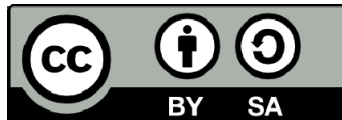




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Aislamiento y caracterización
de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de distintos
habitats: aspectos ecológicos y sanitarios**

Ana M^a Marqués Villavecchia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

R. 446.302

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE Pseudomonas
aeruginosa PROCEDENTES DE DISTINTOS HABITATS :
ASPECTOS ECOLOGICOS Y SANITARIOS

Memoria presentada para
optar al grado de doctor
en Farmacia

Ana Marques

Ana M^a MARQUES VILLAVECCHIA
Barcelona, Mayo 1982

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083939

5.4. TOLERANCIA A LOS METALES PESADOS

En la TABLA 44 se especifican los resultados de las CMI obtenidos con las cepas de P. aeruginosa frente a los diferentes niveles de mercurio en forma de $HgCl_2$, así como las medias correspondientes a los diferentes orígenes. Las medias de las CMI de las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, productos patológicos, aguas superficiales terrestres y fangos de depuradoras son comparables ($t=0,91$; g.l.=559; $\alpha=0,50$). Las cepas con la media más baja pertenecen a muestras de suelos y las que la tienen más alta proceden de aguas marinas. En estos dos grupos existe una diferencia significativa respecto a la media hallada en el grupo de cepas anteriormente descrito ($\epsilon=5,19$; $\alpha < 0,001$ y $\epsilon=4,43$; $\alpha < 0,001$ respectivamente).

Para relacionar estos resultados, se hizo necesario un análisis previo de la varianza, expresado en la TABLA 45, que manifestase la existencia de diferencias significativas entre las CMI. Como el valor hallado de F es superior a $F_{5,559}^5$ leído en la tabla correspondiente para el punto 1%, se verifica que el conjunto de cepas respecto a las CMI tienen comportamientos distintos según su procedencia.

Nº de cepas

CMI ‡	S	A	M	D	H	F	TOTAL
256		29	34	3	1	3	70
128	3	81	17	25	58	5	189
64	2	5	12	1	5	3	28
32	7	4	3	3	1	1	19
16	41	33	3		2	2	81
8	4	54	18	10	35	8	129
4	18	24	1	1	1	4	49
\bar{x}	19,5	83,9	135,7	98,0	81,0	67,1	

TABLA 44 CMI frente al $HgCl_2$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

‡ Concentración expresada en $\mu g/ml$

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$2043143,1 - \frac{(28956)^2}{565} = 559160$	5	111832,18	
Residual	$5416272 - 2043143,1 = 3373128,9$	559	6034,22	18,53
TOTAL	$5416272 - \frac{(28956)^2}{565} = 3932289,82$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{559}^5$

TABLA 45 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al realizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $HgCl_2$.

El estudio de los niveles de resistencia (TABLA 46), mediante la aplicación del índice de Pearson (X^2), pone en evidencia un comportamiento homogéneo al no aparecer diferencias significativas entre las diferentes procedencias estudiadas ($X^2=8,2$; g.l.=5; $\alpha=0,20$).

En la FIGURA 24 se observa que en la curva representativa de las CMI hay dos máximos. Este comportamiento heterogéneo sugiere que en los hábitats estudiados existe una dualidad en la población de P. aeruginosa. Un grupo que alcanza los límites de resistencia a nivel de 8 $\mu\text{g/ml}$ y el otro, más adaptado a los ecosistemas con cargas mercuriales elevadas, que soporta niveles de 128 $\mu\text{g/ml}$.

En la TABLA 47 se señalan los resultados correspondientes a las CMI de la colección de P. aeruginosa respecto al $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{-COO})_2$. En la TABLA 49 se indica el número de cepas de P. aeruginosa resistentes a dicho metal teniendo en cuenta su procedencia. Respecto a las CMI obtenidas según el origen de las cepas, es interesante señalar la existencia de cuatro grupos al observar las medias. El hábitat que presentó una media más baja es el que está formado por bacterias aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos. La diferencia de los resultados

TABLA 46

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al HgCl_2 según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	53	75
A	152	230
M	69	88
D	32	43
H	67	103
F	14	26
TOTALES	387	565

Nº de cepas

CMI ‡	S	A	M	D	H	F	TOTAL
6400	4	42	23	42	44		155
3200	71	188	65	1	59	26	410
\bar{x}	3370,7	3784,3	4036,4	6325,6	4567,0	3200	

TABLA 47 CMI frente al $Pb(CH_3-COO)_2$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

‡ Concentración expresada en $\mu g/ml$.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>G.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$754827617,2 - \frac{(496000)^2}{565} = 319401068,6$	5	63880213,72	
Residual	$1546296608 - 754827617,2 = 79146899,1$	559	1415865,81	45,11
TOTAL	$1546296608 - \frac{(496000)^2}{565} = 110870060$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{5,559}^5$

TABLA 48 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al realizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $Pb(CH_3-COO)_2$.

TABLA 49

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{-COO})_2$ según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

no es significativa si se compara con los datos obtenidos con las cepas aisladas a partir de suelos ($t=0,63$; g.l.=559; $\alpha=0,90$). La media de las CMI hallada para las cepas procedentes de aguas superficiales terrestres y aguas marinas es superior y significativa respecto al grupo anterior ($\xi=5,51$; $\alpha<0,001$). La media más elevada corresponde a las bacterias aisladas de fangos de depuradoras y, aunque le sigue el resultado hallado con las cepas aisladas a partir de muestras hospitalarias, sus distribuciones son distintas ($\xi=10,13$; $\alpha<0,001$), puesto que de 43 P. aeruginosa aisladas de fangos de depuradoras, 42 presentan una CMI que encaja a nivel de 6400 $\mu\text{g/ml}$. En cambio, la distribución interna de P. aeruginosa entre bacterias hospitalarias presenta claramente dos grupos, 44 cepas tienen un nivel de 6400 $\mu\text{g/ml}$ y 59 de 3200 $\mu\text{g/ml}$. Hay que señalar que entre las cepas procedentes del medio acuático y las procedentes de productos patológicos existe una diferencia significativa ($\xi=4,22$; $\alpha<0,001$).

La curva de la distribución de la CMI presenta un comportamiento de resistencia que se ajusta a un modelo genético homogéneo, con un pico mayoritario a nivel de 3200 $\mu\text{g/ml}$ y con valores mínimos a 1600 $\mu\text{g/ml}$ y 12800 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 25).

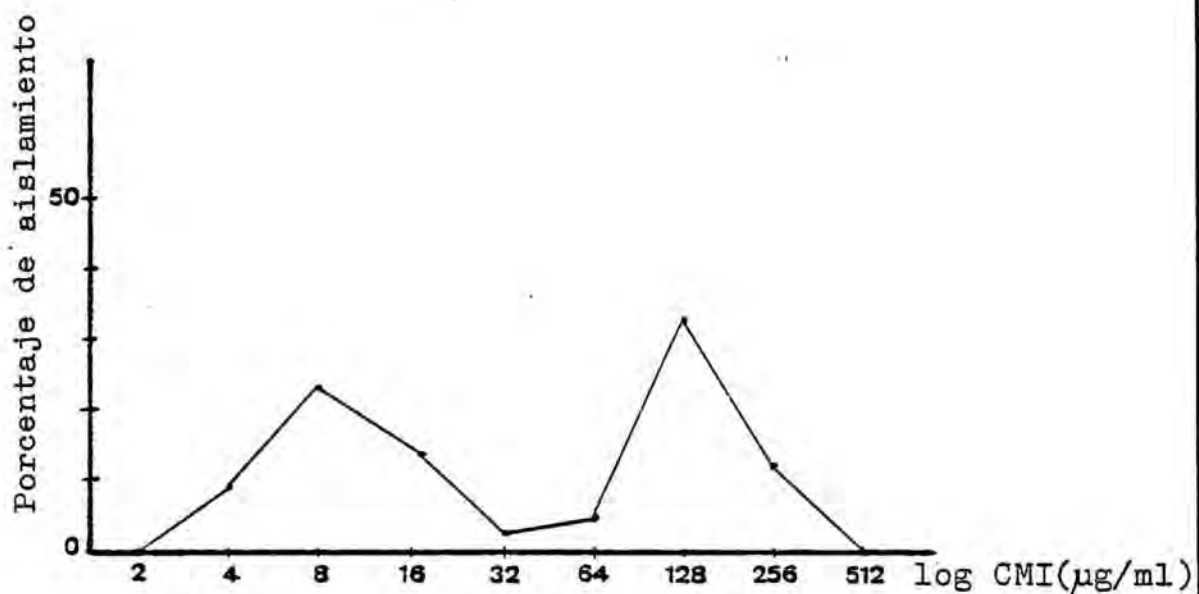


FIGURA 24 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al HgCl_2

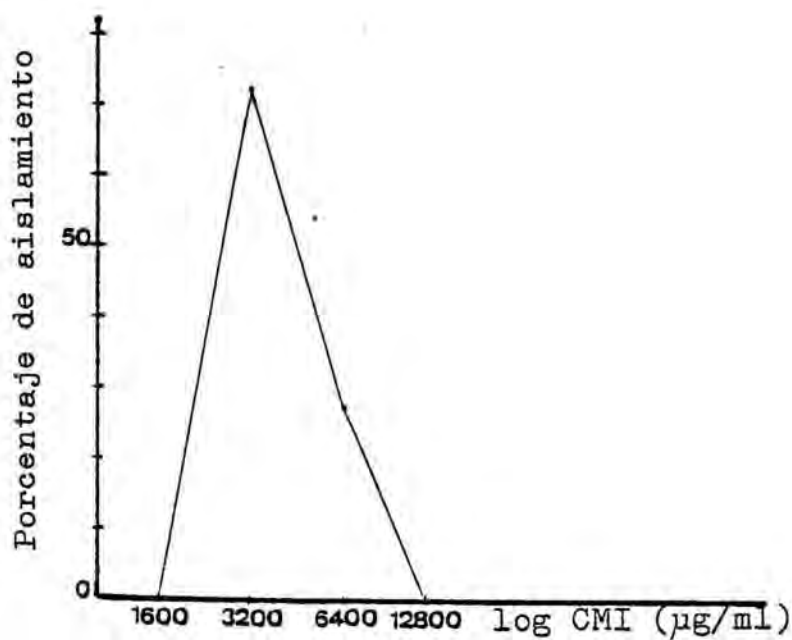


FIGURA 25 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{-COO})_2$

En la TABLA 48 se especifica el análisis de la varianza de los valores obtenidos al realizar la CMI de las 565 cepas de P. aeruginosa frente al acetato de plomo. El valor de F, de acuerdo con las tablas, es superior al valor F_{559}^5 descrito en la tabla de F "punto 1%", comprobándose una diferencia significativa entre las medias de las CMI.

En definitiva, cuando se consideran los resultados de la TABLA 49, puede comprobarse que todas las cepas con las que se ha realizado este trabajo son resistentes a una concentración de 1600 $\mu\text{g/ml}$ de acetato de plomo.

El efecto de la plata sobre el grupo de P. aeruginosa se manifiesta, como indica la FIGURA 26, en una curva de distribución de la CMI en la que aparece un pico de máxima inhibición a 32 $\mu\text{g/ml}$. Esta distribución gaussiana tiene unos extremos que oscilan entre 8 $\mu\text{g/ml}$ y 128 $\mu\text{g/ml}$, comportándose todas las cepas como sensibles (TABLA 52).

En la TABLA 50 se describen los valores de las CMI, el número de cepas que lo alcanzan, así como la media correspondiente a cada grupo de microorganismos. Como puede observarse, las bacterias procedentes de aguas superficiales

Nº de cepas

CMI*	S	A	M	D	H	F	TOTAL
64	14	99	19		8		140
32	28	111	62	43	93	11	348
16	33	20	7		2	15	77
\bar{x}	30,9	44,4	37,6	32	34,2	22,8	

TABLA 50: CMI frente al AgNO_3 de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

* Concentración expresada en $\mu\text{g/ml}$.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>E.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$159,55 - \frac{(203)^2}{565} = 86,61$	5	17,32	20,28
Residual	$637 - 159,55 = 477,45$	559	0,85	
TOTAL	$637 - \frac{(203)^2}{565} = 564,07$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{5,559}^5$

TABLA 51 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al AgNO_3 .

TABLA 52

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al AgNO_3 según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	0	75
A	0	230
M	0	88
D	0	43
H	0	103
F	0	26
TOTALES	0	565

terrestres presentan el mayor índice de resistencia respecto a la media obtenida ($\bar{E}=5,93$; $\alpha < 0,001$). Dentro de este nivel de resistencia se encuentran las cepas procedentes de aguas litorales, con una media de $37,6 \mu\text{g/ml}$. y las procedentes de productos patológicos, correspondiendo en esta ocasión la media de $34,2 \mu\text{g/ml}$. La media más baja la presentan las P. aeruginosa procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Como quiera que las cepas procedentes de muestras de suelos y fangos de depuradoras alcanzan unas medias de sus CMI muy semejantes ($\bar{E}=0,52$; $\alpha = 0,60$), se ha procedido a la verificación estadística entre la media obtenida en este hábitat y la hallada en las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, evidenciándose una diferencia significativa ($t=2,67$; g.l.=559; $\alpha = 0,01$). El tratamiento estadístico de la distribución de las CMI, según la procedencia de las cepas, se expresa en la TABLA 51. Con un análisis de la varianza se ha podido constatar una diferencia significativa al 1% ($F_{559}^5 = 4,10$; $F=20,28 > F_{559}^5$).

Puede confirmarse que el comportamiento con el cadmio es más homogéneo, porque en la curva de distribución de las CMI la mayoría de las cepas se hallan comprendidas entre los

valores 1600 y 6400 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 27). Los valores medios de resistencia a este metal con respecto a su CMI alcanzan los niveles más altos con los aislamientos procedentes de fangos de depuradoras ($\epsilon=6,94$; $\alpha<0,001$) y, en segundo lugar y de una manera nítida, aparece un grupo constituido por aislamientos procedentes de productos patológicos y muestras de suelos. Los valores medios de resistencia al cadmio se han verificado a partir de los aislamientos de aguas superficiales y litorales, constituyendo un tercer grupo con niveles de $\bar{x}=3222,6 \mu\text{g/ml}$ y $\bar{x}=3781,8 \mu\text{g/ml}$ respectivamente ($\epsilon=7,12$; $\alpha<0,001$). Llama la atención el bajo índice de resistencia al cadmio que se encuentra en las P. aeruginosa aisladas a partir de productos farmacéuticos no estériles y alimentos ($t=4,04$; g.l.=559; $\alpha<0,001$)(TABLA 53).

El tratamiento estadístico de las CMI basado en el análisis de la varianza señala la existencia de diferencias significativas (TABLA 54). Finalmente es interesante señalar la detección de una cepa sensible a niveles comprendidos entre 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$ (TABLA 55).

El cinc en forma de sulfato presenta la zona de máxima actividad entre 3200 y 6400 $\mu\text{g/ml}$ de dicha sal; este

Nº de cepas

CMI*	S	A	M	D	H	F	TOTAL
6400	49	78	40	42	73		282
1600	26	151	48	1	30	26	282
400		1					1
\bar{x}	4736	3222,6	3781,8	6288,4	5001,9	1600	

TABLA 53 CMI frente al $CdCl_2$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

* Concentración expresada en $\mu g/ml$.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>G.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$3899270056 - \frac{(1352400)^2}{565} =$ $= 662127118$	5	132425423,6	28,47
Residual	$6498720000 - 3899270056 =$ $= 2599449944$	559	4650178,79	
TOTAL	$6498720000 - \frac{(1352400)^2}{565} =$ $= 3261577026$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{559}^5$

TABLA 54 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al realizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $CdCl_2$.

TABLA 55

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al CdCl_2 según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	229	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	564	565

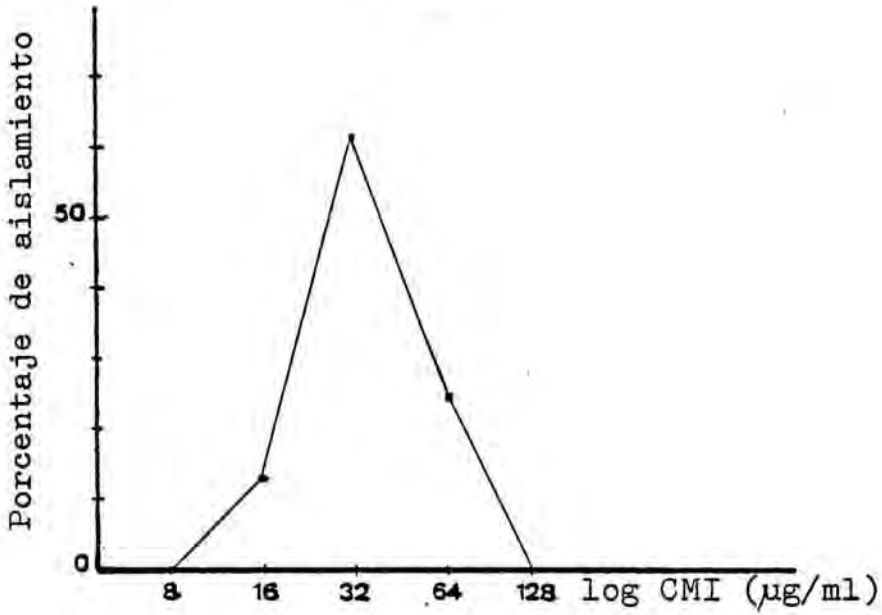


FIGURA 26 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al AgNO₃

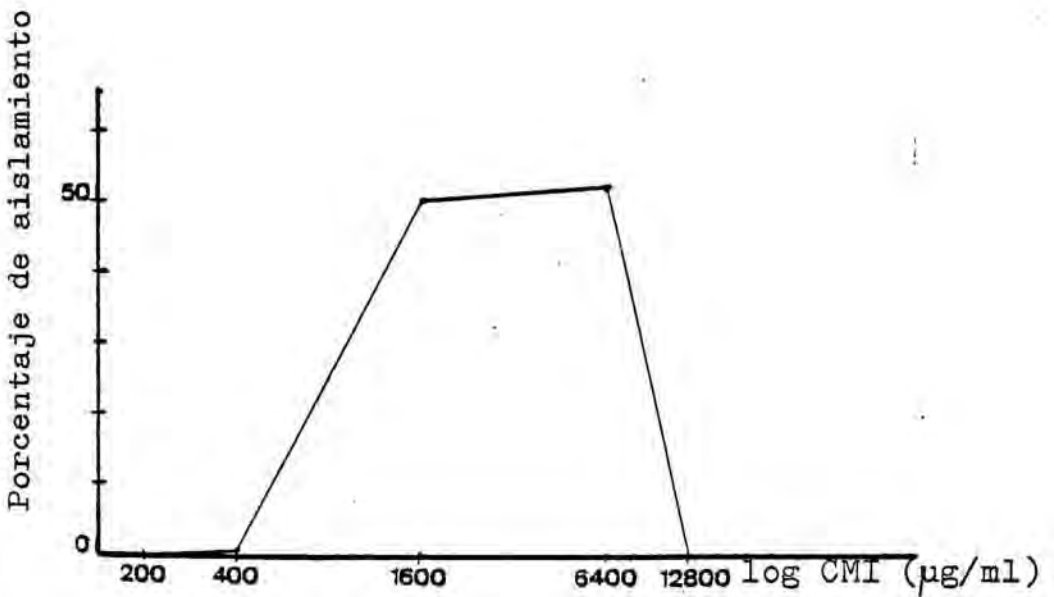


FIGURA 27 Curva de distribución de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI) frente al CdCl₂

hecho se pone en evidencia en la FIGURA 28. La distribución de las CMI de las cepas según su procedencia (TABLA 56) pone de manifiesto unas diferencias ($F > F_{559}^5$; $\alpha < 0,001$) (TABLA 57). Las medias de las CMI halladas sitúan a los microorganismos procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos y de muestras de suelos como los más sensibles ($E=4,89$; $\alpha < 0,001$), teniendo las cepas aisladas de muestras de aguas litorales un comportamiento similar. La población más resistente es la formada por las cepas aisladas de fangos de depuradoras ($E=4,57$; $\alpha < 0,001$), donde todos los microorganismos han presentado una CMI de 6400 $\mu\text{g/ml}$. Seguidamente se hallan las cepas superficiales terrestres, entre cuyas medias el tratamiento estadístico ha puesto en evidencia una diferencia significativa ($E=4,43$; $\alpha < 0,001$).

Es interesante destacar que la producción de pigmento por las cepas de *P. aeruginosa*, al crecer en presencia de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se ve ligeramente alterada respecto a su tonalidad, tal como se puede observar en la FIGURA 29. Al producirse éste durante el crecimiento de los microorganismos, adquiere una coloración marcadamente más pálida.

Nº de cepas

CMI*	S	A	M	D	H	F	TOTAL
6400	4	138	17	43	84		286
3200	52	87	71		19	26	255
1600	16	5					21
800	3						3
\bar{x}	2933,3	5085,2	3818,2	6400	5809,7	3200	

TABLA 56 CMI frente al $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

* Concentración expresada en $\mu g/ml$.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$199820,22 - \frac{(8744)^2}{565} =$ $= 64497,14$	5	12899,42	72,0
Residual	$299968 - 199820,22 =$ $= 100147,78$	559	179,15	
TOTAL	$299968 - \frac{(8744)^2}{565} =$ $= 164644,93$	564		

Para un riesgo de error del 1%. $F > F_{559}^5$

TABLA 57 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.



FIGURA 29 Variación en la tonalidad del pigmento producido por P. aeruginosa al crecer en presencia de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Finalmente al considerar los resultados de la TABLA 58 se comprueba que la mayoría de las cepas de P. aeruginosa aisladas en este trabajo han demostrado resistencia al crecer a concentraciones de 800 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de cinc o superiores, salvo tres microorganismos aislados de muestras de suelos.

En la TABLA 59 se expresan los resultados obtenidos frente a la acción del cromo preparado en forma de cromato potásico. Las medias de las CMI obtenidas separan tres grupos de comportamiento. Por una parte existen los niveles correspondientes a las cepas aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, fangos de depuradoras, productos patológicos y aguas superficiales terrestres. El segundo grupo está constituido por las bacterias aisladas a partir de aguas marinas con una media de 4259,1 $\mu\text{g/ml}$ ($\epsilon=3,57$; $\alpha=0,001$) y finalmente el grupo más sensible es aquel que presenta una media de 3520 $\mu\text{g/ml}$ y que corresponde a suelos ($\epsilon=1,96$; $\alpha=0,05$). En este caso puede observarse que la barrera límite crítica queda establecida a nivel de 6400 $\mu\text{g/ml}$, como muy bien se señala en la curva de la distribución de la CMI (FIGURA 30).

TABLA 58

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	72	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	562	565

Nº de cepas

CMI [‡]	S	A	M	D	H	F	TOTAL
12800		1					1
6400	30	165	49	35	82	23	384
1600	45	63	38	8	19	1	174
400		1	1		2	2	6
\bar{x}	3520	5087,0	4259,1	5507,0	5398,1	5753,8	

TABLA 59 CMI frente al K_2CrO_4 de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

[‡] Concentración expresada en µg/ml.

A nivel estadístico puede indicarse que el análisis de la varianza de los valores obtenidos a partir de las CMI muestran la existencia de diferencias significativas entre las cepas de P. aeruginosa agrupadas según sus orígenes (TABLA 60).

En la TABLA 61 se expresa el número de cepas de P. aeruginosa resistentes al cromato potásico según su procedencia. En conjunto se puede observar un comportamiento de elevada resistencia, siendo ligeramente inferior en las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos (método exacto basado en las diferentes configuraciones, $\alpha = 0,05$).

Independientemente, el efecto del cromo se manifiesta por una serie de variaciones morfológicas (FIGURA 31) que a nivel celular se traducen en la aparición de formas filamentosas. Estos cambios se han detectado principalmente en concentraciones del orden de 400 $\mu\text{g/ml}$ y 1600 $\mu\text{g/ml}$.

Para realizar el estudio del efecto del cromo sobre P. aeruginosa se seleccionaron dos cepas, H₂O 102.3 y S 128.3. Estos microorganismos se caracterizan por la alteración en la morfología que manifiestan al crecer en

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>E.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$628603,4 - \frac{(18472)^2}{565} = 24683,42$	5	4936,68	10,23
Residual	$898144 - 628603,4 = 269540,6$	559	482,18	
TOTAL	$898144 - \frac{(18472)^2}{565} = 294224,03$	564		

Para un riesgo de error del 1%. $F > F_{559}^5$

TABLA 60 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al K_2CrO_4 .

TABLA 61

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al K_2CrO_4 según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	229	230
M	87	88
D	43	43
H	101	103
F	24	26
TOTALES	559	565

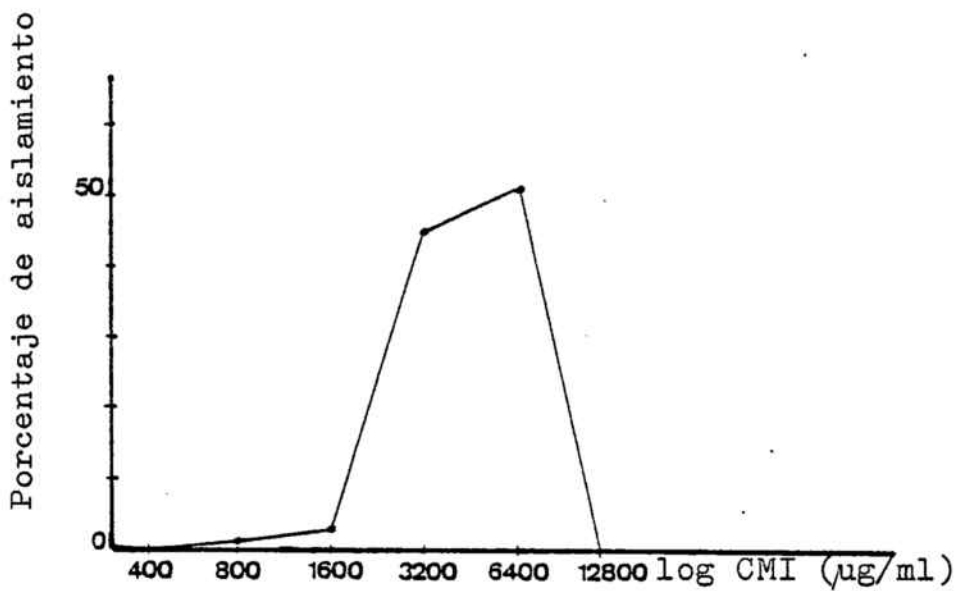


FIGURA 28 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

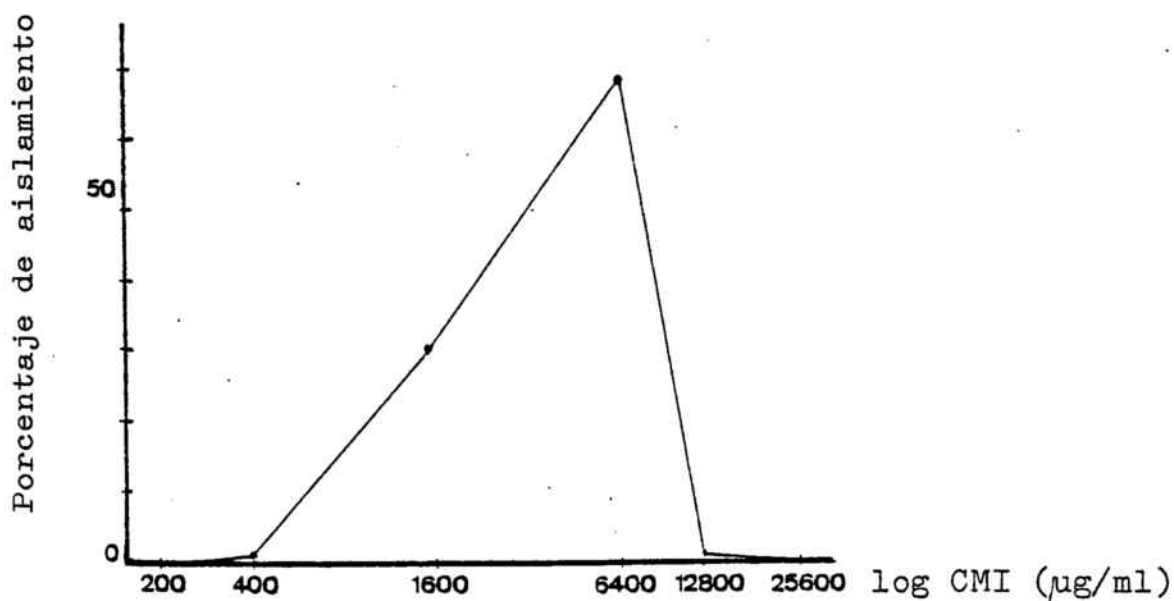


FIGURA 30 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al K_2CrO_4

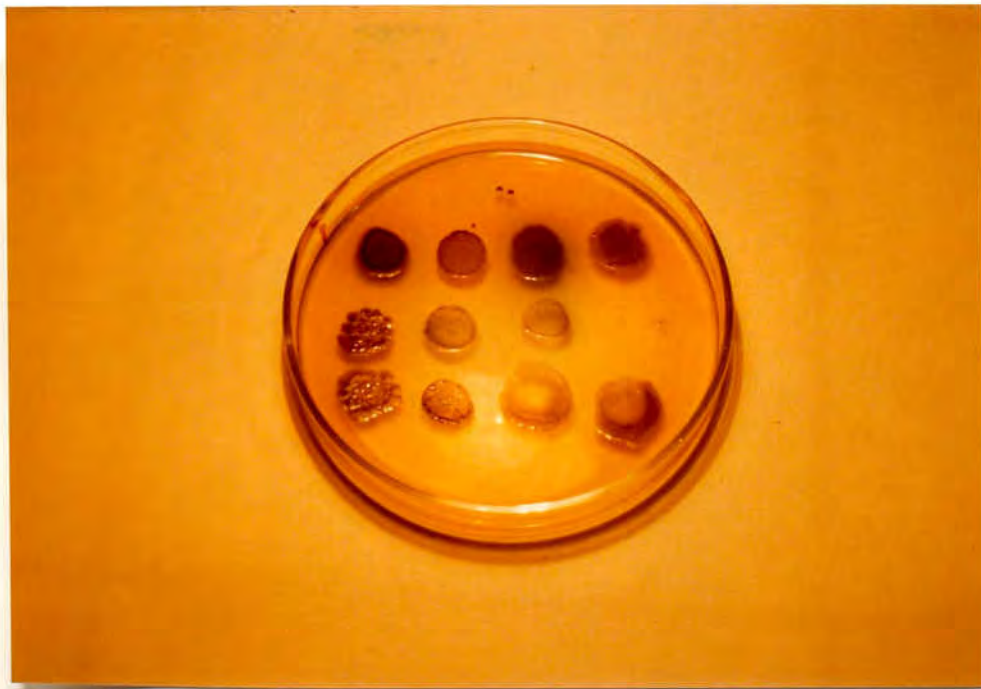


FIGURA 31 Crecimiento de P. aeruginosa en presencia de 400 µg/ml de K_2CrO_4 .

presencia de Cr^{6+} y por su capacidad de desarrollarse a concentraciones de 24000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de esta sal.

Por otra parte y a consecuencia de la actividad metabólica, se forman unos depósitos en las células, incrementándose conforme se eleva la concentración de cromo, fenómeno perfectamente detectable al M.E. por observación directa (FIGURAS 32, 33 y 34). El tratamiento con EDTA no elimina los depósitos inicialmente observados (FIGURAS 35 y 36).

Las variaciones que se producen en la concentración de Cr^{6+} del medio. al crecer *P. aeruginosa* se determinan por colorimetría (FIGURAS 37, 38 y 39). Se puede observar que conforme el tiempo de incubación se incrementa se produce un descenso del cromo hexavalente del medio. Este descenso no está relacionado con la concentración de cromato potásico a que ha sido sometido el microorganismo antes de realizar el ensayo, ni con la concentración empleada del mismo. La adición de H_2O_2 al cultivo de 72 horas pone en evidencia una recuperación de los niveles de Cr^{6+} .

Uno de los factores que influyen en la metabolización del K_2CrO_4 es la concentración de glucosa existente en el me-

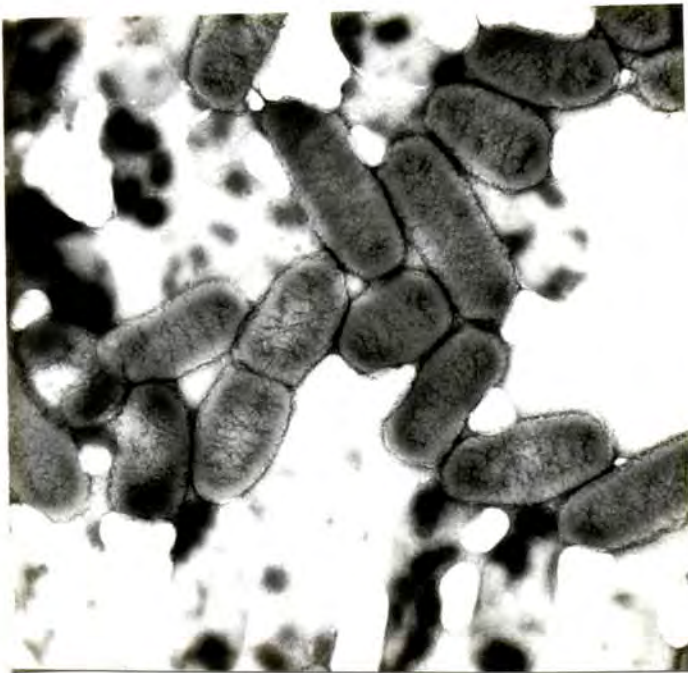


FIGURA 32 Observación directa al M.E. de la cepa H₂O 102.3, según la técnica descrita por BEVERIDGE y MURRAY (1980). Aumento realizado 5400 x 3,2.

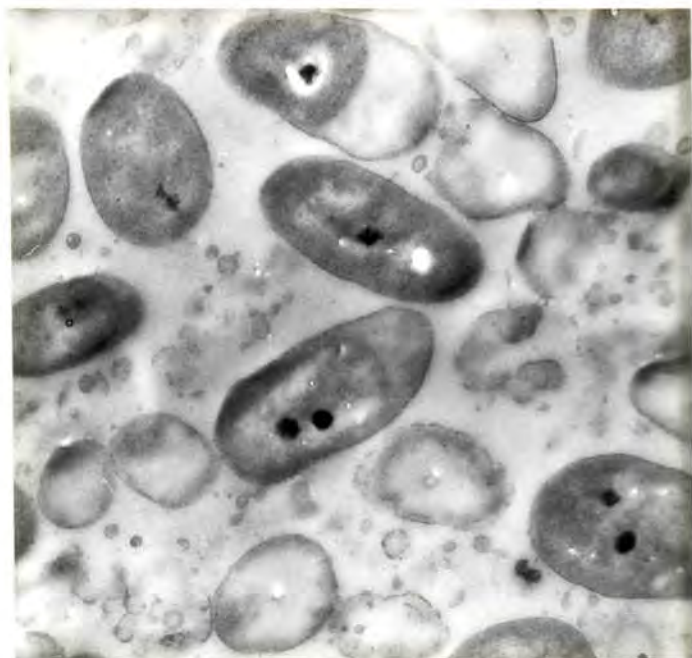


FIGURA 33 Observación directa al M.E. de la cepa H₂O 102.3 procedente de un cultivo con 1600 $\mu\text{g/ml}$ de K_2CrO_4 . Aumento realizado 11200 x 3,2.



FIGURA 34 Observación directa al M.E. de la cepa H₂O 102.3 procedente de un cultivo con 19200 $\mu\text{g/ml}$ de K_2CrO_4 . Aumento realizado 2,8 x 1000 x 3,4.



FIGURA 35 P. aeruginosa S 128.3 desarrollada en un medio con 400 µg/ml de K_2CrO_4 . Observación directa al M.E. Aumento realizado 8500 x 3,2.



FIGURA 36 P. aeruginosa S 128.3 desarrollada en presencia de 400 µg/ml de K_2CrO_4 . Observación directa al M.E. previo tratamiento con EDTA. Aumento realizado 8500 x 3,2.

FIGURA 37 Resultados obtenidos en las determinaciones colorimétricas de la metabolización del K_2CrO_4 por la cepa A 102.3, procedente de un subcultivo en presencia de 24000 $\mu\text{g/ml}$ de K_2CrO_4 .

0 h. $r: 0,9973$ —————
 24 h. $r: 0,9948$ —●—●—
 48 h. $r: 0,9966$ - - - - -
 72 h. $r: 0,9920$ —○—○—
 72h.+H₂O₂ $r: 0,9955$ - - - - -

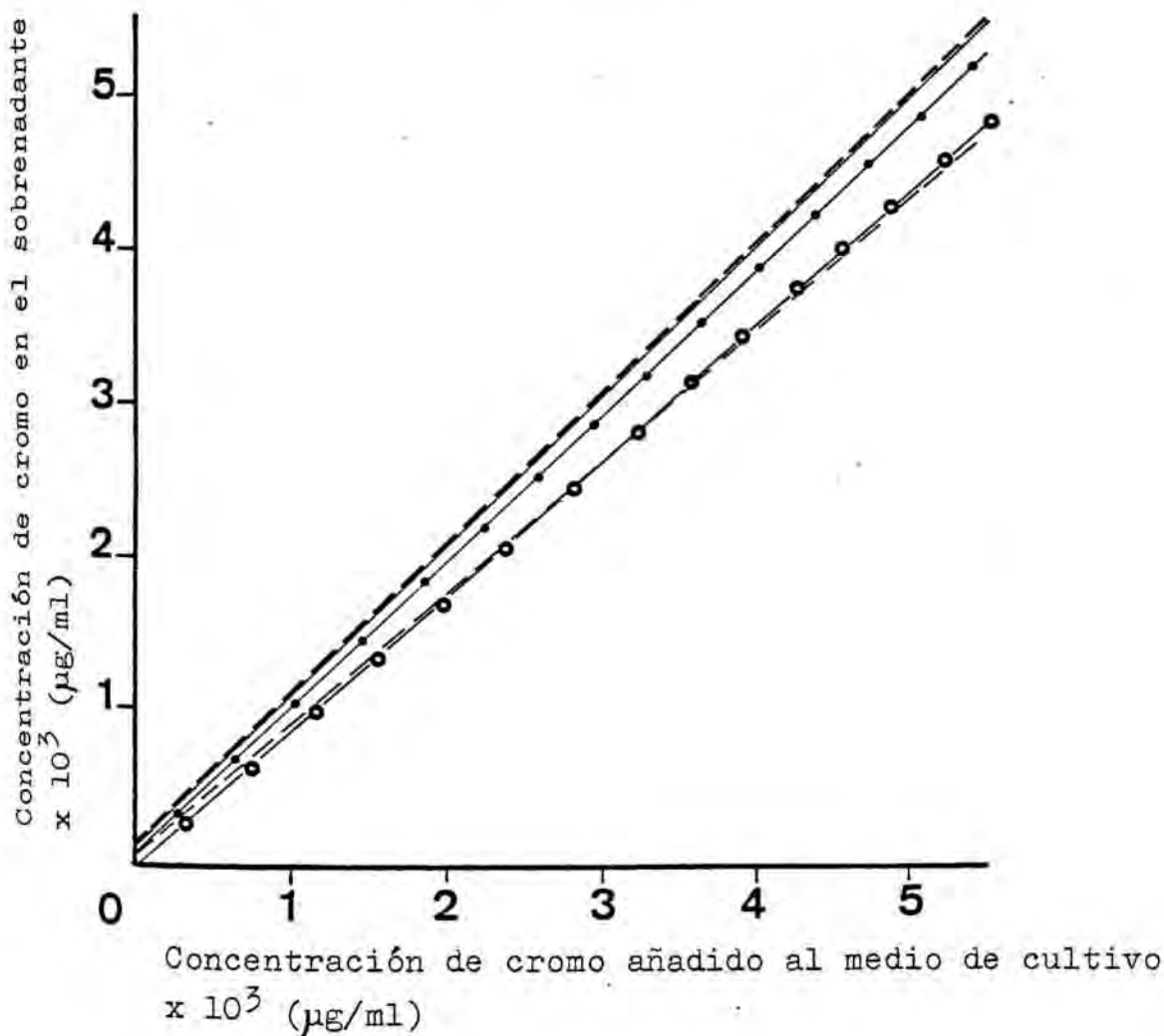


FIGURA 38 Resultados obtenidos en las determinaciones colorimétricas de la metabolización del K_2CrO_4 por la cepa A 102.3, procedente de un subcultivo en presencia de 23200 ug/ml de K_2CrO_4 .

0 h. $r: 0,9970$ —————
 48 h. $r: 0,9625$ - - - - -
 72 h. $r: 0,9828$ - - - - -
 72h.+ H_2O_2 $r: 0,9945$ —○—○—

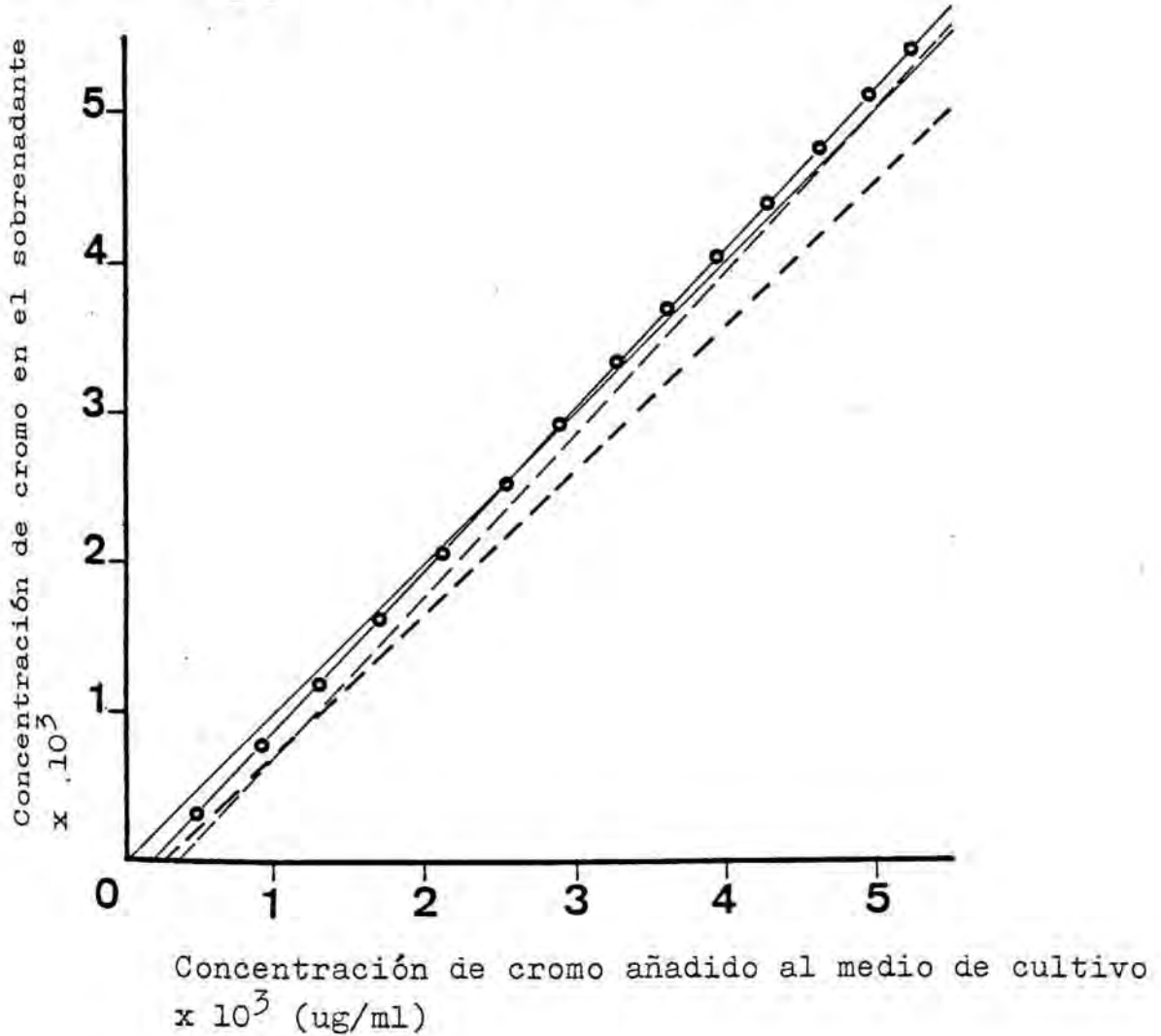
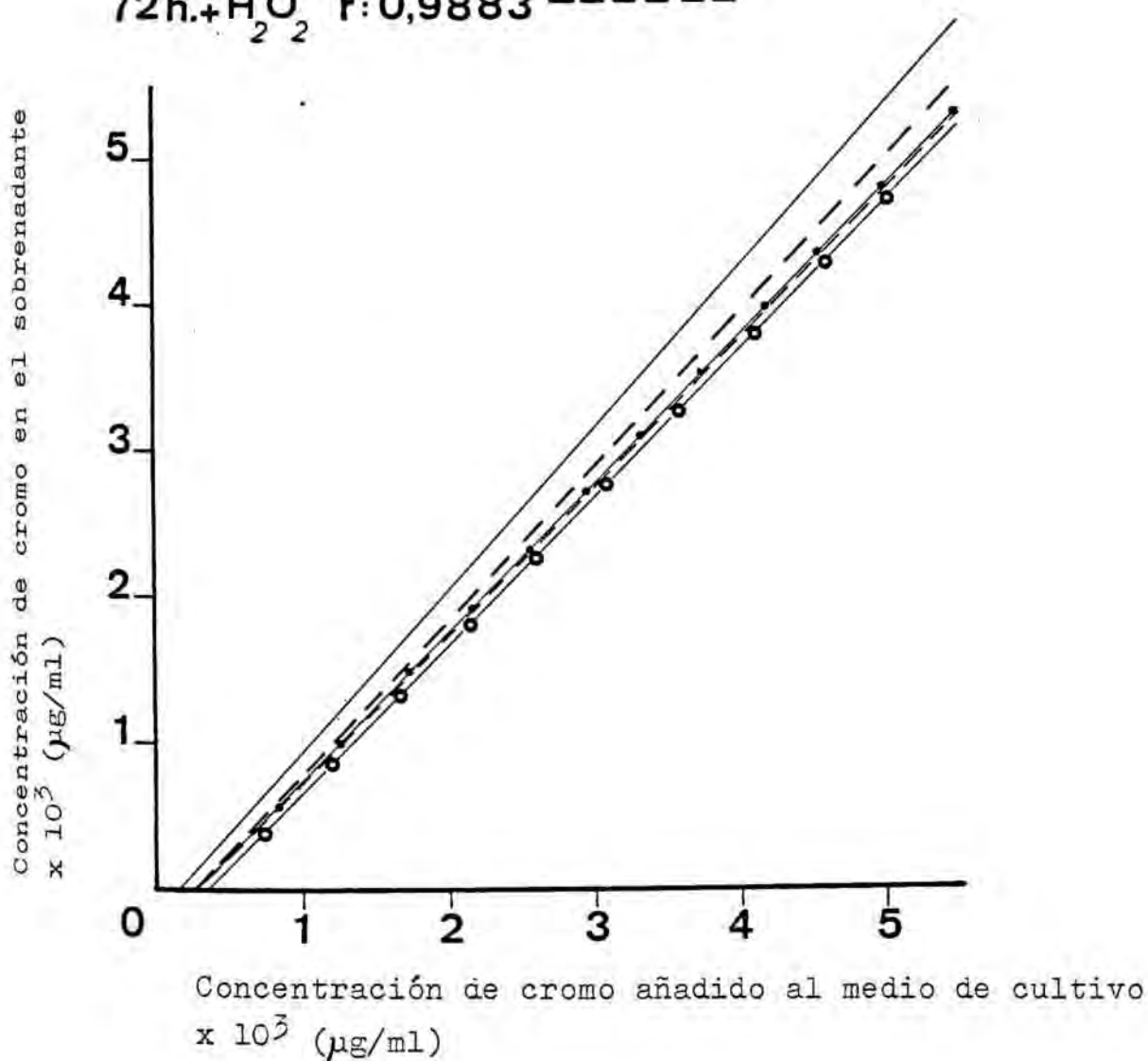


FIGURA 39 Resultados obtenidos en las determinaciones colorimétricas de la metabolización del K_2CrO_4 por la cepa S 128.3, procedente de un subcultivo en presencia de 24000 $\mu\text{g/ml}$ de K_2CrO_4 .

0 h. $r: 0,9778$ —————
 24 h. $r: 0,9872$ —●—●—
 48 h. $r: 0,9852$ - - - - -
 72 h. $r: 0,9808$ —○—○—
 72h.+ H_2O_2 $r: 0,9883$ - - - - -

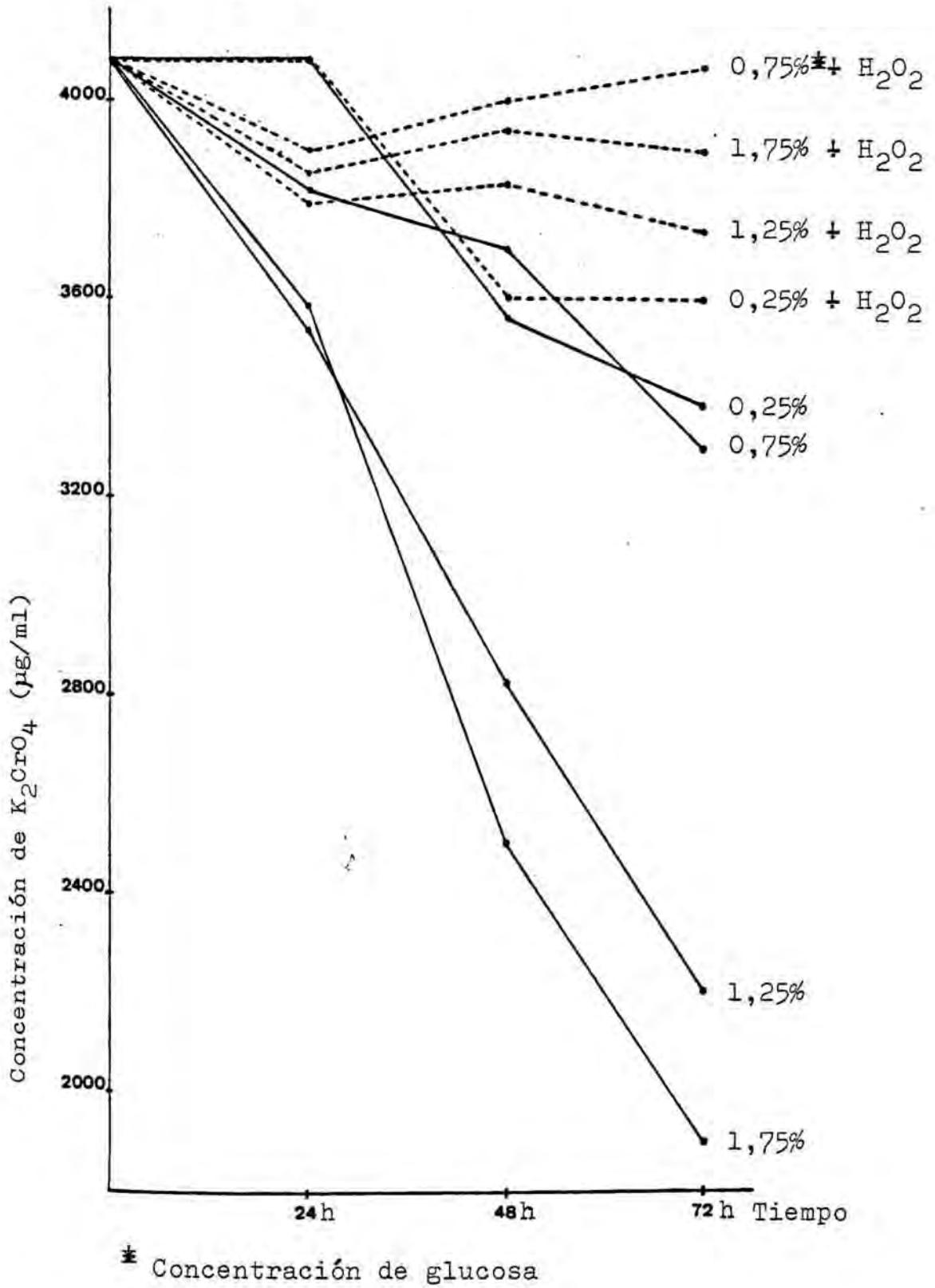


dio. Según se eleva ésta, se produce un descenso del Cr^{6+} (FIGURA 40), recuperándose al adicionar H_2O_2 .

Finalmente en la TABLA 62 se expresan los resultados obtenidos por espectroscopía de absorción atómica. En cualquier caso, los dos métodos utilizados señalan la existencia de cromo en el sedimento celular, obteniéndose mejores resultados al emplear HNO_3 6M (4a), determinando 20,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cromo, que al utilizar DPTA.

El comportamiento de P. aeruginosa frente a la sal de tungsteno empleada destaca por su elevado grado de resistencia. En la curva de la distribución de la CMI descrita en la FIGURA 41 se puede observar un máximo formado por las cepas a 102400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, característica que presentan el 72% de las cepas estudiadas. Al observar la distribución de las CMI según la procedencia de las muestras en la TABLA 63, aparecen dos poblaciones, una mayoritaria con una CMI al tungstato sódico superior o igual a 102400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y otra muy inferior, formada por 17 cepas cuya CMI está incluida entre 51200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 12800 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De la observación de las medias descritas en la TABLA 63 aparece un grupo formado por las cepas procedentes de formas farma-

FIGURA 40 Influencia de la concentración de glucosa del medio en la metabolización del K_2CrO_4 . Se parte de 4083 $\mu\text{g/ml}$ de K_2CrO_4 .



<u>Muestra</u>	<u>Lecturas</u>	<u>Concentración en $\mu\text{g/ml}$</u>	<u>x Dilución</u>	<u>Concentración Final ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{UFC}$</u>
TSB+K ₂ CrO ₄	0,027	1,3550	1 : 1200	1626,11	-
TSB+ cepa	0	0	1 : 2	0	-
TSB	0	0	1 : 2	0	-
TSB+ cepa + K ₂ CrO ₄	0,0265	1,3273	1 : 1200	1592,76	-
HNO ₃ 6M	0,050	2,6335	1 : 8	21,06	$0,0737 \times 10^{-6}$
DPTA	0,0435	2,2722	1 : 8	18,18	$0,078 \times 10^{-6}$

TABLA 62 Resultados obtenidos por espectroscopia de absorción atómica
 $r = 0,9961$; $y = 55,5825 x - 0,1456$

Nº de cepas

CMI*	S	A	M	D	H	F	TOTAL
> 102400	67	16	7	23	29		142
102400	5	211	75	20	71	26	408
51200	3	1	6		3		13
25600		1					1
12800		1					1
\bar{x}	191829,3	108577,4	107054,5	157172,1	129739,8	102400	

TABLA 63 CMI frente al $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

* Concentración expresada en $\mu\text{g/ml}$.

céuticas no estériles y alimentos, aguas superficiales terrestres y marinas, que presentan los valores más bajos ($t=0,83$; g.l.=559; $\alpha=0,50$), siendo el hallado con las cepas de productos patológicos ligeramente superior ($\xi=4,43$; $\alpha=0,001$). La media más elevada corresponde a las cepas aisladas de muestras de suelos ($\xi=3,82$; $\alpha=0,001$), mostrando una resistencia inferior las P. aeruginosa procedentes de fangos de depuradoras.

La aplicación del análisis de la varianza sobre los valores obtenidos al realizar la CMI, muestra la existencia de una diferencia significativa ($F > F_{559}^5$, leído en la tabla 1%)(TABLA 64).

En la TABLA 65 se describe el número de cepas de P. aeruginosa resistentes al tungstato sódico. Los niveles más elevados de resistencia son los producidos con las cepas aisladas a partir de aguas superficiales terrestres, fangos de depuradoras y formas farmacéuticas no estériles y alimentos ($\chi^2=6,59$; g.l.=1; $\alpha=0,01$); de cualquier modo el nivel general alcanzado ha sido muy elevado.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$81649189,04 - \frac{(137088)^2}{565} =$ $= 48387030,21$	5	9677406,04	75,08
Residual	$153698304 - 81649189,04 =$ $= 72049115$	559	128889,29	
TOTAL	$153698304 - \frac{(137088)^2}{565} =$ $= 120436145,2$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{559}^5$

TABLA 64 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de P. aeruginosa frente al $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

TABLA 65

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	72	75
A	227	230
M	82	88
D	43	43
H	100	103
F	26	26
TOTALES	550	565

En las TABLA 66 y 67 se detallan los resultados obtenidos con las cepas de P. aeruginosa al estudiar la acción del molibdeno suministrado en forma de molibdato sódico. Todos los microorganismos estudiados crecen a concentraciones muy elevadas de la sal, como 102400 $\mu\text{g/ml}$; sólo dos cepas aisladas a partir de productos patológicos no crecen a dicho nivel.

El arsénico se caracteriza por presentar un índice bajo de sensibilidad. Algunas cepas alcanzan valores de CMI cercanos a los 102400 $\mu\text{g/ml}$. La media más elevada se alcanza con las cepas aisladas de productos patológicos ($\epsilon=2,54$; $\alpha=0,02$). En segundo lugar, con valores promedios de la CMI relativamente semejantes, se hallan las P. aeruginosa aisladas de aguas superficiales terrestres y aguas marinas ($\epsilon=0,2$; $\alpha=0,85$). El promedio de máxima sensibilidad corresponde a la colección procedente de fangos de depuradoras, formas farmacéuticas no estériles y suelos ($\epsilon=2,51$; $\alpha=0,02$). En la TABLA 68 se detallan los resultados comentados. El número de cepas de P. aeruginosa resistentes al arsénico se describe en la TABLA 70. Obviamente son las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos y las aisladas de muestras de

Nº de cepas

CMI ‡	S	A	M	D	H	F	TOTAL
>102400	75	230	88	43	101	26	563
102400					2		2

TABLA 66 CMI frente al $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de las cepas de P. aeruginosa

según su procedencia.

‡ Concentración expresada en $\mu\text{g/ml}$.

TABLA 67

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nºcepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

Nº de cepas

CMI *	S	A	M	D	H	F	TOTAL
> 102400		4				1	5
102400	1	20	11	5	29	2	68
51200	12	44	15	7	15	3	96
25600	20	49	17	5	18	1	110
12800	11	72	32	21	17	5	158
6400	30	40	12	5	21	9	117
1600	1	1	1		3	5	11
\bar{x}	20842,7	32841,7	32018,2	30214,0	44225,2	27630,8	

TABLA 68. CMI frente al $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

* Concentración expresada en $\mu\text{g/ml}$.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$5413754,47 - \frac{(40432)^2}{565} =$ $= 2520397,61$	5	504079,52	4,36
Residual	$6991168 - 5413754,47 =$ $= 64577413,53$	559	115523,10	
TOTAL	$69991168 - \frac{(40432)^2}{565} =$ $= 67097811,15$	569		

Para un riesgo de error de 1% $F > F_{559}^5$

TABLA 69 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al realizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

TABLA 70

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	44	75
A	189	230
M	75	88
D	38	43
H	79	103
F	12	26
TOTALES	437	565

suelos en las que se ha evidenciado una mayor sensibilidad a la sal de arsénico empleada ($X^2=33,58$; g.l.=1; $\alpha < 0,001$).

En la FIGURA 42 se ilustra la curva de la distribución de las CMI. Puede observarse de un modo gráfico el amplio espectro existente respecto a la distribución de las cepas de P. aeruginosa y las correspondientes CMI. Finalmente el tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza, sobre los datos de la CMI, señala la existencia de diferencias significativas (TABLA 69).

El comportamiento de P. aeruginosa frente al talio destaca por su elevado nivel de sensibilidad. Una concentración de 256 $\mu\text{g/ml}$ supone un límite que solamente superan escasas P. aeruginosa procedentes de hábitats sobre los que se ha realizado el aislamiento y prospección. Por otra parte, el nivel de 128 $\mu\text{g/ml}$ resulta selectivo para una gran mayoría de cepas bacterianas. Si consideramos los valores medios de máxima resistencia, cabe señalar que el grupo formado por las cepas aisladas de formas farmacéuticas y alimentos ha verificado un valor netamente superior ($t=3,22$; g.l.=559; $\alpha = 0,01$), en parte debido a la localización de tres aislamientos a nivel de 2048 $\mu\text{g/ml}$.

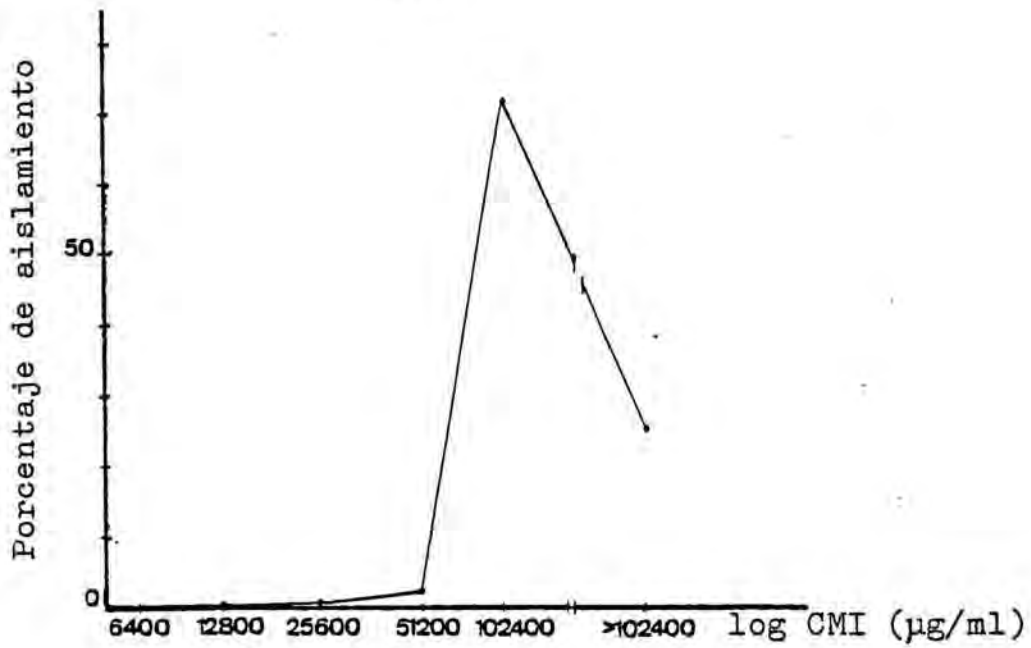


FIGURA 41 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

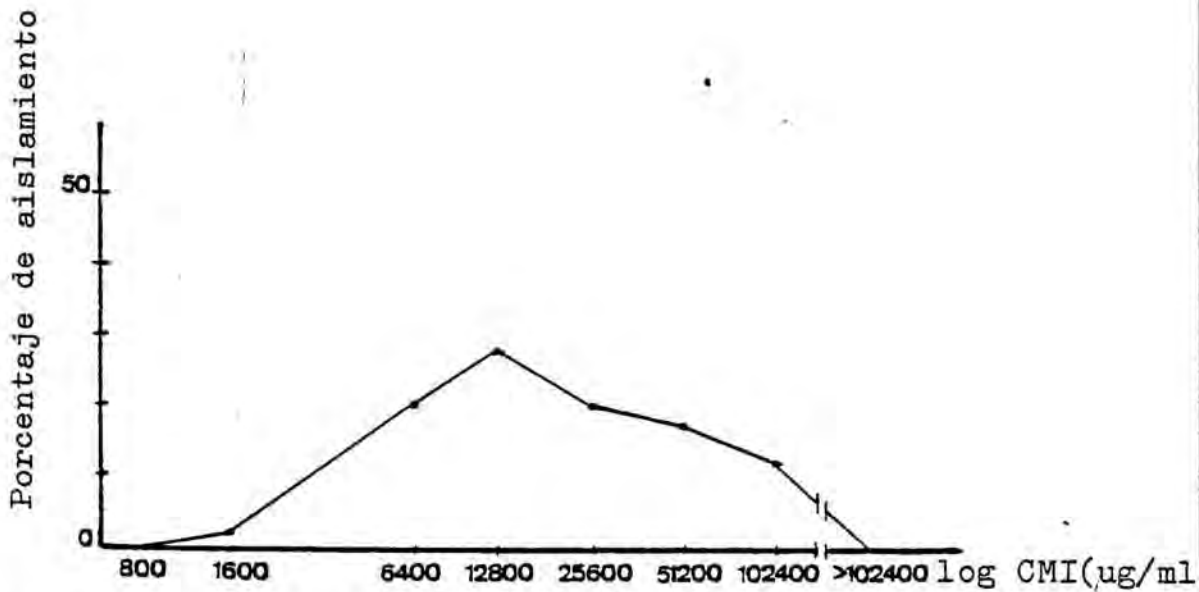


FIGURA 42 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Estos valores aislados pueden desvirtuar el comportamiento más generalizado de la mayoría de las cepas procedentes de este hábitat. El grupo constituido por los microorganismos aislados de las restantes procedencias estudiadas presentan una media muy semejante, que oscila entre 254,6 y 232,1 $\mu\text{g/ml}$ ($\epsilon=0,80$; $\alpha=0,42$)(TABLA 71).

La aplicación del análisis de la varianza sobre los valores de las CMI obtenidas muestra la existencia de diferencias significativas ($\alpha=0,05$)(TABLA 72).

La curva de distribución de la CMI presenta un pico muy característico, que es justamente el que corresponde a los 256 $\mu\text{g/ml}$, con un número de bacterias absolutamente mayoritario (FIGURA 43).

En la TABLA 73 queda expresado el número de cepas de P. aeruginosa resistentes al acetato de talio, según su procedencia. La aplicación del estudio estadístico ha evidenciado que la mayor sensibilidad corresponde a las cepas aisladas de productos patológicos ($X^2=9,45$; g.l.=1; $\alpha=0,01$).

Nº de cepas

CMI [‡]	S	A	M	D	H	F	TOTAL
> 2048					1		1
2048	1					3	4
1024		9	2		2		13
512		2	1	1	2	2	8
256	47	159	64	36	51	10	367
128	25	59	20	6	41	11	162
64	2	1	1		6		10
\bar{x}	232,1	254,6	245,1	244,1	251,0	428,3	

TABLA 71 CMI frente al Tl(CH₃-COO) de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

[‡] Concentración expresada en µg/ml.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$834314,69 - \frac{(384)^2}{565} = 834053,71$	5	166810,74	2,45
Residual	$38805504 - 834314,69 = 37971189,31$	559	67926,99	
TOTAL	$38805504 - \frac{(384)^2}{565} = 38805243,02$	564		

Para un riesgo de error del 5% $F > F_{559}^5$

TABLA 72 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $TL(CH_3-COO)$.

TABLA 73

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al Tl(CH₃-COO) según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	73	75
A	229	230
M	87	88
D	43	43
H	97	103
F	26	26
TOTALES	555	565

El comportamiento de P. aeruginosa frente al telurito potásico presenta una zona de máxima actividad, para todos los casos, que está comprendida entre 32 y 128 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 44). Los valores mediales señalan una máxima resistencia para las bacterias aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos ($t=2,15$; g.l.=559; $\alpha=0,04$). Los aislamientos procedentes de fangos de depuradoras presentan, así mismo, un valor ($\bar{x}=113,5\mu\text{g/ml}$) que sobresale sobre un grupo constituido por los aislamientos de productos patológicos, aguas superficiales terrestres y marinas, con valores que oscilan entre 85,4 y 99,5 $\mu\text{g/ml}$. La media obtenida a partir de los aislamientos procedentes de suelos es la que indica un mayor índice de sensibilidad, altamente significativo ($\epsilon=5,39$; $\alpha<0,001$) (TABLA 74). La significación de estos datos está refrendada mediante el análisis de la varianza (TABLA 75).

Obviamente la curva de la distribución de las CMI presenta una meseta importante, como es la comprendida entre 16 y 256 $\mu\text{g/ml}$, que acoge a la mayoría de la población estudiada (FIGURA 44).

CMI*	Nº de cepas							TOTAL
	S	A	M	D	H	F		
> 2048					1			1
2048								0
1024			1				1	2
512	1	2	2	3	1	2		11
256		15	6	6	2	1		30
128	3	75	15	7	19	7		126
64	10	82	42	6	31	7		178
32	57	51	13	12	33	8		174
16	2		9	9	16			36
8	2	5						7
\bar{x}	45,4	93,0	99,5	113,5	85,4	150,2		

TABLA 74 CMI frente al K_2TeO_3 de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia. * Concentración expresada en $\mu g/ml$.

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$675164,37 - \frac{(14968)^2}{565} = 278631,58$	5	55726,31	3,37
Residual	$9892288 - 675164,37 = 9217123,63$	559	16488,59	
TOTAL	$9892288 - \frac{(14968)^2}{565} = 9495755,22$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{559}^5$

TABLA 75 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al K_2TeO_3 .

TABLA 76

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al K_2TeO_3 según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	14	75
A	174	230
M	66	88
D	22	43
H	54	103
F	18	26
TOTALES	348	565

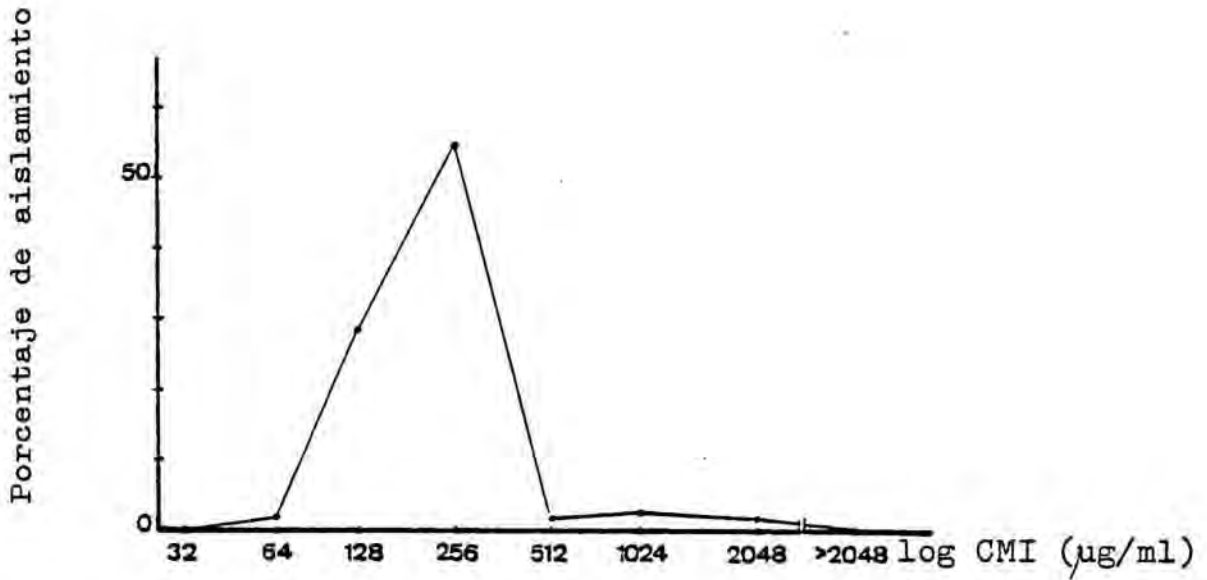


FIGURA 43 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria frente al $Tl(CH-COO)$

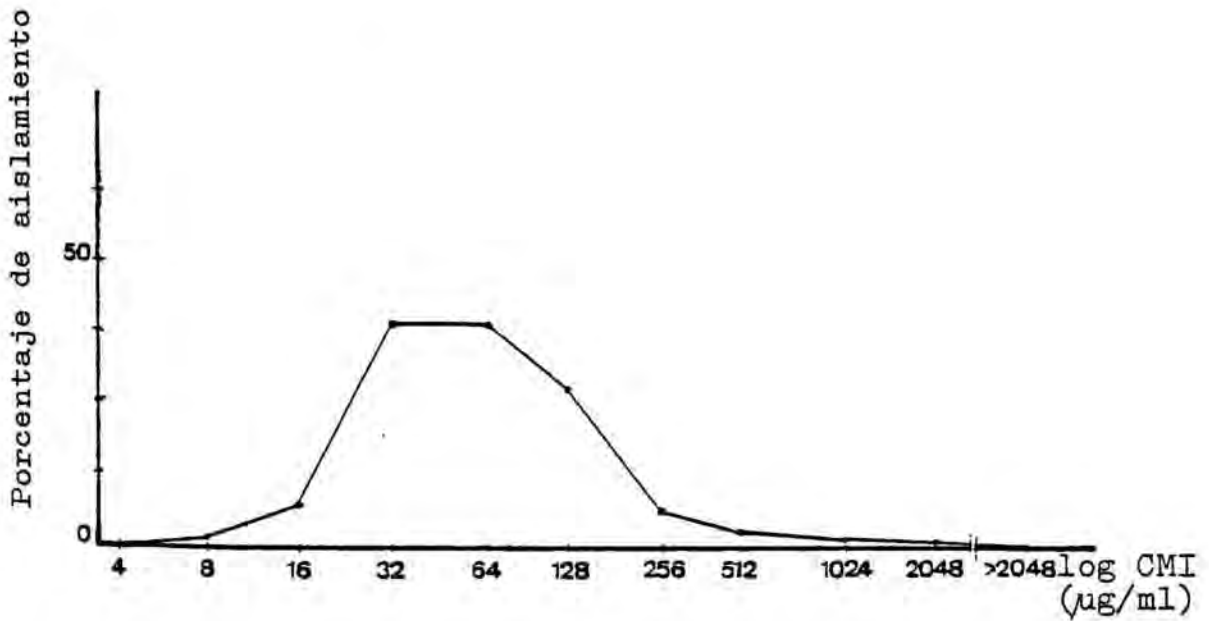


FIGURA 44 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al K_2TeO_3

En la TABLA 76 se describe el número de cepas resistentes al K_2TeO_3 . El mayor índice de sensibilidad se encuentra de forma muy marcada en las P. aeruginosa aisladas de suelos ($X^2=27,5$; g.l.=1; $\alpha < 0,001$). Aproximadamente la mitad de la población procedente de fangos de depuradoras, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos ha sido sensible. El grupo que ha demostrado ser el más resistente es el formado por aguas superficiales terrestres y litorales ($X^2=22,21$; g.l.=1; $\alpha < 0,001$).

Tanto las P. aeruginosa resistentes como las sensibles al crecer en presencia de telurito potásico forman unas colonias de color negro (FIGURA 45). Estos microorganismos son capaces a su vez de formar compuestos metilados que imprimen a los cultivos un olor característico a ajo.

En la TABLA 77 se detallan los resultados de las CMI de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia frente al nitrato de uranilo. Las medias halladas correspondientes a las cepas aisladas de suelos, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos, son las inferiores ($E=2,57$; $\alpha < 0,01$), siendo en los tres hábitats

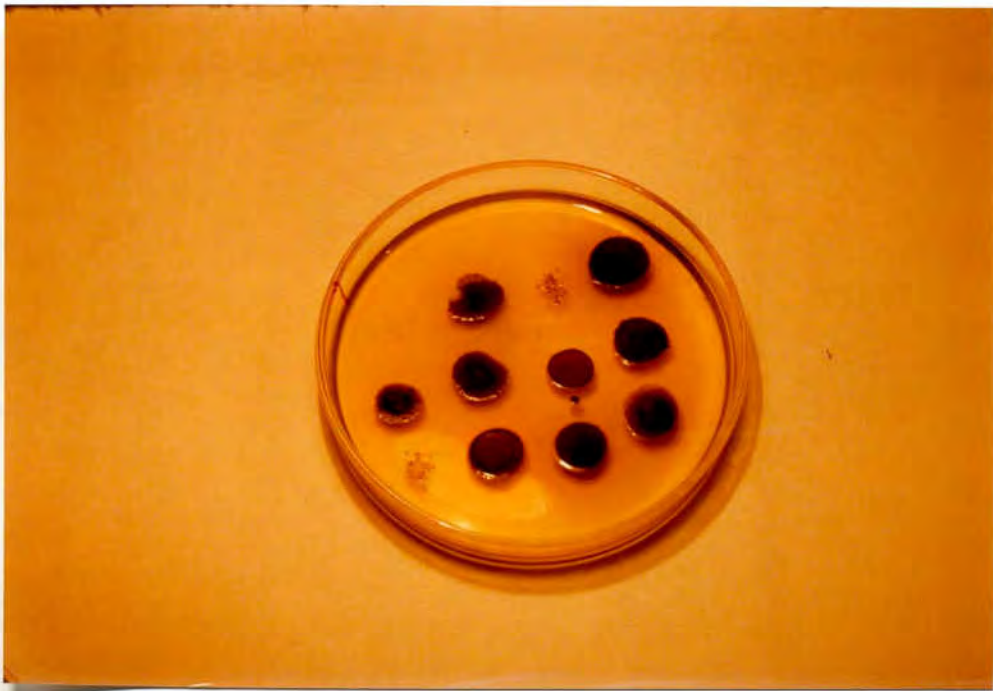


FIGURA 45 Reducción del K_2TeO_3 a Te^0 por cepas de *P. aeruginosa* con aparición de un precipitado negro.

Nº de cepas

CMI †	S	A	M	D	H	F	TOTAL
6400	1	90	7	43			141
3200	72	140	81		103	26	422
1600	2						2
\bar{x}	3200	4452,2	3454,5	6400	3200	3200	

TABLA 77 CMI frente al $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

† Concentración expresada en $\mu g/ml$.

citados de 3200 $\mu\text{g/ml}$. Dentro de este rango de resistencia se puede citar el resultado hallado con las cepas procedentes de aguas marinas litorales, cuya media corresponde a 3454,5 $\mu\text{g/ml}$. Con valores superiores destacan las cepas procedentes de aguas superficiales terrestres. Las P. aeruginosa aisladas de fangos de depuradoras han presentado todas una CMI de 6400 $\mu\text{g/ml}$, que a través de un estudio estadístico ha permitido verificar una diferencia altamente significativa con las cepas anteriormente citadas ($E=1844,63$; $\alpha < 0,001$).

Para relacionar estos resultados se realizó previamente un análisis de la varianza (TABLA 78), manifestándose diferencias significativas entre la distribución de las CMI halladas, según la procedencia de las cepas ($F > F_{559}^5$; $\alpha < 0,001$).

La curva de la distribución de las CMI frente al nitrato de uranilo se halla en la FIGURA 46. Se puede apreciar claramente un punto máximo, que corresponde a una CMI de 3200 $\mu\text{g/ml}$, alrededor del cual se encuentra la población estudiada, sugiriendo este resultado la existencia de una población homogénea. Este resultado se confirma con

<u>Origen</u>	<u>Suma de los cuadrados de las diferencias</u>	<u>g.l.</u>	<u>Varianza</u>	<u>F</u>
Entre hábitats	$80664,78 - \frac{(4480)^2}{565} = 45141,94$	5	9028,38	78,57
Residual	$144896 - 80664,78 = 64231,22$	559	114,90	
TOTAL	$144896 - \frac{(4480)^2}{565} = 109373,17$	564		

Para un riesgo de error del 1% $F > F_{559}^5$

TABLA 78 Análisis de la varianza de los valores obtenidos al analizar la CMI de 565 cepas de P. aeruginosa frente al $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.

los datos presentados en la TABLA 79, donde se aprecia el 100% de resistencia hallado frente a este metal pesado.

En la FIGURA 47 se resumen los efectos originados sobre las poblaciones de P. aeruginosa aisladas de distintos hábitats en función de las sales de los diferentes metales pesados ensayados. Esta distribución es coincidente y superponible con aquella que se expresase en concentraciones molares de dichos metales, ofreciendo una visión panorámica del grado de tolerancia, que puede resumirse en tres grandes grupos. En efecto, los elementos más activos corresponden al grupo constituido por las sales de mercurio, plata, talio y telurio. El grupo intermedio está formado por cromo, cinc, plomo, uranio y cadmio, y el tercer grupo lo constituyen tres elementos : arsénico, molibdeno y tungsteno.

En la TABLA 80 quedan indicados los porcentajes de sensibilidad y resistencia frente a las sales de los metales pesados que se han ensayado y el diagrama de la FIGURA 48 expresa los porcentajes de resistencia de un modo gráfico.

TABLA 79

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

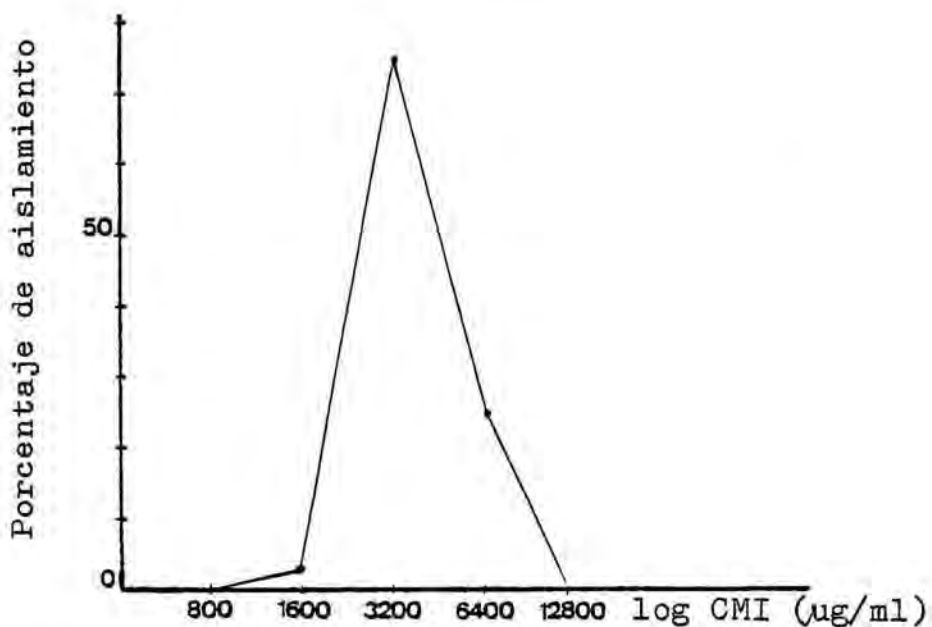


FIGURA 46 Curva de distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente al $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

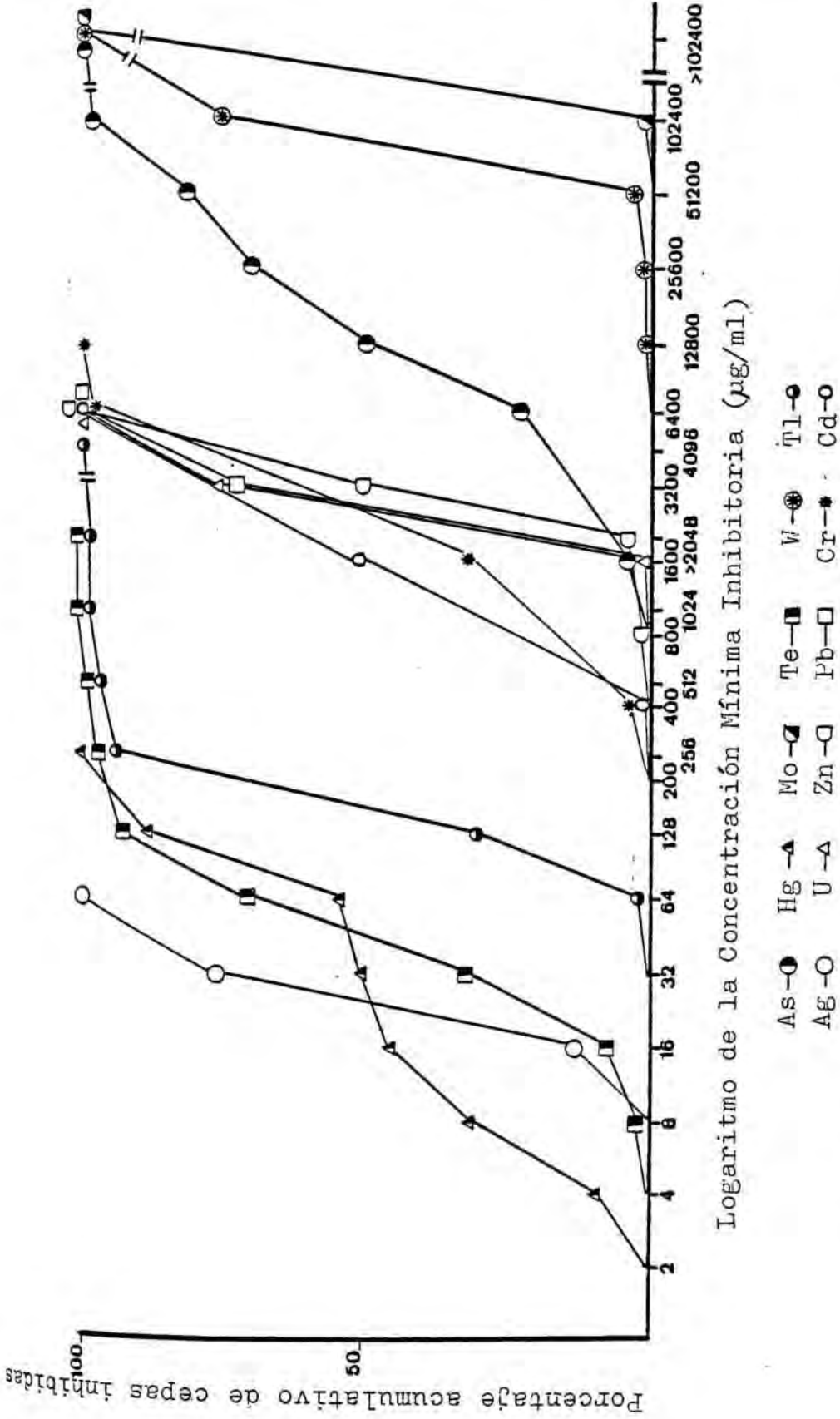


FIGURA 47 Concentraciones Mínimas Inhibitorias acumulativas de 565 cepas de P. aeruginosa frente a las sales de los 12 metales pesados ensayados.

TABLA 80

Porcentajes de sensibilidad y resistencia a las diferentes sales de metales pesados de 565 cepas de P. aeruginosa.

	<u>Sensible (%)</u>	<u>Resistente (%)</u>
HgCl ₂	31,5	68,5
Pb(CH ₃ -COO) ₂	0	100
Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O	22,7	77,3
CdCl ₂	0,2	99,8
AgNO ₃	100	0
K ₂ CrO ₄	1,1	98,9
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	2,7	97,3
Tl(CH ₃ -COO)	1,8	98,2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0	100
K ₂ TeO ₃	38,4	61,6
UO ₂ (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	99,5

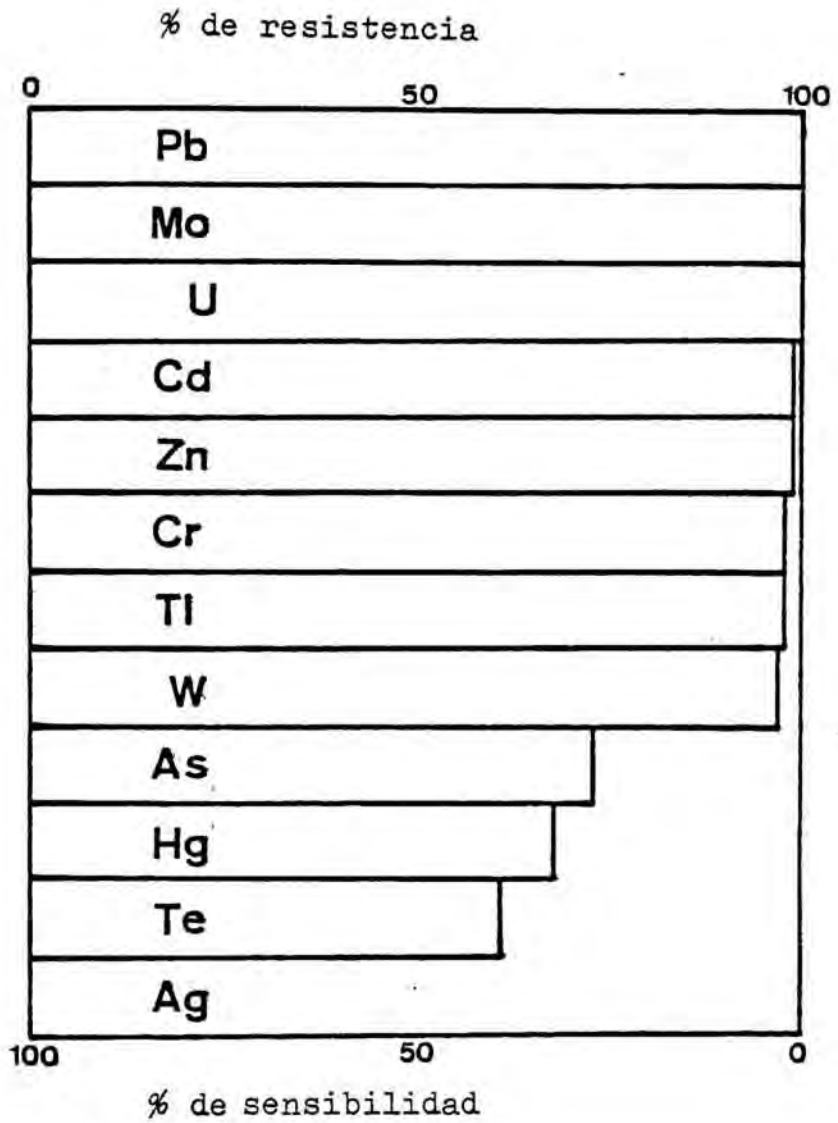


FIGURA 48. Resistencia y sensibilidad de 565 cepas de P. aeruginosa a 12 sales de metales pesados.

En la TABLA 81 se refleja la composición de la matriz de correlación de los porcentajes de resistencia comentados. La correlación más fuerte es la descrita al comparar los resultados obtenidos en el metalograma con las cepas procedentes de productos patológicos y depuradoras ($r=0,9904$). Una relación similar es la que se describe con cepas procedentes de aguas marinas y superficiales ($r=0,9899$). Los valores inferiores son los que se obtienen al comparar los resultados hallados con muestras de suelos con aguas terrestres superficiales ($r=0,8712$) y con aguas marinas ($r=0,8723$). La tendencia general está dirigida hacia una elevada correlación.

5.5. RESISTENCIA MULTIPLE COMBINADA

En las TABLAS 82, 83, 84, 85, 86, 87 y 88 se especifican los resultados hallados en función de la resistencia combinada múltiple a antibióticos y metales pesados. La TABLA 88 muestra la resistencia múltiple de las 565 cepas de P. aeruginosa. El 100% de los microorganismos aislados presentan resistencia por una parte a cloranfenicol, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, cefalotina y ampicilina y a las sales de plomo, molibdeno y uranio. El porcen-

Suelos	1												
Aguas terrestres	0,8712 +++	1											
Aguas marinas	0,8723 +++	0,9899 +++	1										
Depuradoras	0,9453 +++	0,9650 +++	0,9698 +++	1									
P. patológicos	0,9523 +++	0,9759 +++	0,9693 +++	0,9904 +++	1								
F. farmacéuticas	0,8803 +++	0,9438 +++	0,9136 +++	0,8915 +++	0,9372 +++	1							
TOTALES	0,9315 +++	0,9898 +++	0,9851 +++	0,9872 +++	0,9958 +++	0,9470 +++	1						
	S.	A.T.	A.M.	D.	P.P.	F.F.	TOT.						

+++ = Diferencia significativa, $\alpha=0,001$

TABLA 81 Matriz de correlación de los porcentajes de resistencia a los metales pesados entre 565 cepas de P. aeruginosa según su origen.

taje de resistencia disminuye gradualmente a medida que se incrementan los factores de naturaleza antibiótica o metales pesados, alcanzándose un porcentaje del 5,8% que corresponde a toda la gama de antibióticos ensayada, salvo tobramicina y colistina, y a todos los metales pesados a excepción de la plata.

Respecto a la distribución de estas resistencias en función del origen de las cepas, aquellas que proceden de productos patológicos alcanzan un porcentaje más elevado de resistencia. El 16,5% de los microorganismos son resistentes a 14 de los 15 antibióticos y el 30,1% a 11 de los 12 metales pesados empleados. La resistencia total a 25 agentes antimicrobianos se alcanza en un 6,8% de dichas cepas (TABLA 86). Entre estos índices de resistencia, cabe destacar el nivel presentado por las cepas aisladas de aguas litorales, donde el 5,7% son resistentes a 13 antibióticos y el 54,4% a 11 metales pesados. Teniendo en cuenta todos estos agentes, el 5,7% de las cepas se comportaron como resistentes (TABLA 84). Otro grupo con índices de resistencia semejantes es aquel que está formado por las cepas procedentes de suelos, tal como se puede observar en la TABLA 82.

<u>Antibiotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metatotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M.P.%</u>
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM	100	Pb-Cd-Cr-Mo-U	100	100
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO	92	Pb-Cd-Cr-Mo-U-Tl	97,3	89,3
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N	66,7	Pb-Cd-Cr-Mo-U-Tl-W-Zn	89,3	58,7
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD	36	Pb-Cd-Cr-Mo-U-Tl-W-Zn-Hg	65,3	17,3
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD-CB	17,3	Pb-Cd-Cr-Mo-U-Tl-W-Zn-Hg-As	41,3	2,7
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD-CB-GM	2,7	Pb-Cd-Cr-Mo-U-Tl-W-Zn-Hg-As-Te	5,3	0

TABLA 82 Resistencia múltiple combinada de 75 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos.

<u>Antibiototipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metalotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M. P. %</u>
C-FM-NA-CF-AM	100	Pb-Mo-U-Zn	100	100
C-FM-NA-CF-AM-K	97,8	Pb-Mo-U-Zn-Cr	99,6	97,8
C-FM-NA-CF-AM-K-TE	93,0	Pb-Mo-U-Zn-Cr-Tl	99,1	92,6
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S	83,0	Pb-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W	98,3	82,6
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO	73,5	Pb-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W-As	80,4	61,7
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO-SD	47,4	Pb-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W-As-Te	61,3	31,3
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO-SD-CB	32,2	Pb-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W-As-Te-Hg	43,9	17,4

TABLA 83 Resistencia múltiple combinada de 230 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas superficiales terrestres.

<u>Antibiotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metatotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M. P. %</u>
TE-C-FM-NA-K-CF-AM	100	Pb-Cd-Mo-U-Zn	100	100
TE-C-FM-NA-K-CF-AM-FO-S	95,5	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-Tl	97,7	94,3
TE-C-FM-NA-K-CF-AM-FO-S-N	71,6	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W	90,9	68,2
TE-C-FM-NA-K-CF-AM-FO-S-N-SD	46,6	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W-As	78,4	42,0
TE-C-FM-NA-K-CF-AM-FO-S-N-SD-CB	27,3	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W-As-Hg	65,9	22,7
TE-C-FM-NA-K-CF-AM-FO-S-N-SD-CB-CL	5,7	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-Tl-W-As-Hg-Te	54,5	5,7

TABLA 84 Resistencia múltiple combinada de 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas marinas superficiales.

<u>Antibiotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metalotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M. P. %</u>
C-FM-NA-S-CF-AM	100	Pb-Cd-Cr-W-Tl-Mo-U-Zn	100	100
C-FM-NA-S-CF-AM-FO	97,6	Pb-Cd-Cr-W-Tl-Mo-U-Zn-As	88,3	86,0
C-FM-NA-S-CF-AM-FO-TE-K	93,0	Pb-Cd-Cr-W-Tl-Mo-U-Zn-As-Hg	65,1	58,1
C-FM-NA-S-CF-AM-FO-TE-K-SD	60,4	Pb-Cd-Cr-W-Tl-Mo-U-Zn-As-Hg-Te	37,2	23,2

TABLA 85 Resistencia múltiple combinada de 43 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de fangos de depuradoras.

<u>Antibiótipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metatotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M.P. %</u>
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM	100	Pb-Cd-Mo-U-Zn	100	100
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO	95,1	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr	98,1	93,2
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N	80,6	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-W	95,1	76,7
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD	70,9	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-W-Tl	89,3	66,0
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD-CB	53,4	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-W-Tl-As	70,9	43,7
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD-CB-GM	37,9	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-W-Tl-As-Hg	52,4	26,2
TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-FO-N-SD-CB-GM-NN	16,5	Pb-Cd-Mo-U-Zn-Cr-W-Tl-As-Hg-Te30,1		6,8

TABLA 86 Resistencia múltiple combinada de 103 cepas de P. aeruginosa aisladas de productos patológicos humanos y animales.

<u>Antibiotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metalotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M.P. %</u>
FO-TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM	100	Pb-Cd-W-Tl-Mo-U-Zn	100	100
FO-TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-SD	88,5	Pb-Cd-W-Tl-Mo-U-Zn-Cr	92,3	88,5
FO-TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-SD-N	19,2	Pb-Cd-W-Tl-Mo-U-Zn-Cr-Te	61,5	15,4
FO-TE-C-FM-NA-S-K-CF-AM-SD-N-CB	0	Pb-Cd-W-Tl-Mo-U-Zn-Cr-Te-Hg	38,5	0

TABLA 87 Resistencia múltiple combinada de 26 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

<u>Antibiotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Metalotipo</u>	<u>% de aislados</u>	<u>Antibiot. y M.P. %</u>
C-FM-NA-CF-AM	100	Pb-Mo-U	100	100
C-FM-NA-CF-AM-K	98,8	Pb-Mo-U-Cd	99,8	98,8
C-FM-NA-CF-AM-K-TE	96,8	Pb-Mo-U-Cd-Zn	99,3	96,3
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S	92,4	Pb-Mo-U-Cd-Zn-Cr	98,4	91,0
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO	86,0	Pb-Mo-U-Cd-Zn-Cr-Tl	96,6	83,4
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO-SD	56,3	Pb-Mo-U-Cd-Zn-Cr-Tl-W	94,2	53,6
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO-SD-N	39,5	Pb-Mo-U-Cd-Zn-Cr-Tl-W-As	73,5	30,3
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO-SD-N-CB	25,7	Pb-Mo-U-Cd-Zn-Cr-Tl-W-As-Hg	54,2	15,8
C-FM-NA-CF-AM-K-TE-S-FO-SD-N-CB-GM	11,7	Pb-Mo-U-Cd-Zn-Cr-Tl-W-As-Hg-Te	36,6	5,8

TABLA 88 Resistencia múltiple combinada de 565 cepas de P. aeruginosa

Los porcentajes de resistencia combinada, con valores ligeramente inferiores a los anteriormente comentados, son los descritos con las cepas aisladas de aguas superficiales terrestres. La resistencia combinada a 11 antibióticos y a 10 metales pesados la han alcanzado el 17,4% de las cepas (TABLA 83). De estas cepas, el 100% presentaron resistencia a cinco antibióticos y cuatro metales pesados, valor inferior al hallado en las restantes procedencias.

Los resultados obtenidos con las cepas aisladas de fangos de depuradoras y formas farmacéuticas no estériles enmarcan estas cepas dentro de un nivel medio de resistencia, tal como se puede observar en las TABLAS 85 y 87.

5.6. TIPADO SEROLOGICO

En la FIGURA 49 y en la TABLA 89 se expresan los resultados del tipado serológico realizado con 75 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos. El 70,7% de las cepas aglutinan en un solo suero, siendo en las cepas con esta procedencia donde un número mayor de microorganismos presentan aglutinación simple. El suero en el que aglutina un porcentaje más elevado de cepas (28%) es

TABLA 89

Resultados del tipado serológico de 75 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos.

Aglutinaciones simples (70,7%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	21	28	11	0	0
2	0	0	12	0	0
3	6	8	13	0	0
4	1	1,3	14	0	0
5	1	1,3	15	0	0
6	18	24	16	0	0
7	1	1,3	17	0	0
8	3	4			
9	0	0			
10	2	2,6			

Aglutinaciones dobles (16%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
3-15	2	2,6	2-9	1	1,3
8-12	1	1,3	5-16	1	1,3
1-15	1	1,3	6-15	1	1,3
6-16	2	2,6	7-8	1	1,3
2-5	1	1,3	1-10	1	1,3

Aglutinaciones triples (1,3%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
1-8-12	1	1,3

No aglutinables 9 (12%)

el 0:1. Las Pseudomonas de suelos son las que aglutinan con mayor frecuencia en este suero. Las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos presentan un porcentaje similar. En general, es uno de los sueros en los que se evidencia mayor aglutinación.

De igual manera, con el suero 6 aglutinan un número elevado de cepas, el 24%. Con este suero, son las P. aeruginosa procedentes de suelos las que presentan un porcentaje más elevado de aglutinación. Entre las restantes cepas, el 16% presentan aglutinaciones frente a dos sueros de forma simultánea, mientras que tan sólo una presenta aglutinación en tres. El 12% de las cepas no aglutinan ningún suero.

En la FIGURA 49 y en la TABLA 90 se presentan los resultados del tipado serológico de 230 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas superficiales terrestres. En esta ocasión el serotipo que se presenta con mayor frecuencia es el 0:6 (16,5%), seguido del 0:4 (12,1%) y del 0:1 (7,4%). El 62,2% de las cepas aglutinan en un solo suero, mientras que el 15,2% lo hacen en dos, el 4,7% en tres y en un número superior de sueros el 1,3%

TABLA 90

Resultados del tipado serológico de 230 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas superficiales terrestres.

Aglutinaciones simples (62,2%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	17	7,4	11	10	4,3
2	3	1,3	12	1	0,4
3	3	1,3	13	5	2,1
4	28	12,1	14	1	0,4
5	8	3,4	15	1	0,4
6	38	16,5	16	1	0,4
7	0	0	17	0	0
8	5	2,1			
9	7	3,0			
10	15	6,5			

Aglutinaciones dobles (15,2%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
2-5	7	3,0	6-10	1	0,4
5-16	5	2,1	2-4	1	0,4
1-4	2	0,8	6-16	1	0,4
4-11	1	0,4	4-14	1	0,4
10-11	1	0,4	9-11	1	0,4
6-13	4	1,7	7-8	1	0,4
4-16	1	0,4	10-14	1	0,4
6-11	2	0,8	1-10	1	0,4
4-6	2	0,8	2-10	1	0,4
10-16	1	0,4			

TABLA 90 cont.

Aglutinaciones triples (4,7%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
2-5-16	3	1,3
2-5-11	1	0,4
1-2-13	1	0,4
2-4-10	1	0,4
5-10-16	1	0,4
2-5-15	1	0,4
2-5-10	1	0,4
4-6-16	1	0,4
1-4-16	1	0,4

Aglutinaciones múltiples (1,3%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
1-2-3-4-6-9-10-13	2	0,8
1-2-3-4-6-9-10	1	0,4

No aglutinables 38 (16,5%)

de las cepas. 38 cepas (16,5%) no aglutinan en presencia de ningún suero.

En las 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas marinas, el serotipo hallado con mayor frecuencia es el O:6 (14,7%) (FIGURA 49 y TABLA 91), habiéndose descrito esta característica en las aguas terrestres. Otro serotipo hallado abundantemente en este medio es el O:11 (13,6%), serotipo poco descrito generalmente en las cepas estudiadas en este trabajo. Es a partir de las P. aeruginosa aisladas de aguas marinas donde se ha presentado con mayor frecuencia. En las cepas procedentes de productos patológicos se ha observado con una cierta abundancia dicho serotipo (7,7%). El serotipo O:5 lo presentan el 9,1% de las cepas procedentes de hábitats marinos. La frecuencia con que se describe este serotipo en los restantes medios es escasa. En total el 65,9% de las cepas aglutinan en un solo suero, el 12,5% en dos y en tres solamente el 2,3%. Sin embargo, un número considerable de cepas, 19,3%, no aglutinan ningún suero.

Con las cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de fangos de depuradoras, el serotipo que se presenta con

TABLA 91

Resultados del tipado serológico de 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas marinas superficiales.

Aglutinaciones simples (65,9%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	5	5,6	11	12	13,6
2	7	7,9	12	0	0
3	0	0	13	0	0
4	6	6,8	14	0	0
5	8	9,1	15	1	1,1
6	13	14,7	16	1	1,1
7	2	2,2	17	0	0
8	2	2,2			
9	1	1,1			
10	0	0			

Aglutinaciones dobles (12,5%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
3-10	1	1,1	1-5	2	2,2
9-10	1	1,1	5-16	1	1,1
2-16	1	1,1	2-5	3	3,4
11-16	1	1,1	7-8	1	1,1

Aglutinaciones triples (2,3%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
2-5-16	1	1,1
1-5-6	1	1,1

No aglutinables 17 (19,3%)

mayor abundancia es el 0:10 (13,9%)(FIGURA 49 y TABLA 92). Este serotipo es minoritario entre las cepas procedentes de los restantes hábitats; tan sólo en las cepas aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos aparece una proporción comparable. Cabe destacar que un 9,3% de las cepas aglutinan con el suero 0:1 y el 6,9% lo hace en presencia del 0:6. En total solamente el 46,5% de las cepas aglutinan con un suero, siendo el porcentaje más bajo hallado teniendo en cuenta la procedencia de las cepas. Por otra parte, es en este grupo donde se alcanza el porcentaje más elevado de cepas no aglutinables, 20,9%. Del mismo modo son muy elevados los porcentajes de aglutinaciones dobles (27,9%) y triples (4,7%).

En la FIGURA 49 y TABLA 93 se describen los resultados del tipado serológico de 103 cepas de P. aeruginosa aisladas de productos patológicos. En la TABLA 93 se puede observar que el 58,3% de las cepas aglutinan con un solo suero, el 15,5% frente a dos, el 3,9% con tres y frente a un número superior el 7,8%. Las restantes cepas (14,5%) no presentan aglutinación frente a ningún suero. Entre las aglutinaciones simples, es en presencia del suero 4 donde se produce el porcentaje más elevado de reacciones

TABLA 92

Resultados del tipado serológico de 43 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de fangos de depuradoras.

Aglutinaciones simples (46,5%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	4	9,3	11	1	2,3
2	0	0	12	0	0
3	0	0	13	0	0
4	2	4,6	14	0	0
5	2	4,6	15	0	0
6	3	6,9	16	0	0
7	0	0	17	0	0
8	0	0			
9	2	4,6			
10	6	13,9			

Aglutinaciones dobles (27,9%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
7-8	4	9,3	2-5	1	2,3
4-16	1	2,3	5-16	4	9,3
15-16	1	2,3	6-16	1	2,3

Aglutinaciones triples (4,7%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
1-9-10	1	2,3
4-5-16	1	2,3

No aglutinables 9 (20,9%)

TABLA 93

Resultados del tipado serológico de 103 cepas de P. aeruginosa aisladas de productos patológicos.

Aglutinaciones simples (58,3%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	6	5,8	11	8	7,7
2	4	3,8	12	0	0
3	6	5,8	13	0	0
4	17	16,5	14	0	0
5	1	0,9	15	0	0
6	6	5,8	16	3	2,9
7	1	0,9	17	0	0
8	2	1,9			
9	2	1,9			
10	4	3,8			

Aglutinaciones dobles (15,5%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
5-16	2	1,9	6-10	1	0,9
6-13	2	1,9	2-5	2	1,9
2-10	2	1,9	4-10	1	0,9
9-10	1	0,9	7-8	1	0,9
2-4	1	0,9	3-10	1	0,9
3-9	1	0,9	2-16	1	0,9

TABLA 93 cont.

Aglutinaciones triples (3,9%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
4-9-10	1	0,9
2-5-16	1	0,9
5-10-16	1	0,9
1-2-9	1	0,9

Aglutinaciones múltiples (7,8%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
1-2-4-10	1	0,9
4-9-10-13	1	0,9
2-4-9-10	1	0,9
3-4-9-10	1	0,9
1-2-3-10	1	0,9
1-4-9-10-13	1	0,9
1-2-3-4-9-10	1	0,9
1-2-3-4-6-9-10	1	0,9

No aglutinables 15 (14,5%)

positivas, un 16,5%. Este porcentaje es comparable a los hallados con las cepas procedentes de aguas superficiales (12,1%) y formas farmacéuticas no estériles y alimentos (11,5%). En segundo lugar el suero en que aglutinan un número elevado de cepas aisladas de productos patológicos es el 0:11 (7,7%). Un 5,8% de estos microorganismos aglutinan con los siguientes sueros 0:1, 0:3 y 0:6.

Los resultados obtenidos con las 26 cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos se encuentran en la FIGURA 49 y en la TABLA 94. Frente al suero 1 aglutinan el 26,9% de los microorganismos. Este dato es comparable al resultado hallado con las cepas procedentes de suelos (28%). Se ha hallado un porcentaje elevado de aglutinación frente a los sueros 4 y 10, encontrándose en ambos casos un 11,5% de resultados positivos. En los serogrupos 0:3, 0:5, 0:6, 0:11 y 0:13 aglutinan el 3,8% de las cepas respectivamente. En total el 69,2% de las cepas aglutinan únicamente en un suero. El porcentaje de aglutinaciones dobles en las cepas de esta procedencia es 7,7%, triples 3,8% y múltiples 3,8%. Finalmente el 15,4% de las cepas no aglutinan frente a ningún suero.

TABLA 94

Resultados del tipado serológico de 26 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

Aglutinaciones simples (69,2%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	7	26,9	11	1	3,8
2	0	0	12	0	0
3	1	3,8	13	1	3,8
4	3	11,5	14	0	0
5	1	3,8	15	0	0
6	1	3,8	16	0	0
7	0	0	17	0	0
8	0	0			
9	0	0			
10	3	11,5			

Aglutinaciones dobles (7,7%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
5-16	2	7,7

Aglutinaciones triples (3,8%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
2-5-16	1	3,8

Aglutinaciones múltiples (3,8%)

<u>Nº suero</u>	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
3-4-5-6-11-14-15	1	3,8

No aglutinables 4 (15,4%)

En la TABLA 95 se describen los resultados del tipado serológico de 565 cepas de P. aeruginosa. El serotipo más frecuente es el 0:6, describiéndose en el 13,9% de las cepas. En la FIGURA 49 se puede observar que este serotipo no se halla distribuido de forma homogénea según la procedencia de las muestras. Los hábitats más característicos de este serotipo son suelos, aguas terrestres y aguas marinas. Tanto el serotipo 0:1 como el 0:4 se presentan con una frecuencia elevada, describiéndose respectivamente en un 10,6% y 10,0% de las cepas. De forma similar, la distribución de estos serotipos no es uniforme (FIGURA 49). Los restantes serotipos se presentan con una frecuencia más baja, pudiéndose resaltar tan sólo los serotipos 0:11 (5,6%) y 0:10 (5,3%). Únicamente frente al serotipo 0:17 no se evidencia ninguna aglutinación.

El 15,6% de los microorganismos aglutinan en dos sueros. La combinación más abundante es 0:5 y 16 (2,7%). También se pueden describir como características las asociaciones 0:2 y 5 (2,5%) y 0:7 y 8 (1,4%). Los porcentajes de aglutinaciones triples (3,7%) y múltiples (2,1%) son inferiores.

TABLA 95:

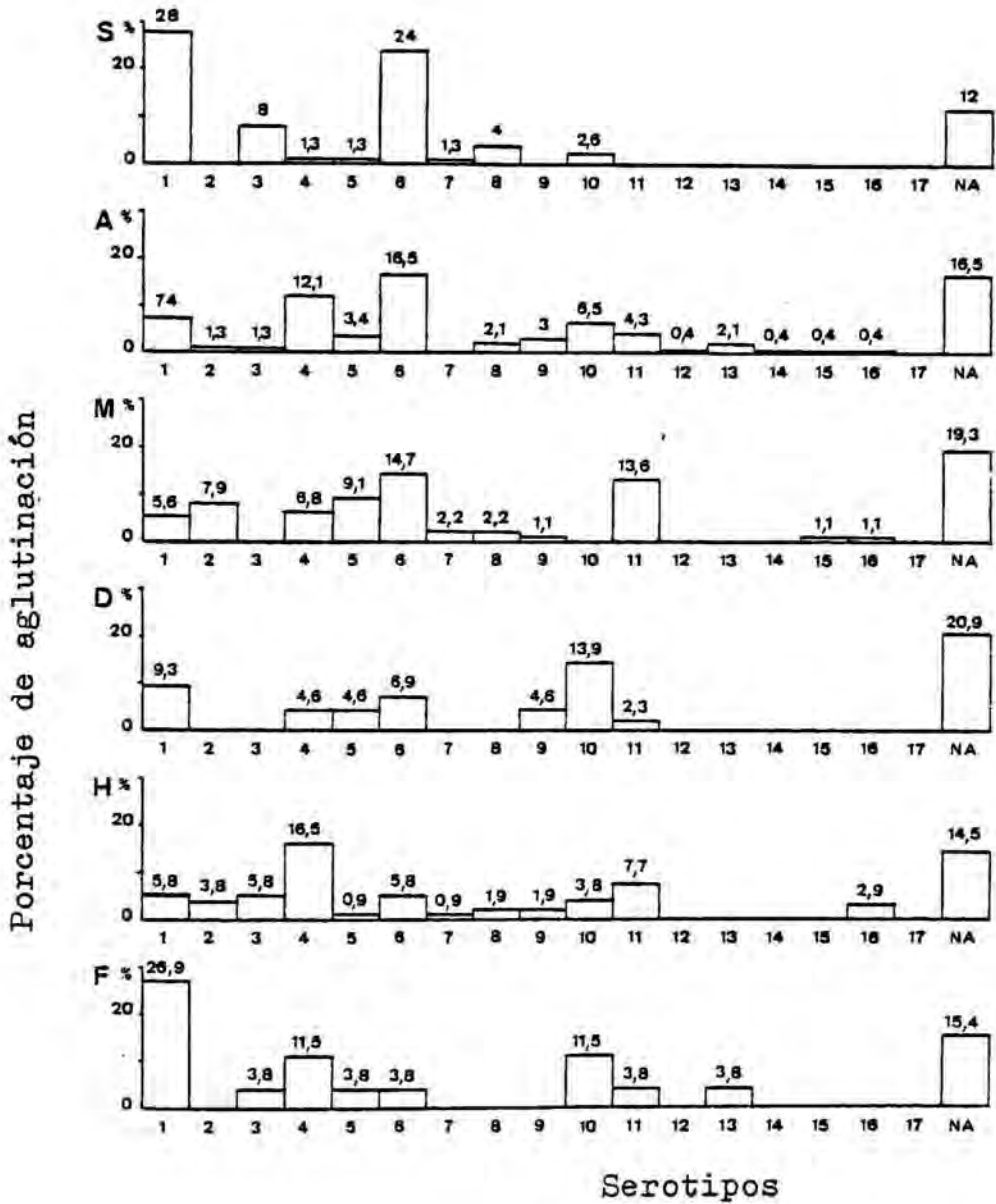
Resultado del tipado serológico de 565 cepas de P. aeruginosa

Aglutinaciones simples (62,3%)

<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>	<u>Nºsuero</u>	<u>Nºaglutinaciones</u>	<u>%</u>
1	60	10,6	11	32	5,6
2	14	2,4	12	1	0,1
3	16	2,8	13	6	1,0
4	57	10,0	14	1	0,1
5	21	3,7	15	2	0,3
6	79	13,9	16	5	0,8
7	4	0,7	17	0	0
8	12	2,1			
9	12	2,1			
10	30	5,3			

	<u>Nº aglutinaciones</u>	<u>%</u>
<u>Aglutinaciones dobles</u>	88	15,6
<u>Aglutinaciones triples</u>	21	3,7
<u>Aglutinaciones múltiples</u>	12	2,1
<u>No aglutinables</u>	92 (16,3%)	

FIGURA 49 Serogrupos hallados en las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.



El examen de los resultados del serotipado de las 565 cepas de P. aeruginosa revela la presencia de unas diferencias entre las distintas procedencias. Para poder tener una información más precisa de la relación existente entre los serotipos de cada zona de muestreo, se ha realizado una matriz de correlación con los porcentajes de aglutinación hallados en cada suero. Estos resultados se presentan en la TABLA 96.

El valor más elevado, $r=0,8074$, se presenta al comprobar los resultados del serotipado obtenidos con las cepas aisladas de fangos de depuradoras y aguas superficiales. Otros valores significativamente elevados son los hallados al comparar los resultados obtenidos con las cepas procedentes de aguas marinas y aguas superficiales ($r=0,7912$) y aguas terrestres con productos patológicos ($r=0,7893$).

Las correlaciones más bajas halladas son las que se presentan al realizar el estudio entre formas farmacéuticas no estériles con aguas marinas ($r=0,3754$) y productos patológicos con cepas procedentes de suelos ($r=0,4616$). Según estos datos, los tipos de cepas aisladas en dichos medios se pueden considerar serológicamente diferentes.

Suelos	1											
Aguas terrestres	0,6832 +++	1										
Aguas marinas	0,5128 +	0,7912 +++	1									
Depuradoras	0,5565 +	0,8074 +++	0,6144 ++	1								
P. patológicos	0,4616	0,7893 +++	0,6486 ++	0,6805 +++	1							
F. farmacéuticas	0,6810 +++	0,5825 ++	0,3754	0,5492 ++	0,5462 +	1						
TOTALES	0,7645 +++	0,9738 +++	0,8260 +++	0,8359 +++	0,8204 +++	0,6789 +++	1					
	S.	A.T.	A.M.	D.	P.P.	F.F.	TOT.					

+++ = Diferencia significativa, $\alpha = 0,001$
 ++ = Diferencia significativa, $\alpha = 0,01$
 + = Diferencia significativa, $\alpha = 0,05$

TABLA 96 Matriz de correlación de los resultados obtenidos en el serotipado de las 565 cepas de P. aeruginosa.

5.7. TIPADO POR PRODUCCION Y SENSIBILIDAD A LAS AERUGINOCINAS

En la TABLA 97 se encuentran los resultados del tipado de P. aeruginosa mediante la producción y sensibilidad a las aeruginocinas sobre 75 cepas aisladas de muestras de suelos. El tipado por producción permite situar a todas las cepas menos la 79.4, lo que supone un 98,8% de capacidad de tipado. Al realizar los ensayos de sensibilidad se tipan el 96% de las cepas, valor ligeramente inferior al anterior. Considerando los resultados obtenidos tanto por producción como por sensibilidad, se sitúa el 100% de las cepas (TABLA 115).

Los resultados del ALA aeruginocinotipo, mediante el uso de las cepas Alabama, tanto por producción como por sensibilidad (los dos primeros dígitos), se encuentran expresados en la TABLA 98. Con las cepas aisladas de muestras de suelos, el ALA aeruginocinotipo más abundante por producción es el 88, hallándose en 29 cepas (38,7%). La frecuencia de aislamiento de los restantes valores es muy inferior. El dígito 34 lo presentan 9 cepas y los dígitos 37 y 57, siete cepas en cada caso. Por sensibilidad

TABLA 97

Resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas y serotipo de 75 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
33.4	10	37 3112	88 8886
37.1	1	88 7588	12 4711
37.2	1	88 7588	12 4711
37.4	1	88 7588	12 4711
40.3	1	88 7588	12 6711
40.4	1	88 7588	12 6711
51.3	1	37 7322	16 6813
51.4	1	88 8878	12 2713
59.1	1	88 8674	12 2711
59.2	1	88 8674	12 2711
62.1	6	36 6888	15 4713
62.2	6	76 6888	15 4713
62.3	6	76 6888	15 4713
62.4	6	36 6888	15 4711
63.1	1	88 8878	12 4311
63.2	1	88 8878	12 4311
63.3	1	88 8878	12 4311
63.4	1	88 8878	12 4311
78.1	3	88 3888	14 4343
78.2	3	88 3888	14 4343
78.3	3,15	88 3888	14 4343
78.4	3,15	88 3888	14 4343
79.1	NA	88 8578	16 4741

TABLA 97 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
79.2	3	88 8578	16 4741
79.3	6	37 3112	38 7342
79.4	3	88 8888	16 4743
84.2	3	88 3578	16 2713
84.3	NA	12 1414	88 8886
86.1	8,12	12 1414	88 8886
86.2	1,15	88 8878	12 4711
116.1	6,16	34 1122	38 7842
116.2	6	34 1122	38 7842
116.3	6,16	34 1122	38 7842
116.4	NA	34 1122	38 7842
117.1	1,2,8	12 1414	88 5876
117.2	8	12 1414	88 5876
117.4	8	12 1414	88 5876
117.3	8	12 1114	88 8888
118.1	NA	34 1122	38 7842
118.2	NA	34 1122	38 7842
118.3	6	34 1122	38 7842
118.4	NA	34 1122	38 7862
123.1	6	37 3112	38 5742
123.3	6	37 3112	38 5742
123.4	6	37 3112	38 5742
124.1	NA	37 3112	38 5742
123.2	6	33 3112	38 5742
126.1	2,5	57 7422	88 8885
128.1	6	57 3122	88 7785
128.2	NA	57 3122	88 7785
128.3	6	57 3122	88 8885
128.4	6	57 3122	86 7772
130.1	1	88 8588	62 6883

TABLA 97 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
130.2	1	88 8578	62 6883
130.3	1	88 8578	12 4783
130.4	1	88 8578	12 4783
131.1	6	38 8877	15 4763
131.2	6	38 8887	18 6883
132.1	10	54 1121	88 8888
132.2	1	68 7738	12 6721
132.3	1	88 7858	12 4311
132.4	5	34 1121	88 8875
151.1	6	38 8887	15 6753
152.1	6	38 8887	15 6763
186	2,9	82 2884	12 2883
187	4	61 1251	88 8888
205	3	68 8878	14 1741
216	5,16	58 7832	88 8885
225	1	57 5122	35 8562
231	1	88 8688	12 6743
232	6,15	57 3112	38 8745
323.1	7,8	64 1117	88 8876
323.2	7	64 1117	88 8876
330	1,10	88 7888	12 6781
331	NA	88 7888	12 6711

Sensibilidad	<u>Producción</u>														Total	
	12	33	34	36	37	38	54	57	58	61	64	68	76	82		88
12												1	1	19	21	
14												1		4	5	
15				2		3							2		7	
16					1									4	5	
18						1									1	
35								1							1	
38		1	8		5			1							15	
62														2	2	
86								1							1	
88	6		1		1		1	4	1	1	2				17	
Total	6	1	9	2	7	4	1	7	1	1	2	2	2	1	29	75

TABLA 98 ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad de 75 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos.

aparecen tres dígitos con una frecuencia bastante elevada. El valor 12 se ha descrito en 21 cepas (28%), seguido del valor 88, hallado en 17 cepas (22,7%) y el valor 38 en 15 cepas (20%).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el ALA aeruginocinotipo tanto por producción como por sensibilidad, los valores hallados en los ensayos de producción con mayor frecuencia corresponden al 88 y en los ensayos de sensibilidad al 12, comunes en 19 cepas (25,3%). Otros valores de frecuencia inferior corresponden a los datos 34-38 para ocho cepas, 12-88 para seis y 37-38 para cinco.

Para poder verificar la existencia de una relación inversa entre los resultados obtenidos en el tipado por producción y sensibilidad, se ha clasificado cada cepa en uno de los nueve patrones distintos referidos al porcentaje de inhibición hallado por producción o sensibilidad a las aeruginocinas (TABLA 99). En caso de las cepas de P. aeruginosa procedentes de suelos, el patrón más frecuente es +/+++ (producción/sensibilidad), en el 28% de las cepas, seguido del patrón +/++, con un 21,3%. Los patrones que no se hallan son +++/+++ y ++/+++ , signifi-

TABLA 99

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 75 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	0%	28%
++	17,3%	2,6%	21,3%
+	17,3%	8%	5,3%

- +
- Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++
- Inhibición de 7 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++
- Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

cando este resultado que entre los microorganismos procedentes de muestras de suelos hay una ausencia de cepas muy productoras y muy sensibles a las aeruginocinas. De acuerdo con estos datos, las cepas de P. aeruginosa aisladas de suelos son malas productoras de aeruginocinas, pero sensibles a las mismas. Estas cepas son las únicas que presentaron dicha característica.

Los resultados del tipado de las cepas aisladas de muestras de aguas superficiales por producción y por sensibilidad se encuentran en la TABLA 100. Por producción se ha tipado el 97,4% de las cepas, mientras que por sensibilidad el 57,4%. Al combinar ambos métodos sólo una cepa no ha podido ser caracterizada (TABLA 115).

En la TABLA 101 se presenta el ALA aeruginocinotipo de las cepas de P. aeruginosa aisladas de aguas superficiales. Por producción los tipos más frecuentes son los que sus cifras iniciales son 88 (14,8%), 62 (12,2%), 37 (11,7%) y 12 (10,4%). La sensibilidad permite una agrupación en tres modelos : 88 en un 64,3%, 38 en un 14,8% y 12 en un 10%. Los ALA aeruginocinotipos obtenidos por combinación más abundantes son : 12-88 (10,4%), 42-88

TABLA 100

Resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas y serotipo de 230 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas superficiales terrestres.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
9.2	NA	88 3888	11 6763
9.4	1	88 7888	12 4711
12.3	13	88 7688	88 8888
25.1	NA	88 7658	11 2741
25.2	5	12 1112	88 8888
25.3	5	11 1414	88 8888
25.4	2,5	12 1414	88 8888
29.1	10	42 2637	88 8888
29.2	NA	42 2637	88 8888
32.1	1	78 8838	12 4883
32.2	1	78 8878	12 6883
32.3	1	88 8688	12 6741
42.1	9	88 7688	88 8888
42.2	9	88 7688	88 8888
42.3	9	88 7688	88 8888
43.1	5,16	12 1424	88 8875
43.2	5,16	12 1111	88 8875
43.3	5,16	12 1424	88 8885
43.4	2,5,16	12 1424	88 8888
57.1	6	57 3112	38 8845
57.2	4	62 1231	88 8888
57.3	4	61 1231	62 6887
57.4	4	61 1311	62 6887
60.1	NA	11 1424	88 8885

TABLA 100 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
60.3	5	11 1424	88 8885
60.4	11	62 1231	88 8888
64.1	4	62 1231	88 8888
64.2	1	88 8888	12 6411
64.3	1,4	61 1231	88 8888
64.4	4	61 1231	88 8888
70.1	2,5,16	11 1424	88 8885
70.2	2,5,16	11 1424	88 8885
71.1	8	12 1114	88 8888
74.1	6	24 3652	88 8888
74.2	6	57 3122	38 8745
74.3	6	57 3122	88 8875
74.4	6,13	37 3112	88 8785
75.1	6	37 3122	38 8845
75.2	6	37 3122	38 8865
75.3	6	37 3122	38 8865
75.4	6	37 3122	38 8865
76.1	1,2,3,4,6,9,10,13	37 3122	88 8885
76.2	1,2,3,4,6,9,10	37 3122	88 8885
76.4	1,2,3,4,6,9,10,13	37 3122	88 8885
85.1	1	57 3412	88 8858
90.1	6	85 7838	15 4741
90.2	13	88 8838	12 4741
90.3	13	37 3122	88 3772
95.1	10	42 1424	88 8888
102.1	10	42 1424	88 8888
102.2	11	62 1231	88 5888
102.3	4	62 1231	88 8888
102.4	10	42 1424	88 8888
104.1	1	88 8888	12 6431

TABLA 100 cont.

<u>Cepas número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
104.2	2	11 1424	88 8885
105.1	11	61 1211	88 5888
105.2	NA	62 1232	88 5888
105.4	2,5,11	42 1411	88 8888
106.3	1,2,13	61 1231	88 5888
107.1	NA	61 1231	88 5888
107.3	4,16	61 1231	88 5888
107.2	13	81 1232	88 5888
107.4	6	57 7112	38 5742
109.1	6,11	17 3122	38 7742
109.2	6,11	17 3122	38 7742
110.1	6,13	36 6887	12 4711
110.2	6,13	36 6887	12 4711
110.3	6,13	36 6867	12 4711
110.4	13	36 6888	12 4711
113.2	NA	37 3122	38 8811
116.4	11	61 1231	88 8878
117.1	6	37 3112	38 3742
117.2	6	37 3122	38 5742
117.3	6	57 7122	38 5742
117.4	6,10	37 3122	38 8762
118.1	8	12 1414	88 5876
118.2	10	12 1424	88 8888
118.3	11	21 1131	88 8878
118.4	10	12 1121	88 8888
125.1	2,4,10	62 1131	88 8888
125.2	4	62 1131	88 8888
125.3	4	62 1131	88 8888
126.3	4	62 1131	88 8888
126.4	4	62 1131	88 8888

TABLA 100 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
126.1	4	62 1151	88 8888
126.2	2,4	62 1151	88 8888
130.4	6	37 3412	38 8762
135.2	NA	24 1631	88 8888
138.1	6	62 1884	12 2841
139.1	5	46 1424	88 8875
139.2	5	42 1414	88 8848
139.3	5,10,16	12 1424	88 8875
139.4	NA	42 1424	88 8888
140.1	1	37 3322	18 4711
140.2	1	37 3312	16 4711
140.3	1	37 3312	16 4721
142.1	4	41 1111	88 8888
142.2	11	88 8578	76 7586
142.3	4	71 1131	88 8888
142.4	NA	42 1124	88 8888
143.1	6	14 3121	38 8772
143.2	NA	14 3111	38 8742
143.3	6,16	37 3111	38 5742
143.4	1	37 3322	15 6511
144.1	NA	11 1111	88 8888
144.2	NA	42 1421	88 8885
144.3	NA	66 1412	88 8888
147.1	NA	37 3112	38 8772
147.2	6	37 3112	38 8842
147.3	NA	37 3112	38 8742
147.4	6	37 3112	38 8742
149.1	NA	57 3111	88 8888
149.2	NA	42 1424	88 8875
155	10	87 7426	38 8865

TABLA 100 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
166	9,11	37 3122	38 8342
168	6	61 1131	88 8888
173	1	88 7888	12 6821
174	11	81 1231	88 5888
189	6	37 3122	38 5365
190	12	88 8888	88 8888
191	11	61 1131	88 8878
192	4	61 1231	88 8888
193	10	88 8858	12 6865
194	6	37 3112	38 8542
195	4	61 1231	88 8888
197	NA	61 7281	12 6885
210	2,5	12 1424	88 8888
232	9	62 1271	12 6511
233	NA	62 1271	12 6511
234	NA	62 1271	12 6511
235	6	57 3122	88 8888
236	9	61 7558	88 8888
237	4	62 1283	78 8811
238	4	62 1273	12 6811
242	NA	82 1273	88 8888
245	6	88 8888	12 6711
257	7,8	62 1672	88 8888
258	10,14	82 1232	88 8888
265	6	51 3125	88 8888
270	3	88 7878	11 6741
275	1	88 6538	88 8878
278	11	12 1411	88 8888
279	11	82 1273	88 8888
283	2	85 6858	88 8888

TABLA 100 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
284	4	12 1233	88 8888
285	4	12 1273	88 8888
286	NA	42 1157	86 8888
304	10	65 6878	88 8888
305	5,16	42 1117	88 8888
306	3	86 1135	11 1741
307	6	37 3112	31 7715
308	2,5	12 1424	88 8888
311	2,5	42 1427	88 8888
1a	5	42 3214	88 8885
2a	6	37 3412	38 5846
3a	2,5,15	12 1414	88 8885
6a	6	88 7178	15 6763
7a	6	88 7278	15 6741
8a	4	62 3231	88 8888
9a	2,5,10	45 3464	88 8888
10a	2,5	42 1424	88 8888
1b	6	88 7138	15 6741
2b	NA	82 1231	82 6887
3b	8	12 1424	88 8888
4b	6	88 7278	15 6883
5b	6	88 4425	88 8888
6b	NA	57 4122	88 8888
7b	10	42 1111	88 8888
8b	2,5	42 1424	88 8888
9b	6	88 8738	18 8885
10b	NA	88 8558	88 8888
1c	NA	57 7122	88 8888
2c	4,6,16	53 7112	88 8888
3c	4	41 1111	88 8888

TABLA 100 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
4c	4,11	41 1131	88 8888
5c	4	88 7355	88 8888
6c	NA	66 1111	88 8888
7c	1,4	61 1131	88 8888
8c	1	88 8686	12 2711
9c	1,4,16	61 1111	88 8888
10c	4,6	87 4726	88 8888
1d	10	57 7122	88 8788
2d	4	88 3155	88 8888
3d	NA	88 7755	88 8888
4d	4	62 1331	88 8888
5d	NA	37 3112	38 8741
1e	2	42 1424	88 8888
2e	15	21 1111	88 8888
3e	6	54 3122	88 8785
4e	5	57 8122	88 8885
5e	NA	11 1424	88 8885
1f	NA	88 8658	88 8885
2f	NA	61 1231	88 5888
3f	10	12 1424	88 8888
4f	5,16	11 1424	88 8888
5f	1,10	88 8888	38 8885
6f	9	57 7122	88 8888
7f	9	87 8558	88 8888
8f	4	62 1131	88 8888
9f	1	88 8578	22 6841
10f	14	87 8588	88 8888
1g	16	44 1111	88 8885
2g	8	12 1414	88 8886
3g	3	85 8878	12 8743

TABLA 100 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
4g	4	86 8858	38 8785
5g	6	64 1231	85 6888
6g	10	12 1424	88 8888
7g	4,6	62 1231	88 8888
8g	4	61 1231	42 6883
9g	2,5	42 1426	88 8888
10g	NA	42 1111	88 8888
1h	NA	33 3122	38 8845
2h	6	88 8888	18 8775
3h	10	86 8856	88 8888
4h	5	54 7112	88 8885
5h	NA	12 1124	88 8885
7h	NA	12 1114	88 8885
8h	6	34 3112	38 8845
9h	4	62 1231	88 8888
10h	10	65 8588	88 8888
1i	10,11	62 1231	88 8888
2i	10,16	87 8588	88 8886
3i	4,14	62 1231	88 8888
4i	NA	62 1231	62 6887
5i	6	57 3122	38 8745
6i	2,10	12 1424	88 8888
7i	8	42 1414	88 8878
8i	6	57 3122	38 8742
9i	1	88 6688	12 6761
10i	1	88 8688	12 6761

		Producción																																									
		11	12	14	17	21	24	33	34	36	37	41	42	44	45	46	51	53	54	57	61	62	64	65	66	71	78	81	82	85	86	87	88	Tot.									
11*																																			3	3							
12						4												1	5							2									11	23							
15										1																										4	6						
16										2																										2	2						
18										1																										2	3						
22																																				1	1						
31										1																										1	1						
38		2	2			1	1			19									6																1	1	34						
42																				1																1	1						
62																					2	1														3	3						
76																																					1	1					
78																					1																1	1					
82																																						1	1				
85																																						1	1				
86																																						1	1				
88	9	24		2	4					3	3	21	1	1	1	1	1	1	2	9	15	21		2	2	1											2	3	2	2	5	11	148
T.	9	24	2	2	4	1	1	4	27	3	22	1	1	1	1	1	1	1	2	15	19	28	1	2	2	1	2	2	1	2	2	4	3	3	6	34	230						

* Sensibilidad

TABLA 101 ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad de 230 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas superficiales terrestres.

(9,1%), 62-68 (9,1%), 37-38 (8,3%), 61-88 (6,5%), 88-12 (4,8%) y 88-88 (4,8%).

Tanto con la observación de los ALA aeruginocinotipos más frecuentes como con los patrones de la relación producción/sensibilidad a las aeruginocinas presentados en la TABLA 102, se puede afirmar que las cepas de P. aeruginosa aisladas de aguas superficiales son buenas productoras de aeruginocinas y poco sensibles a las mismas. En la TABLA 102 el patrón que se encuentra con más frecuencia es el +++/+, en un 44,8% de las cepas, seguido del patrón ++/+ en el 20,4% de las mismas.

Los resultados del tipado hallados con las 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de aguas marinas se encuentran en la TABLA 103. Por ensayos de producción se tipa el 100% de las cepas. En cambio mediante ensayos por sensibilidad el 35,2% de las cepas no han sido tipables (TABLA 115).

El ALA aeruginocinotipo se describe en la TABLA 104. Por producción los tipos que se han hallado con más frecuencia son el 12, que lo presentan 23 cepas, lo que representa un 26,1%. Unos porcentajes mucho más bajos son los

TABLA 102

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 230 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas superficiales terrestres.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	2,2%	5,2%
++	4,3%	6,1%	6,5%
+	44,8%	20,4%	10,4%

- + Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++ Inhibición de 6 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++ Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

TABLA 103

Resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas y serotipo de 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas marinas superficiales.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
1.1	11	61 6141	88 5888
1.2	3,10	88 6578	84 1813
2.1	9,10	58 6858	12 6867
3.1	15	61 1171	88 8888
7.1	NA	33 7112	38 8842
21.1	5	42 1424	88 8875
21.2	11	41 1111	88 8875
22.1	2	36 1855	88 8888
22.2	2,16	24 2722	88 8888
23.1	6	37 1122	58 8762
23.2	6	37 1122	58 8762
24.1	NA	11 1611	85 8888
24.2	11	61 1132	88 8878
25.1	11	61 1231	88 5878
25.2	11,16	64 1231	88 8878
26.1	5	11 1624	88 8875
26.2	7	46 1424	38 8876
28.2	11	66 3111	88 8878
31.1	2,5,16	12 1114	88 8888
31.2	16	12 1414	88 8885
32.1	6	17 1112	38 7762
32.2	2	62 1424	88 8875
33.1	7	12 1424	88 8882

TABLA 103 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
33.2	2	12 1411	88 8888
34.1	1	56 2234	12 6711
34.2	1	87 7828	88 8882
35.1	5	12 1424	88 8875
35.2	NA	12 1424	88 8875
36.1	1,5	12 1424	88 8875
36.2	1,5	12 1424	88 8875
38.1	5	12 1424	88 8875
38.2	1,5,6	12 1424	88 8875
39.1	NA	12 1424	88 8875
39.2	2	12 1424	88 8875
52.1	4	62 1111	88 8888
52.2	4	62 1111	88 8888
53.1	4	62 1111	88 8888
53.2	2	42 1131	88 8888
54.1	NA	42 1121	88 8888
54.2	NA	62 1231	88 8888
55.1	1	88 6538	26 6877
55.2	4	62 1231	88 8888
56.1	6	34 1112	88 8888
56.2	6	37 3112	37 3342
57.1	8	12 1424	18 7862
57.2	NA	37 3112	18 7862
58.1	6	37 3112	37 7862
58.2	NA	57 4112	88 8878
59.1	NA	12 1424	88 8886
59.2	8	12 1424	88 8886
64.1	6	12 1424	38 5745
64.2	NA	33 3112	88 8888
65.1	6	37 3112	37 3342

TABLA 103 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
65.2	6	37 3112	37 3342
78.1	5	42 1424	88 8875
79.1	6	88 7258	15 4761
79.2	5,16	42 1424	88 8875
90.1	1	68 5888	12 6711
99.1	NA	12 1421	85 8888
99.2	NA	12 1421	85 8888
105	2	62 1424	88 8588
106	NA	61 1211	88 8888
116	11	12 1424	88 5878
117	2	12 1424	88 8888
119	4	61 1111	88 8888
120	NA	12 1424	88 8888
121	2,5	42 1124	88 8888
122	NA	57 3422	78 4745
123	NA	42 1414	88 8885
124.1	11	62 1121	88 8888
124.2	11	62 1121	88 8888
126.1	11	61 1231	88 5888
126.2	5	62 3421	88 8885
127	11	21 1231	88 8888
128	6	57 3122	38 8782
131	2,5	11 1411	88 8888
132	NA	12 1424	88 8888
133	11	61 1231	88 8888
134	6	58 8426	88 8888
136	4	82 3271	88 8888
144	5	42 1424	88 8885
146	11	81 1231	88 8888
147	6	31 1122	38 8842

TABLA 103 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
148	5	12 1424	88 8885
149	1	57 8322	88 8888
156	9	34 3122	88 8888
158	7,8	11 1124	88 5888
162	2,5	42 1424	88 8888

que se han obtenido con los valores 62 (11,4%), 42 (10,2%) y 61 (9,1%). Los restantes tipos se encuentran bastante distribuidos. Por sensibilidad un número muy elevado de cepas, 64 (72,7%), que presentan un código que comienza por el número 88. Los restantes datos no manifiestan una frecuencia significativa. Al estudiar los resultados obtenidos combinando el tipado por producción y sensibilidad, los tipos que se describen con más frecuencia son los siguientes : 12-88 (21,6%), 62-88 (11,4%), 42-88 (10,2%) y 61-88 (9,1%).

Las cepas procedentes de poblaciones aisladas a partir de hábitats marinos son altamente productoras de aeruginocinas, presentando el índice más elevado entre la colección de P. aeruginosa que hemos estudiado. Los tres patrones que cumplen esta característica, +++/++, +++/+ y ++/+, se hallan en el 89,8% de las cepas. Entre estos el más abundante es +++/+, en el 69,3% de los casos (TABLA 105).

En la TABLA 106 se presentan los resultados del tipado por producción y sensibilidad de 43 cepas de P. aeruginosa aisladas de fangos de depuradoras. Por producción se tipan todas las cepas, mientras que por sensibilidad 19

Sensibilidad	Producción																											
	11	12	17	21	24	31	33	34	36	37	41	42	46	56	57	58	61	62	64	66	68	81	82	87	88	Tot.		
12														1		1											3	
15																											1	
18										1																	1	
26																											2	
37																											1	
38										4																	4	
58												1															6	
78										2																	2	
84																1											1	
85																											1	
88																											3	
Total	4	23	1	1	1	1	2	2	1	7	1	9	1	1	4	2	8	10	1	1	1	1	1	1	1	3	88	

TABLA 104 ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad de 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas marinas superficiales.

TABLA 105

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 88 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de aguas marinas superficiales.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	1,1%	1,1%
++	9,1%	1,1%	3,4%
+	69,3%	11,4%	3,4%

- + Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++ Inhibición de 7 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++ Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

TABLA 106

Resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas y serotipo de 43 cepas de P. aeruginosa aisladas de fangos de depuradoras.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
1	1	86 5874	12 2788
3	10	12 1424	88 8888
5	NA	42 1424	88 8885
7	10	12 1424	88 8888
8	1	68 8578	11 6744
9	10	66 7578	88 8888
11	7,8	12 1114	88 5878
16	4,16	62 1271	42 6886
18	1	48 8878	12 4714
19	9	62 2684	12 6844
20	6	37 3112	38 5748
21	6	88 4255	15 2744
29	9	12 1424	12 6864
31	NA	62 1644	88 8888
34	15,16	66 7666	88 8885
35	NA	14 3112	88 8788
36	6	14 3112	88 8888
37	NA	54 7125	88 8888
38	NA	54 7125	88 8888
39	NA	14 3112	88 8888
43	11	61 1211	88 5888
50	4	12 1424	88 8888
52	NA	42 1424	88 8888
53	1,9,10	27 1122	38 8846
54.1	2,5	42 1414	88 8888

TABLA 106 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
54.2	5,16	57 1122	38 8866
55.1	10	12 1421	88 8888
55.2	10	86 7858	88 8888
57	5,16	42 1121	88 8888
58	5,16	12 1424	88 8885
59	7,8	12 1424	88 8886
60	10	42 1424	88 8888
61	7,8	58 5712	18 8535
63.1	7,8	87 8888	12 6713
63.2	1	87 8688	38 8788
64	5	42 1414	88 8888
65	4	82 1271	88 8888
67	6,16	56 8786	88 8885
72	NA	61 1231	88 8888
73	NA	58 8422	38 8788
74	5,16	12 1426	88 8888
75	4,5,16	62 5426	88 8885
77	5	22 8488	88 8885

cepas presentan el patrón 888888, lo que significa que un 44,2% no fueron tipables (TABLA 115).

El ALA aeruginocinotipo por producción se presenta en la TABLA 107. Se puede observar que por producción hay una distribución bastante amplia de los resultados. Los códigos más frecuentes son 12 (20,9%) y 42 (14,0%). Por ensayos de sensibilidad más de la mitad de las cepas (67,4%) tienen como código 88. El 12 se presenta en 11,6% de las mismas. En la TABLA 107, al comparar los valores obtenidos tanto por producción como por sensibilidad encontramos que las combinaciones más frecuentes son 12-88, que la presentan ocho cepas (18,6%) y la combinación 42-88 en seis cepas (14,0%).

En la TABLA 108 se presentan los patrones de la relación producción/sensibilidad a las aeruginocinas de las cepas procedentes de fangos de depuradoras. El patrón que se describe con mayor frecuencia es +++/+, en el 46,5% de los casos. En general, los patrones más abundantes son los que presentan una mayor producción que sensibilidad, afectando al 69,7% de las cepas, valor muy similar al hallado en las cepas procedentes de aguas terrestres.

		<u>Producción</u>																																												
<u>Sensibilidad</u>		12	14	22	27	37	42	48	54	56	57	58	61	62	66	68	82	86	87	88	Total																									
11										1											1																	1								
12						1						1									1																			5						
15																									1																	1				
18																								1																			1			
38						1	1				1	1																																5		
42														1																															1	
88		8	3	1		6		2	1				2	2	2								1																						29	
Total		9	3	1	1	1	6	1	2	1	1	2	2	4	2	1	1					2																							43	

TABLA 107 ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad de 43 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de fangos de depuradoras.

TABLA 108

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 43 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de fangos de depuradoras.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	0%	2,3%
++	2,3%	4,7%	9,3%
+	46,5%	20,9%	14,0%

- +
- Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++
- Inhibición de 7 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++
- Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

Una vez realizado el tipado por aeruginocinas de las 103 cepas de P. aeruginosa procedentes de productos patológicos, se dispusieron los resultados en forma de código. Estos resultados se presentan en la TABLA 109. Por producción, cinco cepas no pudieron ser tipadas, lo que representa un 95,1% de tipabilidad del método. Por sensibilidad este valor es más bajo, habiéndose tipado el 70,9% de las cepas. Al combinar ambos métodos se ha conseguido un 98,1% de tipabilidad, apareciendo dos cepas no caracterizables usando los dos métodos (TABLA 115).

Según la TABLA 110 el ALA aeruginocinotipo que se presenta con mayor frecuencia al tipar las cepas por producción es el 88 (25,2%), seguido del 86 (16,5%) y 61 (9,7%). Los restantes códigos se han hallado en un número inferior de cepas. Por sensibilidad también el código 88 es el que se ha descrito con más frecuencia (43,7%), seguido del 62 (16,5%) y del 38 (9,7%). Combinando el tipado por producción y sensibilidad, los resultados más significativos debido al número de cepas en los que se han descrito son: 86-62 (11,7%) y 61-88 (9,7%), no pudiéndose describir modelos homogéneos de tipado por hallarse los distintos tipos heterogeneamente distribuidos entre las cepas.

TABLA 109

Resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas y serotipo de 103 cepas de P. aeruginosa aisladas de productos patológicos.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
1	5,16	42 1424	88 8888
2	8	22 1424	88 8888
3	16	61 1151	88 8888
4	6,13	65 6558	88 5883
5	1,2,4,10	88 6888	38 8888
6	NA	86 1481	66 6887
7	4	86 2781	68 6887
8	1	88 8688	12 6741
9	2,10	88 8888	18 6863
10	4	86 8788	62 6887
11	9,10	86 8758	12 6863
12	2,4	86 3755	62 6887
13	2	86 5788	62 6887
14	4	86 3755	62 6887
15	4	86 3755	62 6887
16	2	57 7425	88 8888
17	4,9,10,13	68 8886	58 8888
18	16	88 8888	38 6863
19	16	88 8388	12 6841
20	10	37 7422	88 8888
21	NA	22 1251	88 8888
22	NA	86 3751	62 6887
23	4	88 8886	88 8888
24	11	11 1131	88 8888

TABLA 109 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
25	NA	41 1231	88 8888
26	3,9	88 8856	38 8885
27	4	86 1755	62 8887
28	4	82 1871	88 8888
29	4	86 1731	62 6887
30	2	88 8688	12 6863
31	1	88 7658	12 6741
32	NA	77 4422	36 8765
33	9	88 8858	18 8867
34	4	86 1731	62 6887
35	NA	86 1731	88 8888
36	2,16	42 1414	88 8885
37	2	75 7432	88 8888
38	6,10	37 4422	38 8785
39	4	84 5884	28 8888
40	7	14 1112	88 8888
41	1	88 8688	78 8781
42	6,13	57 1412	78 8888
43	11	61 2214	88 5888
44	2,4,9,10	61 1231	88 8888
45	11	61 1211	88 8888
46	2,5	42 1424	88 8888
47	NA	61 1211	88 5888
48	4	86 1481	62 6887
49	11	61 1211	88 5888
50	2,10	88 5277	88 5878
51	6	38 3112	58 8868
52	NA	88 3888	21 4567
53	4,9,10	88 8888	88 8888
54	NA	88 8688	58 8365

TABLA 109 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
55	6	37 1112	36 5742
56	2,5	62 1626	58 8868
57	3	76 4885	21 4313
58	NA	61 1211	88 8888
59	1	84 1281	62 6888
60	6	37 1112	88 8888
61	NA	87 8628	88 6883
62	6	87 7426	38 8785
63	5	41 1424	88 8885
64	8	61 1414	88 8878
65	11	61 1111	88 8888
66	NA	61 1231	88 8888
67	5,16	62 1424	88 8885
68	4,10	88 8888	88 8888
69	1,2,3,4,6,9,10	88 7838	62 6887
70	7,8	62 3626	88 8878
71	NA	87 8426	38 8868
72	2,5,16	62 3426	88 8885
73	5,10,16	62 3426	88 8885
74	6	57 7426	38 8885
75	3,10	85 7888	11 6887
76	1	57 8722	36 7851
77	1	57 8722	36 7851
78	10	42 3424	88 8888
79	3	88 7888	55 6753
80	6	55 7122	38 8842
81	4	82 1272	88 8888
82	NA	88 7888	21 6873
83	3	88 7876	11 8783
84	11	81 1231	88 8888

TABLA 109 cont.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
85	9	11 1426	88 8888
86	11	81 1232	88 8888
87	3	88 7848	88 6866
88	3	88 7878	11 6773
89	NA	37 3122	38 8885
90	4	86 3282	62 6887
91	1,2,9	12 1422	88 8888
92	3,4,9,10	78 8888	78 8888
93	3	88 7888	12 6783
94	10	12 1414	88 8888
95	11	88 8588	88 8885
96	10	12 3424	88 8888
98	4	86 3282	62 6583
100	1,2,3,4,9,10	58 8888	22 6887
101	4	82 7282	82 6583
102	4	82 7282	62 6885
103	4	88 7888	62 6887
104	1,4,9,10,13	88 8888	62 2876
105	1,2,3,10	86 8888	38 8888

		Producción																	Total									
		11	12	14	22	37	38	41	42	55	57	58	61	62	65	68	75	76	77	78	81	82	84	85	86	87	88	
11*																												
12																												
18																												
21																												
22																												
28																												
36	1																											
38	2																											
55																												
58	1																											
62																												
66																												
68																												
78																												
82																												
88	2	3	1	2	2	2	4	1	2	4	1	10	4	1	1	1	2	2	1	1	6	45						
Total	2	3	1	2	5	1	2	4	1	5	1	10	5	1	1	1	1	1	1	2	4	2	1	17	3	26	103	

* Sensibilidad

TABLA 110 ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad de 103 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de productos patológicos.

Al observar los patrones de la relación producción/sensibilidad en la TABLA 111, se puede apreciar una tendencia hacia la existencia de cepas buenas productoras. El patrón más frecuente, ++/+, lo presentan el 31,2% de las cepas y el patrón +++/+, el 24,3%. Cabe también destacar la elevada presencia del patrón +/+, en el 26,2% de las cepas. Estas se caracterizan por la escasa producción de aeruginocinas y al mismo tiempo por su baja sensibilidad. Es en las cepas procedentes de productos patológicos donde se presenta este patrón con más frecuencia.

En la TABLA 112 se encuentran los resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas de 26 cepas de P. aeruginosa aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Mediante el tipado por producción se ha caracterizado el 100% de las cepas, mientras que por sensibilidad tan sólo se ha tipado el 46,2% (TABLA 115).

Según la TABLA 113 los ALA aeruginocinotipos más frecuentes hallados por producción son el 88 (30,8%), el 42 (23,1%) y el 12 (11,5%). Por sensibilidad principalmente se encuentra el valor 88 (61,5%) y también el 11 (23,1%).

TABLA 111

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 103 cepas de P. aeruginosa aisladas de productos patológicos.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	0%	1,0%
++	1,0%	2,9%	13,6%
+	24,3%	31,2%	26,2%

- +
- Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++
- Inhibición de 7 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++
- Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

TABLA 112

Resultados del tipado por producción y sensibilidad a las aeruginocinas y serotipo de 26 cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

<u>Cepa número</u>	<u>Serotipo</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>
14	4	61 1231	88 8888
96	4	61 1231	88 8888
71	3	82 3858	14 8888
126	NA	12 1411	88 8888
172	NA	12 1411	88 8888
129	1	88 8688	11 6743
132	1	88 8688	11 6743
133	1	88 8688	11 6743
150	1	88 8688	11 6743
243	1	88 8688	11 6743
245	1	88 8688	11 6743
155	10	42 1414	88 8888
173	11	42 1414	88 8888
174	10	42 1434	88 8888
189	10	41 1114	88 8888
224	2,5,16	12 1414	88 8888
294	5,16	42 1414	88 8885
503	5,16	42 1414	88 8885
295	1	88 8688	16 6773
540	5	42 1414	88 8888
541	NA	41 1414	88 8888
548	6	88 8688	15 6763
553	4	82 1281	67 2883
561	13	57 7412	88 8888
563	NA	57 7412	88 8888
564	3,4,5,6,11,14,15	81 1151	88 8888

Al hacer el estudio del tipado los dos tipos más abundantes son : 42-88 (23,1%) y 88-11 (23,1%).

En la TABLA 114 se presentan los patrones de la relación producción/sensibilidad a las aeruginocinas. El patrón más frecuente es +++/+, describiéndose en el 53,8% de las muestras. El 30,8% de las mismas fueron malas productoras, poseyendo el patrón +/-.

Los valores del aeruginocinotipado permiten además verificar ensayos de semejanza entre los distintos grupos naturales aislados de P. aeruginosa. Para ello hemos calculado los porcentajes de inhibición presentados frente a cada cepa ALA (TABLA 116). Con los datos obtenidos se ha construido una matriz de correlación (TABLA 117). El valor de r más elevado corresponde a las cepas procedentes de fangos de depuradoras y aguas marinas ($r=0,9099$); es asimismo interesante señalar que el índice de correlación de productos patológicos y aguas terrestres superficiales proporciona un índice de correlación $r=0,9040$. Los restantes valores obtenidos por este procedimiento son claramente inferiores. En realidad estos resultados confirman la gran variabilidad entre las cepas estudiadas del medio ambiente.

Sensibilidad	<u>Producción</u>											Total
	12	41	42	57	61	62	81	82	88	88	Total	
11										6		6
14								1				1
15									1			1
16										1		1
67								1				1
88	3	2	6	2	1	1	1					16
Total	3	2	6	2	1	1	1	2	8			26

TABLA 113 ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad de 26 cepas de P. aeruginosa aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

TABLA 114

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 26 cepas de P. aeruginosa aisladas de formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	0%	0%
++	0%	0%	30,8%
+	53,8%	11,5%	3,8%

- + Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++ Inhibición de 7 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++ Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

<u>Método</u>	<u>Porcentajes de tipabilidad</u>							TOTALES
	S	A	M	D	H	F		
<u>Producción</u>	98,7 (74)*	97,4 (224)	100 (88)	100 (43)	95,1 (98)	100 (26)		97,9 (553)
<u>Sensibilidad</u>	96 (72)	57,4 (132)	64,8 (57)	55,8 (24)	70,9 (73)	46,2 (12)		65,5 (370)
<u>Producción y Sensibilidad</u>	100 (75)	99,6 (229)	100 (88)	100 (43)	98,1(101)	100 (26)		99,5 (562)

470

* No de cepas tipables

TABLA 115 Tipado por aeruginocinas. Porcentajes de tipabilidad obtenidos en cada técnica.

TABLA 116 Porcentaje de inhibición producido por las aeruginocinas de las 565 cepas de P. aeruginosa sobre las cepas ALA.

ALA	<u>Origen de las muestras</u>						TOTAL
	S(75)	A(230)	M(88)	D(43)	H(103)	F(26)	
1	53,3	40,4	55,7	48,8	20,4	19,2	40,5
2	14,7	51,3	72,7	69,8	30,1	50,0	47,4
3	44,0	43,9	59,1	46,5	21,4	42,3	42,3
4	14,7	53,0	70,5	53,5	36,9	61,6	48,1
5	32,0	58,3	77,3	76,7	55,3	61,5	58,8
6	34,7	43,5	40,9	27,9	32,0	26,9	37,9
7	48,0	73,0	89,8	69,8	55,3	61,5	68,3
8	32,0	56,1	79,5	55,8	42,7	57,7	54,2
9	58,7	84,8	70,5	51,1	71,8	69,2	73,5
10	36,0	63,5	53,4	39,5	31,1	19,2	48,5
11	45,3	81,3	92,0	81,4	60,2	96,1	75,0
12	45,3	63,5	78,4	62,8	47,6	53,8	60,0
13	40,8	81,3	95,5	69,8	61,2	65,4	73,8
14	42,7	52,6	79,5	67,4	38,8	46,2	53,8
15	45,3	51,3	45,5	39,5	31,1	57,7	45,3
16	38,7	57,8	55,7	39,5	47,6	30,8	50,4
17	53,3	73,0	93,2	76,7	65,0	69,2	72,2
18	24,0	52,6	69,3	48,8	33,9	57,7	47,9

Suelos	1												
Aguas terrestres	0,4477	1											
Aguas marinas	0,1569	0,6821 ++	1										
Depuradoras	0,0900	0,5314 +	0,9099 +++	1									
P. patológicos	0,4210	0,9040 +++	0,6918 ++	0,5724 +	1								
F. farmacéuticas	0,0988	0,6701 ++	0,7319 +++	0,6990 ++	0,6927 ++	1							
TOTALES	0,4777 +	0,9537 +++	0,8315 +++	0,7160 +++	0,9366 +++	0,7618 +++	1						
	S.	A.T.	A.M.	D.	P.F.	F.F.	TOT.						

+++ = Diferencia significativa, $\alpha = 0,001$
 ++ = Diferencia significativa, $\alpha = 0,01$
 + = Diferencia significativa, $\alpha = 0,05$

TABLA 117 Matriz de correlación de los porcentajes de inhibición producidos por las aeruginocinas de 565 cepas de P. aeruginosa sobre las cepas ALA según la diferente procedencia de las mismas.

Los resultados obtenidos con el tipado por sensibilidad proporcionan asimismo porcentajes de inhibición sobre las distintas cepas de P. aeruginosa según su procedencia (TABLA 118). Con estos datos se ha verificado una matriz de correlación (TABLA 119). Como puede observarse, al comparar los datos por producción y sensibilidad (TABLAS 116 y 118), es claro que los valores por producción permiten una mayor capacidad de relación entre las distintas cepas de P. aeruginosa problema debido a la elevada inhibición hallada. En la TABLA 119 se señalan los datos correspondientes a la matriz de correlación obtenida a partir de los valores de sensibilidad. Los valores más bajos son los que se presentan al comparar las cepas procedentes de aguas marinas con productos patológicos ($r=0,2250$) y con los procedentes de formas farmacéuticas no estériles ($r=0,3529$). En general, los valores obtenidos son más elevados que los presentados en la TABLA 117. Esta correlación más fuerte es debida en parte a que un número elevado de cepas fueron no tipables por sensibilidad y no al hecho de que al tiparlas fueran iguales.

TABLA 118 Porcentaje de inhibición producido por las aeruginocinas de las cepas ALA sobre 565 cepas de P. aeruginosa.

ALA	<u>Origen de las muestras</u>						TOTAL
	S(75)	A(230)	M(88)	D(43)	H(103)	F(26)	
1	70,6	33,0	21,6	32,6	33,9	34,6	36,5
2	54,7	19,1	7,9	20,9	34,9	38,5	25,8
3	70,7	33,5	19,3	32,6	27,2	34,6	35,0
4	38,7	18,3	7,9	18,6	33,0	26,9	22,5
5	45,3	16,1	5,7	18,6	36,9	30,8	23,0
6	9,3	1,7	5,7	2,3	5,8	30,8	5,5
7	21,3	10,0	11,4	13,9	6,8	3,8	11,2
8	54,7	18,7	7,9	18,6	36,9	34,6	25,8
9	53,3	7,8	11,4	2,3	3,9	0	12,9
10	17,3	3,5	4,5	2,3	4,9	0	5,5
11	2,7	0,9	0	0	0	0	0,7
12	61,3	22,6	13,6	25,6	12,6	30,8	25,1
13	30,7	9,6	3,4	6,9	4,9	0	9,9
14	68,0	28,3	20,5	23,3	18,4	26,9	30,1
15	66,7	30,0	36,4	23,3	11,7	26,9	31,9
16	82,7	45,7	43,2	20,9	36,9	42,3	46,5
17	53,3	24,8	22,7	23,3	9,7	0	24,2
18	54,7	20,0	6,8	13,9	33,0	34,6	24,1

Suelos	1																	
Aguas terrestres	0,9163 +++	1																
Aguas marinas	0,7387 +++	0,8474 +++	1															
Depuradoras	0,8027 +++	0,8532 +++	0,5810 +	1														
P. patológicos	0,6003 ++	0,6110 ++	0,2250	0,6102 ++	1													
F. farmacéuticas	0,6006 ++	0,6263 ++	0,3529	0,6132 ++	0,8140 +++	1												
TOTALES	0,9428 +++	0,9806 +++	0,7857 +++	0,8636 +++	0,7244 +++	0,7230 +++	1											
	S.	A.T.	A.M.	D.	P.P.	F.F.	TOT.											

+++ = Diferencia significativa, $\alpha = 0,001$
 ++ = Diferencia significativa, $\alpha = 0,01$
 + = Diferencia significativa, $\alpha = 0,05$

TABLA 119 Matriz de correlación de los porcentajes de inhibición producidos por 18 cepas ALA sobre 565 cepas de P. aeruginosa según los diferentes orígenes de las cepas.

El ALA aeruginocinotipado de las 565 cepas de P. aeruginosa se presenta en la TABLA 120. Por producción el tipo más frecuente es el 88, que lo presentan 101 cepas (17,9%); también lo son el 12 (62 cepas, 11,0%), el 37, 42 y 62 (47 cepas, 8,3% cada uno). Por sensibilidad se pueden considerar tres tipos como los más característicos. Principalmente se encuentra el 88 (319 cepas, 56,5%), aunque también el 38 (70 cepas, 12,4%) y el 12 (58 cepas, 10,3%).

Combinando el ALA aeruginocinotipo por producción y sensibilidad tenemos que los valores más frecuentes son : 12-88 (10,1%), 42-88 (8,1%), 61-88 (6,7%), 62-88 (6,5%) y 88-12 (6,2%). Entre estos valores se puede observar una tendencia hacia la presencia de cepas buenas productoras de aeruginocinas y poco sensibles. De todas formas esta propiedad puede apreciarse claramente en la TABLA 121.

El patrón que se presenta con mayor frecuencia al tener en cuenta la relación entre la inhibición por producción y por sensibilidad de las 565 cepas de P. aeruginosa aisladas es el +++/+ (41,8%) (TABLA 121). En ningún caso se ha descrito el patrón +++/+++ . Sin embargo, el patrón +/+, que corresponde a las cepas tanto malas productoras como poco sensibles, se presenta en un 11,5% de los microorganismos estudiados.

TABLA 121

Relación entre la producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas en 565 cepas de P. aeruginosa.

<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción</u>		
	+++	++	+
+++	0%	1,1%	6,4%
++	5,8%	3,9%	10,6%
+	41,8%	18,9%	11,5%

- + Inhibición de 0 a 6 cepas ALA o inhibición producida por 0 a 6 lisados de cepas ALA.
- ++ Inhibición de 7 a 12 cepas ALA o inhibición producida por 7 a 12 lisados de cepas ALA.
- +++ Inhibición de 13 a 18 cepas ALA o inhibición producida por 13 a 18 lisados de cepas ALA.

En la TABLA 121 se puede observar que el 66,5% de las cepas de P. aeruginosa estudiadas en este trabajo se comportan como buenas productoras y poco sensibles (+++/++, +++)/+ y ++/+), el 18,1% presentan el patrón contrario (++/+++, +/+++ y +/++), el 3,9% presentan una producción y sensibilidad media (++/++), mientras que el patrón de las restantes es de baja producción y sensibilidad (+/+).

Se ha realizado un estudio con los tres métodos de tipado empleados : serológico, por producción y por sensibilidad a las aeruginocinas. Los resultados obtenidos combinando estos tres métodos se presentan en la TABLA 122. Al estudiar cada método de forma individual se puede apreciar que el porcentaje más elevado de cepas no tipables es el que corresponde al realizar el tipado por sensibilidad a las aeruginocinas. Ligeramente inferior es el resultado obtenido al realizar la aglutinación de las cepas de P. aeruginosa. De todos modos este resultado no es muy satisfactorio, pues 92 cepas (16,3%) no fueron tipables. Mediante el tipado por producción, el porcentaje de cepas no tipables desciende considerablemente, pues únicamente el 2,1% cumplen esta característica.

<u>Combinación de los métodos</u>						
	<u>Agglutinación</u>	<u>Producción</u>	<u>Sensibilidad</u>	<u>Producción Sensibilidad</u>	<u>Agglutinación Producción</u>	<u>Agglutinación Sensibilidad</u>
S	12 (9)‡	1,3 (1)	4 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A	16,5 (38)	2,6 (6)	42,6 (98)	0,4 (1)	0 (0)	6,5 (15)
M	19,3 (17)	0 (0)	35,2 (31)	0 (0)	0 (0)	6,8 (6)
D	20,9 (9)	0 (0)	44,2 (19)	0 (0)	0 (0)	6,8 (6)
H	14,6 (15)	4,8 (5)	29,1 (30)	1,9 (2)	0 (0)	4,9 (5)
F	15,4 (4)	0 (0)	53,8 (14)	0 (0)	0 (0)	15,4 (4)
Total	16,3 (92)	2,1 (12)	34,5 (195)	0,5 (3)	0 (0)	6,4 (36)

TABLA 122 Porcentajes de cepas no tipables según las diferentes combinaciones de métodos de tipado (‡, número de cepas).

Al combinar dos métodos se obtienen los siguientes resultados : por producción y sensibilidad sólo tres cepas resultan no tipables (0,5%);teniendo en cuenta el tipado serológico y por producción de aeruginocinas, todas las cepas se pueden caracterizar. Se obtiene un resultado ligeramente inferior al combinar los resultados del tipado serológico y por sensibilidad, puesto que el 6,4% de los microorganismos no son tipables.

En la TABLA 123 se expresan las experiencias correspondientes a presuntas relaciones entre los tres modelos de serotipos más frecuentes, el 0:6, 0:1 y 0:4 respecto a antibióticos, quimioterápicos y metales pesados. En el caso del serotipo 0:4 destacan las elevadas resistencias frente a la gentamicina, mercurio y telurio. Contrariamente las cepas pertenecientes al serotipo 0:1 se caracterizan por ser las más sensibles a la carbenicilina, arsénico y talio. El serotipo 0:6 no presenta caracteres significativamente distintos.

Independientemente se ha considerado oportuno verificar un estudio comparativo sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y las diferentes relaciones producción/sensibilidad a las aeruginocinas (TABLA 124). Al comparar

TABLA 123 Resistencia a los agentes antimicrobianos en los serotipos más abundantes de las cepas de P. aeruginosa aisladas en este trabajo.

	<u>Serotipo 1(60)</u>	<u>Serotipo 4(57)</u>	<u>Serotipo 6(79)</u>
FO	88,3	87,7	88,6
NN	0	5,3	3,8
CB	3,3	49,1	54,4
GM	5	42,1	8,9
TE	98,3	98,2	98,7
CL	8,3	8,8	3,8
SD	73,3	61,4	50,6
C	100	100	100
FM	100	100	100
N	68,3	68,4	63,3
NA	100	100	100
S	98,3	96,5	94,9
K	100	100	100
CF	100	100	100
AM	100	100	100
Hg	61,7	84,2	64,6
Pb	100	100	100
As	50	91,2	87,3
Cd	100	100	100
Ag	0	0	0
Cr	100	96,5	100
W	100	98,2	98,7
Tl	95	100	100
Mo	100	100	100
Te	45	84,2	59,5
U	100	100	100
Zn	100	100	100

TABLA 124 Porcentaje de resistencia a los agentes antimicrobianos en las cepas de P. aeruginosa agrupadas según la relación entre la producción y sensibilidad a las aeruginocinas.

	+++/+	+++/++	++/+	++/++	++/+++	+/+	+/++	+/+++
	(236)	(33)	(107)	(22)	(6)	(65)	(60)	(36)
FO	91,9	90,9	64,5	90,9	100	93,8	93,3	94,4
NN	5,5	6,1	5,6	0	0	13,8	5	0
CB	46,2	57,6	47,7	50	66,7	58,5	45	55,6
GM	13,1	9,1	18,7	9,1	16,7	41,5	15	5,6
TE	98,7	100	96,3	95,5	100	66,2	100	88,9
CL	11,4	6,1	6,5	4,5	16,7	9,2	3,3	2,8
SD	57,6	51,5	57,0	40,9	66,7	64,6	81,7	72,2
C	100	100	100	100	100	100	100	100
FM	100	100	100	100	100	100	100	100
N	56,4	57,6	53,3	59,1	50	67,7	63,3	72,2
NA	100	100	100	100	100	100	100	100
S	93,6	97,0	96,3	100	83,3	96,9	100	91,7
K	100	97,0	96,3	100	100	100	100	100
CF	100	100	100	100	100	100	100	100
AM	100	100	100	100	100	100	100	100
Hg	72,0	60,6	74,8	36,4	16,7	89,2	60	41,7
Pb	100	100	100	100	100	100	100	100
As	78,4	97,0	82,2	86,4	83,3	84,6	63,3	44,4
Cd	100	100	100	95,5	100	100	100	100
Ag	0	0	0	0	0	0	0	0
Cr	98,7	100	100	95,5	100	96,9	100	100
W	96,6	100	100	95,5	100	93,8	98,3	97,2
Tl	98,3	100	98,1	100	100	98,5	96,7	97,2
Mo	100	100	100	100	100	100	100	100
Te	66,9	33,3	67,3	81,8	83,3	67,7	51,7	22,2
U	100	100	100	100	100	100	100	100
Zn	100	97,0	100	100	100	100	100	100

los resultados de las cepas que presentan el patrón +++/+ y el +/+++ hay que destacar que las 236 cepas pertenecientes al primer grupo se manifiestan como más resistentes frente a la tetraciclina, cloruro mercuríco, arseniato sódico bibásico y telurito potásico.

Las cepas pertenecientes al grupo +/+, cuyo número asciende a 65, presentan un curioso comportamiento respecto a su elevado porcentaje de resistencia a la gentamicina y a la sal de mercurio empleada. En ambos casos son los porcentajes más altos entre todos los grupos integrantes de las restantes cepas de P. aeruginosa. Curiosamente frente a la tetraciclina se presenta el porcentaje más bajo de resistencia.

Se ha determinado la homogeneidad de los aeruginocinotipos que presentan los distintos serotipos. Para ello se ha calculado la inhibición media por cepa que producen las aeruginocinas de los microorganismos en estudio en las cepas ALA (tipado por producción), así como la media de la inhibición por cepa que manifiestan los lisados de las cepas ALA sobre los microorganismos problema (tipado por sensibilidad). La TABLA 125 refleja estos resultados, que

TABLA 125 Relación entre el serotipo y la producción y sensibilidad a las aeruginocinas.

Origen cepas	Serotipo 1			Serotipo 2			Serotipo 3			Serotipo 4		
	Nº cepas	P [‡]	S [‡]	Nº cepas	P	S	Nº cepas	P	S	Nº cepas	P	S
S	21	2,8 +	12,2 ++				6	2 +	12,5 ++	1	13 +++	0 +
A	17	4,5 +	10,5 ++	3	10,3 ++	0,3 +	3	4,7 +	12,7 ++	28	12,7 ++	1,4 +
M	5	5,6 +	6,8 +	7	13 +++	0,7 +				6	14 +++	0 +
D	4	3,3 +	9 ++							2	13,5 +++	0 +
H	6	4,8 +	8,2 ++	4	5,6 +	4,7 +	6	2,3 +	8,8 ++	17	6,4 +	3,9 +
F	7	1 +	11,6 ++				1	5 +	5 +	3	12,6 ++	2 +
Total	60	3,5 +	10,6 ++	14	10,2 ++	1,4 +	16	2,8 +	10,7 ++	57	11 ++	2 +

P[‡], media de las inhibiciones/cepa, al realizar el tipado por producción

S[‡], media de las inhibiciones/cepa, al realizar el tipado por sensibilidad

TABLA 125 cont.

Origen cepas	Serotipo 5			Serotipo 6			Serotipo 8			Serotipo 9		
	Nº cepas	P	S	Nº cepas	P	S	Nº cepas	P	S	Nº cepas	P	S
S	1	15 +++	2 +	18	8,6 ++	8,4 ++	3	15,3 +++	2 +			
A	8	13,4 +++	1 +	38	10,0 ++	6,0 +	5	14,8 +++	1 +	7	5,4 +	1,9 +
M	8	13,4 +++	1,6 +	13	12,2 ++	6,6 +	2	14 +++	4 +	1	13 +++	0 +
D	2	10 ++	0,5 +	3	11,3 ++	5,7 +				2	11 ++	9,5 ++
H	1	14 +++	1 +	6	10,8 ++	4 +	2	13,5 +++	0,5 +	2	7,5 ++	2,5 +
F	1	14 +++	0 +	1	1 +	9 ++						
Total	21	13,2 +++	1,2 +	79	10,1 ++	6,5 +	12	14,6 +++	1,7 +	12	7,3 ++	3,1 +

TABLA 125 cont.

Origen cepas	Serotipo 10			Serotipo 11			Serotipo 5, 16			Serotipo 2, 5		
	N ^o cepas	P	S	N ^o cepas	P	S	N ^o cepas	P	S	N ^o cepas	P	S
S	2	14 +++	0,5 +				1	6 +	1 +	1	9 ++	1 +
A	15	10,1 ++	0,9 +	10	12,7 ++	1,1 +	5	14,8 +++	1 +	7	13,3 +++	0 +
M				12	14,1 +++	0,8 +	1	13 +++	2 +	3	14,7 +++	0 +
D	6	10,7 ++	0 +	1	15 +++	1 +	4	13,5 +++	1,3 +	1	14 +++	0 +
H	4	12,5 ++	0 +	8	12,8 ++	0,4 +	2	12,5 ++	0,5 +	2	11,5 ++	1 +
F	3	14,3 +++	0 +	1	14 +++	0 +	2	14 +++	1 +			
Total	30	11,2 ++	0,5 +	32	13,3 +++	0,8 +	15	13,3 +++	1,1 +	14	13,1 +++	0,2 +

TABLA 125 cont.

<u>Origen</u> <u>Cepas</u>	<u>Serotipo 7,8</u>		
	<u>Nº cepas</u>	<u>P</u>	<u>S</u>
S	1 13 +++	2 +	
A	1 10 ++	0 +	
M	1 16 +++	1 +	
D	4 9,8 ++	5,5 +	
H	1 9 ++	1 +	
F			
Total	8 10,9 ++	3,3 +	

señalan claramente que aquellas cepas pertenecientes a los serotipos 0:1 y 0:3 son bajas productoras de aeruginocinas y por lo tanto muy sensibles. El modelo inverso se manifiesta en los serotipos 0:5, 0:8, 0:11, 0:2 y 5, 0:5 y 16. Los restantes serotipos, 0:2, 0:4, 0:6, 0:9, 0:10, 0:7 y 8 representan un modelo intermedio al no ser tan marcadamente productores.

Finalmente hemos considerado importante establecer una comparación entre los datos obtenidos que refleje la existencia de aquellos modelos de P. aeruginosa más potentes biológicamente hablando. Es decir, que siendo altamente productoras de aeruginocinas y poco sensibles a las mismas, presentan asimismo una resistencia significativa frente a distintos agentes antimicrobianos. Este planteamiento queda reflejado en la TABLA 126 en la que se puede observar como 94 cepas (16%) de P. aeruginosa tienen comparativamente una alta resistencia a la carbenicilina y a las sales de mercurio, arsénico y telurio ensayadas. Este mismo grupo destaca respecto a los que presentan baja producción y una sensibilidad media por una menor resistencia a la sulfadiazina y neomicina.

TABLA 126 Resistencia a los agentes antimicrobianos en las cepas de P. aeruginosa pertenecientes a los serotipos con los patrones de producción y sensibilidad a las aeruginocinas +/++ (0:1; 0:3) y +++/+ (0:5; 0:11; 0:8; 0:5 y 16; 0:2 y 5).

<u>Agente</u> <u>Antimicrobiano</u>	+/++ (76) [‡]	+++/ (94)
FO	90,8 ^{‡‡}	96,8 ^{‡‡}
NN	3,9	8,5
CB	15,8	50
GM	10,5	16,0
TE	98,7	100
CL	6,6	10,6
SD	76,3	58,5
N	72,4	57,4
S	98,7	95,7
Hg	55,3	83,0
As	53,9	78,7
Cd	100	98,9
W	100	95,7
Tl	96,1	100
Te	43,4	62,8

[‡] N° de cepas

^{‡‡} Porcentajes

VI DISCUSION

VI DISCUSION

Como se ha señalado en los capítulos anteriores de esta memoria doctoral, los aislamientos de P. aeruginosa proceden fundamentalmente de cuatro hábitats distintos, aguas superficiales terrestres, aguas marinas superficiales, suelos y fangos de depuradoras. Paralelamente se han estudiado las características de P. aeruginosa aisladas a partir de productos patológicos y de formas farmacéuticas no estériles, así como de alimentos que estaban expuestos a un ambiente hospitalario.

Es interesante señalar que las pruebas morfológicas y bioquímicas verificadas con todas las cepas confirman su identificación de acuerdo a los criterios de COWAN (1974), DOUDOROFF y PALLERONI (1974), HUGH y GILARDI (1974) y GILARDI (1976).

El valor más bajo hallado en hábitats naturales, expresado en frecuencias de aislamientos, es el que corresponde a muestras de suelos, con un 21,4% de aislamientos positivos. Este dato se ajusta a los resultados hallados por GREEN et al. (1974), que verificaron la presencia de P. aeruginosa en suelos a nivel de un 24% de las muestras

estudiadas. Obviamente, P. aeruginosa se aísla con una frecuencia más baja, del orden del 4,6%, en muestras procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

Independientemente, los datos procedentes de aislamientos de aguas superficiales terrestres (57,5%), aguas marinas litorales (54,3%) y fangos de depuradoras (55,8%) son muy similares en su frecuencia. El procesado de estos datos por una prueba de significación señala una interesante relación positiva, sin manifestarse diferencias significativas. En realidad, el enfoque consecuente con estos datos es interpretarlos como aislamientos que corresponden a un hábitat ubícuo de Pseudomonas, como es el de las aguas superficiales, que se ha hecho extensivo a otros medios en sí mismos diferentes pero que pueden constituir una prolongación accidental del anterior, sobre todo para el caso de aguas marinas, en los que presuntivamente la carga de P. aeruginosa debe seleccionarse a medida que los muestreos se alejan de la costa.

Respecto a la prospección realizada en distintas formas farmacéuticas, los datos que se presentan en los resultados de esta memoria señalan un escaso índice de aislamientos

tos positivos de P. aeruginosa. Sin embargo, es conveniente señalar que el índice de mayor contaminación por P. aeruginosa corresponde a formas farmacéuticas elaboradas en las farmacias hospitalarias, concretamente en sueros glucosados y soluciones fisiológicas.

En cuanto a otros preparados farmacéuticos no estériles dispensados por la farmacia hospitalaria, únicamente se ha demostrado la presencia de P. aeruginosa en tres de ellos. Presumiblemente, la contaminación procede de manipulaciones verificadas en el propio ambiente hospitalario. Este planteamiento tiene un apoyo experimental crítico, porque la identificación exhaustiva de la cepa de P. aeruginosa, como queda señalado en el capítulo de resultados, indica que se trata del mismo microorganismo. Paralelamente, se han hallado resultados semejantes con preparados farmacéuticos elaborados en la farmacia hospitalaria. Resulta altamente significativo que diferentes muestras de solución glucosada al 50%, suero glucosado y suero Ringer, hasta un número total de seis, presenten el mismo biotipo de P. aeruginosa, como se demuestra por su misma identidad en la producción y sensibilidad de aeruginocinas y aglutinación con antisuero específico. Obviamente, todas las muestras examinadas de estos preparados

se encontraban en la farmacia del mismo centro hospitalario.

Otro caso interesante, que se presta a una discusión ligada a estos fenómenos, es el hallazgo en el mismo hospital de una cepa aislada a partir de suero glucosado y otra a partir de una verdura destinada a la alimentación, con aeruginocinotipos coincidentes, pero con respuesta al antígeno somático O distinta. En este caso se descarta que el foco contaminante sea el mismo. Este resultado se repite en aislamientos procedentes de productos alimenticios, en los que hay coincidencia en el aeruginocinotipo y discordancias respecto al antígeno O.

Los datos suministrados por el antibiograma muestran una elevada correlación, de gran interés epidemiológico. En líneas generales los resultados hallados concuerdan con los suministrados por otros autores. Es decir, la prospección realizada a partir de 565 cepas pone de manifiesto que el mayor grado de resistencia se presenta en aislados procedentes de ambiente hospitalario. Al discutir con cierto detalle los resultados frente a distintos antibióticos adecuados para el tratamiento de Pseudomonas, destaca en primer lugar la diferencia de comportamiento entre

las cepas de hábitats naturales, aguas y suelos, y las de ambiente hospitalario.

Si consideramos únicamente los antibióticos de elección, sobresale ante todo el caso de la tobramicina, con una clara resistencia a favor de las cepas procedentes de ambiente hospitalario y, por contra, una mayor sensibilidad en las cepas procedentes del medio ambiente. Esta situación sigue siendo válida para los casos de carbenicilina y gentamicina.

Los niveles superiores de resistencia alcanzados con tetraciclina, neomicina y kanamicina pertenecen a las cepas aisladas de ambiente hospitalario, suelos y aguas litorales, siendo inferiores para las cepas procedentes de aguas superficiales y fangos de depuradoras.

Entre los antibióticos β -lactámicos, tres de ellos se emplearon en nuestro estudio. La ampicilina se manifiesta ineficaz tanto para las P. aeruginosa aisladas del medio ambiente como en las procedentes de productos patológicos. Este resultado coincide con la bibliografía consultada, donde SANCHEZ-BUENAVENTURA et al. (1972) tan sólo des-

criben un 1,4% de cepas sensibles y GILARDI (1976) un 100% de resistencia. DUVAL (1981), en el estudio realizado sobre la evolución de las resistencias, encuentra que el comportamiento de P. aeruginosa con la ampicilina es constante en la última década, caracterizándose por un elevado nivel de resistencia.

Respecto a la carbenicilina, es interesante señalar que las cepas procedentes del medio ambiente se comportan de una forma homogénea. Como se ha señalado en el capítulo de resultados, su umbral de resistencia es sensiblemente inferior al de las cepas procedentes de aislamientos hospitalarios. Estas diferencias claramente significativas están soportadas con metodología estadística (X^2). El mayor índice de sensibilidad a este antibiótico se presenta en las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Estos resultados confirman que la presión selectiva ejercida por antibióticos y quimioterápicos sobre las cepas de P. aeruginosa procedentes de hábitats naturales es sensiblemente inferior a la que reciben los aislados de centros hospitalarios. La carbenicilina es un antibiótico eficaz contra P. aeruginosa pero a consecuencia de su uso indiscriminado se ha producido una selección, sobre todo a nivel

de cepas de P. aeruginosa de origen hospitalario, que poseen una capacidad adquirida de resistencia a este antibiótico. Debido a esto, conviene indicar que el tratamiento con carbenicilina de infecciones ocasionadas por P. aeruginosa presenta una eficacia relativa. Además, ésta queda reducida si se consideran los márgenes que existen entre la concentración de este antibiótico alcanzable en suero y la CMI de este producto.

El número más elevado de cepas resistentes a la carbenicilina procede de cepas de P. aeruginosa aisladas en quemados y en enfermos afectados de cistitis y pielonefritis. Básicamente, si se comparan los resultados hallados en este trabajo con los de otros especialistas como ROBERTS (1980), que encuentra un 35% de cepas resistentes a la carbenicilina, y los de NORD et al. (1975), DE VITO (1979) y HOOBKAMP-KORSTANJE y WESTERDAAL (1979), que señalan unos porcentajes que oscilan entre el 10-20% de resistencia, se pone de relieve la existencia de una evolución hacia unos niveles más elevados de resistencia.

Respecto a los antibióticos de la familia de las cefalosporinas, se ha sometido a prospección rutinaria únicamente

la cefalotina, que por su comportamiento confirma las ideas de HOFFLER (1975). Este autor considera a dicho antibiótico corrientemente inactivo frente a P. aeruginosa. En nuestro caso, como ya se ha señalado en los resultados, la totalidad de las cepas de cualquier procedencia es resistente a este antibiótico.

Esta apreciación no sería completa si no se comentase el comportamiento de los nuevos agentes antimicrobianos sintetizados pertenecientes a este grupo. Algunos β -lactámicos son más activos que los descritos frente a P. aeruginosa (piperacillina, azlocillina y cefsulodina); otros presentan un amplio espectro de actividad, los llamados segunda y tercera generación de cefalosporinas y cefamicinas (cefoxitina, cefamandol, cefuroxime, cefotaxime, moxalactam) (DUVAL, 1981; LIVERMORE et al., 1981; TSELENTIS et al., 1981). Desafortunadamente, nuestro trabajo experimental no abarca el comportamiento de P. aeruginosa en toda esta línea. Según SLACK (1981), en esta familia destacan por su actividad anti-Pseudomonas y por su estabilidad a las β -lactamasas, ceftazidime, cefsulodin y thienamycin.

Los valores de sensibilidad a la estreptomocina permiten establecer, según su comportamiento, dos grupos de cepas. Por una parte, aparecen aislamientos con un índice de sensibilidad significativo en el caso de las bacterias procedentes de aguas terrestres y marinas. En cambio, el resto se comporta de una manera similar, apareciendo una resistencia total para el caso de las cepas procedentes de suelos, fangos de depuradoras, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Los datos comparables con la bibliografía específica suministrada por otros autores sólo hacen referencia a las cepas procedentes de aislamientos hospitalarios. En general, la coincidencia es significativa, pues, aunque GILARDI (1971) encuentra un 80% de resistencia, el mismo autor en 1976 halla valores más elevados, del orden del 95%. Probablemente la estreptomocina y de acuerdo con BRYAN (1979) hay que considerarla como un antibiótico inoperante frente a P. aeruginosa.

La sensibilidad a la neomicina distribuye a las cepas estudiadas en dos grupos. Por una parte, los aislamientos procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, fangos de depuradoras y aguas superficiales terrestres. Un segundo grupo estaría constituido por aquellas

cepas procedentes de suelos, aguas litorales y productos patológicos, siendo en este último hábitat donde se alcanza el índice superior de resistencia.

Si utilizamos la neomicina como marcador, la procedencia de las P. aeruginosa contaminantes de productos farmacéuticos y alimentos no coincide con la de aquellas cepas obtenidas a partir de productos patológicos, pese a que estos fármacos han sido elaborados en muchos casos en la farmacia hospitalaria. Igualmente, estos datos sugieren que la carga bacteriana de los fangos de depuradoras es el resultado de una contaminación por Pseudomonas procedentes de aguas superficiales terrestres. Si comparamos nuestros datos con aquellos que se han señalado en la bibliografía, siempre contrastada con resultados de P. aeruginosa de origen hospitalario, la concordancia es aceptable con los valores presentados por SANCHEZ-BUENAVENTURA et al. (1972) y por BLUE y WOOLEY (1977), que señalan un 75 y un 60% de resistencia respectivamente.

La kanamicina, en general, es otro antibiótico que se muestra ineficaz para el tratamiento de P. aeruginosa. Nuestros datos señalan una resistencia absoluta para las cepas procedentes de suelos, aguas marinas superficiales,

productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Quizás los únicos resultados que llaman la atención se refieren al comportamiento de las cepas aisladas de aguas terrestres superficiales y fangos de depuradoras, en donde se encuentra una resistencia del 98 y 95% respectivamente. Entre estos datos no aparecen diferencias significativas, lo que induce al planteamiento de una cierta similitud en cuanto al origen de las cepas aisladas. De cualquier forma y de acuerdo a las teorías de THOMASSEN et al. (1979), hay que convenir que virtualmente la mayoría de las cepas de P. aeruginosa son resistentes a la kanamicina. Bajo el punto de vista histórico, el gradiente de resistencia ha experimentado un importante incremento a lo largo de la década de 1970. Existen publicaciones de 1972 (SANCHEZ-BUENAVENTURA et al.) en las que se habla de un 40% aproximadamente de resistencia entre las cepas de P. aeruginosa de origen hospitalario. En cambio, con los datos de 1975, JACOBY presenta un cuadro de resistencia del 95%.

La gentamicina ofrece un aspecto alentador respecto al porcentaje de resistencia presentado por P. aeruginosa. Los mayores índices de sensibilidad corresponden a las cepas aisladas de suelos, aguas marinas superficiales,

fangos de depuradoras y formas farmacéuticas no estériles y alimentos. En cambio, las cifras de resistencia halladas entre las cepas de P. aeruginosa pertenecientes a productos patológicos son claramente distintas, en el sentido de un elevado índice de resistencia si se compara con el comportamiento presentado por las restantes. Nuevamente se reitera el fenómeno de selección negativa para el caso de P. aeruginosa aisladas de productos patológicos. Es curioso señalar que para este antibiótico el comportamiento de las cepas aisladas de aguas superficiales es distinto al de las cepas de suelos, aguas marinas superficiales y depuradoras y, por supuesto, al de los aislados de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, en el sentido de un porcentaje más elevado de resistencia. Estas diferencias significativas están demostradas por la metodología estadística adecuada.

En general, la visión bibliográfica existente sobre el grado de resistencia a la gentamicina entre cepas de P. aeruginosa aisladas de ambiente hospitalario es extraordinariamente heterogénea. Para ello basta considerar los datos de SANCHEZ-BUENAVENTURA et al. (1972), con un 7% de resistencia en cepas clínicas, y los de MORENO y DE MAGALHAES LOPES (1974), con valores de resistencia

que ascienden hasta el 40%. Finalmente JACOBY (1975) y ZANON et al. (1975) señalan resultados cuyos porcentajes se aproximan a los de SANCHEZ-BUENAVENTURA et al. (1972). Para estos autores la resistencia oscila entre un 3 y un 5%.

En general, el desarrollo de la resistencia a los aminoglicósidos ha sido señalado adecuadamente por otros autores (TORTORICI, 1980). A pesar de que la tobramicina es un antibiótico de uso más reciente que la gentamicina, se ha demostrado un desarrollo más rápido de resistencias en determinados hábitats. Por ello es importante conocer los patrones de resistencia y emplear dicho antibiótico en casos estrictamente necesarios, para evitar la aparición de modelos resistentes.

La tobramicina se ha comportado como activa con las P. aeruginosa aisladas en este trabajo. Casi la totalidad de las cepas procedentes de suelos y aguas litorales y la totalidad de las cepas aisladas de fármacos se han manifestado sensibles. El elevado nivel de resistencia alcanzado con las cepas procedentes de productos patológicos podría ser el resultado de la fuerza selectiva ejercida por el uso de dicho antibiótico, sin haberse manifes-

tado este efecto hasta el momento en las cepas cuyo hábitat es el medio ambiente extra-hospitalario.

Nuestra aportación experimental a lo largo de estos años de trabajo ha puesto de manifiesto ciertas diferencias respecto al dualismo cepas resistentes a la gentamicina-cepas sensibles a la tobramicina, ya que mientras que YU y WASHINGTON II (1977) hallan resultados que corresponden a un 68% de sensibilidad a la tobramicina, nuestros datos indican que las cepas de P. aeruginosa estudiadas son ligeramente más sensibles, puesto que el 75% de las resistentes a la gentamicina mostraron sensibilidad a la tobramicina.

Los datos aportados en nuestro trabajo experimental que hacen referencia a la tetraciclina reiteran la historia establecida desde hace varios años sobre la interacción de P. aeruginosa y este antibiótico. Por lo tanto, los resultados de BRYAN (1979) en principio son absolutamente concordantes con los nuestros. Concretamente, se ha hallado un 100% de resistencia entre las cepas procedentes de suelos, aguas marinas, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Tan sólo doce cepas procedentes de aguas superficiales terrestres (5,2%)

y dos procedentes de fangos de depuradoras (4,7%) han resultado sensibles a la tetraciclina. Bajo el punto de vista sanitario, el conocimiento del espectro de actividad de la tetraciclina presenta connotaciones muy interesantes en el campo de la alimentación animal e incluso humana. No debe olvidarse el pésimo empleo de este antibiótico en piensos. Probablemente este antibiótico ha actuado como un poderoso agente selectivo.

El comportamiento del cloranfenicol no ha presentado sorpresa alguna en cuanto a los datos que hemos obtenido. La resistencia observada es absolutamente homogénea en todos los casos. Sin embargo, GILARDI en 1971, al realizar un trabajo con bacterias gram-negativas no fermentadoras, obtiene un 11% de sensibilidad en cepas de P. aeruginosa. El mismo autor en 1976 rectifica estos resultados, admitiendo hasta un 100% de resistencia. La mayoría de los especialistas convergen en considerar al cloranfenicol como un antibiótico con escasa actividad frente a P. aeruginosa y, por tanto, poco eficaz en los tratamientos.

La colistina obviamente es uno de los antibióticos más eficaces frente a P. aeruginosa. Los aislamientos procedentes de suelos y de fangos de depuradoras presentan un

índice de sensibilidad más elevado que los procedentes de productos patológicos y formas farmacéuticas. Es interesante señalar que únicamente frente a este antibiótico las cepas procedentes de ambiente hospitalario no se han manifestado como las más resistentes, correspondiendo esta característica a aislamientos del medio acuático.

Este hecho concuerda con los niveles constantes de resistencia hallados con este antibiótico en ambiente hospitalario a pesar de su empleo, pudiendo influir en este resultado la ausencia de plásmidos descritos hasta la actualidad que codifiquen resistencia a dicho antibiótico.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden esencialmente con los de JACOBY (1975) y DE VITO (1979), que analizan este comportamiento frente a cepas de ambiente hospitalario. Independientemente, parece que la combinación con penicilinas semisintéticas presenta una nueva perspectiva para el tratamiento de infecciones sistémicas por P. aeruginosa, aunque los datos mayoritarios acumulados en este sentido pertenecen a experiencias realizadas "in vitro" (YOUNG, 1979).

La respuesta de la colección de P. aeruginosa frente al ácido nalidíxico ha sido homogénea. Se ha hallado un 100% de resistencia entre todas las cepas aisladas de diferentes hábitats. A efectos prácticos varios autores consideran al ácido nalidíxico como un producto inactivo frente a P. aeruginosa, aunque existen varios trabajos en los que señalan índices de resistencia entre 78 y 94% (SANCHEZ-BUENAVENTURA et al., 1972; DE VITO, 1974).

La sulfadiazina es uno de los quimioterápicos ensayados en nuestras experiencias y la discusión que se plantea frente a este fármaco reitera básicamente los resultados obtenidos con otros productos biológicamente activos, es decir, las cepas procedentes del medio ambiente son más sensibles que las aisladas de medios hospitalarios. Estos resultados sometidos a metodología estadística resultan significativos. En nuestro caso se presentan diferencias interesantes en el comportamiento de la sulfadiazina frente a P. aeruginosa hospitalarias si se compara con los datos suministrados por SANCHEZ-BUENAVENTURA et al. (1972) y MORENO y DE MAGALHAES LOPES (1974), pues prácticamente el 100% de las cepas aisladas por estos autores alcanzan un alto grado de resistencia, mientras que en nuestra colección se detecta un 81%. Este resultado se

asemeja al de MARCO LANATA et al. (1975), que hallan un 89,5% de resistencias entre P. aeruginosa procedentes de aislamientos en quemados. Es curioso señalar que entre estos datos aparecen modelos que sugieren una mayor heterogeneidad de las poblaciones de P. aeruginosa, en contradicción con las afirmaciones de JACOBY (1979), que sostiene la idea de que las dos terceras partes de las cepas de P. aeruginosa son resistentes a las concentraciones de sulfamidas alcanzadas en un organismo sometido a tratamiento.

Respecto a la discusión que pueda presentarse con los datos obtenidos utilizando la nitrofurantoina frente a nuestra colección de P. aeruginosa, se ha considerado que su utilidad es una confirmación de la identidad de las cepas aisladas en el biotipo P. aeruginosa. En realidad, varios especialistas en esta especie bacteriana han utilizado estos resultados como datos taxonómicos confirmativos para la identificación de la especie (GILARDI, 1976).

A pesar de la elevada resistencia obtenida frente a la fosfomicina, las cepas procedentes de aguas superficiales se han manifestado ligeramente más sensibles. En la bibliografía consultada hay una ausencia de datos del medio

ambiente. A partir de cepas hospitalarias, CRESPO y ROCA de VINALS (1977) encuentran un 62,6% de resistencia, valor ligeramente inferior al descrito en nuestra memoria. Hay que tener en cuenta que REPARAZ (1977) describe unos niveles distintos de resistencia según el origen de las cepas, relacionándolo con el consumo realizado de dicho antibiótico. GOMEZ LUS et al. (1977) y DAMASO et al. (1977), al estudiar los niveles de resistencia en cepas aisladas en centros hospitalarios, describen una variación en el nivel de resistencia, incrementándose con el tiempo.

Los resultados obtenidos sobre el comportamiento frente a los antibióticos sugieren la presencia de unos modelos de resistencia similares. Una posible explicación podría ser que todas las cepas tuviesen una exposición similar a los antibióticos y que, por lo tanto, éstos hubiesen ejercido igual presión selectiva sobre cada grupo. El aislamiento de unas cepas procedentes de hábitats con características tan distintas dificulta la aceptación de esta teoría. Una explicación más probable podría ser la presencia en estos grupos de información genética similar, que codificase resistencia a los antibióticos, con un posible intercambio genético a cualquier nivel (KELCH y LEE, 1978).

A efectos de considerar el problema de la resistencia de P. aeruginosa al cloruro mercúrico es imprescindible plantear los trabajos de SMITH (1967) con E. coli y Salmonella spp. Este autor consideraba como resistentes aquellas cepas que crecían a concentraciones 2-3 veces superiores respecto a la mayoría de la población.

Posteriormente NAKAHARA et al. (1977_{a,b}) establecen el umbral de resistencia al HgCl₂ a nivel de 10 µg/ml. Estos autores encuentran un claro desdoblamiento de la población en dos grupos, de acuerdo a una distribución bimodal. En efecto, nosotros recogemos una primera población a la que tradicionalmente se le llama sensible, que presenta un comportamiento ante las cargas de cloruro mercúrico del mismo orden que los hallados por otros especialistas, es decir entre 2 y 32 µg/ml. La segunda fracción de la población, denominada resistente, alcanza valores de CMI más elevados que los descritos sobre cepas preferentemente hospitalarias. Los valores experimentales obtenidos en esta memoria corresponden principalmente a cepas procedentes de aguas litorales.

En 1976, JOLY et al., con P. aeruginosa aisladas de aguas superficiales y ambiente hospitalario, encuentran que un

32,3% de las cepas procedentes de muestras de aguas fueron resistentes, al utilizar como umbral de resistencia concentraciones superiores o iguales a 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HgCl_2 . Según nuestros resultados es esta concentración la que fracciona las dos poblaciones halladas, poniéndose en evidencia un desplazamiento respecto a los valores de NAKAHARA et al. (1977_{a,b}), pudiendo ser el resultado de una mayor presión selectiva ejercida sobre estas cepas en los hábitats estudiados.

Según NELSON y COLWELL (1975), el número total de bacterias resistentes al mercurio en una determinada zona de muestreo es un índice de la transformación microbiana de este metal. Este hecho debe tenerse en cuenta, pues en muchas ocasiones, especialmente en el medio acuático marino, es Pseudomonas spp. el microorganismo aislado con más frecuencia (TIMONEY et al., 1978).

Tanto el exceso de compuestos de plomo orgánico como inorgánico es tóxico para los microorganismos (VALLEE y ULMER, 1972). A pesar de su toxicidad, algunas bacterias, como S. aureus, portadoras de plásmidos penicilinasas, son resistentes a compuestos de plomo (SUMMERS et al., 1978).

Nuestra colección de P. aeruginosa es capaz de crecer a niveles relativamente elevados de acetato de plomo, siendo las cepas aisladas de fangos de depuradoras las que destacan por un nivel superior de tolerancia. Es curioso comprobar que la curva representativa de las CMI sólo alcanza un máximo. Este modelo es común para el establecimiento de la relación de este metal con otras cepas bacterianas.

Ya en 1967 SMITH encontró que todos los microorganismos crecían a igual concentración de plomo. NAKAHARA et al. (1977_{a,b}), con cepas de origen hospitalario, encontraron que las CMI al acetato de plomo estaban incluidas entre 1600 y 3200 $\mu\text{g/ml}$, produciendo igualmente un solo máximo al representar dichos valores. En conclusión, el comportamiento de las cepas en estudio cumple las características descritas por otros autores.

Respecto a la plata, el comportamiento se ajusta totalmente a unos niveles de elevada sensibilidad. La totalidad de la población estudiada no sobrepasa niveles de CMI de 64 $\mu\text{g/ml}$. Dentro de este comportamiento, es la población procedente de aguas superficiales la que se ha manifestado como más tolerante a este metal.

JOLY et al. (1976) describen que el 6,5% de las Pseudomonas procedentes de aguas son resistentes a 128 $\mu\text{g/ml}$ de AgNO_3 ; sin embargo, los niveles alcanzados por las cepas hospitalarias son claramente inferiores. El posible efecto selectivo que pueda tener el uso de la sal de plata en clínica es puesto en duda por BRIDGES et al. (1979) al no poder demostrar la transferencia de dicha resistencia. En el medio ambiente, SUMMERS et al. (1978) relacionan el nivel de resistencia hallado con el grado de contaminación presente en el medio. Evidentemente, no hemos identificado ningún punto de muestreo que haya coincidido con cepas de P. aeruginosa altamente seleccionadas para resistir elevados niveles de plata.

Frecuentemente el cadmio es un subproducto metalúrgico, especialmente en el refinado del cinc. Se eliminan grandes concentraciones de este metal a través del aire y del agua, donde los microorganismos juegan un papel importante en el reciclaje de este metal a través de la cadena alimentaria (DOYLE et al., 1975; SILVER et al., 1976).

P.aeruginosa se comporta de forma similar frente al cadmio que frente al uranio y al cinc, lo cual revela la existencia

de una población seleccionada con una resistencia extraordinaria hacia este elemento en un hábitat artificial concreto, lodos de depuradoras. Al observar los resultados de NAKAHARA et al. (1977_{a,b}), obtenidos al trabajar con cepas de P. aeruginosa, se pueden distinguir dos poblaciones, una minoritaria, más sensible, con unas CMI frente al CdCl₂ incluidas entre 25 y 100 µg/ml. La población restante es más resistente, con unas CMI entre 800 y 6400 µg/ml. Los microorganismos estudiados en este trabajo se han comportado de forma homogénea, hallándose incluidos en el grupo mayoritario descrito por los autores anteriormente citados.

Sorprendentemente, la resistencia al cadmio determinada por plásmidos tan sólo se ha asociado con S. aureus. El mecanismo de resistencia no es una transformación química, sino más bien se produce un cambio de permeabilidad. Por lo tanto, las células portadoras de plásmidos no acumulan los niveles tóxicos de cadmio hallados en los microorganismos sensibles (KONDO et al., 1976).

El comportamiento de la colección de P. aeruginosa frente a niveles de cinc no ha resultado sorprendente. Es un hecho conocido que los niveles de cinc que resultan tóxicos

para diversas poblaciones bacterianas son inactivos frente a P. aeruginosa. La curva de inhibición presenta un comportamiento en el que no se distingue la existencia de poblaciones heterogéneas. El nivel de resistencia más elevado corresponde a bacterias que teóricamente son susceptibles de recibir cargas más elevadas de este elemento, como sucede con cepas cuyo hábitat corresponde a los lodos de las depuradoras.

BABICH y STOTZKY (1978) observan que una mayor tolerancia frente al Zn^{2+} puede ser debida al requerimiento de dicho metal como micronutriente. En comparación con otros metales pesados divalentes como Cd^{2+} , Pb^{2+} ó Hg^{2+} , afirman que es necesaria una concentración relativamente más alta de Zn^{2+} para reducir la supervivencia de las bacterias. En nuestros resultados se observa claramente este hecho en el caso del Hg^{2+} , pues concentraciones mucho más bajas producen la inhibición del crecimiento de P. aeruginosa. No ocurre lo mismo al estudiar los niveles de resistencia alcanzados con Cd^{2+} y Pb^{2+} , pues, a pesar de que parte de la población es más sensible, existe un grupo importante con unas CMI similares a las descritas con $ZnSO_4$.

El comportamiento de P. aeruginosa frente al cromo queda muy bien reflejado en los resultados, donde parece sencillo demostrar que el umbral de resistencia para este metal está situado, para la mayoría de las Pseudomonas, entre 1600 y 6400 µg/ml.

SUMMERS y JACOBY (1978) describen que el plásmido pMG6, del grupo de incompatibilidad P-2, codifica resistencia al Na_2CrO_4 , alcanzando una CMI de 8100 µg/ml. En nuestros resultados aparece una cepa procedente de aguas superficiales que alcanza unos niveles similares.

Capítulo aparte merece el comportamiento que presenta a nivel morfológico la población examinada frente a niveles elevados de cromo, en el sentido de un cambio colonial con amplia acumulación de material mucoso y su enorme opacidad presentada al M.E. por las células vivas de P. aeruginosa.

DRUCKER et al. (1979), al estudiar la respuesta metabólica del microbiota al cromo, observó que los metabolitos producidos como resultado del crecimiento de microorganismos resistentes al cromo son capaces de modificar el cromo añadido al medio, produciendo como resultado

la movilización de dicho metal. A través de nuestros resultados se ha puesto en evidencia que dos cepas de P. aeruginosa son capaces de reducir el cromo $6+$ presente en el medio hasta compuestos menos tóxicos, lo que permite el desarrollo de los microorganismos.

Uno de los factores que están relacionados con esta metabolización es la concentración de glucosa existente en el medio. De acuerdo con los resultados de SHIMADA (1978), se ha observado que, al crecer P. aeruginosa en un medio con glucosa, el descenso de cromo está influenciado por la concentración del azúcar, produciéndose un mayor descenso cuando la concentración de glucosa es superior. Igualmente se ha puesto de manifiesto que, cuando el tiempo de incubación se incrementa, la proporción de Cr^{6+} en el medio disminuye, asociándose este hecho con el crecimiento celular.

El mecanismo bioquímico de resistencia al Cr^{6+} no se conoce exactamente. SHIMADA (1979) describe la presencia de un enzima reductor, no detectando cromo reducido dentro de la célula. BALDRY et al. (1977) describen el sistema de transporte de sulfatos como vía de entrada del cromo en la célula bacteriana. Nuestros resultados ponen

en evidencia la existencia de depósitos intracelulares al crecer los microorganismos a concentraciones elevadas del metal, pudiendo ser este mecanismo una posible vía de entrada.

Los niveles más elevados de resistencia alcanzados por la población de P. aeruginosa estudiada están referidos a las sales de molibdeno y tungsteno. Respecto al molibdeno, se observa un comportamiento homogéneo mediante las CMI halladas, pues prácticamente la totalidad de las cepas alcanzan valores superiores a 102400 µg/ml.

En cambio, el tungsteno ha demostrado un valor umbral para la mayoría de la población, puesto que 408 cepas sobre 565 muestran una CMI de 102400 µg/ml. El resto (142 cepas) presentan valores superiores. Tan sólo 15 cepas no han sido capaces de tolerar las concentraciones anteriormente dichas.

A diferencia del poder mutagénico ejercido por el Cr^{6+} sobre P. aeruginosa (VENIT y LEVI, 1974), al crecer estos microorganismos en presencia de distintas concentraciones de molibdeno y tungsteno en el medio de cultivo,

aparecen colonias con la morfología típica de la especie. Esto podría de alguna manera confirmar el hecho de que estos iones no se comporten como mutagénicos, pues, tal como señala KRISHNAPILLAI (comunicación personal), los mutantes que probablemente afectan a la estructura de la pared celular pueden ser aislados fácilmente en P. aeruginosa a partir de variaciones en la morfología de las colonias.

Evidentemente, una de las cuestiones que han despertado un gran interés en nuestro trabajo experimental, es aquella que hace referencia al comportamiento de la mayoría de las cepas aisladas frente a la sal de arsénico.

Los resultados presentados en esta memoria revelan una gran amplitud en la distribución de las CMI, siendo 12800 µg/ml el valor que alcanza la mayoría de la población. NAKAHARA et al. (1977_{a,b}) describen, según las distribuciones de las CMI, dos poblaciones. El grupo resistente presenta unas CMI ligeramente más bajas que las halladas en este trabajo. Nuestros resultados se hallan más próximos a los de JOLY et al. (1979), que describen tres grupos: el denominado sensible, con una CMI inferior a

3100 µg/ml, al cual pertenece el 22,7% de las cepas aisladas en esta memoria; el intermedio, con unos valores de las CMI entre 3100 y 25000 µg/ml, en el cual se incluye el 28,0% de los microorganismos; y el tercero, con un elevado nivel de resistencia, que comprende al 49,3% del total de las cepas estudiadas. Teniendo en cuenta estos resultados, JOLY et al. (1979) hallan un número superior de cepas resistentes (72,2%).

En nuestros resultados, los valores más elevados de las medias de las CMI pertenecen a las cepas procedentes de productos patológicos. De forma contraria, la mayor sensibilidad la alcanzan las cepas procedentes de suelos y productos farmacéuticos. Es más frecuente, igual que con las cepas aisladas por JOLY (1979), la presencia de cepas resistentes que sensibles.

La resistencia al arsenato está determinada por plásmidos en S. aureus (NOVICK y ROTH, 1968). En Enterobacteriaceae HEDGES y BAUMBERG (1973) transfirieron esta resistencia entre E. coli y S. typhi. JOLY et al. (1979) confirmaron este hecho, asociándolo siempre con transferencia de resistencia a antibióticos. Sin embargo, hasta la actualidad,

a pesar del elevado nivel de resistencia hallado, no se ha descrito este proceso en P. aeruginosa.

La discusión que puede presentarse al considerar los resultados frente al talio es relativamente original, porque no existen datos que se singularicen respecto a los reflejados en la literatura especializada.

En los resultados existentes aparece una gran variación entre las distintas especies. WILSON y DEAN (1977) describen una CMI de 123 $\mu\text{g/ml}$ como umbral medio de sensibilidad en P. aeruginosa. En nuestra experiencia, este nivel es alcanzado por un número importante de microorganismos, pero el nivel máximo que alcanza a un 65,0% de cepas, se sitúa en una CMI de 256 $\mu\text{g/ml}$.

El comportamiento de las cepas de P. aeruginosa frente a la sal de talio es muy homogéneo en todas las procedencias estudiadas. El nivel superior en la media de las CMI es el alcanzado en las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Este máximo viene condicionado por el aislamiento de tres microorganismos que son capaces de crecer a concentraciones elevadas de dicha sal.

El comportamiento de la colección de P. aeruginosa estudiada frente al telurito potásico, no ha aportado sorpresas experimentales. En efecto, es un hecho ya establecido desde el año 1977 (SUMMERS y JACOBY) que la resistencia al telurito potásico está codificada en P. aeruginosa por plásmidos del grupo IncP-2, plásmidos que se hallan ampliamente distribuidos en la especie, codificando de forma adicional resistencia a la carbenicilina, a la gentamicina y a otros marcadores.

Considerando los resultados obtenidos, es fácil detectar que la distribución, teniendo en cuenta el comportamiento frente a la sal de telurio empleada, es bastante homogénea. Las poblaciones aisladas de productos patológicos, aguas superficiales terrestres, litorales y fangos de depuradoras presentan un comportamiento similar, relativamente elevado en su CMI. En cambio, las cepas procedentes de suelos alcanzan valores mucho más bajos. Esto podría indicar que la necesidad de mantenimiento de plásmidos como los del grupo IncP-2 para estas poblaciones bacterianas habitantes comunes del suelo no es imprescindible. Este hecho puede ser el resultado de una menor presión selectiva ejercida en dicho hábitat.

Según SUMMERS y JACOBY (1977), la resistencia al telurito no está relacionada con ninguna resistencia descrita previamente a metales pesados y antibióticos, aunque a menudo se encuentra asociada con resistencia al arsénico, mercurio y plata. En las Pseudomonas aisladas en esta memoria se aprecia una asociación entre la resistencia al telururo y a los restantes agentes antimicrobianos ensayados.

Finalmente, por lo que respecta al capítulo de resistencia a metales pesados, el comportamiento de resistencia de las diferentes P. aeruginosa frente a los niveles ensayados de uranio suministrado en forma de nitrato de uranilo presenta varios aspectos interesantes, adecuados para su discusión.

En general, el comportamiento de la población frente a concentraciones crecientes de dicho metal responde a un modelo homogéneo, tal como se ha resaltado anteriormente en el capítulo de resultados. Lo que quisiéramos señalar en esta discusión es el especial comportamiento que tiene P. aeruginosa frente al uranio. Este microorganismo está extraordinariamente dotado para la movilización de este elemento químico, verificándose su acumulación a

nivel intracelular, formando unos depósitos visibles al M.E. (STRANDBERG et al., 1981).

Pero es más, en nuestro trabajo experimental se ha podido detectar cómo a nivel de las distintas poblaciones de P. aeruginosa aisladas se presenta con claridad un fenómeno de selección. Según los resultados, es un hecho evidente que el hábitat correspondiente a los lodos de depuradoras contiene cepas de P. aeruginosa altamente cualificadas para la acumulación de uranio; en cambio, resulta claramente inferior para las poblaciones de Pseudomonas de otras procedencias.

En definitiva, con el uranio se alcanza a comprender sutilmente la existencia de un nicho ecológico, como es el que corresponde al de la población de P. aeruginosa perteneciente a fangos de depuradoras. El efecto de la presión selectiva originada por los elevados niveles de cadmio, plomo, cinc y uranio en este entorno ha seleccionado, indiscutiblemente, una población de Pseudomonas altamente especializadas.

Ante el elevado nivel de resistencia hallado se podría establecer, bajo un punto de vista teórico, una relación

entre las distintas cepas de P. aeruginosa aisladas, a efectos de comprobar la existencia de presuntos plásmidos que hayan conferido a las cepas una adaptación selectiva hacia sus hábitats de procedencia.

La descripción del CUADRO D-1 ayuda al planteamiento de esta parcela de la discusión, que hace referencia al comportamiento de P. aeruginosa en función del potencial biológico en forma de su contenido plasmídico y su respectiva adaptación a las distintas biocenosis estudiadas. A tal efecto puede intuirse, con el grupo de incompatibilidad P-1, que un 31,1% de las cepas aisladas de productos patológicos cumplen un modelo que se ajusta al factor plasmídico R527, que codifica resistencia a la carbenicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, sulfadiazina y mercurio. Este resultado está ausente en las cepas procedentes de suelos, depuradoras y formas farmacéuticas no estériles y alimentos. En las cepas procedentes de aguas superficiales sólo se describe un 9,1% y en las marinas un 1,1%. Paralelamente, dentro del mismo grupo de incompatibilidad se hallan unas diferencias altamente significativas entre las cepas procedentes de productos patológicos y las restantes, sugiriendo la exis-

Grupo Inc	Plásmido	Propiedades	Ecosistemas					
			S	A	M	D	H	F
P-1	R527	CB, C, GM, K, S, SD, HG	0	9,1	1,1	0	31,1	0
	R1033	CB, C, GM, K, S, SD, TE, HG	0	9,1	1,1	0	14,6	0
	RP4-pMG2	CB, GM, K, S, SD, TE, HG	0	9,1	1,1	0	14,6	0
P-2	pMG1, pMG2	GM, S, SD, HG, Te	0	10,4	1,1	2,3	21,4	0
	pMG5	K, SD, NN, HG, Te	0	2,2	1,1	2,3	8,7	0
	pMG6	C, GM, K, SD, NN, Cr, HG, Te	0	1,3	1,1	2,3	8,7	0
	RPL11	CB, C, GM, S, SD, TE, HG, Te	0	9,6	1,1	0	18,4	0
	Rm16a	CB, C, GM, K, S, NN, HG, Te	0	1,3	1,1	0	8,7	0
	R38	S, SD, TE, HG, Te	4	28,3	38,6	41,9	29,1	34,6
	kR61	C, S, SD, TE, HG, Te	4	28,3	38,6	41,9	29,1	34,6
	Rms159	C, S, TE, HG, Te	12	52,6	62,5	41,9	34,0	46,2
	R931	S, TE, HG, Te	12	52,6	62,5	41,9	34,0	46,2
	R3108	S, SD, TE, HG, Te	4	28,3	38,6	41,9	29,1	34,6
	P-3	pMG7	GM, K, SD, NN, HG	0	1,3	1,1	2,3	11,7
RIP64		CB, GM, C, SD, NN, HG	0	1,3	1,1	0	11,7	0
P-5	Rms163	C, SD, TE	44	54,8	58,0	29,5	80,6	88,5
P-6	Rms149	CB, GM, S, SD	2,7	11,3	2,2	0	36,9	0
P-9	R2	CB, K, S, SD	22,7	34,8	31,8	27,9	58,3	7,7
P-10	pSR1	GM, K, SD, NN, HG	0	1,3	1,1	0	11,7	0

CUADRO D-1 Posibles frecuencias de plásmidos portadores de resistencia a antibióticos, quimioterápicos y metales pesados en los distintos ecosistemas estudiados.

tencia de los factores R1033 y RP4pMG2 para un 14,6% de las cepas hospitalarias.

Respecto al grupo de incompatibilidad P-2 aparece un comportamiento dualístico. En efecto, la frecuencia de aislados es significativamente mayor en las cepas aisladas de productos patológicos, para aquellos plásmidos en los que el espectro de quimioterápicos y antibióticos es importante. Sólo aparecen porcentajes de resistencia interesantes, netamente inferiores a los presentados por dichas cepas, para el caso de P. aeruginosa procedentes de aguas superficiales. No se ha conseguido el aislamiento de ninguna cepa de P. aeruginosa procedente de suelos que presente resistencia a los plásmidos pMG1, pMG2, pMG5, pMG6, RPL11 y Rml6a.

Los microorganismos procedentes de formas farmacéuticas no estériles presentan un comportamiento idéntico. Finalmente, el índice de resistencia presentado por las bacterias aisladas de aguas marinas y fangos de depuradoras es mínimo o nulo.

En cambio, se manifiesta una modificación en el comportamiento que hace referencia al grupo IncP-2 para aquellos plásmidos en los que su genoma contiene resistencia a metales pesados pero no a ciertos antibióticos y quimioterápicos. Ante esta configuración genética se produce una variación en el comportamiento, hallándose los índices de máxima resistencia en cepas cuyo hábitat es aguas litorales, con valores de 62,5% para plásmidos como Rms159 y R931 y de 52,6% para los aislamientos procedentes de aguas superficiales terrestres respecto a los mismos plásmidos.

El tercer lugar, teniendo en cuenta las frecuencias de resistencia, lo ocupan las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, presentando el hábitat formado por los microorganismos aislados de fangos de depuradoras valores muy próximos. Las cepas procedentes de productos patológicos se caracterizan por el nivel inferior alcanzado.

Este comportamiento puede hacerse extensible, con ligeras variaciones, a las frecuencias de resistencia para los plásmidos R38 y kR61. Para ellos el índice de máxima resistencia corresponde a los aislamientos verificados a partir

de lodos de depuradoras y aguas litorales, encontrándose asimismo los aislamientos realizados a nivel hospitalario en penúltimo lugar, prácticamente igualados con los biotipos de aguas terrestres superficiales y a gran distancia de las P. aeruginosa aisladas de suelos.

Como puede observarse en el CUADRO D-1, la selección de resistencias parece que se declina hacia medios en los que hay agentes contaminantes relacionados con mercuriales y metales pesados en general.

El grupo IncP-2, a nivel de los plásmidos pM67 y RIP64, contiene en sus marcadores la tobramicina, surgiendo de nuevo índices de resistencia que favorecen la selección negativa de biotipos procedentes de productos patológicos, con amplias diferencias sobre los aislamientos procedentes de los restantes hábitats. Este hecho se repite a nivel de los grupos de incompatibilidad P-6, P-9 y P-10.

En cambio, en el grupo IncP-5, representado por el plásmido Rms163, los porcentajes de resistencia alcanzan valores más elevados para todos los biotipos, incluso valores de un 44% en las cepas aisladas de suelos. De forma marcada destacan los porcentajes obtenidos en las P. aeruginosa

aisladas de productos patológicos (80,6%) y formas farmacéuticas no estériles y alimentos (88,5%), donde se ha manifestado con mayor intensidad la fuerza selectiva negativa ejercida por el medio.

A través de los resultados obtenidos en este trabajo, el serotipado se ha manifestado como un método sencillo, rápido y preciso para identificar y clasificar las cepas de P. aeruginosa aisladas tanto del medio ambiente como a partir de productos patológicos.

El serotipo que se describe con mayor abundancia en nuestro trabajo es el O:6, a pesar de no hallarse distribuido de igual forma entre los orígenes estudiados. Este resultado se halla incluido dentro de los datos suministrados por otros autores. Podemos citar los resultados publicados por BROKOPP et al. (1977) que, tras haber estudiado cepas de origen hospitalario, encontraron un 27,1% de aglutinaciones con el suero 6. De igual forma GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977) describen dicho serotipo en el 18,7% de las cepas y KURUP et al. (1976) en el 26%.

Cabe también destacar los resultados descritos con los sueros O:1 y O:4. Tanto los autores anteriormente citados

como MAIQUEZ-RICHART et al. (1977) consideran estos serotipos como unos de los más característicos de P. aeruginosa.

Al medir la eficacia de un método de tipado, uno de los factores a tener en cuenta es el porcentaje de cepas que no pueden ser clasificadas por dicha técnica. En este trabajo el 16,2% de las cepas no se han identificado al utilizar los sueros descritos por P.V. LIU. La tipabilidad más baja alcanzada es la descrita en cepas del medio ambiente, especialmente en cepas procedentes de fangos de depuradoras. Este hecho podría significar la existencia de una mayor diversidad en dicho medio que en las cepas aisladas de ambiente hospitalario. De todas formas al citar los resultados de BROKOPP et al. (1977), con un 5,2% de cepas no tipables y GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977) con un 12,5%, habiendo ambos trabajado con cepas hospitalarias, se puede apreciar la existencia de una cierta variación en los resultados.

Se han realizado muchos estudios para poner de manifiesto la existencia de reacciones cruzadas entre los sueros empleados (HOMMA, 1976; TERADA et al., 1977; KUSAMA, 1978).

Teniendo en cuenta las cepas aisladas en este trabajo, un 15% han presentado aglutinación en dos sueros de forma simultánea. Entre estas aglutinaciones algunas se presentaron con una cierta frecuencia como 0:5 y 16 (2,7%), 0:2 y 5 (2,5%) y 0:7 y 8 (1,4%). Este hecho se encuentra ampliamente distribuido, pues BROKOPP et al. (1977) citan la existencia de estas combinaciones, recomendando KUSAMA en 1978 esta forma de expresar los resultados antes que crear nuevos grupos propuestos por otros autores.

El examen de los resultados del serotipado revela la existencia de unas diferencias según el origen de las cepas. A través de los datos obtenidos en la matriz de correlación se puede determinar la existencia de ciertas relaciones.

La correlación hallada al comparar los resultados obtenidos con las cepas procedentes de productos patológicos y aguas terrestres ($r=0,7893$) aproxima a las Pseudomonas de ambos orígenes. Estos resultados concuerdan con LANYI et al. (1966/67) y LANYI y BERGAN (1978), pues observan la existencia de una concordancia entre los serotipos de las P. aeruginosa aisladas a partir de aguas de bebida y

muestras fecales. Este hecho indica la posibilidad de que las Pseudomonas de origen hídrico sean el resultado de una contaminación fecal.

Parece obvio admitir la elevada correlación entre los serotipos descritos en aguas terrestres superficiales y fangos de depuradoras como una consecuencia de las características del agua que procesan. Por otra parte, la descarga bacteriana que reciben las aguas litorales, vehiculizada por aguas superficiales de origen terrestre, explica la relación elevada hallada en los serotipos de ambos ambientes.

Las bajas correlaciones halladas entre formas farmacéuticas no estériles con aguas marinas y, productos patológicos con cepas procedentes de suelos, permiten considerar la posibilidad de un origen distinto de los microorganismos en dichos hábitats.

Para realizar el tipado e identificación de las cepas de P. aeruginosa existen varios métodos descritos en la bibliografía. Uno de los métodos más ampliamente utilizados es el descrito por GILLIES y GOVAN (1966) que mediante

la producción de aeruginocinas logra diferenciar 36 tipos distintos de cepas. El método a emplear en este trabajo debía conducir a una mayor diferenciación de las cepas, así como permitir conocer la relación entre la producción y sensibilidad a las aeruginocinas. La técnica empleada nos permite realizar un "fingerprinting" de las cepas así como estudiar su capacidad de competir en un medio hostil.

Con el tipado por producción de aeruginocinas según JONES et al. (1974), se ha identificado el 97,9% de las cepas, valor elevado al comparar los resultados hallados por otros autores al utilizar diferentes técnicas. De todos modos, se han de tener en cuenta dos hechos. Por una parte este método se ha desarrollado para el tipado de cepas de origen hospitalario, dando excelentes resultados al emplearlo con cepas procedentes del medio ambiente, pues tan sólo siete no han podido ser caracterizadas. Por otra parte, a pesar de ser P. aeruginosa productora de aeruginocinas, no todas las cepas cumplen esta característica, pudiéndose hallar las cepas anteriormente descritas dentro de este grupo.

A pesar de estar este método inicialmente dirigido hacia el trazado de este microorganismo en infecciones nosoco-

miales, cabe destacar que es a partir de cepas aisladas de productos patológicos donde el porcentaje de tipabilidad alcanzado (95,1%) es inferior. De forma contraria, se ha logrado un 100% de tipabilidad con las cepas aisladas de aguas marinas y fangos de depuradoras, a pesar de la gran diversidad de cepas existente en dichos hábitats. El mismo resultado se ha obtenido con las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles. En este caso, al tratarse de hábitats cerrados, en determinadas ocasiones se ha observado la existencia de una sola cepa, cuyo aislamiento se ha verificado en diversos productos en un tiempo relativamente próximo.

Mediante el tipado por sensibilidad, el porcentaje de tipabilidad alcanzado es menor (65,5%), estando de acuerdo con la literatura existente sobre el tema (FARMER y HERMAN, 1969). La técnica empleada (GOMEZ LUS y RUBIO CALVO, 1977) nos ha permitido, en algunos casos de cepas no productoras de aeruginocinas, tipar microorganismos, con un total de nueve, sin alcanzar de todas formas a la totalidad de las cepas. A pesar de la complementariedad que presenta esta técnica con el tipado por producción, hay que tener en cuenta su mayor inestabilidad, debido a la presencia de varios tipos de aeruginocinas en los lisados, pudiendo

variar fácilmente su composición o la sensibilidad de la cepa problema por ligeras variaciones en las condiciones del medio de cultivo. Entre las cepas estudiadas, es a partir de los microorganismos aislados de muestras de suelos donde se ha alcanzado un mayor porcentaje de tipabilidad (96%), lo que coincide con la característica sensibilidad que han verificado dichas cepas.

Para poder expresar de forma más simplificada los resultados del tipado se empleó al ALA-aeruginocinotipo, utilizando tan sólo los dos primeros dígitos de los seis obtenidos en el tipado por producción y sensibilidad (JONES et al., 1974). Al relacionar los resultados obtenidos por ambos métodos se puede observar que la combinación más frecuente se caracteriza por ser buena productora y poco sensible. De igual forma, la combinación 42-88, también cumple esta característica. Es únicamente a partir de las cepas de suelos donde la combinación más abundante corresponde a 88-12, presentando las propiedades opuestas.

A través de la relación producción/sensibilidad se pudieron establecer seis patrones de comportamiento. El patrón +++/+++ es el único que no se evidencia en ningún aislado. Este resultado cabía esperarse, pues es lógico

que una cepa muy productora de aeruginocinas no sea sensible a las mismas, pues, tal como describe OGAWARA (1981), el microorganismo productor debe ser resistente a sus propios metabolitos, como mínimo durante el periodo productor. El patrón más frecuente es el que corresponde a cepas buenas productoras y poco sensibles, cumpliendo esta asociación las cepas aisladas de aguas superficiales, aguas marinas, fangos de depuradoras y formas farmacéuticas no estériles. El patrón contrario se presenta mayoritariamente en los microorganismos aislados en muestras de suelos.

Parece, pues, que existe una relación inversa entre producción de aeruginocinas y sensibilidad a las mismas, siendo el patrón más frecuente el que corresponde a cepas buenas productoras y poco sensibles, es decir resistentes. Desde un punto de vista ecológico estas cepas parecen las mejor dotadas para competir por los sustratos, siendo capaces de antagonizar a otras cepas en cualquier nicho ecológico. Este hecho es afirmado por GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977) al observar la prevalencia en ambiente hospitalario de cepas buenas productoras frente a las muy sensibles. En nuestros resultados, todos los ambientes, excepto en sue-

los, se observa una elevada frecuencia de cepas buenas productoras de aeruginocinas y por lo tanto poco sensibles. Esta característica, junto con su posible resistencia múltiple a los agentes antimicrobianos, podría permitir a P. aeruginosa desarrollarse favorablemente en medios hostiles, tanto naturales como creados por el hombre.

Diversos trabajos sobre P. aeruginosa concuerdan en que el tipado serológico es el primer paso a seguir; sin embargo, los resultados presentados en esta memoria, sobre el tipado por aeruginocinas, han facilitado una mayor subdivisión, en parte debido al número de cepas indicadoras empleadas, obteniéndose como resultado un número superior de subtipos. La combinación de ambos métodos conduce a un conocimiento muy exacto de las cepas problema.

El serotipo identificado con mayor frecuencia en las cepas de P. aeruginosa estudiadas, tal como ya se ha descrito, es el O:6. Al observar los niveles de resistencia, dicho grupo de cepas no destaca por sus elevados valores. DENIS y GODEAU en 1972 ya describen que el serotipo más frecuente no tiene porque ser el más resistente, pudiendo variar los niveles de resistencia según el agente antimicrobiano

estudiado. Según MICHEL-BRIAND et al. (1975), resulta fácil relacionar un serotipo con una resistencia, pero este resultado no se puede extrapolar a la totalidad de la población, pues varían los resultados según los hábitats estudiados. Al hablar de las cepas aisladas en este trabajo, las pertenecientes al serotipo O:4 son las que se han comportado como las más resistentes, sin ser las más frecuentes. De forma contraria, las pertenecientes al serotipo O:1 se caracterizan por ser más sensibles.

Teniendo en cuenta la relación entre la resistencia a los agentes antimicrobianos y la bacteriocinogénesis se pueden describir cuatro categorías en P. aeruginosa. Las cepas antibio-resistentes, productoras de bacteriocinas, constituyen el grupo de bacterias mejor preparadas para prevalecer. De forma contraria, no presentarían propiedades adecuadas los microorganismos antibio-sensibles no productores de bacteriocinas.

El estudio comparativo del tipado serológico y la relación producción/sensibilidad de aeruginocinas revela una homogeneidad. Los serotipos 1 y 3 se caracterizan por ser malos productores de aeruginocinas. Como buenos productores y poco sensibles aparecen los serotipos O:5; O:11;

O:8; O:5 y 16, y O:2 y 5. Este comportamiento es coincidente con los resultados obtenidos por GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977) y GOMEZ LUS et al. (1981). El estudio realizado por estos autores sobre la dinámica de la población en medio hospitalario, les permite concluir que una aeruginogénesis intensa junto con una escasa sensibilidad caracteriza a las cepas prevalentes en este medio; las cepas con características opuestas son deficientes para competir y sobrevivir. Esto se manifiesta por un descenso significativo de los serotipos 1 y 3 en los aislamientos realizados entre 1968-1973 y 1974-1976 por dichos autores.

El 16% de las cepas aisladas en este trabajo se hallan incluidas dentro del grupo prevalente, caracterizándose de forma adicional por su resistencia a determinados agentes antimicrobianos. La presión selectiva ejercida sobre este grupo puede conducir a la aparición de una población altamente resistente no sólo en medio hospitalario sino también en el medio ambiente, con el peligro que puede representar para la salud pública. Es necesario conocer y controlar la evolución que presenta dicha población en los reservorios naturales si queremos controlar las poblaciones a nivel del hombre.

Este trabajo aporta un estudio sobre el comportamiento de P. aeruginosa aisladas del medio ambiente. Para conocer la importancia de las fuentes ecológicas en la transmisión de este microorganismo a los pacientes, se debe estudiar su comportamiento en los nichos naturales. La clara comprensión de los ciclos verificados por este microorganismo en los hábitats en los que es capaz de crecer, proporciona una aproximación válida para el control de P. aeruginosa.

VII. CONCLUSIONES

VII CONCLUSIONES

1. Se ha aislado P. aeruginosa en todos los hábitats estudiados, siendo el porcentaje de aislamiento próximo al 50% en el caso de fangos de depuradoras, aguas superficiales terrestres y marinas. El porcentaje inferior de aislamientos (4%) corresponde a formas farmacéuticas no estériles.
2. Se han obtenido unos porcentajes muy elevados de resistencia (92-100%) frente al ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, estreptomina, fosfomicina, kanamicina, nitrofurantoína y tetraciclina. Los mayores porcentajes de sensibilidad se han hallado con la tobramicina, colistina y gentamicina.
3. El grupo de cepas procedentes de productos patológicos proporciona el mayor porcentaje de resistencia a los antibióticos estudiados.
4. Las medias más bajas de las CMI frente a las sales de los metales pesados empleados las presentan las cepas de P. aeruginosa aisladas de muestras de suelos y for-

mas farmacéuticas no estériles y alimentos. A partir de las cepas procedentes de fangos de depuradoras se obtienen las medias de las CMI más elevadas.

5. Se han presentado unos porcentajes muy elevados de resistencia (97-100%) frente a las sales de cadmio, cinc, cromo, molibdeno, plomo, talio, tungsteno y uranio. Todas las cepas son sensibles a la sal de plata.
6. Por hábitats, las cepas procedentes de aguas superficiales terrestres presentan el mayor porcentaje de resistencia a los metales pesados estudiados, excepto con el mercurio para el cual se han obtenido unos porcentajes de resistencia similares en todos los ambientes estudiados.
7. La elevada correlación hallada entre los niveles de resistencia frente a los antibióticos, quimioterápicos y metales pesados indica la presencia de un modelo de resistencia homogéneo.
8. El 6% de las cepas es resistente a 13 de los 15 agentes antimicrobianos y a 11 de las 12 sales de metales pesados estudiados.

9. Cepas de P. aeruginosa resistentes al cromo hexavalente son capaces de reducirlo y acumular una pequeña cantidad del elemento.
10. Los serotipos que se han descrito con mayor frecuencia son: el O:6 (14%), principalmente en microorganismos procedentes de suelos, aguas superficiales terrestres y marinas, el O:1 (11%) y el O:4 (10%). El 16% de las cepas no ha aglutinado frente a ningún suero y el 21% frente a más de uno.
11. Mediante el tipado con aeruginocinas, el 98% de las cepas se han identificado por producción y el 66% por sensibilidad. Al combinar ambos métodos se ha obtenido un 99,5% de tipabilidad. El 67% de las cepas de P. aeruginosa se han comportado como buenas productoras de aeruginocinas y poco sensibles.
12. Las cepas que pertenecen a los serotipos O:1 y O:3 se caracterizan por ser malas productoras de aeruginocinas y muy sensibles. Las cepas buenas productoras y poco sensibles a las aeruginocinas pertenecen a los serotipos O:5, O:8, O:11, O:2,5 y O:5,16.

13. Por sus especiales características de resistencia, el 16% de las P. aeruginosa aisladas en este trabajo destacan por estar mejor dotadas para prevalecer en medios hostiles. Este hecho tiene una especial significación desde el punto de vista ecológico y sanitario.

VIII BIBLIOGRAFIA

VIII BIBLIOGRAFIA

- ADLER, J.L. and FINLAND, M.(1971) Susceptibility of Recent Isolates of Pseudomonas aeruginosa to Gentamicin, Polymixin and five Penicillins, with Observations on the Pyocin and Immunotypes of the Strains. *Appl. Microbiol.* 22, (5), 870-875.
- ADUAN, R.P. and REYNOLDS, H.Y.(1979) The Importance of Cell-mediated responses to Pseudomonas Infection, 135-156. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed. Doggett R.G. Academic Press. New York.
- AICKIN, R.M. and DEAN, A.C.R. (1977) Lead Accumulation by Microorganisms. *Microbios Letters* 5, (19-20), 129-133.
- AICKIN, R.M. and DEAN, A.C.R. (1978) Lead Accumulation by Pseudomonas fluorescens by a Citrobacter spp. *Microbios Letters* 9, 55-66.
- AL DELAMI, K. et DENIS, F. (1976) Sensibilité aux antibiotiques de Pseudomonas aeruginosa, fluorescens et putida de provenances diverses. *Ouest Med.* 24, 1793-1798.
- ALLEN, D.A., AUSTIN, B. and COLWELL, R.R. (1977) Antibiotic Resistance Patterns of Metal-Tolerant Bacteria

- Isolated from an Estuary. Antimicrob. Agents Chemother. 12, (4), 545-547.
- ALLEN, J.C. and KELLY, P.C. (1975) Antigenic Heterogeneity among Pyocins of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 12, (2), 318-323.
- ANDERSON, M.S., HALL, R.A. and GRIFFIN, M. (1980) Microbial Metabolism of Alicyclic Hydrocarbons : Cyclohexane Catabolism by a Pure Strain of Pseudomonas spp. J. of Gen. Microbiol. 120, (1), 89-94.
- ANON (1980) British Pharmacopœia. Vol II, Appendix XVI. London Her Majesty's Stationes Office. University Press. Cambridge.
- ANON (1980) The United States Pharmacopeia. The National Formulary 15^a ed. United States Pharmaceutical Convention, Inc. Rockville. Md.
- ARVIDSON, S., DORNBUSCH, K. and ERICSSON, H. (1981) Interpretation of Agar Diffusion Method for Bacterial Susceptibility Testing. J. Antimicrob. Chemother. 7, 5-14.
- AUSTIN, B., ALLEN, D.A., MILLS, A.L. and COLWELL, R.R. (1977) Numerical Taxonomy of Heavy Metal Tolerant Bacteria Isolated from an Estuary. Can. J. Microbiol. 23, (10), 1443-1447.
- AUSTIN, B., GARGES, S., CONRAD, B., HARDING, E.E., COLWELL, R.R., SINIDU, U. and TAGA, N. (1979) Comparative Study

- of the Aerobic, Heterotrophic Bacterial Flora of Chesapeake Bay and Tokyo Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, (4), 704-714.
- AYLIFFE, G.A.J. (1978) The application of Typing Methods to Nosocomial Infections, 39-60. En : *Methods in Microbiology*. Ed. Bergan, T. and Norris, J.R. Academic Press. London.
- AYLIFFE, G.A.J., BAB, J.R., COLLINS, B.J., LOWBURY, E.J.L. and NEWSOM, S.W.B. (1974) *Pseudomonas aeruginosa* in Hospitals Sinks. *Lancet* ii, 578-581.
- AYLIFFE, G.A.J., COLLINS, B.J. and LOWBURY, E.J.L. (1967) Ward Floors and Other Surfaces as Reservoirs of Hospital Infection. *J. Hyg. Camb.* 65, (4), 515-536.
- AYLIFFE, G.A.J., LOWBURY, E.J.L., HAMILTON, J.G., SMALL, J.M., ASHESHO, V.E.A. and PARKER, M.T. (1965) Hospital Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Neurosurgery. *Lancet* ii, 365-368.
- BABICH, H. and STOTZKY, G. (1978) Toxicity of Zinc to Fungi, Bacteria and Coliphages : Influence of Chloride Ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, (6), 906-914.
- BABOR, J.A. y IBARZ AZNARES, J. (1964) *Química general moderna*. Ed. Marín S.A. Barcelona.
- BAILEY, W.R. and SCOTT, E.G. (1970) *Diagnostic Microbiology* 3ª ed. Saint Tonis. The C.V. Mosby Company.

- BAIRD, R.M., BROWN, W.R.L. and SHOOTER, R.A. (1976a) Pseudomonas aeruginosa in Hospital Pharmacies. Brit. Med. J. 1, 511-512.
- BAIRD, R.M., ELHAG, K.M. and SHAW, E.J. (1976b) Pseudomonas thomasi in a Hospital Distilled-Water Supply. J. Med. Microbiol. 9, 493-495.
- BAIRD, R.M., FARWELL, J.A., STURGISS, M., AWAD, Z.A. and SHOOTER, R.A. (1979) Microbial Contamination of Topical Medicaments Used in the Treatment and Prevention of Pressure Sores. J. Hyg. Camb. 83, 445-449.
- BAIRD, R.M., PARKS, A. and AWAD, Z.A. (1977) Control of Pseudomonas aeruginosa in Pharmacy Environments and Medicaments. Pharm. J. 20, 164-165.
- BAIRD, R.M. and SHOOTER, R.A. (1976) Pseudomonas aeruginosa Infection Associated with Use of Contaminated Medicaments. Brit. Med. J. 2, 349-350.
- BALDRY, M.G.C., HOGART, D.S. and DEAN, A.C.R. (1977) Chromium and Copper Sensitivity and Tolerance in Klebsiella (Aerobacter) aerogenes. Microbios Letters 4, 7-16.
- BALTCH, A.L., GRIFFIN, P.E. and HARMER, M. (1979) Pseudomonas aeruginosa bacteriemia : Relationship of Bacterial Enzyme Production and Pyocine Types with Clinical Prognosis in 100 Patients. J. Lab. Clin. Med. 93, (4), 600-606.

- BARRY, A.L., SCHOENKNECHT, F.D., NORTON, R., O'BRIEN, T. F., MATSEN, J.M., THORNSBERRY, C., THRUPP, L.D., MARKLEY, E. and GAVAN, T.L. (1976) Inter and Intralaboratory Variability in Antibiotic Susceptibility Test with Pseudomonas aeruginosa and Enterobacteriaceae. *J. Infect. Dis.* 134, (4), 328-335.
- BARRY, A.L. and THORNSBERRY, C. (1980) Susceptibility Testing : Diffusion Test Procedures. 463-474. En : *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. A.S.M. Washington.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. and TURK, M. (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45, (4), 493-496.
- BERCHE, P., DESCAMPS, P., AURIL, J.L., DAOULAS-LEBOURDELLES, F. and VERON, M. (1979) Effect of Antibiotics on Mucoid Strains of Pseudomonas aeruginosa. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 130a, 315-330.
- BERGAN, T. (1975) Epidemiological Typing of Pseudomonas aeruginosa. 189-236. En : *Resistance of Pseudomonas aeruginosa*. Ed BROWN, M.R.W. John Willey and Sons. London.
- BEVERIDGE, T.J. and MURRAY, R.G.E. (1976) Uptake and Retention of Metals by Cell Walls of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 127, (3), 1502-1518.

- BEVERIDGE, T.J. and MURRAY, R.G.E. (1980) Sites of Metal Deposition in the Cell Wall of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 141, (2), 876-887.
- BLOOMFIELD, S.F. (1978) A Review. The Use of Desinfectants in the Home. J. Appl. Bacteriol. 45, 1-38.
- BLUE, J.L. and WOOLEY, R.E. (1977) Antibacterial Sensitivity Patterns of Bacteria Isolated from Dogs with Otitis Externa. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 171, (4), 362-363.
- BOBO, R.A., NEWTON, E.J., JONES, L.F., FARMER, L.H. and FARMER III, J.J. (1973) Nursery Outbreak of Pseudomonas aeruginosa : Epidemiological Conclusions from Five Different Typing Methods. Appl. Microbiol. 25, (3), 414-420.
- BOGGIS, W., KENWARD, M.A. and BROWN, M.R.W. (1979) Effects of Divalent Metal Cations in the Growth Medium upon Sensitivity of Batch-Grown Pseudomonas aeruginosa to EDTA or Polimixin B. J. Appl. Bacteriol. 47, 477-488.
- BRADLEY, D.E. (1967) Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31, (4), 230-314.
- BRADLEY, D.E. (1977) Pili and Associated Bacteriophages of Pseudomonas aeruginosa. 127-133. En : Microbiology 1977. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.
- BRIDGES, K., KIDSON, A., LOWBURY, E.J.L. and WILKINS, M.D. (1979) Gentamicin and Silver-Resistant Pseudomonas in Burns Unit. Brit. Med. J. 1, 446-449.

- BROCK, T.D. (1976) *Biología de los microorganismos*. Ed Omega S.A. Barcelona.
- BRODA, P. (1979) *Plasmids*. W.H. Freeman and Company. Oxford.
- BRODA, P., BAYLEY, S., DUGGLEBY, C.J., WORSEY, M.J., WILLIAMS, P.A. (1977) Plasmid-Coded Degradation of Toluene and Xylenes in soil Pseudomonads. 403-406. En : *Plasmids. Medical and Theoretical aspects*. Ed Mitsuhashi, S., Rosival, L. and Krcmery, V. Avicenum, Czechoslovak Medical Press. Prague. Springer Verlag. Berlin.
- BRODSKY, M.M. and NIXON, M.C. (1974) Membrane Filter Method for the Isolation and Enumeration of Pseudomonas aeruginosa from Swimming Pools. *Appl. Microbiol.* 27, (5), 938-943.
- BROKOPP, C.D. and FARMER III, J.J. (1979) Typing Methods for Pseudomonas aeruginosa. 90-134. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- BROKOPP, C.D., GOMEZ LUS, R. and FARMER III, J.J. (1977) Serological Typing of Pseudomonas aeruginosa : Use of Commercial Antisera and Live Antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2, (6), 640-649.
- BROWN, M.R.W. (1975) The Role of the Cell Envelope in Resistance. 71-107. En : Resistance of Pseudomonas aeruginosa. Ed Brown, M.R.W. John Willey and Sons. London.

- BROWN, M.J. and LESTER, J.N. (1979) Metal Removal in Activate Sludge : the Role of Bacterial Extracelular Polymers. Water Res. 13, 817-837.
- BRYAN, L.E. (1979) Resistance to Antimicrobial Agents : the General Nature of the Problem and the Basis of Resistance. 219-271. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- BRYAN, L.E. (1980) Mechanisms of Plasmid Mediated Drug Resistance. 57-81. En : Plasmids and Transposons. Environmental Effects and Maintenance Mechanism. Ed Stuttard C. and Rozee, K.R. Academic Press. New York.
- BRYAN, L.E., SEMAKA, S.D., VAN DEN ELZEN, H.M., KINNEAR, J.E. and WHITEHORSE, R.L.S. (1973) Characteristics of R931 and Other Pseudomonas aeruginosa R Factors. Antimicrob. Agents Chemother. 3, (5), 625-637.
- CALLAHAN III, L.T. (1976) Pseudomonas aeruginosa Exotoxin : Purification by Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis and the Development of Highly Specific Antitoxin Serum. Infec. Immun. 14, (1), 55-61.
- CANTO JANER, J., GUARDIOLA PUJALS, J.y SALVATELLA BATLLORI, N. (1975) Polución del agua por cromo en el río Llobregat. Agua 88, 13-29.
- CARSON, L.A., PETERSEN, N.J., FAVERO, M.S., DOTO, I.L., COLLINS, D.E. and LEVIN, M.A. (1975) Factor Influencing Detection and Ennumeration of Pseudomonas aerugi-

nosa by Most Probable Number and Membrane Filtration Techniques. Appl. Microbiol. 30, (6), 935-942.

- CLANCY, C.F. (1973) Pseudomonas. 239-242. En : Handbook of Microbiology. Ed Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. CRC Press. Cleveland. Chemical Rubber Co.
- CLARK, D.L., WEISS, A.A. and SIMON, S. (1977) Mercury and Organomercurial Resistances Determined by Plasmids in Pseudomonas J. Bacteriol. 132, (1), 186-196.
- CLARKE, K., GRAY, G.W. and REAVELEY, D.A. (1967) The Cell Walls of Pseudomonas aeruginosa. Biochem. J. 105, 749-754.
- CLARKE, P.H. and ORNSTON, L.N. (1975a) Metabolic Pathways and Regulation. Part I. 191-262. En : Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarkê, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.
- CLARKE, P.H. and ORNSTON, L.N. (1975b) Metabolic Pathways and Regulation : II. 263-340. En: Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.
- CLARKE, P.H. and RICHMOND, M.H. (1975) Evolutionary Prospects for Pseudomonas Species. 341-358. En : Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.

- CLOWES, R.C. (1972) Molecular Structure of Bacterial Plasmids. *Bacteriol. Rev.* 36, (3), 361-405.
- COLWELL, R.R. and KAPER, J. (1978) Distribution, Survival, and Significance of Pathogenic Bacteria and Viruses in Estuaries. *Proc. of 4^o Bienal Int. Estuarine Research Conference.* 443-457. Academic Press.
- COLWELL, R.R. and NELSON, J.A. (1974) Bacterial Mobilization of Mercury in Chesapeake Bay. *Proc. of the International Conference on Transport of Persistent Chemicals in Aquatic Ecosystems.* III 1-III 10. Ottawa. Canada.
- COLWELL, R.R. and SIZEMORE, R.K. (1974) Drug-Resistant Bacteria in the Marine Environment. *Proc. 10^a Ann. Conf. Marine Tec. Soc.* 427-430.
- COOKE, M.D. (1976a) Antibiotic Resistance Among Coliform and Fecal Coliform Bacteria Isolated from Sewage, Seawater and Marine Shellfish. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, (6), 879-884.
- COOKE, M.D. (1976b) Antibiotic Resistance Among Coliform and Fecal Coliform Bacteria Isolated from the Freshwater Mussel Hydriddella menziesii. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, (6), 885-888.
- COOKE, M.D. (1976c) Antibiotic Resistance in Coliform and Faecal Coliform Bacteria from Natural Waters and Effluents. *N.Z.J. Mar. Freshwater Res.* 10, (3), 391-397.

- COSTERTON, J.W. (1977) Cell Envelope as a Barrier to Antibiotics. 151-157. En : Microbiology 1977. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.
- COSTERTON, J.W., BROWN, M.R.W. and STRUGESS, J.M. (1979) The Cell Envelope : Its Role in Infection. 41-62. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- COSTERTON, J.W. and CHENG, K.J. (1975) The Role of the Bacterial Cell Envelope in Antibiotic Resistance. J. Antimicrob. Chemother. 1, 363-377.
- COSTERTON, J.W., INGRAM, J.M. and CHENG, K.J. (1974) Structure and Function of the Cell Envelope of Gram-negative Bacteria. Bacteriol. Rev. 38, 87-110.
- COSTIN, I.D. (1968) Einzelnährboden für die Biochemische Ausscheidung von Salmonella und Arizona-kulturen. Zbl. F. Bakt. I. Orig. 206, 390-395. En : Manual de Microbiología. Medios de cultivo deshidratados. Bases de medios de cultivo. Otros productos para Microbiología. Merck, E. Darmstadt. R.F. de Alemania.
- COWAN, S.T. (1974) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- COX, C.D. and PARKER, J. (1979) Use of 2-Aminoacetophenone production in Identification of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 9, (4), 479-484.

- CRESPO, E. and ROCA de VIÑALS, J.A. (1977) Evolution of Bacterial Sensitivity to Fosfomicin in the Ciudad Sanitaria Francisco Franco in Barcelona. *Chemother.* 23, (supl 1), 112-116.
- CROSSE, J.E. (1968) Plant Pathogenic Bacteria in Soil. En : *The Ecology of Doil Bacteria an International Symposium.* 552-572. Ed Gray, T. R. G. and Parkinson, D. Liverpool University Press.
- CHAKRABARTY, A.M. (1976) Plasmids in Pseudomonas. *Ann. Rev. Genet.* 10, 7-30.
- CHAN, K.Y. and KUEH, C.S.W. (1976) Distribution of Heterotrophic Bacteria Related to some Environmental Factors in Tolo Harbour. *Int. J. Ecol. Environ. Sci.* 2, (1), 47-57.
- CHARLOT, Y. (1978) Dosages absorptométriques des elements minéraux. 224-229. Masson. Paris.
- DAMASO, D., MORENO-LOPEZ, M. y MARTINEZ-BELTRAN, J. (1977) Evolución de la sensibilidad a la fosfomicina en bacterias aisladas en clínica. *Farmaes* II, (134), 468-476.
- DARRELL, J.H. and WAHBA, A.H. (1964) Pyocine-Typing of Hospital Strains of Pseudomonas pyocyanea. *J. Clin. Pathol.* 17, 236-242.
- DASCHNER, F., BORNEFF, J., JACKSON, G.G. and PARKER, M.T. (1978) Conclusions. 105-109. En : *Proven and Unproven Methods in Hospital Infection Control. Proc. of an Int. Workshop at Baiersbronn. Germany 1977.* Ed. Dasch-

- ner, F. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- DATTA, N. (1977) R Factors in Enterobacteriaceae. 255-272.
En : R Factor Drug Resistance Plasmid. Ed Mitsuhashi,
S. University Park Press. Baltimore.
- DAVIES, J. (1971) Bacterial Resistance of Aminoglycoside
Antibiotics. J. Infect. Dis. 124s, 7-10.
- DAVIES, J. (1979a) General Mechanisms of Antimicrobial
Resistance. Rev Infect. Dis. 1, (1), 23-27.
- DAVIES, J. (1979b) Infection Diseases 1979. The Future of
Antibiotics. J. Infect. Dis. 140, (4), 636-638.
- DAVIES, J. (1981) R-Plasmids in Hospitals-Implications for
Antibiotic Use. Infection 9, (2), 66-67.
- DAVIES, J. and COURVALIN, P. (1977) Mechanims of Resistan-
ce to Aminiglycosides. Ann. J. Med. 62, (6), 868-872.
- DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S.,
WOOD, W.B. y McCARTY, M. (1978) Tratado de Microbiolo-
gía. 2ª ed. Salvat Editores S.A. Barcelona.
- DEMKO, C.A. and THOMASSEN, M.J. (1980) Effect of Mucoid
Property on Antibiotic Susceptibility of Pseudomonas
aeruginosa. Curr. Microbiol. 4, 69-73.
- DENIS, F. et GODEAU, C. (1972) Relation entre rêsistance
aux antibiotiques et sêrotype chez Pseudomonas aerugi-
nosa. C. R. Soc. Biol. 166, (11), 1534-1538.

- DE VITO, D. (1979) Studio delle caratteristiche microbiologiche e della sensibilità agli antibiotici di 108 stipi di Pseudomonas aeruginosa isolati nel corso di infezioni intraospedaliere. Ann. Sclavo 21, (4), 425-434.
- DEVLEESCHOUWER, M.J., AIKIN, A. et DONY, J. (1980) Flore microbienne des médicaments. Données écologiques et sensibilité aux antibiotiques. 2^e partie : forme magistrale liquide. J. Pharm. Belg. 35, (4), 266-272.
- DEVLEESCHOUWER, M.J. et DONY, J. (1979) Flore microbienne des médicaments. Données écologiques et sensibilité aux antibiotiques. J. Pharm. Belg. 34, (4), 189-203.
- DIXON, R.E. (1980) Control of Nosocomial and Other Infections Acquired in Medical-Care Institutions. 934-938. En : Manual of Clinical Microbiology. Ed Lennette, E. H., Ballows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. A.S.M. Washington D.C.
- DOGGETT, R.G. (1979) Microbiology of Pseudomonas aeruginosa. 1-7- En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- DONY, J. (1972) Données écologiques relatives à certaines bactéries retrouvées dans les médicaments non stériles. Farmaceutisch Tijdschrift voor Belg. 49, (2), 99-106.
- DONY, J. (1976) Microbiologie du médicament. Bull. Acad. Méd. Belg. 131, 323-335.

- DONY, J. (1977) La qualité microbiologique des médicaments. Matières premières et produits terminés. Labo-Pharma-Problèmes et Tech. 262, 113-121.
- DOUDOROFF, M. and PALLERONI, N.J. (1974) Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci. 217-289. En : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- DOWDING, J. and DAVIES, J. (1975) Mechanisms and Origins of Plasmid-Determined Antibiotic Resistance. 179-186. En : Microbiology 1974. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.
- DOYLE, J.J., MARSHALL, R.T. and Pfander, W.H. (1975) Effects of Cadmium on the Growth and Uptake of Cadmium by Microorganisms. Appl. Microbiol. 29, (4), 562-564.
- DRAPEAU, A.J. et JANKOVIC, S. (1977) Manuel de microbiologie de l'environnement. O.M.S. Ginebra.
- DREWRY, D.T., GRAY, G.W. and WILKINSON, S.G. (1971) Release of Ethanolamine Pyrophosphate during wild Acid Hydrolysis of the Lipopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. Env. J. Biochem. 21, 400-403.
- DRUCKER, H., GARLAND, T.R. and WILDUNG, R.E. (1979) Metabolic Response of Microbiota to Chromium and other Metals. 1-25. En : Trace Methods in Health and Disease. Ed Kharasch, N. Raven Press. New York.

- DRUGEON, H. et COURTIEU, A.L. (1978) Comparison de deux méthodes d'antibiogramme : diffusion en gélose et méthode automatisée par l'appareil ABAC. II Etude sur 399 souches isolées en milieu hospitalier. Ann. Biol. Clin. 36, 523-526.
- DUNCAN, N.H., HINTOW, N.A., PENNER, J.L. and DUNCAN, I. B.R. (1976) Preparation of Typing Antisera Specific for O Antigens of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 4, (2), 124-128.
- DUTKA, B.J. and KWAN, K.K. (1977) Confirmation of the Single-Step Membrane Filtration Procedure for Estimating Pseudomonas aeruginosa Densities in Water. Appl. Environ. Microbiol. 33, (2), 261-269.
- DUVAL, J. (1981) Evolution of Resistance Patterns. 75-90. En : Future Antibiotherapy Antibiotic Research. Ed Ninet, L., Bost, P.E., Bouanchaud, D.H. and Florent, J. Academic Press. London.
- EAGON, R.G. (1974) Ultrastructure of the Cell Envelope of Pseudomonas aeruginosa : Electron Microscopic and Chemical Observations. J. Infect. Dis. 130, 565-580.
- EAGON, R.G., STINNETT, J.D. and GILLELAND, H.E. (1975) Ultrastructure of Pseudomonas aeruginosa as related to resistance. 109-144. En : Resistance of Pseudomonas aeruginosa. Ed Brown, M.R.W. John Willey and Sons. London.

- EDMONDS, P., SUSKIN, R., MacMILLAN, B. and HOLDER, I.
(1972) Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in a Burns Hospital : Evaluation of Serological, Bacteriophage, and Pyocin Typing Methods. Appl. Microbiol. 24,(2), 213-218.
- EHRlich, H.L. (1978) How Microbes Cope with Heavy Metals, Arsenic and Antimony in Their Environment. 381-408.
En : Microbial Live in Extreme Environments. Ed Kushner, D.J. Academic Press. London.
- EICKHOFF, T.C. (1978) Clinical Aspects of Hospital Infection. 3-8. En : Proven and Unproven Methods in Hospital Infection Control. Proc. of an Int. Workshop at Baiersbronn. 24-25. Germany. Ed Daschner, F. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- ELWELL, L.P. and FALKOW, S. (1977) New Antibiotic-Resistant Plasmids in Gonorrhoea Bacteria Open an Ominous Chapter in the History of Disease: Genetic Loose Change. Science 17, 8-11.
- ENOMOTO, N. and UCHIDA, Y. (1973) Cadmium and Other Heavy Metal Contents in Marine Products from Ariake Sea and in Canned Foods on the Market. Agri. Bull. Saga Univ. 35, 69-75.
- FARMER III, J.J. and HERMAN, L.G. (1969) Epidemiological Fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa by the Production and Sensitivity to Pyocin and Bacteriophage. Appl. Microbiol. 18, (5), 760-765.

- FARMER III, J.J. and HERMAN, L.I.G. (1974) Pyocin Typing of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 130 suppl., 543-546.
- FAVERO, M.S., CARSON, L.A., BOND, W.W. and PETERSEN, N.J. (1971) Pseudomonas aeruginosa : Growth in Distilled Water from Hospitals. Science 173, 836-838.
- FAYDI, V.D. and NABBUT, N.H. (1978) Isolation, Purification and Characterization of a Pyocin. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 129a, 313-322.
- FISHER, M.W., DEVLIN, H.B. and GNABASIK, F.J. (1969) New Immunotype Schema for Pseudomonas aeruginosa Based on Protective Antigens. J. Bacteriol. 98, (2), 835-836.
- FITZGERALD, G.P. and DER VARTANIAN, M.E. (1969) Pseudomonas aeruginosa from the Evaluation of Swimming Pool Chlorination and Algicides. Appl. Microbiol. 17, (3), 415-421.
- FONTAINE, T.D. and HOADLEY, A.W. (1976) Transferable Drug Resistance Associated with Coliforms Isolated from Hospital and Domestic Sewage. Hlth. Lab. Sci. 13, (4), 238-245.
- FOSTER, T.J. and KLECKNER, N. (1980) Properties of Drug Resistance Transposons, with Particular Reference to Tn10. 207-224. In : Plasmids and Transposons. Environmental Effects and Maintenance Mechanisms. Ed Stuttard, C. and Rozee, K.R. Academic Press. New York.

- FOZ, A., ROY, C. y LLOREN, J. (1962) Estudio microbiológico de la orina. Aspectos bacteriológicos. Técnicas. 24-25. X Jornadas de la asociación nacional de médicos especialistas en análisis clínicos. Palma de Mallorca.
- FRANKLIN, T.J. (1977) Bacterial Resistance to Antibiotics. 137-154. En : Pharmaceutical Microbiology. Ed Hugo, W. B. and Russell, A.D. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- FURTH, A. (1979) The β -lactamases of Pseudomonas aeruginosa. 403-428. En : β -lactamases. Ed Hamilton-Miller, J.M.T. and Smith, J.T. Academic Press. London.
- GARROD, L.P., LAMBERT, H.P. and O'GRADY, F. (1973) Antibiotic and Chemotherapy. Churchill Livingston. Edimburg.
- GELBART, S.M., REINHARD, G.F. and GREENLEE, H.B. (1973) Multiplication of Nosocomial Pathogens in Intravenous Feeding Solutions. Appl. Microbiol. 26,(6), 874-879.
- GELBART, S.M., REINHARD, G.F. and GREENLEE, H.B. (1976) Pseudomonas cepacia Strains Isolated from Water Reservoirs of Unheated Nebulizers. J. Clin. Microbiol. 3, (1), 62-66.
- GERBER, G.B., LEONARD, A. and JACQUET, P. (1980) Toxicity, Mutagenicity and Teratogenicity of Lead. Mut. Res. 76, 115-141.

- GERRAD, T.L., TELFORD, J.N. and WILLIAMS, H.H. (1974) Detection of Selenium Deposits in Escherichia coli by Electron Microscopy. *J. Bacteriol.* 119,(3), 1057-1060.
- GIBBS, D.L. and THORNSBERRY, C. (1979) Susceptibility of Gram-negative Bacteria to β -lactam Antibiotics and Rapid Characterization of β -lactamase Activity. *Curr. Microbiol.* 2,(4), 239-244.
- GILARDI, G.L. (1971) Characterization of Pseudomonas Species Isolated from Clinical Specimens. *Appl. Microbiol.* 21,(3), 414-419.
- GILARDI, G.L. (1976) Identification of Non-Fermentative Gram-negative Bacteria. Comunicación personal.1-8.
- GILLELAND, H.E., STINNETT, J.D. and EAGON, R.G. (1974) Ultrastructural and Chemical Alteration of the Cell Envelope of Pseudomonas aeruginosa Associated with Resistance to Ethylenediaminetetraacetate Resulting from Growth in a Mg^{2+} Difficult Medium. *J. Bacteriol.* 117, (1), 302-311.
- GILLELAND, H.E., STINNETT, J.D., ROTH, I.L. and EAGON, R. G. (1973) Freeze-etch Study of Pseudomonas aeruginosa: Localization within the Cell Wall on an Ethylenediaminetetraacetate-extractable Component. *J. Bacteriol.* 113, (1), 417-432.
- GILLIES, R.R. and GOVAN, J.R.W. (1966) Typing of Pseudomonas pyocyanea by Pyocine Production. *J. Path. Bact.* 91, 339-345.

- GOMEZ LUS, R. y RUBIO CALVO, M.C. (1977) Bacteriocinas en Pseudomonas aeruginosa : aplicaciones ecológicas y epidemiológicas. Aspectos actuales de las relaciones huésped-parásito e intermicrobianas. En : Monografías de la S.E.M. Nº2. 133-168.
- GOMEZ LUS, R., RUBIO CALVO, M.C., GOMEZ LOPEZ, L., MUNIE-SA CUENCA, M.P., DURAN SANCHEZ, E., BERNAL PEREZ, M., MARTINEZ MOLINA, A., CLAVELL PARRILLA, A., GARCIA GARCIA, C., LARRAD MUR, L., LASIERRA DIAZ, M.P., CISTERNA CANCER, R. y PETIT COLELL, A. (1977) Evolución de la resistencia bacteriana a fosfomicina. Estudio comparativo con aminoglicósidos. Farmaes IV, (134), 129-143.
- GOMEZ LUS, R., RUBIO CALVO, M.C., LASIERRA, M.P. y TOMAS ALONSO, J. (1981) Dinámica de las poblaciones hospitalarias de Pseudomonas aeruginosa y Serratia marcescens. Resúmenes de comunicaciones y ponencias. 409. VIII Congreso Nacional de Microbiología. Madrid 1981.
- GOVAN, J.R.W. (1978) Pyocin Typing of Pseudomonas aeruginosa. 61-92. En : Methods in Microbiology. Ed Bergan, T. and Norris, J.R. Academic Press. London.
- GOVAN, J.R.W. (1981) The Pseudomonas and Clinical Microbiology : a Comming of Age. Soc. Gen. Microbiol.Q.8, (2), 145.
- GRABOW, W.O.K., MIDDENDORFF, I.G. and PROZESKY, O.W. (1973) Survival in Maturation Pounds of Coliform Bacteria with Transferable Drug Resistance. Water Res. 7, 1589-1597.

- GRABOW, W.O.K., PROZESKY, O.W. and BURGER, I.S. (1975) Behaviour in River and Dam of Coliform Bacteria with Transferable or non-Transferable Drug Resistance. *Water Res.* 9, 777-782.
- GRABOW, W.O.K. and VAN ZYL, M. (1976) Behaviour in Conventional Sewage Purification Processes of Coliform Bacteria with Transferable or non-Transferable Drug-Resistance. *Water Res.* 10, 717-723.
- GRAY, L.D. and KREGER, A.S. (1975) Rabbit Corneal Damage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Infect. Immunol.* 12, (2), 419-432.
- GREEN, S.K., SCHROTH, M.N., CHO, J.J., KOMINOS, S.D. and VITANZA-JACK, V.B. (1974) Agricultural Plants and Soil as Reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 28, (6), 987-991.
- HABS, I. (1957) Untersuchungen über die O antigene von *Pseudomonas aeruginosa*. *Z. Hyg. Infektionskr.* 144, 218-228.
- HAMMOND, S.M. and LAMBERT, P.A. (1978) Antibiotic and Antimicrobial Action. Ed Arnold, E. Limited. London.
- HARRIGAN, W.F. y McCANCE, M.E. (1979) Métodos de laboratorio en Microbiología de alimentos y productos lácteos. Academia. León.

- HART, A., MOORE, K.E. and TALL, D. (1976) A Comparison of the British Pharmacopœia (1973) and United States Pharmacopeia (1975). Methods for Detecting Pseudomonads. J. Appl. Bacteriol. 41, 235-242.
- HART, A. and RATANSI, M.B. (1975) The Isolation and Enumeration of Pseudomonas aeruginosa from Oil Creams J. Pharm. Pharmac. 27, 142-144.
- HEDBERG, M. (1969) Acetamide Agar Medium Selective for Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 17, (3), 481.
- HEDGES, R.W. and BAUMBERG, S. (1973) Resistance to Arsenic Compounds Conferred by a Plasmid Transmissible between Strains of Escherichia coli. J. Bacteriol. 115, (1), 459-460.
- HEILMANN, H.D. (1972) On the Peptidoglycan of the Cell Walls of Pseudomonas aeruginosa. Environ. J. Biochem. 31, 456-463.
- HELINSKI, D.R. (1973) Plasmid Determined Resistance to Antibiotics : Molecular Properties of R Factors. Ann. Rev. Microbiol. 27, 437-470.
- HELINSKI, D.R. (1979) Bacterial Plasmids : Autonomons Replication and Vehicles for Gene Cloning. CRC Critical Reviews in Biochemistry 7, (1), 83-101.
- HIGGINS, I.J. and BURNS, R.G. (1975) The Chemistry and Microbiology of Pollution. 189-210. Academic Press. London.

- HIGHSMITH, A.K. and ABSHIRE, R.L. (1975) Evaluation of a Most-Probable Number Technique for the Enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 30, (4), 596-599.
- HIRSCH, J.I., CANADA, A.T. and RANDALL, E.L. (1969) Microbial Contamination of Oral Liquid Medications. Amer. J. Hosp. Pharm. 26, 625-629.
- HOADLEY, A.W. (1977) Pseudomonas aeruginosa in Surface Waters. 31-58. En : Pseudomonas aeruginosa : Ecological Aspects and Patient Colonization. Ed Young, V.M. Raven Press. New York.
- HOFFLER, D. (1975) Terapeutica antibiótica. Med. Klin. Nr162, 31-69.
- HØIBY, N. (1979) Immunity-Humoral Response. 157-190. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- HOLDER, I.A. (1977) Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in a Burns Hospital. En : Pseudomonas aeruginosa : Ecological Aspects and Patient Colonization. Ed Young, V.M. Raven Press. New York. 77-96.
- HOLLOWAY, B.W. (1955) Genetic Recombination in Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. 13, 572-581.
- HOLLOWAY, B.W. (1975) Genetic Organization of Pseudomonas. En : Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.

- HOLLOWAY, B.W. (1979) Role of Formal Genetics in Medical Microbiology. 9-40. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestation of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- HOLLOWAY, B.W., CROWTHER, C., GODFREY, A., HAAS, D., KRISHNAPILLAI, V., MORGAN, A. and WATSON, J. (1977) Plasmid-Chromosome Interactions in Pseudomonas aeruginosa. 77-88. En : Plasmids, Medical and Theoretical Aspects. Ed Mitsuhashi, S., Rosival, L. and Krcméry, V. Avicenum, Cezchoslovak Medical Press. Prague. Springer Verlag. Berlin.
- HOLLOWAY, B.W., CHANDLER, P., KRISHNAPILLAI, V., MILLS, B., ROSSITER, H., STANISICH, V. and WATSON, J. (1975) Genetic Basis of Drug Resistance in Pseudomonas aeruginosa. 271-286. En : Drug-Inactivating Enzymes and Antibiotic Resistance. Ed Mitsuhashi, S., Rosival, L. and Krcméry, V. Avicenum. Czechoslovak Medical Press. Prague. Springer Verlag. Berlin.
- HOLLOWAY, B.W. and KRISHNAPILLAI, V. (1975) Bacteriophages and Bacteriocins. 99-132. En : Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.
- HOLLOWAY, B.W., KRISHNAPILLAI, V. and MORGAN, A.F. (1979) Chromosomal Genetics of Pseudomonas. Microbiol. Rev. 43, (1), 73-102.

- HOLMES, C.J. and ALLWOOD, M.C. (1979) The Microbial Contamination of Intravenous Infusions During Clinical Use. *J. Appl. Microbiol.* 46, (2), 247-267.
- HOMMA, J.Y. (1971) Recent Investigations on Pseudomonas aeruginosa. *Jpn.J. Exp. Med.* 41, (5), 387-400.
- HOMMA, J.Y. (1974) Serological Typing of Pseudomonas aeruginosa and Several Points to Be Considered. *Jpn. J. Exp. Med.* 44, (1), 1-12.
- HOMMA, J.Y. (1976) A New Schema and Live-Cell Slide Agglutination procedure for the Intrasub-Specific, Serologic Classification of Pseudomonas aeruginosa. Report of the Serotype Committee of the Japan Pseudomonas aeruginosa Society. *J. Exp. Med.* 46, 329-336.
- HOMMA, J.Y. (1980) Roles of Exoenzymes and Exotoxin in the Pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa and Development of a New Vaccine. *Jpn. J. Exp. Med.* 50, (3), 149-165.
- HOMMA, J.Y., GHODA, A., GOTO, S., JO, K., KATO, I., KODAMA, H., KOSAKAI, N., KONO, M., SHIONOYA, H., TERADA, Y., TOMIYAMA, T. and YABUUCHI, E. (1979) Proposal of an International Standart for the Intraespecific Serologic Classification of Pseudomonas aeruginosa. *Jpn. J. Exp. Med.* 49, (1), 88-94.
- HOMMA, J.Y., HIRAO, Y., SAKU, K., TERADA, Y. and SIGIYAMA, J. (1977) Serological Typing of Pseudomonas aeruginosa Comparison of Various Antigenic Schema. *Jpn. J. Exp. Med.* 47, (3), 195-201.

- HOMMA, J.Y., SHIONOYA, H., YAMADA, H. and KAWABE, Y.
(1971) Production of Antibody against Pseudomonas aeruginosa and its Serological Typing. Jpn. J. Exp. Med. 41, (1), 89-94.
- HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A. and WESTERDAAL, N.A.C. (1979)
In Vitro Susceptibility of Pseudomonas to four β -lactamantibiotics (Ampicillin, Cephalotin, Carbenicillin, Piperacin), to four Aminoglycosides (Kanamycin, Amikacin, Gentamycin, Tobramycin) and to Colimycin. Chemother. 25, 48-53.
- HORIKOSHI, T., NAKAHIMA, A. and SAKAGUCHI, T. (1979)
Uptake of Uranium by Chlorella regularis. Agric. Biol. Chem. 43, (3), 617-623.
- HUANG, N.N. and DOGGETT, R.G. (1979) Antibiotic Therapy of Pseudomonas Infection in Patients with Cystic Fibrosis. 411-444. En: Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- HUGH, R. and GILARDI, G.L. (1974) Pseudomonas. 250-269.
En: Manual of Clinical Microbiology. Ed Lennette, E.H., Spaulding, E.H. and Truant, J.P. A.S.M. Washington D.C.
- HUGH, R. and GILARDI, G.L. (1980) Pseudomonas. 288-317.
En: Manual of Clinical Microbiology. Ed Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. A.S.M. Washinton D.C.

- HUGH, R, and LEIFSON, E. (1953) The Taxonomic Significance of Fermentative Versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram-negative Bacteria. J. Bacteriol. 66, 24-26. En: Manual de Microbiología. Medios de cultivo deshidratados. Bases de medios de cultivo. Otros productos para microbiología. Ed Merck, E. Darmstadt. R.F. de Alemania.
- HUMMEL, R.P., MISKELL, P.W., and ALTEMEIER, W.A. (1977) Antibiotic Resistance Transfer from non-Pathogenic to Pathogenic Bacteria. Surg. 82, (3), 382-383.
- IKEDA, K. and EGAMI, F. (1973) Lippopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa with Especial Reference to Pyocin R Receptor Activity. J. Gen Appl. Microbiol. 19, 115-128.
- IKEDA, K. and NISHI, Y. (1973) Interaction between PyocinR and Pyocin R Receptor. J. Gen. Appl. Microbiol. 19, 209-219.
- ISENBERG, H.D. and BERKMAN, J.I. (1971) The Role of Drug-Resistant and Drug-Selected Bacteria in Nosocomial Disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 182, 52-58.
- IYOBE, S. and MITSUHASHI, S. (1977a) Genetics of R Factors. 49-71. En: R Factor Drug Resistance Plasmid. Ed Mitsuhashi, S. University Park Press. Baltimore.
- IYOBE, S. and MITSUHASHI, S. (1977b). R Factors in Pseudomonas aeruginosa. 272-276. En: R Factor Drug Resistance Plasmid. Ed Mitsuhashi, S. University Park Press. Baltimore.

IZAKI, K., TASHIRO, Y. and FUNABA, T. (1974) Mechanism of mercuric Chloride Resistance an Microooganism. III Purification and Properties of a Mercuric Ion Reducing Enzyme from Escherichia coli Bearing R Factor. J. Biochem. 75, 591-599.

JACOB, F. et WOLLMAN, E.L. (1958) Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. C.R. Acad. Sci. 247, 154-156.

JACOBY, G.A. (1974) Properties of R Plasmids Determining Gentamycin Resistance by Acetylation in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 6, 239-252.

JACOBY, G.A. (1975) Properties of R Plasmids in Pseudomonas aeruginosa. 36-42. En Microbiology 1974. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.

JACOBY, G.A. (1977) Clasification of Plasmids in Pseudomonas aeruginosa. 119-126. En : Microbiology 1977. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.

JACOBY, G.A. (1979) Plasmids of Pseudomonas aeruginosa. 272-310. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.

JACOBY, G.A. (1980) Plasmid Determined Resistance to Carbenicilin and Gentamycin in Pseudomonas aeruginosa. 83-93. En : Plasmids and Transposons. Environmental Effects and Maintenance Mechanisms. Ed Stuttard, C. and Rozee, K.R. Academic Press. New York.

- JACOBY, G.A. (1981) Varieties of Pseudomonas Plasmids. Soc. Gen. Microbiol. Q. S24, 8,(2),88.
- JACOBY, G.A. and MATTHEW, M. (1979) The Distribution of β -lactamase Genes on Plasmids Found in Pseudomonas. Plasmid 2, 41-47.
- JARREL, K. and KROPINSKI, A.M. (1978) The Chemical Composition of the Lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa Strain PAO and a Spontaneously Derived Rought Mutant. Microbios 19, 103-116.
- JOLY, B. et CLUZEL, R. (1975) Rôle des métaux lourds et de leurs dérivés dans la selection de bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques. Ann. Microbiol. (Inst.Pasteur) 126B, 51-61.
- JOLY, B. et CLUZEL, R. (1978) Etude de la résistance au mercure d'Entérobactéries d'origine hospitalière : aspects génétique et épidémiologique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 129A, 167-176.
- JOLY, B., CLUZEL, R., HENRI, Ph. et BARJOT, J. (1976) La résistance de Pseudomonas aux antibiotiques et aux métaux lourds : CMI et transferts. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 127B, 57-68.
- JOLY, B.H., CLUZEL, R.A., PETIT, S.M. and CHANAL, M.E. (1979) Transferable Sodium Arsenate Resistance in Enterobacteriaceae. Curr. Microbiol. 2, 151-155.

- JONES, L.F., PINTO, B.V., THOMAS, E.T. and FARMER III, J. J. (1973) Simplified Method for Producing Pyocins from Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 26,(1),120-121.
- JONES, R.J., ROE, E.A. and GUPTA, J.L. (1978) Low Mortality in Burned Patients in a Pseudomonas Vaccine Trial. Lancet 2, 401-403.
- JONES, L.F., ZAKANYCZ, J. P., THOMAS, E.T. and FARMER III, J.J. (1974) Pyocin Typing of Pseudomonas aeruginosa : a Simplified Method. Appl. Microbiol. 27, (2),400-406.
- KAGEYAMA, M. (1964) Studies of a Pyocin. J. Biochem. 55, (1), 49-53.
- KAGEYAMA, M. (1970) Genetic Mapping of a Bacteriocinogenetic Factor in Pseudomonas aeruginosa. I Mapping of Pyocin R2 Factor by Conjugation. J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 523-530.
- KAHN, N.C. and SEN, S.P. (1967) Genetic Transformation in Pseudomonas. J. Gen. Microbiol. 49, 201-209.
- KELCH, W.J. and LEE, J.S. (1978) Antibiotic Resistance Patterns of Gram-negative Bacteria Isolated from Environmental Sources. Appl. Environ. Microbiol. 36,(3),450-456.
- KELLY, M.T. and MATSEN, J.M. (1976) In Vitro Activity, Synergism and Testing Parameters of Amikacin with Comparisons to Other Aminoglycoside Antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 9, (3), 440-447.

- KELLY, D.P., NORRIS, P.R. and BRIERLEY, C.L. (1979) Microbiology Methods for the Extraction and Recovery of Metals. 263-308. En: Microbial Technology: Current States, Future Prospects. Symposium 29. Ed Bull, P., Elwood, R. and Ratledge, A. Cambridge University Press. Cambridge.
- KENWARD, M.A., BROWN, M.R.W. and FRYER, J.J. (1979) The Influence of Calcium or Magnese on the Resistance to EDTA, Polimyxin B or Cold Shock, and the Composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in Glucose -or Magnesium-Depleted Batch Cultures. J. Appl. Bacteriol. 47, 489-503.
- KLYHN, K.M. and GORILL, R.H. (1967) Studies on the Virulence of Hospitals Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 47, 227-235.
- KODAMA, H. and ISHIMOTO, M. (1976) Comparison of Test Typing Sera for *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 46, (6), 383-391.
- KODITSCHKEK, L.K. and GUYRE, P. (1974) Antimicrobial-Resistant Coliforms in New York Bight. Mar. Pollut. Bull. 2, (5), 71-74.
- KHOLER, R.B. and WHITE, A. (1979) Miscellaneous *Pseudomonas* Disease. 446-487. En: *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.

- KOMINOS, S.D., COPELAND, Ch.E. and DELENKO, C.A. (1977) Pseudomonas aeruginosa from Vegetables, Salads, and Other Foods Served to Patients with Burns. 59-75. En : Pseudomonas aeruginosa: Ecological Aspects and Patient Colonization. Ed Young, V. M. Raven Press. New York.
- KOMINOS, S.D., COPELAND, Ch. E., GROSIK, K.B. and PROSTIC, B. (1972a) Introduction of Pseudomonas aeruginosa into a Hospital Via Vegetables. Appl. Microbiol. 24, (4), 567-570.
- KOMINOS, S.D., COPELAND, Ch.E., and GROSIK, K.B. (1972) Mode of Transformation of Pseudomonas aeruginosa in a Burn Unit and Intensive Care Unit in a General Hospital. Appl. Microbiol. 23, (2), 309-312.
- KOMURA, I., FUNABA, T. and IZAKI, K. (1971) Mechanism of mercuric Chloride Resistans in Microorganism. II NADPH-Dependent Reduction of Mercuric Chloride Vaporization Resistant Strain of Escherichia coli. J. Biochem. 70, 895-901.
- KOMURA, I, and IZAKI, K. (1971) Mechanism of Mercuric Chloride Resistance in Microorganism. I Vaporization of a Mercury Compound from Mercuric Chloride by Multiple Drug Resistant Strain of Escherichia coli. J. Biochem. 70, 885-893.
- KOMURA, I., IZAKI, K. and TAKHASHI, H. (1970) Vaporization of Inorganic Mercury by Cell-Free Extracts of Drug Resistant Escherichia coli. Agr. Biol. Chem. 34, (3), 480-482.

- KONDO, I., ISHIKAWA, T. and NAKAHARA, H. (1974) Mercury and Cadmium Resistance Mediated by the Penicillinase Plasmid in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 117, (1), 1-7.
- KONDO, I., ISHIKAWA, T. and NAKAHARA, H. (1976) Staphylococci and Staphylococcal Diseases. Heavy Metal Resistance in Staphylococcus aureus. Znt. Back. Parasitenk. Infek. Hyg. I. A. Suppl 5, 217-233.
- KONISKY, J. (1978) The Bacteriocins. 71-136. En: The Bacteria. A treatise on Structure and Function. Ed Gunsalus, I.C. Vol VI: Bacterial Diversity. Ed Ornston L.N. and Sokatch, J.R. Academic Press. New York.
- KRISHNAPILLAI, V. (1979) DNA Insertion Mutagenesis in a Pseudomonas aeruginosa R Plasmid. Plasmid 2, 237-246.
- KURUP, V.P., SHETH, N.K. and PATH, M.R.C. (1976) Immunotyping and Pyocin Typing of Pseudomonas aeruginosa from Clinical Speciments. A. J. C. P. 65, (4), 557-563.
- KURYLOWICZ, W., CHOJNOWSKI, W., RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K. and KOWSZYK-GINDIFER, Z. (1976) Antibiotics a Critical Review. Polish Medical Publishers. Varsovia.
- KUSAMA; H. (1978) Serological Clasification of Pseudomonas aeruginosa by a Slide Agglutination Test. J. Clin. Microbiol. 8, (2), 181-188.

- LABIA, R., GUINOIE, M., MASSON, J.M., PHILIPPON, A. and BARTHELEMY, M. (1977) β -lactamases Produced by a Pseudomonas aeruginosa Strain Highly Resistant to Carbenicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 11, (5), 785-790.
- LANYI, B. (1966/67) Serological Properties of Pseudomonas aeruginosa. I Group-Specific Somatic Antigens. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 13, 295-318.
- LANYI, B. and BERGAN, T. (1978) Serological Characterization of Pseudomonas aeruginosa. 94-168. En: Methods in Microbiology, Vol 10. Ed Bergan, T and Norris, J.R. Academic Press. London.
- LAUB-KUPERSZTEJN, R., THOMAS, J. et POHL, P. (1974) Résistance des Enterobactéries au mercure et aux antibiotiques. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125B, 501-508.
- LECLERC, H., MIZON, F., BONIFACE, B. et BONIFACE, M. (1977) Eau et bactéries résistantes aux antibiotiques : étude écologique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 128B, (2), 253-260.
- LEDERBERG, J. and TATUM, E.L. (1946) Novel Genotypes in Mixed Cultures of Biochemical Mutants of Bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 113.
- LE GOFFIC, F., CAPMAU, M.L., TANGY, F. and BAILLARGE, M. (1979) Mechanism of action of Aminoglycoside Antibiotics. Binding Studies of Tobramycin and its 6'-N-Acetyl Derivate to the Bacterial Ribosoma and its Sununits. Env. J. Biochem. 102, 73-81.

- LEONARD, A. and LAUWERYS, R.R. (1980) Carcinogenity, Tera-
togenicity and Mutagenicity of Arsenic. *Mut. Res.* 75,
49-62.
- LESTER, J.N., FERRY, R. and DADD, A.H. (1979) The Influen-
ce of Heavy Metals on a Mixed Bacterial Population of
Sewage Origin in the Chemostat. *Water Res.* 13, 1055-63.
- LEVIN, M.A. and CABELLI, V.J. (1972) Membrane Filter Tech-
nique for Enumeration of Pseudomonas aeruginosa. *Appl.*
Microbiol. 24, (6), 864-870.
- LEVINSON, M.E. (1977) Factors Influencing Colonization of
the Gastrointestinal Tract with Pseudomonas aeruginosa.
97-110. En : Pseudomonas aeruginosa : Ecological Aspects
and Patient Colonization. Ed Young, V.M. Raven Press.
New York.
- LIEBERMAN, M.M. (1978) Pseudomonas Ribosomal Vaccines :
Preparation, Properties and Immunogenicity. *Infect. Im-
munol.* 21, (1), 76-86.
- LINDAY, W.L. and NOVEL, W.A. (1978) Development of a
DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese and Copper.
Soil Sci. Soc. Amer. J. 42, (3), 421-428.
- LIU, P.V. (1957) Survey of Hemolysin Production among Spe-
cies of Pseudomonads. *J. Bacteriol.* 74, 718-727.
- LIU, P.V. (1961) Identification of Pathogenic Pseudomonads
by Extracelular Antigens. *J. Bacteriol.* 81, (1), 28-35.

- LIU, P. V. (1976) Biology of Pseudomonas aeruginosa. Hosp. Pract. 11, (1), 138-147.
- LIU, P.V. (1979) Toxins of Pseudomonas aeruginosa. 63-89. En : Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- LIVERMORE, D.M., WILLIAMS, R.J. and WILLIAMS, J.D. (1981) Comparison of the β -lactamase Stability and the in-Vitro Activity of Cefoperazone, Cefotaxime, Cefsulodin, Ceftazidime, Moxalactam and Ceftriaxone against Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob. Chemother. 8, 323-331.
- LOFROTH, G. and AMES, B.N. (1978) Mutagenicity of Inorganic Compounds in Salmonella typhimurium : Arsenic, Chromium and Selenium. Mut. Res. 53, 65-66.
- LOWBURY, E.J.L. (1975) Biological Importance of Pseudomonas aeruginosa : Medical Aspects. 37-65. En : Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.
- LOWBURY, E.J.L. and JONES, R.J. (1975) Treatment and Prophylaxis for Pseudomonas Infections. 237-270. En : Resistance of Pseudomonas aeruginosa. Ed Brown, M. R. W. John Willey and Sons. London.
- MAIQUEZ RICHART, J., BORRAS SALVADOR, R., LORENTE ORTUÑO, S. y FERRER GARCIA, A. (1977) Serotipificación de 250 cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas en H.C.Ll. de Valencia. Interés epidemiológico. Med.Españ. 76, 293-296.

- MANDELI, E.F. (1975) Contaminación marina por elementos traza. Conferencias 3º curso de captación FAO/SIDA sobre contaminación de las aguas en relación con la protección de los recursos vivos. Lima, Perú. Editado por O.N.U. para la agricultura y alimentación. Roma .
- MANDELI, E.F. (1978) Contaminación por metales pesados. Int. Workshop on Marine Pollut. in the Southeast Pacific. Santiago, Chile. PCSP/FAO/IOC/UNEP.
- MARCO LANATA, M.L., LOMBA FUENTES, E., AISA IRIARTE, M.C. y OLA AGUSTIN, M. (1975) Flora microbiana aislada en exudados de quemaduras en enfermos hospitalizados y su sensibilidad a los antibióticos. *Nedicamenta* 45, (319), 89-72.
- MARE, I.J. (1968) Incidence of R Factors among Gram-negative Bacteria in Drug-Free Human and Animal Communities. *Nature* 220, 1046-1047.
- MARKOWITZ, S.M., MACRINA, F.L. and Phibbs, P.V. (1980) Antimicrobial Susceptibility of Mucoid Pseudomonas aeruginosa and their Spontaneously Occurring non-Mucoid Derivates. *J. Antimicrob. Chemother.* 6, (2), 251-260.
- MARQUES, A.M., CONGREGADO, F. et SIMON-PUJOL, M.D. (1978) Activité des agents antimicrobiens sur Pseudomonas aeruginosa isolés des eaux. *Microbia* 4, (2), 43-55.
- MARQUES, A.M., CONGREGADO, F. and SIMON-PUJOL, M.D. (1979) Antibiotic and Heavy Metal Resistance of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Soils. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 347-350.

- MATSEN, J.M. and BARRY, A.L. (1974) Diffusion Test Procedures. 418-427. En: Manual of Clinical Microbiology. Ed Lennette, E.H., Spaulding, E.H. and Truant, J.P. A.S.M. Washington D.C.
- MEADOW, P. (1975) Wall and Membrane Structures in the Genus Pseudomonas. 67-98. En: Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M.H. John Willey and Sons. London.
- MEITERT, T. (1964) Contribution à l'étude de la structure antigénique des B. pyocyaniques (Pseudomonas aeruginosa). Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. 23, (3), 679-688.
- MELLY, M.A., MENG, H.C. and SCHAFFNER, W. (1975) Microbial Growth in Lipid Emulsions Used in Parenteral Nutrition. Arch. Surg. 110, 1479-1481.
- MICHEL-BRIAND, Y. (1977) Resistance extrachromosomique aux antibiotiques de la flore bactérienne intestinale. Nouv. Presse Méd. 6, (41), 3851-3855.
- MICHEL-BRIAND, Y., DUPONT, M.J. and PERRET, T. (1975) Action of Antibiotics on Pseudomonas aeruginosa. Results on 1123 Strains Isolated in 1972-73. Effects of Serotype and Location of Pathogen on Resistance. Biomed. Express. 23, (6), 218-225.
- MIDDLEBROOK, J.L. and DORLAND, R.B. (1977) Response of Cultured Mamalian Cells to the Exotoxins of Pseudomonas aeruginosa and Corynebacterium diphtheriae: Differential Cytotoxicity. Can. J. Microbiol. 23, 183-189.

- MILLS, B. and HOLLOWAY, B.W. (1977) Intrinsic Resistance to Aminoglycosides in Pseudomonas aeruginosa. 89-94. En : Plasmids Medical and Theoretical Aspects. Ed Mitsuhashi, S., Rosival, L. and Krcméry, V. Avicenum Czechoslovak Medical Press. Prague. Springer Verlag, Berlin.
- MIRELMAN, d. and NUCHAMOWITZ, Y. (1979) Biosintesis of Peptidoglycan in Pseudomonas aeruginosa. I The Incorporation of Peptidoglycan into the Cell Wall. Env. J. Biochem. 94, 541-548.
- MITSUHASHI, S. (1977a) Epidemiology of R Factors. 25-45. En : R Factor Drug Resistance Plasmid. Ed Mitsuhashi, S. University Park Press. Baltimore.
- MITSUHASHI, S. (1977b) Translocable Drug Resistance Determinants. 73-87. En : R Factor Drug Resistance Plasmid. Ed Mitsuhashi, S. University Park Press. Baltimore.
- MITSUHASHI, S., YAMAGISHI, S., SAWAI, T. and KAWABE, H. (1977) Biochemical Mechanisms of Plasmid-Mediated Resistance. 195-254. En : R Factor Drug Resistance Plasmid. Ed Mitsuhashi, S. University Park Press. Baltimore.
- MOODY, M.R. (1977) Effect of Acquisition on the Incidence of Pseudomonas aeruginosa in Hospitalized Patients. 111-132. En : Pseudomonas aeruginosa : Ecological Aspects and Patient Colonization. Ed Young, V.M. Raven Press.
- MORENO, G. y DE MAGALAES LOPES, C.A. (1974) Otite em crianças Aspectos bacteriológicos. Arg. Inst. Biol. 41, (4), 171-174.

- MORGAN, R.C., GUERRY, P. and COLWELL, R.R. (1976) Antibiotic Resistant Bacteria in Chesapeake Bay. *Chesapeake Sci.* 17, (3), 216-219.
- MORIHARA, K. (1964) Production of Elastase and Proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 88, (3), 745-754.
- MORRISON, S.M. (1978) