



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 188 412**

② Número de solicitud: 200102502

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 1/20

/(C12N 1/20

C12R 1:01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **13.11.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2003**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2003

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**
Edificio CACTUS - CITT - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑦ Inventor/es: **Santos Rodríguez, Ysabel;**
Pazos Álvarez, Francisco y
Cepeda Pereira, Catalina

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Preparación de medios de cultivo Agar y Caldo *Tenacibaculum maritimum* (Agar TM y Caldo TM).**

⑤ Resumen:

Preparación de medios de cultivo Agar y Caldo *Tenacibaculum maritimum* (Agar TM y Caldo TM) para el aislamiento y cultivo de la bacteria *Tenacibaculum maritimum* causante de la enfermedad Tenacibaculosis marina que afecta a peces cultivados en agua de mar a nivel mundial. El medio Agar *Tenacibaculum maritimum* se prepara por disolución en agua destilada de una mezcla definida de sales, peptona bacteriológica, extracto de levadura y Agar bacteriológico. El medio Caldo *Tenacibaculum maritimum* se prepara por disolución en agua destilada de una mezcla definida de sales, peptona bacteriológica y extracto de levadura. El medio Agar *Tenacibaculum maritimum* puede ser utilizado para el aislamiento de *Tenacibaculum maritimum* a partir de peces, agua de mar y sedimento; y el medio Caldo *Tenacibaculum maritimum* puede utilizarse para el enriquecimiento de las muestras o la obtención de masa celular.

ES 2 188 412 A1

DESCRIPCION

Preparación de medios de cultivo Agar y Caldo *Tenacibaculum maritimum* (Agar TM y Caldo TM).

La Tenacibaculosis (antes Flexibacteriosis) marina, causada por la especie *Tenacibaculum maritimum* (antes *Flexibacter maritimus*), es una de las enfermedades bacterianas más importantes que afectan a peces marinos a nivel mundial. Este microorganismo presenta un estricto requerimiento de sales inorgánicas para su crecimiento que no puede ser cubierta mediante la simple adición de NaCl a los medios de cultivo preparados en agua dulce. La presencia en el medio de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} favorece el crecimiento del microorganismo, mientras que el SO_4^{+2} es ligeramente inhibitorio. Por todo ello, para el aislamiento de este microorganismo se ha sugerido el uso de medios no selectivos con bajo contenido en nutrientes como son el medio Anacker y Ordal Agar (AOA) (Anacker y Ordal, 1959. Journal of Bacteriology 78: 25-32), o modificaciones del mismo como el medio Triptona-Casaminoácidos-Extracto de Levadura (TCY) (Hikida et al, 1979. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 45: 421-428), o el medio *Flexibacter maritimus* (FMM) (Pazos et al, 1996. Journal of Fish Diseases 19: 193-197). Además de los medios no selectivos antes citados, se ha descrito el medio selectivo para *Flexibacter* sp (SFM), medio de Hsu y Shots, que contiene antimicrobianos (Austin y Austin, 1993. Bacterial Fish Pathogens: Diseases in Farmed and Wild Fish, 2nd edn. Ellis Horwood Ltd, Chichester). Todos estos medios deben ser preparados en agua de mar al 70%.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Pazos et al, 1996 opus cited), indican que los medios SFM y FMM tienen similar capacidad de inhibición de las bacterias marinas heterotróficas, favoreciendo el aislamiento de *T. maritimum*. Sin embargo, el medio SFM tiene la desventaja de contener neomicina y seleccionar sólo las cepas de *T. maritimum* resistentes a este agente quimioterápico. Uno de los principales inconvenientes que presentan todos los medios anteriormente descritos, para su uso rutinario en un laboratorio, es que para su preparación requieren agua de mar, cuya composición y salinidad varía en función de la procedencia geográfica.

