



ES 450835 A1
FECHA DE PRESENTACION
30 JUL. 1976

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|---|--------------------------------------|---------|
| INDICACIONES | | |
| 10 NUMERO | 21 FECHA | 22 PAIS |
| 75 23851 | 30 Julio 1975 | Francia |
| 30 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA | |
| | C12K | |
| TITULO DE LA INVENCION | | |
| "Procedimiento de identificación y/o separación de microorganismos" | | |
| 71 SOLICITANTE (S) | | |
| INSTITUT PASTEUR | | |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE | | |
| 25-28, rue du Docteur Roux, 75015 París, Francia | | |
| 72 INVENTOR (ES) | | |
| Jean Buisnière | | |
| 73 TITULAR (ES) | | |
| | | |
| 74 REPRESENTANTE | | |
| M. Curell Suñol | | |

DE/PL-0327 76 B - INSTITUT PASTEUR - "D.10099-milieu de culture visqueux"
EX-FR

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

solicitada en España a favor de INSTITUT PASTEUR, de nacionalidad francesa, domiciliada en 25-28, rue du Docteur Roux, 75015 París, Francia, por "Procedimiento de identificación y/o separación de microorganismos", con prioridad de la solicitud francesa 75 23851 de fecha 30 julio 1975. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

5. La invención se refiere a un procedimiento de identificación y/o separación de microorganismos que utiliza un nuevo medio de base destinado en particular a servir para la constitución de medios de cultivo para los microorganismos más diversos, que es apto para recibir los diversos elementos de nutrición o "nutrimentos" necesarios para el desarrollo de estos microorganismos y, en caso necesario, de los diversos agentes de los cuales se quiere estudiar los efectos sobre este desarrollo y se refiere, evidentemente también, a los medios de cultivo así constituidos. - - - - -

Se sabe en efecto que todos los microorganismos, por ejemplo todas las especies bacterianas, no pueden desarrollarse sobre los mismos medios de cultivo. Conviene para

5. cada familia, cada género, a veces para especies extremadamente próximas, definir unos medios de cultivo particulares. Asimismo, diversos substratos o agentes introducidos en unos medios de cultivo, o bien favorecen, o bien inhiben el desarrollo de un microorganismo particular. De donde se desprende una diversidad extrema de los comportamientos de los microorganismos frente a diversos medios de cultivo que han sido elaborados hasta el presente, y de lo que se desprenden también las técnicas conocidas de identificación de familias, de géneros, incluso de especies particulares de microorganismos, o simplemente de verificación de algunas de sus propiedades esenciales, las cuales ponen en juego su aptitud para metabolizar dichos nutrimentos, en dichos medios, en caso necesario en presencia de dichos agentes químicos o biológicos particulares. - - - - -

10.

15.

20. Estas técnicas de identificación y de caracterización son a menudo difíciles de utilizar en razón de la inapropiación de los medios de base utilizados para la constitución de los medios de cultivo utilizados hasta el presente, para la realización sistemática y normalizada de todos los ensayos de cultivo necesarios para estas identificaciones o caracterizaciones. - - - - -

25. Por ejemplo, entre las características de base de estos microorganismos se encuentra de nuevo, en particular, su aptitud a desarrollarse o no en presencia de oxígeno. Este constituye, en efecto, un nutrimento esencial, por ejemplo de las bacterias llamadas "aerobias estrictas", mien-

5. tras que es un veneno metabólico de las bacterias llamadas "anaerobias estrictas". Entre estos extremos, se encuentran también familias de bacterias aero-anaerobias, las cuales son capaces de desarrollarse, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. En cada una de las categorías precitadas, se distinguen aún, algunas veces, los microorganismos móviles o inmóviles. - - - - -

