



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 164 536**

②① Número de solicitud: 009901455

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 1/20  
C12Q 1/24

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **30.06.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

Fecha de concesión: **12.03.2003**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2003**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.04.2003**

⑦③ Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
Patio de Escuelas Menores, 1  
37007 Salamanca, ES

⑦② Inventor/es: **Velázquez Pérez, Encarnación;**  
**Martínez Molina, Eustaquio;**  
**Mateos González, Pedro F. y**  
**Chordi Corbo, Andrés**

⑦④ Agente: **Dávila Baz, Angel**

⑤④ Título: **Procedimiento para el aislamiento y crecimiento de bacterias capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para el aislamiento y crecimiento de bacterias capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono, en muestras de procedencia humana, animal, vegetal, industrial o medioambiental y, en general, de cualquier tipo de muestras. Comprende las etapas de (i) sembrar un medio de cultivo que incluye: manitol, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, extracto de levadura, triptona, sales minerales, vitaminas, bien con una suspensión densa de la muestra o bien directamente con la propia muestra o con una colonia bacteriana aislada de dicha muestra; e ii) incubar el medio de cultivo así sembrado a la temperatura óptima de crecimiento para cada cepa bacteriana a estudiar.

ES 2 164 536 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Procedimiento para el aislamiento y crecimiento de bacterias capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.

La presente invención se refiere a un procedimiento para aislar y hacer crecer bacterias de la Familia Rhizobiaceae presentes en cualquier tipo de muestras.

El procedimiento según la presente invención es susceptible de ser aplicado en el aislamiento de bacterias de la Familia Rhizobiaceae y cualquier otra bacteria capaz de utilizar el manitol como fuente de carbono, en cualquier tipo de muestras ya sean de procedencia humana, animal, vegetal, industrial o medioambiental, siendo utilizable por lo tanto en todos los centros de estudio, diagnóstico, análisis o investigación que trabajan o pueden aislar este tipo de bacterias.

Actualmente estas bacterias se aíslan en diferentes medios de cultivo cuyo nexo de unión es la presencia de manitol como fuente de carbono aunque no exclusivamente, pero cuyas composiciones en cuanto al resto de los componentes es muy diversa y muchas veces no permite el correcto crecimiento de todos los microorganismos de estos grupos por carecer de algunos nutrientes, lo que hace que se recurra a la utilización de medios complejos de preparación.

La presente invención solventa ese problema incluyendo en el medio de cultivo todos los componentes esenciales necesarios para que puedan crecer todas las especies descritas en la Familia Rhizobiaceae y que también puede ser utilizado para el crecimiento de otras especies que utilicen el manitol como fuente de carbono.

Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para aislar y crecer bacterias de la Familia Rhizobiaceae presentes en cualquier tipo de muestras y que utilizan manitol como fuente de carbono caracterizado porque comprende las etapas de:

(i) Sembrar un medio de cultivo que incluye: manitol, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, extracto de levadura, triptona, sales minerales, vitaminas, bien con una suspensión densa de la muestra o bien directamente con la propia muestra o con una colonia bacteriana aislada de dicha muestra; y

(ii) incubar el medio de cultivo así sembrado a la temperatura óptima de crecimiento para cada cepa bacteriana a estudiar.

Concretamente, el procedimiento de la invención es aplicable al aislamiento y al crecimiento de las siguientes bacterias:

- **Rizobios:** *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Alorhizobium*, *Bradyrhizobium* y, en general, todas las bacterias que forman nódulos en las raíces de plantas.

- **Aarobacterias:** *Agrobacterium* y, en general, todas las bacterias capaces de formar tumores en plantas.

- **Filobacterias:** *Phyllobacterium* y, en general, todas las bacterias capaces de formar nódulos en las hojas de plantas.

- **Azobacterias:** *Azotobacter*, *Derrxia*, *Beyerinckia* y, en general, todas las bacterias fijadoras de

nitrógeno que sean capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.

Igualmente, el procedimiento de la invención es aplicable al crecimiento de las siguientes bacterias:

- **Pseudomonas:** *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, en general, todas las bacterias capaces Gram negativas aerobias capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono,

- **Corinebacterias:** *Clavibacter* y, en general, todas los Bacilos Gram positivos no esporulados que sean capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.

- **Bacilos esporulados:** *Bacillus* y, en general, todos los bacilos Gram positivos esporulados que sean capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.

- **Estafilococos:** *Staphylococcus aureus* y, en general, todos los cocos Gram positivos que sean capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.

- **Levaduras:** todas las levaduras que sean capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono.