Alternativamente, se ha sugerido (Frerichs, 1993. In: "Bacterial Diseases of Fish", ed. by V. English, R. J. Roberts y N. R. Bromage, pp.257-283. Blackwell Scientific Publications, Oxford) el uso del medio comercial Agar Marino (AM), para el aislamiento de *T. maritimum*, y que no requiere agua de mar para su preparación. Sin embargo, nuestros estudios indican que el medio AM al igual que el medio AOA no son los más adecuados para el aislamiento de este microorganismo a partir de tejidos de peces o muestras ambientales puesto que favorecen el crecimiento de otras bacterias marinas heterotróficas que tienen efecto inhibitorio sobre *T. maritimum*.

Otro aspecto destacable es que en los medios AOA, FMM y SFM las colonias bacterianas presentan las características típicas descritas para la especie (color amarillo pálido, planas, de bordes

irregulares y fuertemente adherentes al medio), lo cual facilita la identificación de *T. maritimum*, mientras que en el medio AM las colonias de *T. maritimum* son redondeadas y de color amarillo-anaranjado, lo cual no permite su diferenciación con respecto a otras bacterias marinas pigmentadas.

En base a lo expuesto anteriormente, se puede concluir que para el aislamiento de *T. maritimum* a partir de peces, agua de mar y sedimento, el medio más adecuado es el FMM dado que proporciona un buen crecimiento de la bacteria a la vez que inhibe el de otras bacterias marinas heterotróficas competidoras sin necesidad de utilizar antimicrobianos.

Con el fin de solventar el problema de la variabilidad en composición/salinidad del agua de mar que puede afectar el crecimiento del microorganismo preparamos los dos medios Agar y Caldo de *Tenacibaculum maritimum* (Agar TM y Caldo TM) objeto de la presente invención.

Los medios Agar TM y Caldo TM tienen una composición parecida a la descrita en la patente de número de publicación: ES2139549 para el medio FMM, pero con la excepción de que los medios propuestos no requieren agua de mar para su preparación al incluir una mezcla definida de sales posibilitando su producción industrial y posterior comercialización y, por tanto, el uso de este medio en cualquier parte del mundo. El medio Agar TM puede ser utilizado para el aislamiento del microorganismo a partir de peces o de muestras ambientales (agua de mar o sedimento) y el medio Caldo TM puede emplearse para el enriquecimiento de muestras o la obtención de masa celular.

La comparación de los medios sólidos Agar FM y Agar TM, tanto en condiciones de laboratorio (utilizando cultivos puros de cepas de *T. maritimum*) como en condiciones de campo (muestras de peces, sedimento y agua), indican que el medio Agar TM es de utilidad para el aislamiento de la bacteria con fines de diagnóstico así como para su cultivo rutinario en laboratorio.

La composición de los medios es la siguiente:

Agar TM (g/L)

| | gramos (g) | |
|------------------------|------------|-------------------|
| Peptona bacteriológica | 5,0 | |
| Extracto de Levadura | 0,5 | |
| Cloruro Sódico | 19,4 | |
| Cloruro de Magnesio | 5,9 | |
| Sulfato Sódico | 3,24 | |
| Cloruro Cálcico | 1,8 | |
| Cloruro Potásico | 0,55 | |
| Bicarbonato Sódico | 0,16 | |
| Acetato Sódico | 0,01 | pH Final: 7,4±0,2 |
| Bromuro Potásico | 0,08 | |
| Cloruro de Estroncio | 0,034 | |
| Acido Bórico | 0,022 | |
| Silicato Sódico | 0,004 | |
| Fluoruro Sódico | 0,0024 | |
| Nitrato Amónico | 0,0016 | |
| Fosfato Disódico | 0,008 | |
| Agar bacteriológico | 15 | |
| Total gramos | 51,7 | |

Caldo TM (g/L)

| | gramos (g) | |
|------------------------|------------|-------------------|
| Peptona bacteriológica | 5,0 | |
| Extracto de Levadura | 0,5 | |
| Cloruro Sódico | 19,4 | |
| Cloruro de Magnesio | 5,9 | |
| Sulfato Sódico | 3,24 | |
| Cloruro Cálcico | 1,8 | |
| Cloruro Potásico | 0,55 | |
| Bicarbonato Sódico | 0,16 | |
| Acetato Sódico | 0,01 | pH Final: 7,4±0,2 |
| Bromuro Potásico | 0,08 | |
| Cloruro de Estroncio | 0,034 | |
| Acido Bórico | 0,022 | |
| Silicato Sódico | 0,004 | |
| Fluoruro Sódico | 0,0024 | |
| Nitrato Amónico | 0,0016 | |
| Fosfato Disódico | 0,008 | |
| Total gramos | 36,7 | |

*Modo de preparación**Medio Agar Tenacibaculum maritimum (Agar TM)*

Suspender 51,7 gramos del Agar TM en un litro de agua destilada. Disolver por calentamiento agitando constantemente y hervir durante 1 min. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio preparado es de color ámbar claro y transparente.

Medio Caldo Tenacibaculum maritimum (Caldo TM)

Suspender 36,7 gramos del Caldo TM en un litro de agua destilada. Disolver por calentamiento agitando constantemente y hervir durante 1 min. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio preparado es de color ámbar claro y transparente.

Los medios Agar TM y Caldo TM deben almacenarse a temperaturas de 2-8°C, debido a que son altamente higroscópicos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Preparación de medios de cultivo Agar y Caldo *Tenacibaculum maritimum* (Agar TM y Caldo TM) **caracterizado** por la disolución en agua destilada de peptona bacteriológica, extracto de levadura y sales en cantidades definidas para su aplicación en el aislamiento y cultivo de *Tenacibaculum maritimum*.

2. Preparación de medio de cultivo Agar *Tenacibaculum maritimum* (Agar TM), según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la composición en gramos por litro es: Peptona bacteriológica (5), Extracto de levadura (0,5), Cloruro Sódico (19,4), Cloruro de Magnesio (19), Sulfato sódico (3,24), Cloruro Cálculo (1,8), Cloruro Potásico (0,55), Bicarbonato Sódico (0,16), Acetato Sódico

(0,01), Bromuro Potásico (0,08), Cloruro de Estroncio (0,034), Acido Bórico (0,022), Silicato Sódico (0,004), Fluoruro Sódico (0,0024), Nitrato Amónico (0,0016), Fosfato Disódico (0,008), Agar bacteriológico (15).

3. Preparación de medio de cultivo Caldo *Tenacibaculum maritimum*, (Caldo TM), según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la composición en gramos por litro es: Peptona bacteriológica (5), Extracto de levadura (0,5), Cloruro Sódico (19,4), Cloruro de Magnesio (5,9), Sulfato sódico (3,24), Cloruro Cálculo (1,8), Cloruro Potásico (0,55), Bicarbonato Sódico (0,16), Acetato Sódico (0,01), Bromuro Potásico (0,08), Cloruro de Estroncio (0,034), Acido Bórico (0,022), Silicato Sódico (0,004), Fluoruro Sódico (0,0024), Nitrato Amónico (0,0016), Fosfato Disódico (0,008).

5

10

15

20

25

30

35

40

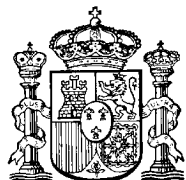
45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | PAZOS, F. et al. Evolution of media for succesful culture of Flexibacter maritimus. Journal of Fish Diseases, 1996, Vol. 19, páginas 193-197. | 1 |
| A | | 2,3 |
| X | DESOLME, B. y BERNARDET, J.F. Freeze-drying of Flavobacterium columnare, Flavobacterium psychrophilum and Flexobacter maritimus. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, Vol. 27, páginas 77-80. | 1 |
| A | US 5587313 A (WEINER et al.) 24.12.1996, todo el documento. | 1-3 |
| A | GB 1234226 A (AQUARIUM SYSTEMS INC.) 03.06.1971, todo el documento. | 2-3 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

17.01.2003

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1