. Se tratan 24 muestras con 15 ppm de NO<sub>2</sub> 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 NO<sub>2</sub> 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 NO<sub>2</sub>.

Muestra nº	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
3	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
8	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
13	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
18	720	9 horas	680.000	944

415410

30



	Muestra nº	Cuentas iniciales en placa	Tiempo	Cuentas finales en placa	Rendimiento
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

415410



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  
10 definida según la ley teniendo en cuenta las reivindicaciones del apéndice.

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener un producto formado por el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo que contiene dichos microorganismos, cuyo procedimiento comprende las etapas de poner en contacto dicho  
20 medio con un material seleccionado entre el grupo formado por óxidos de nitrógeno gaseosos y mezclas de los mismos y después separar dicho producto de dicho medio.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, en el que dicho material comprende  $NO_2$ .

4. Un procedimiento según la Reivindicación 2, en el que dicho material comprende  $N_2O$ .

5. Un procedimiento según la Reivindicación 2,

415410



1 en el que dicho material comprende NO.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicho material comprende una mezcla de óxidos de nitrógeno.

5 7. Un procedimiento según la Reivindicación 6, en el que dicho material es una mezcla de  $\text{NO}_2$  y  $\text{N}_2\text{O}$ .

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

10 9. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

10. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho material comprende una mezcla de óxidos de nitrógeno.

15 11. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Streptococcus.

12. Un procedimiento según la Reivindicación 11, en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

20 13. Un procedimiento según la Reivindicación 11, en el que dicho material es  $\text{N}_2\text{O}$ .

14. Un procedimiento según la Reivindicación 11, en el que dicho material es NO.

15. Un procedimiento según la Reivindicación 11, en el que dicho material es una mezcla de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_2$ .

25 16. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Paracolon.

17. Un procedimiento según la Reivindicación 16, en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

18. Un procedimiento según la Reivindicación 8



415410

1 en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Staphilococcus aureus (hemolítico).

19. Un procedimiento según la Reivindicación 18, en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

5 20. Un procedimiento según la Reivindicación 18, en el que dicho material es  $\text{N}_2\text{O}$ .

21. Un procedimiento según la Reivindicación 18, en el que dicho material es  $\text{NO}$ .

10 22. Un procedimiento según la Reivindicación 18, en el que dicho material es una mezcla de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_2$ .

23. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Micrococcus albus.

15 24. Un procedimiento según la Reivindicación 23, en el que dicho material es  $\text{N}_2\text{O}$ .

25. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Escherichia coli.

20 26. Un procedimiento según la Reivindicación 25, en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

27. Un procedimiento según la Reivindicación 25, en el que dicho material es  $\text{N}_2\text{O}$ .

28. Un procedimiento según la Reivindicación 25, en el que dicho material es  $\text{NO}$ .

25 29. Un procedimiento según la Reivindicación 25, en el que dicho material es una mezcla de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_2$ .

30. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Neisseria.

31. Un procedimiento según la Reivindicación 30,

*Handwritten signature or initials*



415410

1

en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

32. Un procedimiento según la Reivindicación 30,  
en el que dicho material es  $\text{N}_2\text{O}$ .

5

33. Un procedimiento según la Reivindicación 30,  
en el que dicho material es  $\text{NO}$ .

34. Un procedimiento según la Reivindicación 30,  
en el que dicho material es una mezcla de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_2$ .

10

35. Un procedimiento según la Reivindicación 8,  
en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por listeria.

36. Un procedimiento según la Reivindicación 35,  
en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

37. Un procedimiento según la Reivindicación 35,  
en el que dicho material es  $\text{N}_2\text{O}$ .

15

38. Un procedimiento según la Reivindicación 35,  
en el que dicho material es  $\text{NO}$ .

39. Un procedimiento según la Reivindicación 35,  
en el que dicho material es una mezcla de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_2$ .

20

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

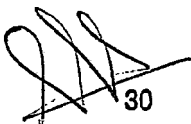
41. Un procedimiento según la Reivindicación 40,  
en el que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

42. Un procedimiento según la Reivindicación 40,  
en el que dicho material comprende una mezcla de óxidos  
de nitrógeno.

25

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

44. Un procedimiento según la Reivindicación 43,  
en el que dicho material es  $\text{NO}_2$ .

  
30

415410 30



1

45. Un procedimiento según la Reivindicación 43, en el que dicho material es  $N_2O$ .

46. Un procedimiento según la Reivindicación 43, en el que dicho material es  $NO$ .

5

47. Un procedimiento según la Reivindicación 43, en el que dicho material es una mezcla de  $NO_2$  y  $N_2O$ .

48. Un procedimiento según la Reivindicación 40, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por F. Mucor.

10

49. Un procedimiento según la Reivindicación 48, en el que dicho material es  $NO_2$ .

50. Un procedimiento según la Reivindicación 48, en el que dicho material es  $N_2O$ .

15

51. Un procedimiento según la Reivindicación 48, en el que dicho material es  $NO$ .

52. Un procedimiento según la Reivindicación 48, en el que dicho material es una mezcla de  $N_2O$  y  $NO_2$ .

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

20

54. Un procedimiento según la Reivindicación 53, en el que dicho material comprende un óxido de nitrógeno.

55. Un procedimiento según la Reivindicación 53, en el que dichos microorganismos están constituidos esencialmente por Rhodotorula.

25

56. Un procedimiento según la Reivindicación 55, en el que dicho material es  $NO_2$ .

57. Se reivindica por último como objeto que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN PRODUCTO FORMADO POR EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN UN MEDIO DE CULTIVO QUE CONTIENE DICHOS

MM  
30



415410

1 MICROORGANISMOS.

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

5

Madrid, 30 de Mayo de 1.973

BERNARDO UNGRIA

p.p.

10

15

20

25

30

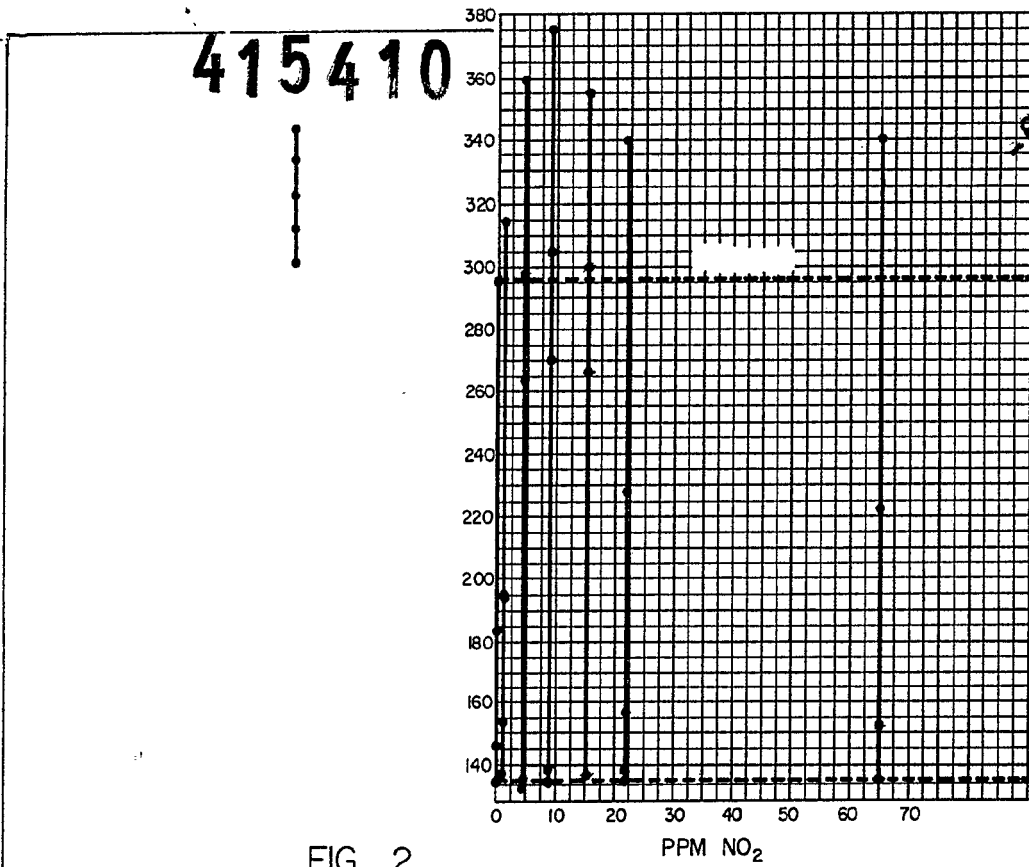
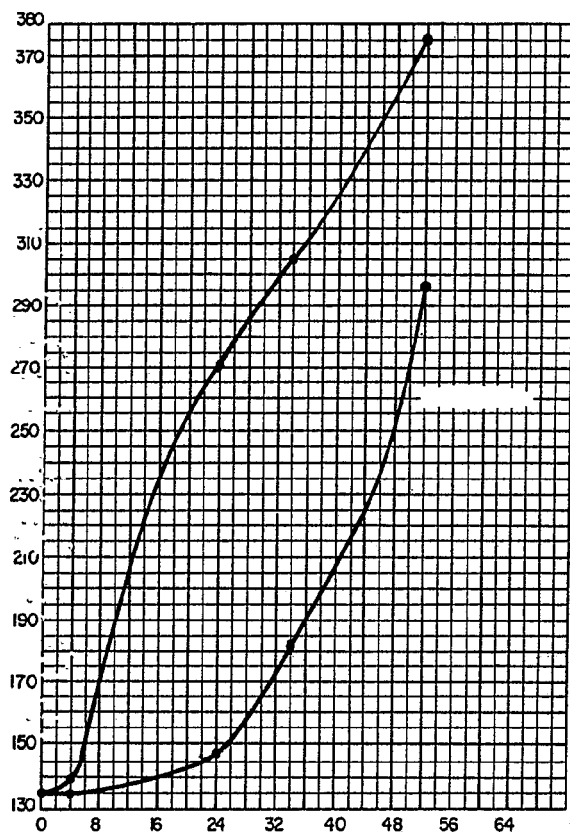
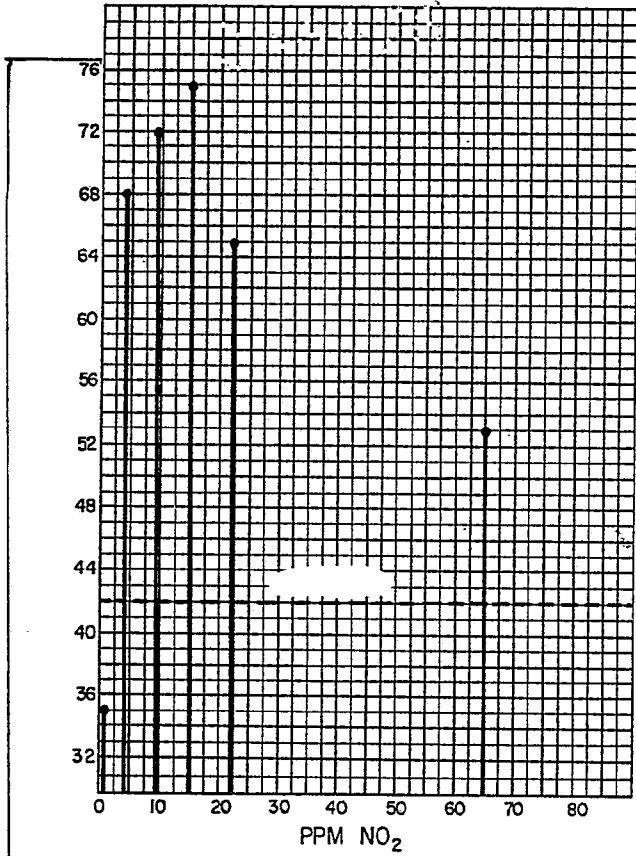


FIG. 2



MADRID, 30 de Mayo DE 1973  
BERNARDO UNZUE  
P. P.

FIG. 3

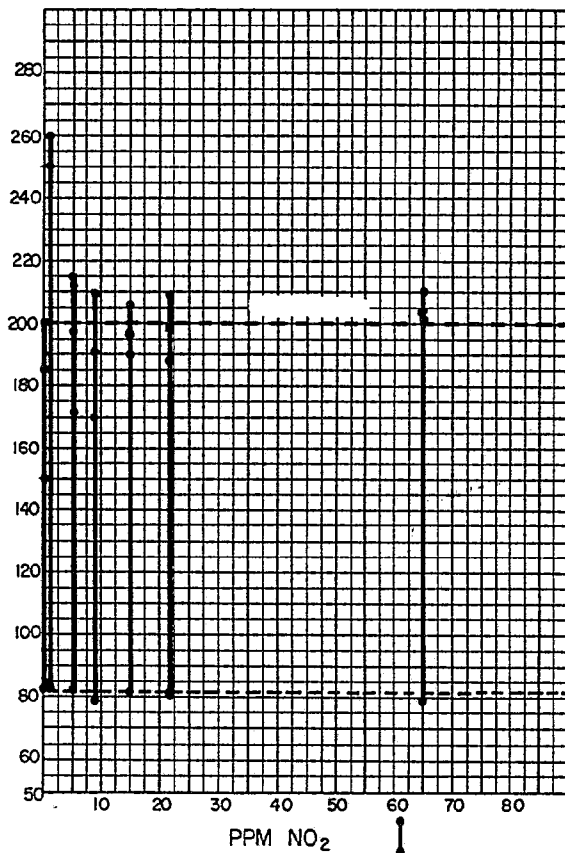


415410



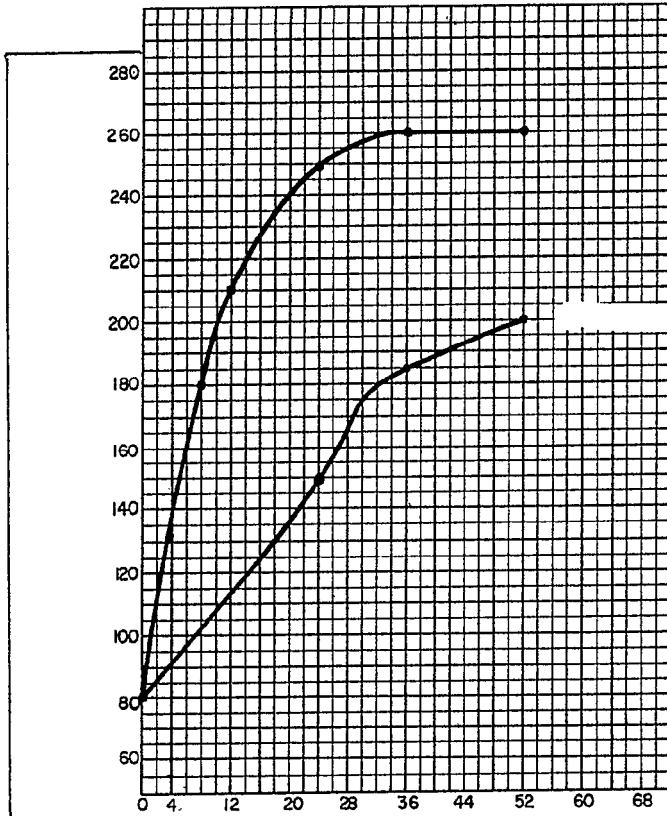
-6

FIG 4



PPM NO<sub>2</sub>

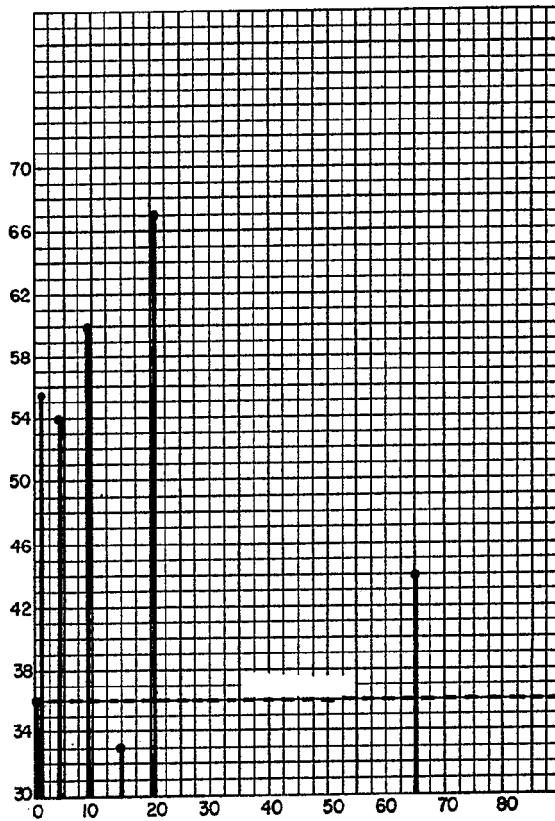
ESCALA VARIABLE  
MADRID, 30 DE Mayo DE 1973  
BERNARDO UNGRIG  
P.P.



415410



FIG. 6



PPM NO<sub>2</sub>

MADRID, 30

Mayo

DE 19.73

BERNARDO UÑERÍA  
P. P.

415410

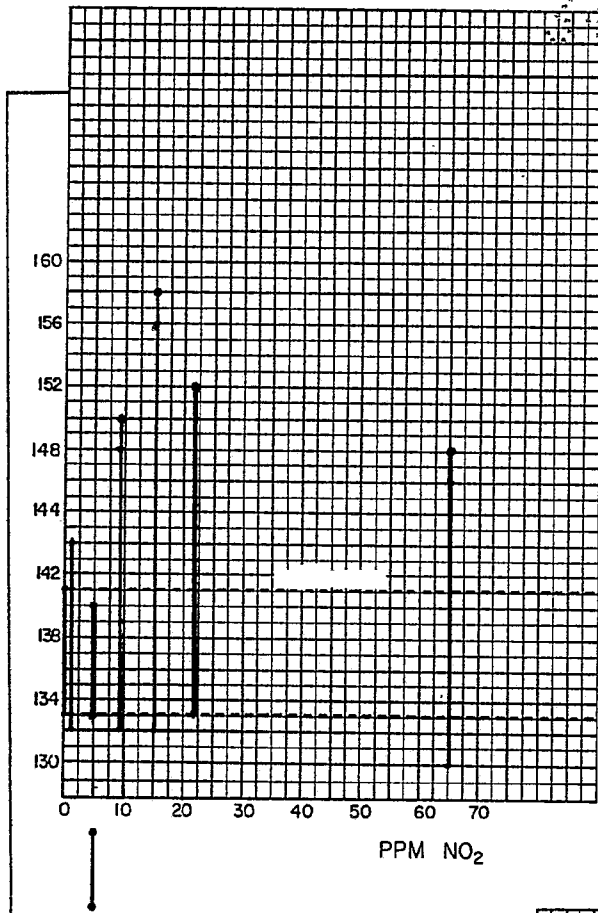
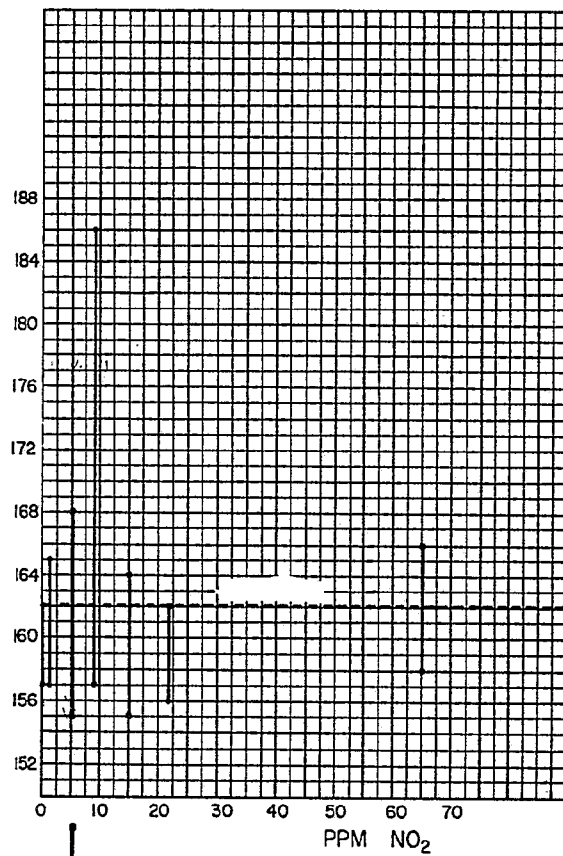
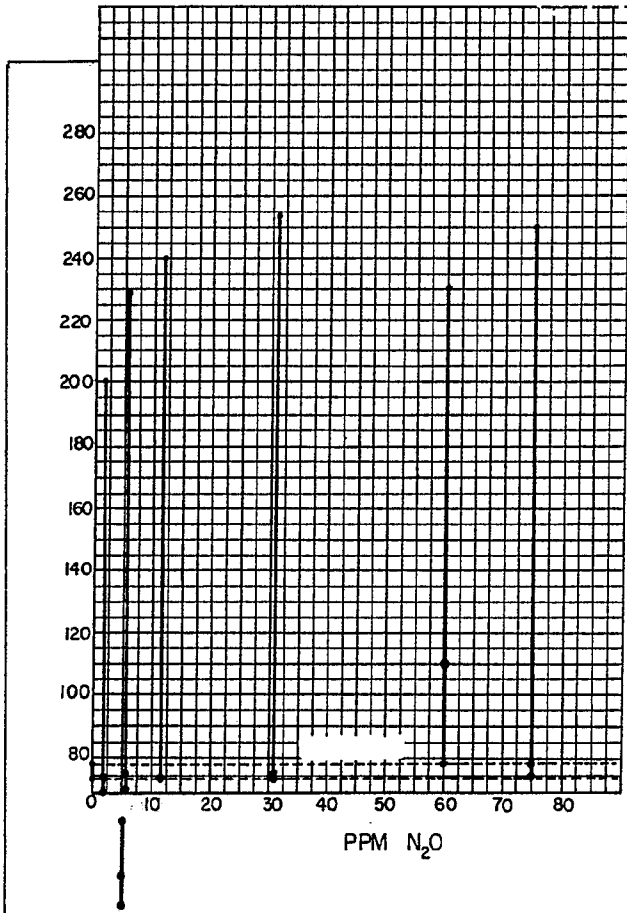


FIG. 8



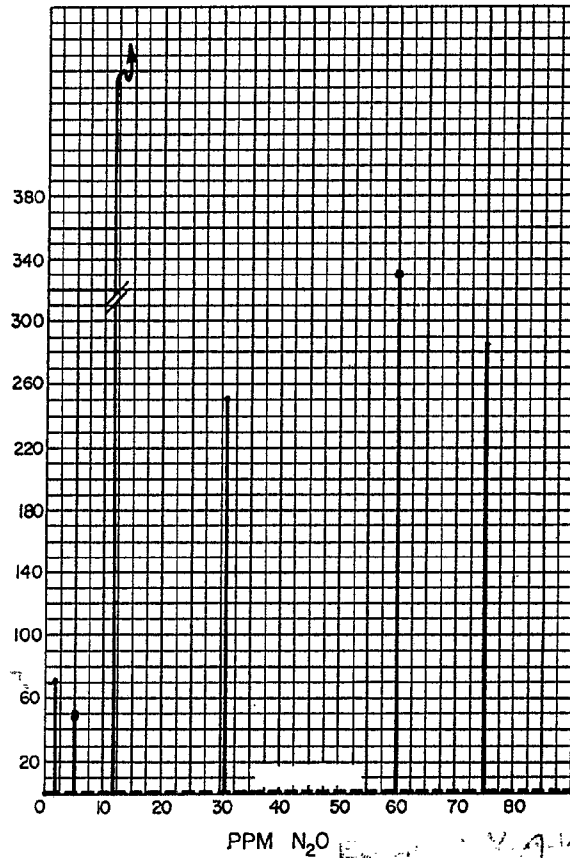
ESCALA VARIABLE  
MADRID, 30 DE Mayo DE 1973  
BERNARDO UNGRIA  
P. P.



415410



FIG. 10



PPM N<sub>2</sub>O

MADRID, 30 de Mayo de 1973

BERNARDO UNGRÍA

P. P.

415410

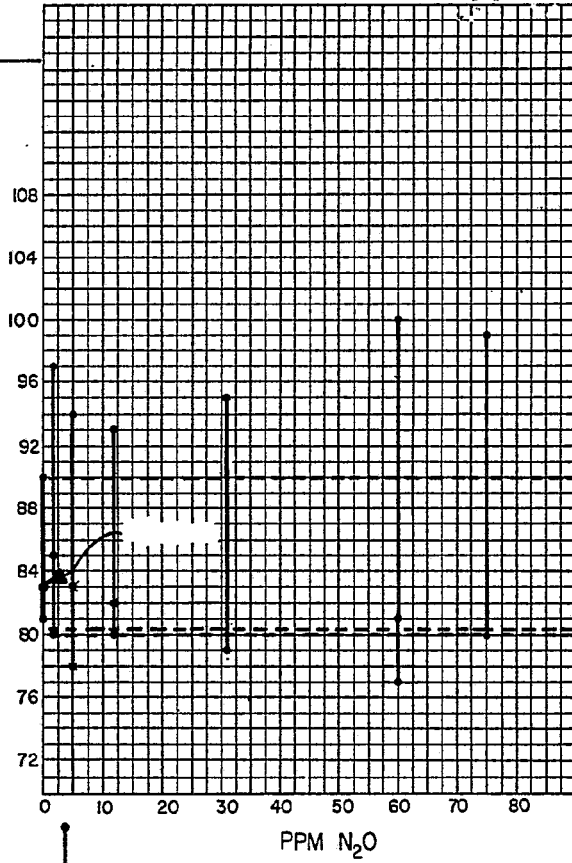
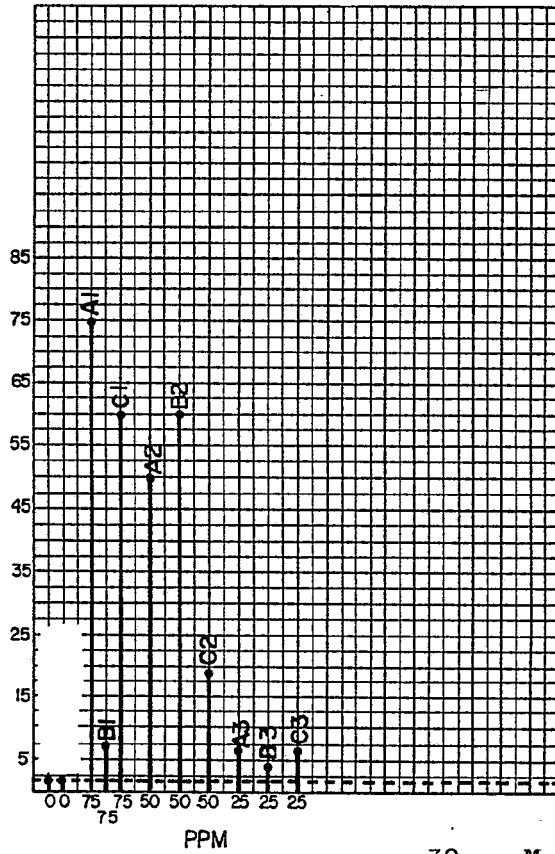


FIG. 13

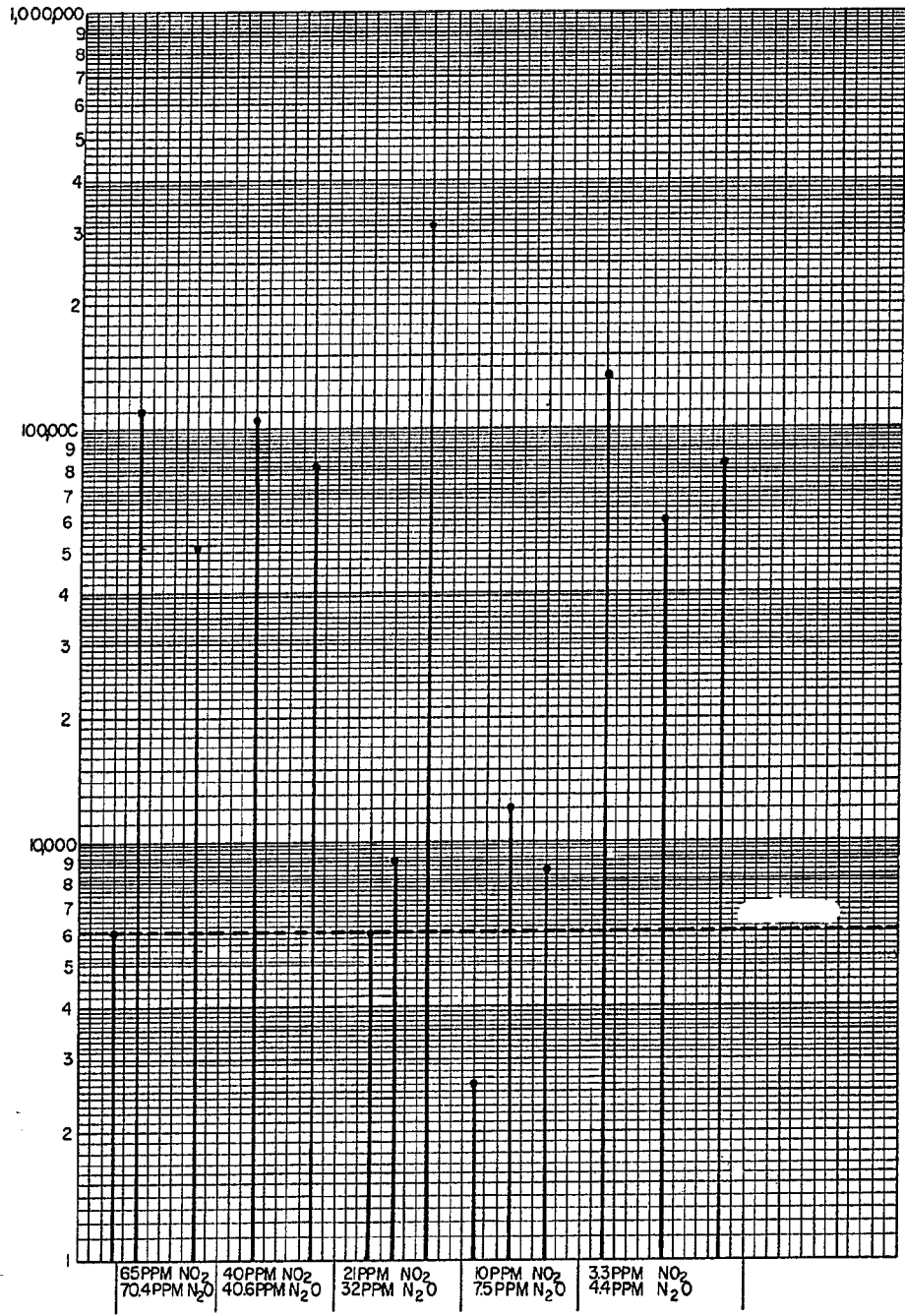


MAR. 30 Mayo 1973  
 BERNARDO, UNGRIA  
 P. P.

415410



FIG. 12



Mayo 30 DE 1973  
BERNARDO UNGRÍA  
P. E.

FIG. 14 **415410**

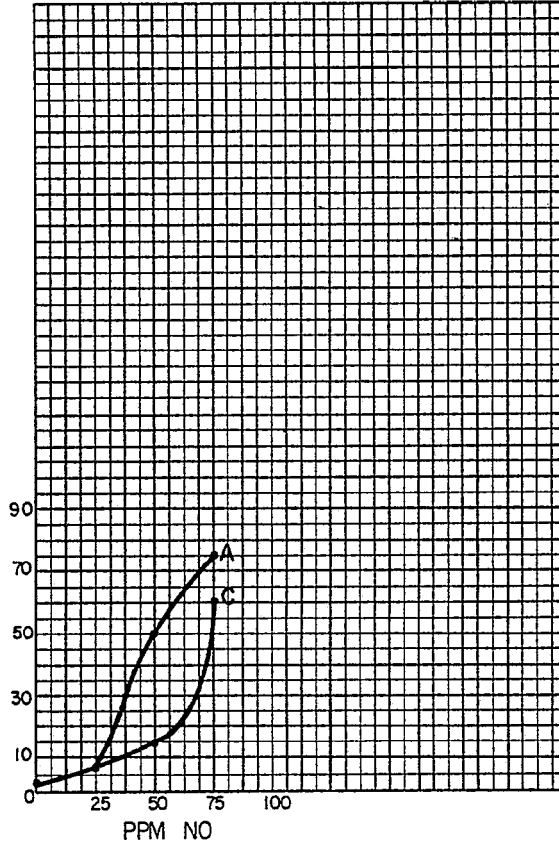
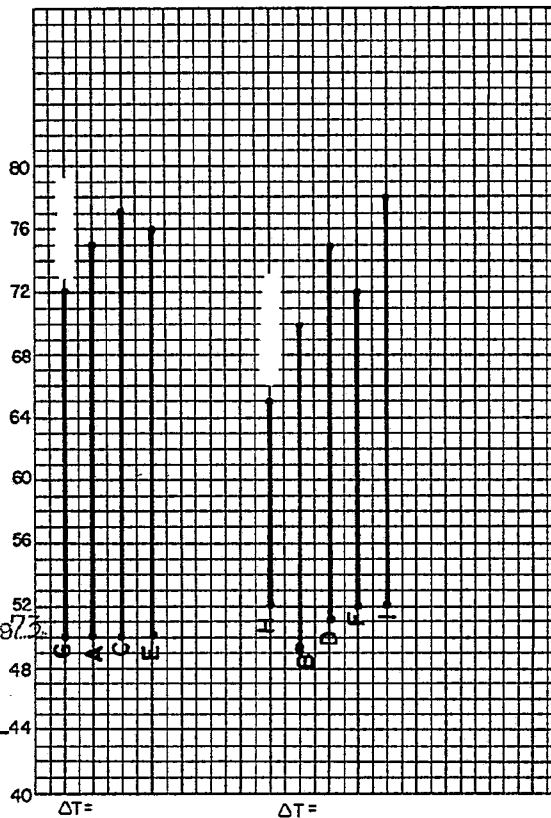


FIG. 15



MADRID, 30 Mayo DE 1973  
BERNARDO UMERIH  
P. E.

415410



FIG. 16

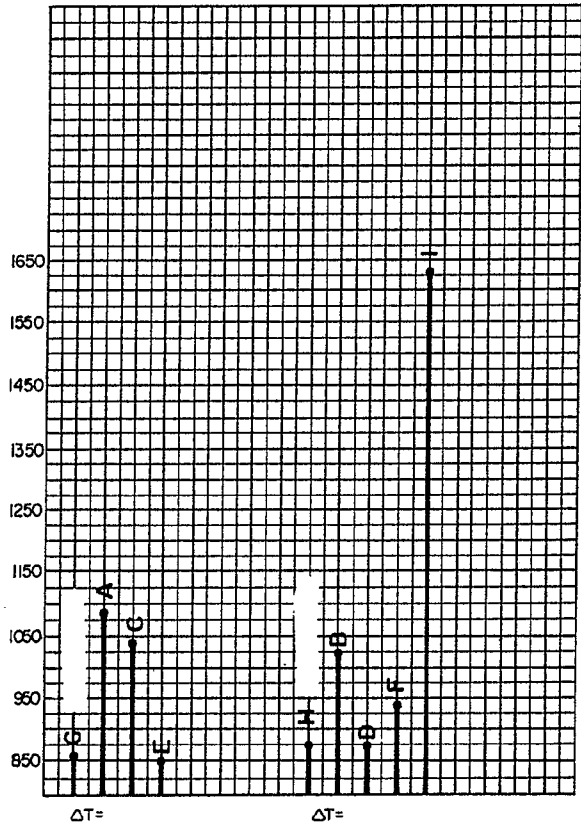
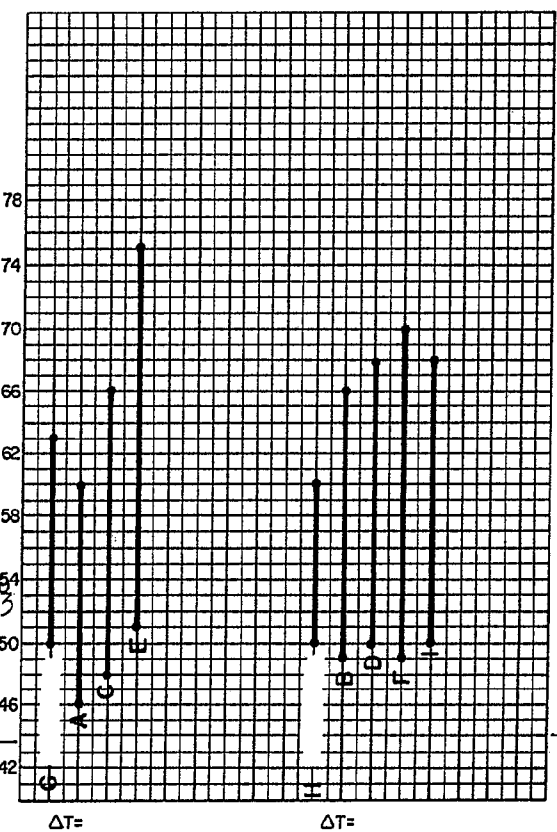


FIG. 17



MADRID, 30 Mayo 1973  
 BERNARDO UNGRIA  
 P. P.



FIG. 18

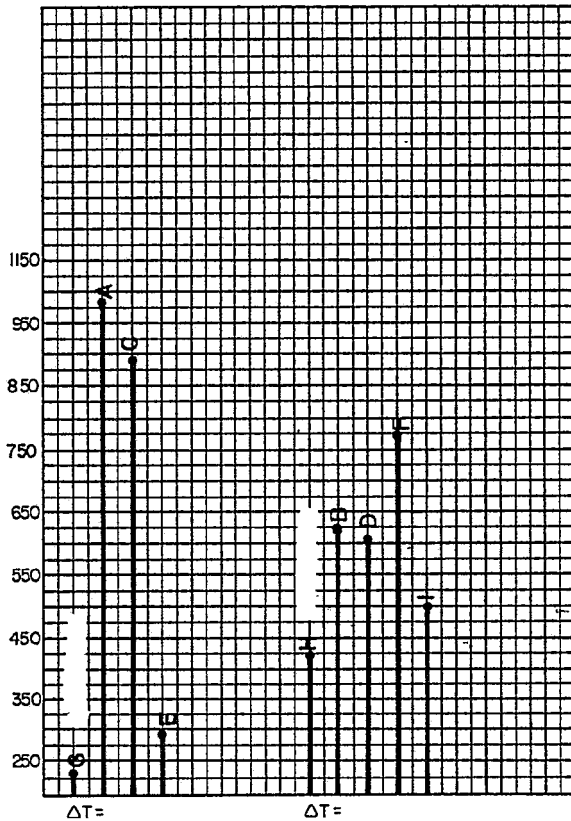
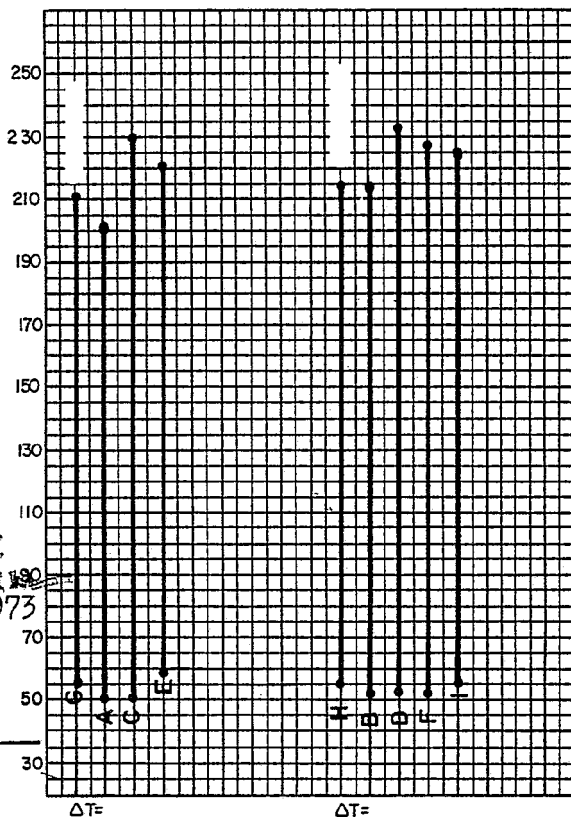


FIG. 19



MADRID, 30 Mayo DE 1973  
BERNARDO GONZALEZ  
P. E.



FIG. 20

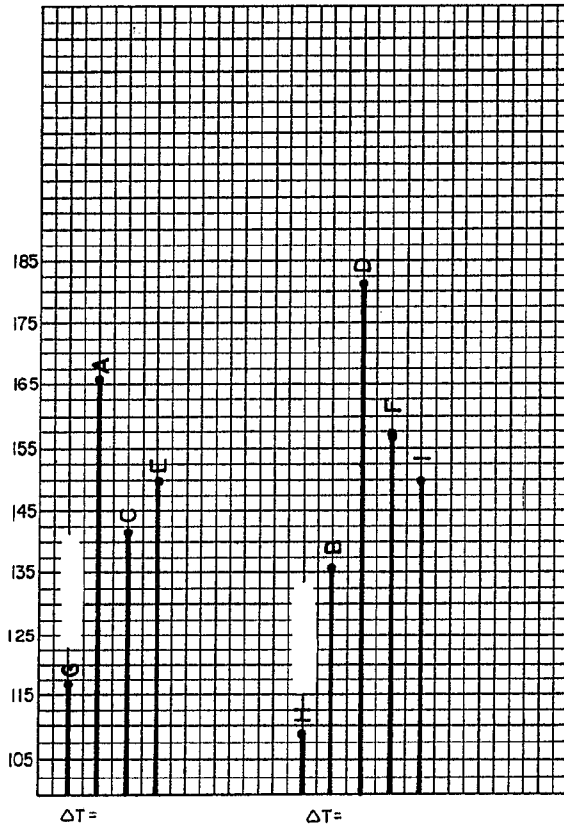
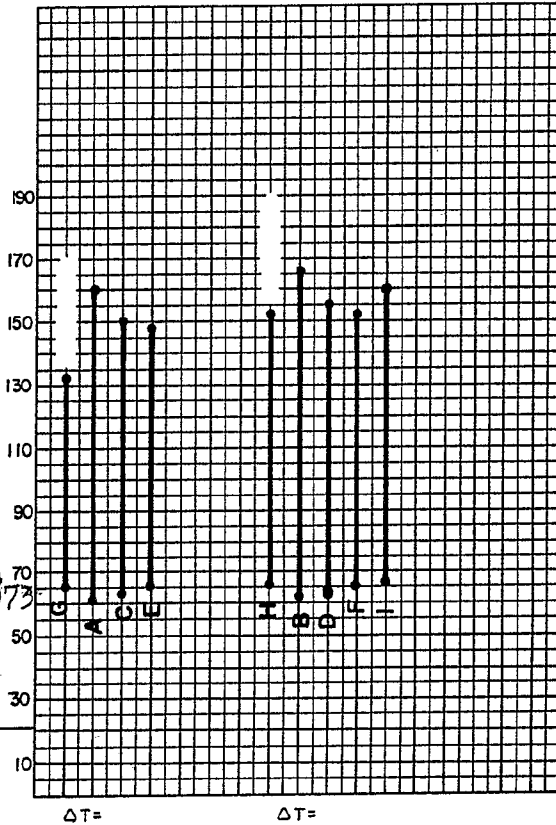


FIG. 21



MADRID, 30 Mayo 1973  
BERNARDO UNGRÍA  
P. E.



FIG. 22

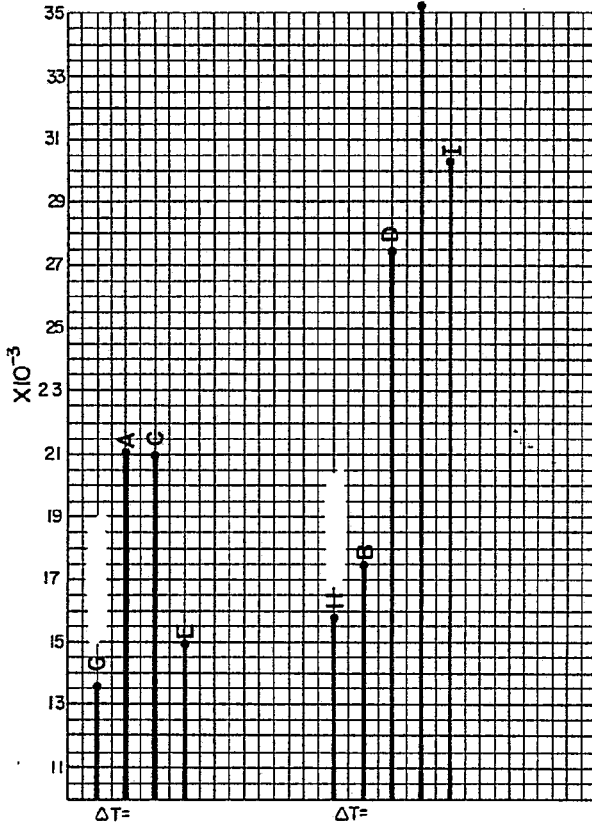
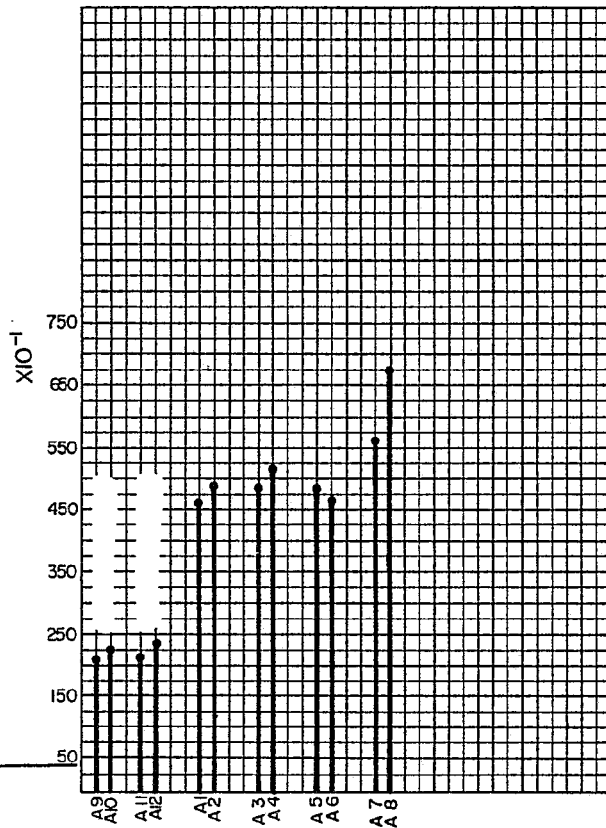


FIG. 23



4 Días, 30 Mayo 1973  
 BERNARDO UNGERÍA  
 P. R.



FIG. 24

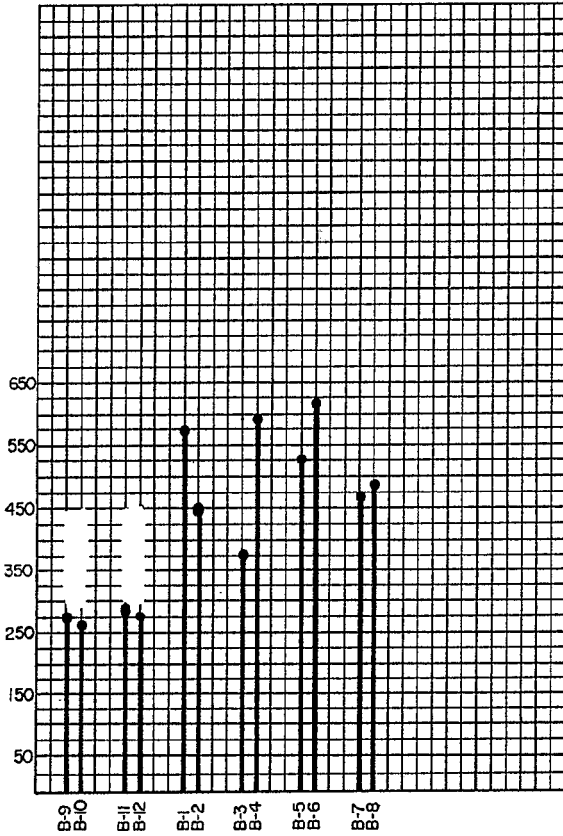
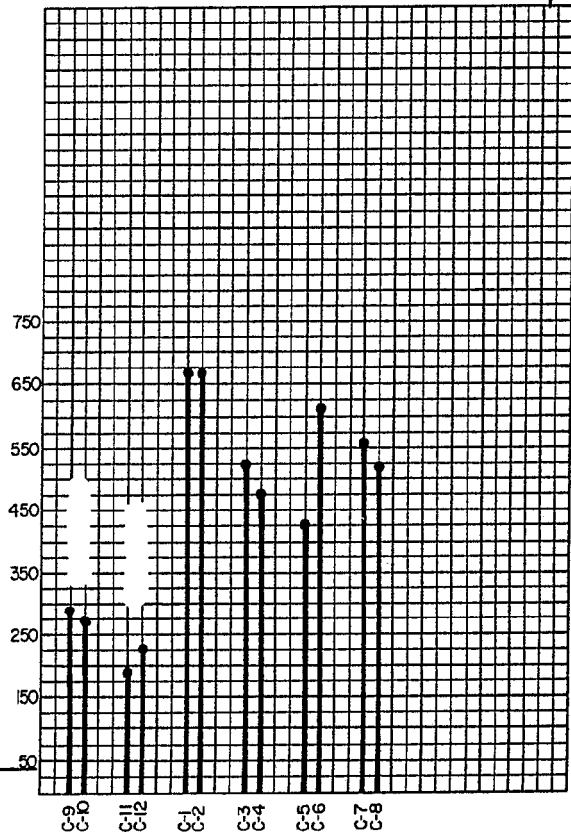


FIG. 25



30 Mayo DE 1973  
 BERNARDO LIVERA  
 P. B.



FIG. 26

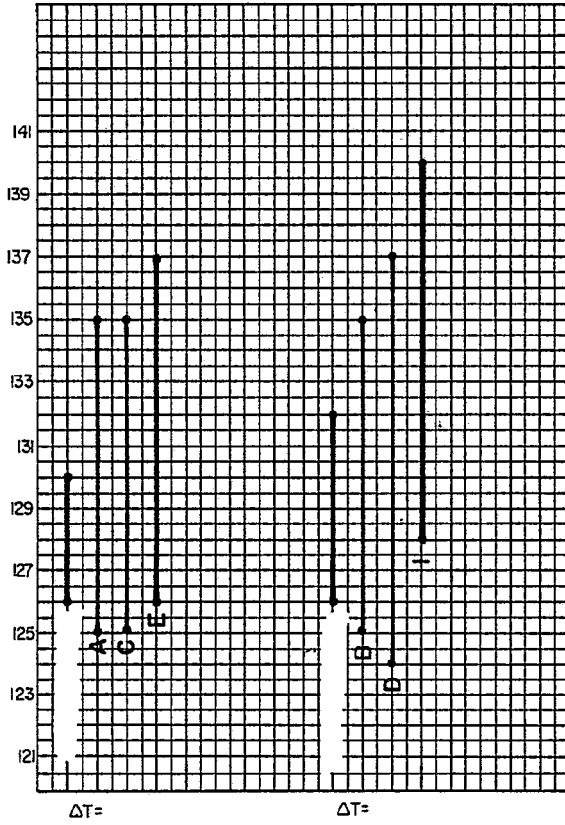
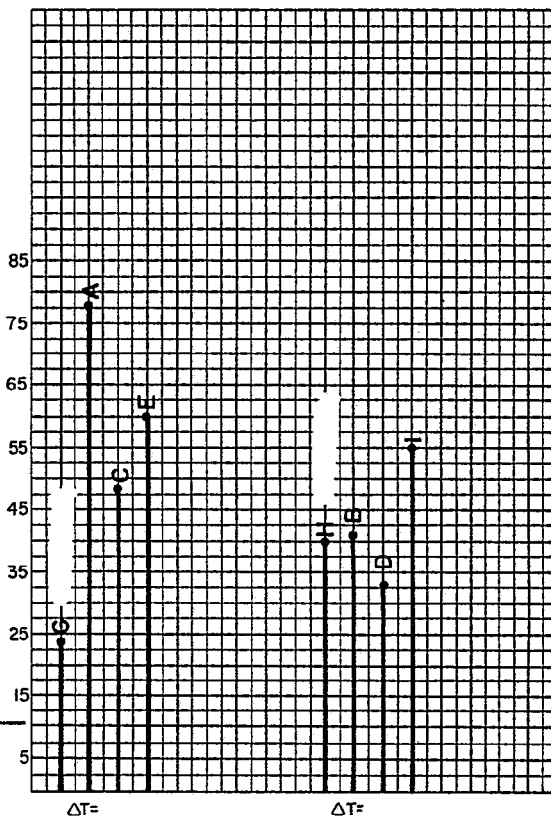


FIG. 27



MADRID, 30 Mayo DE 1973  
BERNARDO UNGRÍA  
P. E.

4155.10

415410

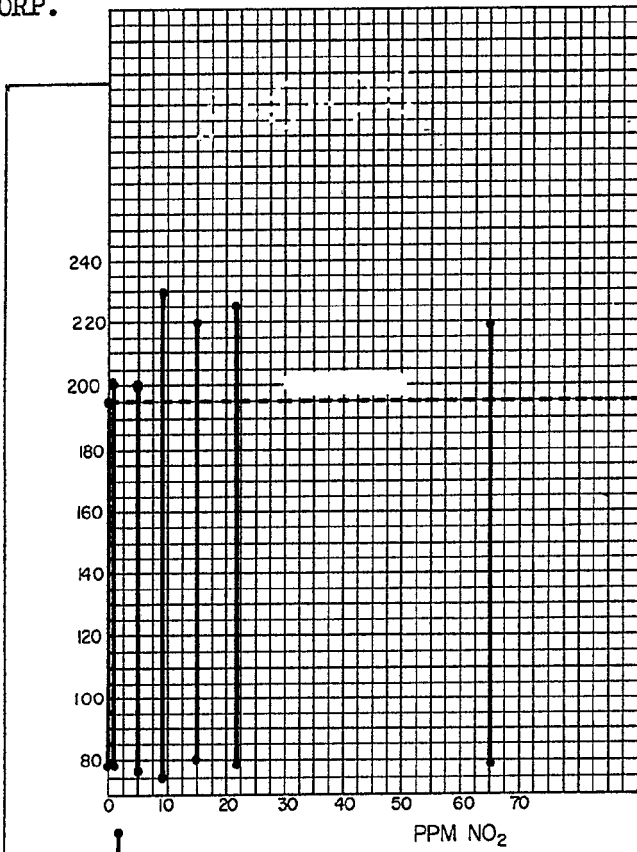
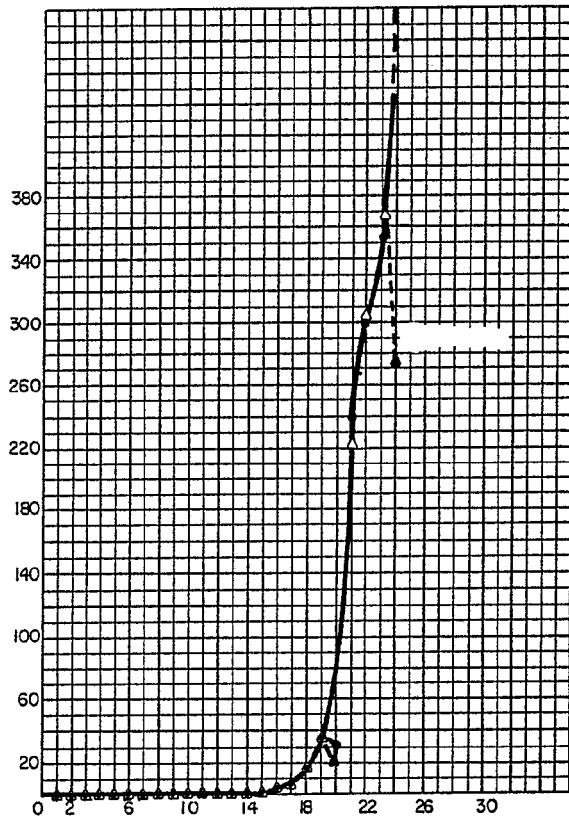


FIG. 29



ESCALA VARIABLE  
 MADRID, 30 DE Mayo DE 1973  
 BERNARDO UNGRICH  
 P. E.