De acuerdo con la invención, el medio de cultivo comprende los siguientes componentes en las siguientes proporciones

- Manitol como fuente de carbono	0,7-1 %
- Fosfato monopotásico	0,01-0,02 %
- Fosfato dipotásico	0,005-0,01 %
- Extracto de levadura	0,2-0,4 %
- Triptona	0,1-0,2 %
- Sales minerales	<0,01 %
- Vitaminas	<0,01 %

Para facilitar el crecimiento se utilizarán vitaminas predominantemente grupo B, pantotenato y ácido nicotínico. Asimismo se añadirán soluciones de sales minerales en cantidades traza que aportan potasio, fósforo, magnesio, calcio, cloruros, sodio, sulfatos, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y/o boro.

Cuando se trate de medios sólidos se añadirá agar al 1,5-2,5 %.

Por último se indica que el medio de cultivo utilizado en el procedimiento de la invención puede presentarse en placas Petri, tubos, microtubos, microplacas o cualquier otro soporte miniaturizado o no.

A continuación, la invención es ilustrada por el siguiente ejemplo no limitativo.

## Ejemplo 1

Se procede al aislamiento de rizobios a partir de nódulos presentes en raíces de leguminosas, dichos nódulos se esterilizan en superficie y se machacan con una varilla de vidrio estéril sobre una gota de agua estéril. Con la misma varilla se efectúa la siembra de acuerdo a las especificaciones de la patente, teniendo en cuenta que los microorganismos obtenidos a partir de la muestra requieren la utilización de placas de Petri con medio sólido, por lo que se añade a dicho medio de cultivo agar al 1,5-2,5 %. Sembradas las placas,

se incuban durante varios días a 28°C. A continuación se coge una colonia aislada y se vuelve a sembrar en el mismo medio de cultivo, las colo-

nias de rizobios en este medio sólido son mucosas y blanquecinas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aislar y cultivar bacterias que utilizan el manitol como fuente de carbono en muestras de procedencia humana, animal, vegetal, industrial o medioambiental y, en general, de cualquier tipo de muestras, **caracterizado** porque comprende las etapas de:

- (i) Sembrar un medio de cultivo que incluye: manitol, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, extracto de levadura, triptona, sales minerales, vitaminas, bien con una suspensión densa de la muestra o bien directamente con la propia muestra o con una colonia bacteriana aislada de dicha muestra;
- (ii) incubar el medio de cultivo así sembrado a la temperatura óptima de crecimiento para cada cepa bacteriana a estudiar.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo comprende los siguientes componentes en las siguientes proporciones:

- manitol	0,7-1 %
- fosfato monopotásico	0,01-0,02 %
- fosfato dipotásico	0,005-0,01 %
- extracto de levadura	0,2-0,4 %
- triptona	0,1-0,2 %
- sales minerales	< 0,01 %
- vitaminas	< 0,01 %

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo se presenta en estado sólido, semisólido o líquido.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque cuando el citado medio de cultivo es sólido, se le añade agar entre el 1,5-2,5 %.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la fuente de nitrógeno orgánica asimilable por las bacterias se encuentra en unos límites de 0,3-0,6 %

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque las sales minerales que componen el medio de cultivo aportan potasio, fósforo, magnesio, calcio, cloruros, sodio, sulfatos, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y/o boro.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque las vitaminas que componen el medio de cultivo son del grupo B, pantotenato y ácido nicotínico.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el medio de cultivo se presenta en placas Petri, tubos, microtubos, microplacas o cualquier otro soporte miniaturizado o no.

9. Aplicación del procedimiento según la reivindicación 1 a 8 en aislamiento y crecimiento de las siguientes bacterias: Rizobios, Agrobacterias, Filobacterias y Azobacterias.

10. Aplicación del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8 en el crecimiento de las siguientes bacterias: Pseudomonas, Corinebacterias, Bacilos esporulados, Estafilococos y Levaduras.



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 1/20, C12Q 1/24

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2099679 A (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 16.05.1997, página 3, línea 55 - página 5, línea 30.	1-10
Y	CARLYLE JORDAN en "Bergey's manual of systematic bacteriology", Baltimore (USA), Williams y Wilkings, 1986, Volumen 1, páginas 234-242.	1-10
A	REDDY N. et al. "Nutritional factors affecting growth and production of anti microbial substances by streptococcus-lactis-ssp-diacetylactis S-1-67-C". 1983. J. Food. Prot., Vol. 46 (6), páginas 514-517.	1,2
A	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 1980-74015C [42], JP 55-076874 A (KITASATO RES. INST.) 28.04.1981, resumen.	1,2
A	EP 872545 A (MIYAMOTO) 21.10.1998, página 11, líneas 22-25.	1,2

#### 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

18.01.2002

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1