10. Estos medios de cultivo utilizados hasta el presente, a saber unos medios de cultivo líquidos o unos medios de cultivo sólidos, no permiten distinguir rápidamente microorganismos "aerobios", microorganismos "anaerobios" y microorganismos "aero-anaerobios" en una sola manipulación. En efecto, el cultivo de los microorganismos anaerobios en medio líquido, incluso en profundidad, no es fácil, en razón de la
15. aptitud del oxígeno ambiente de difundirse en el seno de la masa líquida, salvo que se opere en una atmósfera desprovista de oxígeno. Además, el cultivo en medio líquido no permite siempre, particularmente bajo atmósfera de oxígeno, distinguir los microorganismos aerobios estrictos y aero-anaerobios,
20. teniendo en cuenta la aptitud de los cultivos aerobios de desarrollarse en toda la masa del cultivo líquido, o en ausencia de oxígeno exterior distinguir los microorganismos aero-anaerobios y anaerobios estrictos, teniendo en cuenta la propiedad de los microorganismos aero-anaerobios
25. de desarrollarse en toda la masa del medio, incluso en dichas condiciones. - - - - -

Los medios líquidos son ciertamente fáciles de fabri-

car (por ejemplo por simple disolución o puesta en suspensión de las sustancias nutritivas o de las sustancias de las cuales se desea estudiar el metabolismo) y también fáciles de inocular con los microorganismos o las bacterias a estudiar. Pero, como demuestra el ejemplo anterior, las aplicaciones de los medios líquidos no podían ser siempre suficientes para todas las operaciones necesarias de caracterización y/o identificación.

10. los medios sólidos son, por tanto, siempre utilizados aún de manera corriente en los laboratorios de bacteriología, a pesar de las dificultades inherentes a su utilización que serán evocadas a continuación. En particular, si se vuelve, al ejemplo ya evocado, se destaca que los medios sólidos permiten identificaciones o caracterizaciones difíciles o imposibles de utilizar en los medios líquidos. Los microorganismos aerobios no se desarrollan más que en su superficie. Los microorganismos anaerobios estrictos pueden ser cultivados en la masa de medio sólido. La observación del crecimiento en la masa del medio solidificado permite también distinguir microorganismos aerobios estrictos y microorganismos aero-anaerobios. - - - - -
- 15.

20. Estos medios sólidos deben, sin embargo, responder a numerosas condiciones. Deben ser esencialmente no biodegradables e inertes frente a los cultivos bacterianos. Deben ser transparentes, poder ser llevados al estado licuado a unas temperaturas relativamente bajas, particularmente para permitir su in-
25. seminación por las cepas de microorganismos a cultivar y, al mismo tiempo, no ser licuables a estas mismas temperaturas, cuando se hallan en estado sólido. - - - - -

- En la práctica corriente, solamente los geles de gelosa o agar permiten responder a estas condiciones aparentemente contradictorias. En efecto, los geles sólidos de gelosa, que contienen por lo menos 10 g, y generalmente 20 g, de gelosa por litro de agua, tienen la propiedad de fundir a una temperatura del orden de 100°C, de manera que estos geles permanecen sólidos a todas las temperaturas de cultivo de los microorganismos. Sin embargo, después de fusión, estos geles permanecen líquidos hasta que la temperatura haya vuelto a 35-40°C, lo que hace posible su inseminación con los microorganismos a cultivar, sin riesgo de matarlos antes de la regelificación del medio en un gel elástico y transparente. En razón de las dificultades que han sido mencionadas, no es más que muy excepcionalmente que se recurre, para preparar los medios sólidos de composición química estrictamente definida, a otros agentes gelificantes muy raros, tales como por ejemplo el ácido silícico (cuyos geles son, además, muy delicados de preparar). - - - - -
5. .
- 10.
- 15.

- No ha sido por tanto posible, hasta el presente, en la práctica, obviar las manipulaciones fastidiosas que representan la fusión necesaria previa de los geles de gelosa a una temperatura elevada, después su enfriamiento en condiciones apropiadas. Además, se destacará que la necesidad de esta fusión a alta temperatura impide el estudio de la acción sobre el crecimiento de los microorganismos de productos que se degradan con el calor (vitaminas, ácidos amino, algunas macromoléculas). Esta fusión necesaria hace
- 20.
- 25.

también difícil, sino imposible, la utilización de recipientes de material plástico. - - - - -

5. La invención tiene por objetivo evitar estos diversos inconvenientes, utilizando en particular unos medios de base que pueden ser substituidos tanto en los medios líquidos como en los medios sólidos tradicionales, que tengan por tanto a la vez las propiedades de los medios sólidos y de los medios líquidos, cuya manipulación sea simple y que no requieran ninguno de los tratamientos térmicos que han sido evocados a propósito de los medios sólidos. - - - - -

15. La invención resulta del descubrimiento de que la capacidad de los microorganismos aerobios estrictos de desarrollarse en la masa de un líquido podía ser interrumpida bastante rápidamente por un incremento de la viscosidad de este líquido, particularmente por adición en éste de cantidades controladas de agentes de viscosidad, pudiendo las viscosidades necesarias permanecer compatibles con la conservación de una fluidez suficiente para permitir la sedimentación de microorganismos, incluso inmóviles, en el seno del medio así constituido, bajo el simple efecto del peso, como en un medio líquido verdadero. - - - - -

20. Confiriendo a este líquido una cierta viscosidad, se obtiene por tanto que unos microorganismos aerobios estrictos no sean capaces de desarrollarse o de crecer más que en la superficie o en la proximidad de ésta. - - - - -

Este fenómeno puede ser atribuido a la reducción de la capacidad del oxígeno exterior de difundirse en el seno del medio líquido, como consecuencia del incremento de su viscosidad. Recíprocamente, en razón de la difusión reducida del oxígeno en la masa de este medio, las bacterias anaerobias estrictas, ~~que sedimentan en este medio~~ bajo el efecto del peso, resultan capaces de desarrollarse en este medio, en profundidad. - - - - -

El medio de base según la invención puede por tanto definirse como que tiene una viscosidad suficiente para que unos microorganismos aerobios estrictos, incluso móviles, no pueden desarrollarse más que en la superficie o en la proximidad de ésta, no excediendo sin embargo esta viscosidad a la que provocaría una disminución de fluidez demasiado importante que impida la sedimentación de los microorganismos en el medio bajo efecto del peso, y por consiguiente el desarrollo en profundidad de estos microorganismos, si se trata de microorganismos anaerobios estrictos. - - - - -

Este medio puede también definirse como que tiene una viscosidad suficientemente importante para que la capacidad de difusión del oxígeno exterior en este medio pueda ser suficientemente reducida para que el crecimiento o el desarrollo de microorganismos aerobios estrictos, introducidos en este medio, no pueda tener lugar más que en la superficie o en la proximidad de ésta, no sobrepasando esta viscosidad sin embargo de aquélla para la cual el medio no poseería ya una fluidez suficiente para permitir la sedimentación bajo

el simple efecto del peso de microorganismos introducidos en el medio. - - - - -

5. Desde luego que, en lo que precede, los medios viscosos o los agentes de viscosidad considerados deben ser esterilizables, inertes frente a microorganismos, y esencialmente no biodegradables, es decir que no corran el riesgo de sufrir el ataque por parte de las bacterias, por lo menos durante las duraciones necesarias para la realización y para el mantenimiento de los cultivos normalmente efectuados, particularmente con el fin de la identificación o de la caracterización de los microorganismos del tipo en cuestión. - -

15. En uno de sus modos de realización preferidos, el medio según la invención es un medio acuoso homogéneo, transparente, que contiene un agente de viscosidad que responde a las condiciones antes indicadas y tomado en unas proporciones apropiadas para conferirle las viscosidades definidas anteriormente. - - - - -

20. La viscosidad del medio según la invención está generalmente comprendida entre aproximadamente 50 y aproximadamente 250 centipoises (cPo). Los valores óptimos de la viscosidad son del orden de 100 a 200 cPo. En el caso de un medio que presente unas propiedades tixotrópicas el valor de viscosidad a tomar en cuenta es la del medio en reposo, pero el valor medido puede serle inferior en varias decenas de centipoises si la medida se efectúa sin espera después de agitación del medio. - - - - -
- 25.

- El agente que confiere esta viscosidad al medio puede estar en forma de solución o de suspensión en agua. Su concentración es variable según su naturaleza. Debe permitir la esterilización del medio sin destrucción, por la una o la otra de las técnicas conocidas, como el calentamiento en autoclave o la ultrafiltración. Debe también conservar en el agua su cualidad de inercia frente a los microorganismos. Se entiende por ello que no debe haber ni destrucción de los microorganismos, ni ataque del agente por estos últimos. Dicho de otra manera, el agente utilizado es, a la vez, no tóxico para los microorganismos, o más particularmente para las bacterias, y no biodegradable. - - - - -
- 5.
- 10.

- Este agente puede ser la gelosa, anteriormente utilizada como gelificante. La concentración de la gelosa está entonces ventajosamente comprendida entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 1,6 g/l. Una concentración de 1,4 g/l conduce a una viscosidad del medio del orden de 100 cPo. Se destacará en todos los casos que la concentración de gelosa, sin ser despreciable, es considerablemente más baja que las concentraciones utilizadas de manera clásica, para la gelificación de los medios llamados sólidos. - - - - -
- 15.
- 20.

- Según otro modo de realización, el agente de viscosidad puede estar constituido por cualesquiera sustancias macromoleculares, naturales o sintéticas, siempre que respeten las exigencias ya mencionadas relativas a la esterilización y a la inercia frente a microorganismos y a la no biodegradabilidad. Los derivados solubles de la celulosa, como la carboxi-
- 25.

metilcelulosa, pueden convenir aunque, en ciertos casos, pueden sufrir una degradación lenta bajo la acción de ciertas bacterias. Unas sustancias macromoleculares de síntesis utilizables son, por ejemplo, las poliacrilamidas o los polímeros vinílicos como el alcohol de polivinilo o la polivinilpirrolidona. Las concentraciones apropiadas varían según la naturaleza química de la sustancia y según su peso molecular. Por ejemplo se obtiene un medio de viscosidad apropiada recurriendo, en lugar de la gelosa, al gel de poliacrilamida comercializado por la sociedad PROGIL, a razón de 5 g/l aproximadamente. - - - - -

El medio de la invención constituye un medio de base muy ventajoso para unos medios de cultivo de microorganismos en general, y más particularmente de bacterias. Es destacable y totalmente sorprendente que se haya podido idear, en unión con la elección de viscosidades bien definidas, un medio único cuyas propiedades y comportamiento frente al crecimiento de las bacterias tienen a la vez las de los medios líquidos y las de los medios sólidos por lo que puede ser considerado como "medio universal". - - - - -

El medio según la invención es un medio viscoso, que la presencia de un agente de viscosidad distingue de los medios líquidos clásicos, no siendo estos últimos sensiblemente más viscosos que el agua. Sin embargo, su viscosidad es baja, de manera que permanece tan fácil de manipular y de utilizar como el agua. Está siempre preparado para el

- empleo, sin ningún tratamiento térmico especial; es fluido y se transvasa fácilmente. Es fácil de introducir en el mismo un cultivo bacteriano y de repartir en él uniformemente las bacterias por agitación, tanto antes como después de su desarrollo en el medio. Es también fácil de preparar por simple solución de los medios de cultivo más diversos mezclando al medio de base unas sustancias nutritivas, antibióticos, compuestos químicos, o generalmente cualquier producto susceptible de tener un efecto sobre el crecimiento de las bacterias, sin que sea necesario que un producto de este tipo sea estable al calor. La misma libertad en la elección de los constituyentes se encuentra además en la del agente de viscosidad y permite utilizar para este agente unos productos químicos cuya pureza está asegurada, lo que no es además siempre el caso de las gelosas comerciales, y cuya conservación no podía de ninguna manera preverse en el caso de los medios sólidos tradicionales. - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.

- Sin embargo, el medio según la invención permite él solo identificar los microorganismos, tales como las bacterias, por su modo de crecimiento, como lo permitiría el empleo combinado de medios diferentes, líquidos y sólidos, pero sin los inconvenientes inherentes a la utilización de los productos sólidos. Frente al crecimiento, por ejemplo, de las bacterias aerobias y anaerobias, el medio de base se comporta como un medio sólido, en el sentido de que las bacterias no pueden hallar oxígeno atmosférico en profundidad, en la masa del medio, en razón de la difusión reducida de
- 20.
- 25.

los gases en este medio. Por el contrario, el comportamiento del medio según la invención se parece al de los medios líquidos, si se consideran los desplazamientos de las bacterias. Todas las bacterias, incluso inmóviles, son capaces de penetrar en el medio, por sedimentación bajo solamente el efecto del peso, pero las bacterias aerobias estrictas, incluso móviles, no pueden multiplicarse en el mismo. Se observa por tanto: - - - - -

5.

- para las bacterias aerobias estrictas, incluso móviles, un desarrollo únicamente en superficie o en la proximidad de ésta, - - - - -

10.

- para las bacterias aero-anaerobias, incluso inmóviles, un desarrollo en superficie y en profundidad, - - - - -

- para las bacterias anaerobias estrictas, un desarrollo únicamente en profundidad. - - - - -

15.

Para identificar un tipo de bacterias entre los tres tipos anteriores, es suficiente disponer de un medio de cultivo constituido a partir del medio según la invención, como medio de base, y de sustancias nutritivas apropiadas en por lo menos un recipiente transparente, insembrarlo por medio de un cultivo de dichas bacterias, dejar el recipiente en reposo un tiempo suficiente para permitir un desarrollo apreciable de las bacterias, y determinar donde las bacterias están concentradas: en la superficie del medio y/o en profundidad. La determinación final puede efectuarse por simple observación visual, de una manera automática,

20.

25.

por ejemplo con la ayuda de un densitómetro o de un espectrofotómetro. - - - - -

- El medio según la invención tiene por ventaja poder ser inoculado por depósito de una simple gota de suspensión en su superficie y se presta bien a observaciones en serie en diferentes recipientes. Se presta bien, también, a identificaciones más complejas de bacterias, o más generalmente de microorganismos, haciendo intervenir sustancias susceptibles de modificar sus características de crecimiento, particularmente el modo de crecimiento o el porcentaje de crecimiento. Estas sustancias pueden ser, por ejemplo, unos productos de naturaleza química o biológica, a unas concentraciones variables, productos que tengan un efecto promotor o inhibidor de crecimiento más o menos selectivo para ciertas especies de bacterias, como los antibióticos, compuestos que contienen oxígeno en forma combinada, susceptibles de ser utilizados para ciertas especies de bacterias.-
- 5.
- 10.
- 15.

- Otra ventaja del medio según la invención es que facilita unas medidas cuantitativas de desarrollo de los microorganismos. Estas medidas pueden ser efectuadas recurriendo a técnicas clásicas de nefelometría. El modo operativo puede ser el mismo cualquiera que sea el modo de crecimiento de los microorganismos estudiados. En efecto, es suficiente agitar el medio de cultivo viscoso para asegurar la puesta en suspensión de los microorganismos que han podido desarrollarse en superficie, de manera que la medida
- 20.
- 25.

nefelométrica resulta aplicable al modo de crecimiento aerobio en superficies del medio tanto como a los desarrollos en la masa. - - - - -

5. El medio según la invención puede ser utilizado en todos los recipientes no susceptibles de ser atacados por las bacterias, particularmente de material plástico transparente, de un uso a menudo mucho más práctico que el cristal. - - - - -

10. Desde luego, la invención se refiere también a los medios nutritivos mismos, constituidos a partir de los medios de base antes indicados a los cuales han sido incorporados los nutrimentos o agentes cuya acción sobre el crecimiento bacteriano debe ser estudiada, etc. - - - - -

15. En particular, la invención se refiere a un medio de cultivo que retiene en el seno del medio de base antes indicado los constituyentes más esenciales de los medios de cultivo clásicos, a fin de que pueda recibir el número de aplicaciones mayor posible y ser aplicable, en la práctica, al conjunto del mundo de los microorganismos, particularmente del mundo bacteriano. Entre estos constituyentes esenciales, se citan: unas fuentes de nitrógeno minerales u orgánicas, unas fuentes de carbono y de energía ... etc.

20. Otras particularidades de la invención aparecerán aún en el curso de la descripción siguiente de ejemplos de utilización del medio de base según la invención, y de

su aplicación al estudio de las características de crecimiento de microorganismos. Los ejemplos elegidos permitirán apreciar la gran diversidad de las posibilidades de aplicación que permite este medio. - - - - -

5. EJEMPLO I: PREPARACION DEL MEDIO.

Se prepara (a menos de que haya sido preparado de antemano) un medio viscoso según la invención, mezclando con el agua gelosa DIFCO a la concentración final de 1,4 g/l. Eventualmente este medio es completado, después de esterilización, por unas sustancias nutritivas de base, por ejemplo peptona de carne. - - - - -

Es entonces repartido por fracciones de volúmenes idénticos en una serie de tubos o cubetas semejantes. Se pueden utilizar unos tubos de ensayo de vidrio, pero se usan ventajosamente unos tubos de material plástico transparente, destruidos después del uso, de dimensiones adaptadas a un uso económico del medio. Se tiene la ventaja de utilizar tubos de un diámetro tal que la relación superficie sobre altura sea del orden de 1 sobre 2 ó 1 sobre 3. Por ejemplo, se disponen 2 ml del medio en un tubo de superficie 1 cm^2 para que la altura de la columna sea de 2 cm. - - - - -

Se pueden entonces adicionar, en los diferentes tubos, unos productos químicos elegidos en función de los fenómenos biológicos que se desea observar y, en el momen-

to del empleo, depositar en la superficie del medio, en cada tubo, una gota de una suspensión bacteriana a analizar. - - -

EJEMPLO II: METODO RACIONAL DE UTILIZACION DE ESTOS MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS.

5. En 10 tubos semejantes llevados en un mismo soporte y que contienen bajo el mismo volumen el mismo medio viscoso y una substancia nutritiva (peptona de carne), se adicionan unas dosis de cloruro de sodio, creciente de un tubo al otro, para obtener unas concentraciones respectivas de 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 120 g/l, 240 g/l. - - - - -

Estos tubos son a continuación inseminados con unos productos supuestos contaminados por varias especies bacterianas, como es frecuentemente encontrado en patología humana, en los excrementos o en alimentos contaminados. - - - - -

15. Después de 24 horas de cultivo en reposo, solamente la especie más resistente a la sal se ha desarrollado en los tubos que contienen las más fuertes concentraciones de sal. La misma es así aislada de todas las demás. Puede ser extraída en superficie y/o en profundidad según el lugar en que el desarrollo se haya concentrado. - - - - -

20. Según que se haya desarrollado en superficie, en profundidad, o simultáneamente en superficie y en profundidad, se la identifica como una bacteria aerobia, anaerobia, o aero-anaerobia. - - - - -

5. El reemplazado del cloruro de sodio por otra sustancia química inhibidora permite, de la misma manera, buscar la presencia de otras bacterias, selectivamente resistentes a esta sustancia, y aislarlas en el tubo donde la concentración de sustancia inhibidora es más elevada. - - - - -

10. Si el cultivo tomado en el último tubo puede contener aún varias especies bacterianas, se utiliza para inseminar otra serie de tubos, o varias series sucesivas de tubos, que contienen inhibidores diferentes, a unas dosis crecientes en cada serie, de manera que se aislen estas especies. - - -

El conjunto de estas operaciones puede ser programado, su utilización automatizada, los resultados registrados con el fotómetro y las informaciones tratadas por ordenador. - -

15. EJEMPLO III: PUESTA EN EVIDENCIA DE LA UTILIZACION DEL OXIGENO DEL NITRATO POR LAS BACTERIAS AEROBIAS ESTRICTAS: POR EJEMPLO PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

20. En un tubo de las proporciones preconizadas en el ejemplo precedente, se introducen 2 a 3 ml de un medio nutritivo acuoso que contiene 1,4 g/l de gelosa DIFCO y nitrato de potasio a razón de 1 g/l. - - - - -

Una suspensión de bacterias aerobias estrictas a analizar es depositada en superficie, simplemente dejando caer una gota con la ayuda de una pipeta. Las bacterias sedimentan lentamente en el medio. - - - - -

25. Durante la incubación a la temperatura elegida, por e-

jemplo 30°C, las bacterias que son capaces de utilizar el oxígeno del nitrato de potasio no tienen necesidad del oxígeno atmosférico; las mismas pueden desarrollarse en la profundidad del medio. Las bacterias que no utilizan el oxígeno del nitrato no pueden desarrollarse más que en superficie en contacto con el oxígeno atmosférico. - - - - -

5. Se dispone así de un procedimiento muy simple de puesta en evidencia de la aptitud eventual de una bacteria aerobia estricta de consumir igualmente el oxígeno del nitrato. Ello permite distinguir: - - - - -

- las Pseudomonas aeruginosa, que se desarrollan entonces en la profundidad del medio, - - - - -

- unas Pseudomonas putida, que no se desarrollan más que en superficie. - - - - -

15. Para unas bacterias aero-anaerobias, según el mismo procedimiento, se puede reemplazar el nitrato por el clorato de potasio, cuyo efecto es inverso: en efecto, las bacterias que consumen oxígeno del clorato son muertas por el cloro que se halla así desprendido. En consecuencia, las bacterias 20. aero-anaerobias que utilizan el clorato de potasio se multiplican en profundidad pero son muertas, mientras que las que no lo utilizan se desarrollan normalmente. - - - - -

EJEMPLO IV:

Resultados análogos a los del ejemplo II se obtienen

utilizando, como agente de viscosidad, poliacrilamida de PROGIL a la concentración de 5/1000, reemplazando a la gelsa.-----

5. EJEMPLO V: MEDIDA NEFELOMETRICA DEL CONSUMO DE UN SUBSTRATO POR UN MICROORGANISMO, TAL COMO UNA LEVADURA (CANDIDA ALBICANS).

10. Un medio viscoso con 1,4 g/l de gelosa, tal como el del ejemplo I, se utiliza para estudiar cuantitativamente el consumo de productos químicos por unas levaduras. Si se trata de productos químicos que la levadura no es capaz de asimilar más que en presencia de oxígeno atmosférico, la levadura se desarrolla en superficie exclusivamente. En el caso contrario, se desarrolla en profundidad.-----

15. Observando el cultivo obtenido, se pueden distinguir unas especies diferentes de levadura. Así, Candida Albicans se desarrolla en superficie en presencia de trealosa, mientras que Candida tropicalis se cultiva en profundidad en los dos casos.-----

20. En todos los casos, los cultivos son puestos en suspensión de forma homogénea, o bien por simple agitación mecánica de los tubos, o bien por agitación por una bola de acero o de níquel desplazada en el medio con la ayuda de un imán, y el desarrollo es medido por nefelometría.-----

25. De una manera general, se constata que la invención se refiere por tanto igualmente a un procedimiento de identificación de microorganismos, o incluso de separación de

- microorganismos, a partir de una mezcla que los contiene, teniendo en cuenta su comportamiento frente al oxígeno en condiciones determinadas. Este procedimiento está caracterizado porque se insemnan estos microorganismos o esta mezcla
5. de microorganismos en el medio tal como se ha definido anteriormente, contenido en un tubo, conteniendo este medio, además, los nutrimentos necesarios para el establecimiento de las condiciones de desarrollo determinadas mencionadas, siendo la altura o la profundidad del medio en el interior del
10. tubo suficientes para permitir la obtención, por debajo de la superficie superior del medio que se halla en contacto con la atmósfera ambiente, de un nivel que esté suficientemente aislado del oxígeno exterior para que unas bacterias anaerobias estrictas puedan desarrollarse en el mismo. Se
15. puede entonces, después de incubación, recoger los cultivos que se habrán formado, eventualmente a niveles diferentes del medio de cultivo, de donde se desprende la posibilidad de separar diferentes clases de microorganismos. - - - - -

- Las condiciones a las cuales la viscosidad del medio de cultivo debe responder han sido definidas más arriba. En particular, deben permitir la sedimentación hacia su fondo de microorganismos depositados en la superficie del medio. Esta sedimentación puede, sin embargo, ser bastante lenta. - - - -
- 20.

- De acuerdo con una característica suplementaria ventajosa del procedimiento según la invención, se puede realizar
25. la insemnación de dichos microorganismos o de dicha mezcla de microorganismos, en toda la altura del medio, por medio de

un elemento sólido, particularmente una bola, más densa que el medio de cultivo y sobre el cual habrán sido inicialmente depositados los microorganismos o la mezcla de microorganismos a estudiar. El elemento sólido, y preferentemente la bola, constituye entonces un vehículo cuya función es, a la vez, la de arrastrar hacia abajo los microorganismos introducidos en el medio, produciendo una inseminación en la totalidad de su trayecto a través del medio de cultivo. - -

Desde luego, la bola debe estar constituida por un material eventualmente poroso e inerte frente a los microorganismos y al medio. Está por ejemplo constituida de cristal o de un material plástico inerte. Puede también estar constituida por un metal inerte. - - - - -

Además, la mayor rapidez de inseminación del medio de cultivo con los microorganismos a estudiar, la presencia de la bola en el fondo del tubo permite asegurar que la inseminación ha sido realmente efectuada (en particular que los microorganismos a estudiar no han permanecido pegados a las paredes del tubo por encima del nivel superior del medio de cultivo, como puede producirse en el caso en que estos microorganismos se introducen en los tubos por medio de una gota de agua depositada en las paredes del tubo con una pipeta). En caso necesario, la bola está hecha de un material poroso (vidrio, cerámica, material plástico). - - - -

Desde luego, y como resulta además de lo que precede, la invención no se limita en modo alguno a aquéllos de sus

modos de aplicación y de realización que han sido más especialmente previstos sino que abarca, por el contrario, todas las variantes. - - - - -

N O T A

- 5. Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

- 10. 1.- Procedimiento de identificación y/o separación de microorganismos, a partir de una mezcla que los contiene, teniendo en cuenta los comportamientos diferentes que pueden manifestar frente al oxígeno en condiciones de desarrollo de terminadas, caracterizado porque se inseminan estos microorganismos o esta mezcla de microorganismos en un medio de base fluido esterilizable, inerte frente a microorganismos, esencialmente no biodegradable, con una viscosidad suficiente para que unos microorganismos aerobios estrictos, incluso móviles, no puedan desarrollarse más que en la superficie o en la proximidad de ésta, no excediendo sin embargo esta viscosidad de la que provocaría una disminución de fluidez demasiado importante, que impida la sedimentación de microorganismos en este medio, bajo el efecto de su peso, conteniendo el citado medio los nutrimentos necesarios para el establecimiento de las condiciones de desarrollo determinadas mencionadas, en el interior de un tubo o análogo, en una
- 15. altura o profundidad suficientes para permitir el establecimiento, por debajo de la superficie superior del medio, de un
- 20.
- 25.

5. nivel suficientemente aislado del oxígeno exterior para que unas bacterias anaerobias estrictas puedan desarrollarse en el mismo y, después de incubación, recoger, si es necesario, los cultivos que se formarán a diferentes niveles del medio de cultivo. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la inseminación de dichos microorganismos o de la mezcla de microorganismos se realiza en toda la altura del medio, por medio de un elemento sólido inerte, particularmente una bola, más denso que el medio de cultivo, en el cual han sido depositados de antemano los microorganismos o mezcla de microorganismos a introducir en el medio. - - -

15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la viscosidad del medio es tal que la capacidad de difusión del oxígeno atmosférico en este medio es suficientemente reducida para que los microorganismos aerobios estrictos no puedan desarrollarse más que en la superficie o en la proximidad de la superficie de este medio. - - - -

20. 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de base está constituido por un medio acuoso, homogéneo, transparente, cuya mencionada viscosidad es debida a un agente de viscosidad esterilizable, inerte frente a microorganismos, y esencialmente no biodegradable.-

25. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de base presenta una viscosidad apro-

ximadamente comprendida entre 50 y 250 centipoises, y preferentemente del orden de 100 a 200 centipoises. - - - - -

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho agente de viscosidad es la gelosa. - - -

5. 7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 6, caracterizado porque la concentración de gelosa está comprendida entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 1,6 g/l, y preferentemente del orden de 1,4 g/l. - - - - -

10. 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho agente de viscosidad está constituido por lo menos por una substancia macromolecular de síntesis. - - -

15. 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la mencionada substancia macromolecular de síntesis es un polímero del tipo poliacrilamida o del tipo polímero vinílico, como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona, o del tipo polímero celulósico o de sus derivados. - - - - -

20. 10.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el medio de cultivo incluye además substancias nutritivas para los microorganismos, y eventualmente substancias susceptibles de modificar sus características de crecimiento. - - - - -

11.- "PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION Y/O SEPARACION DE MICROORGANISMOS". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veinticinco hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

BARCELONA, 30 JUL. 1976
P. A. M. CURELL SUÑER

M. Curell Suñer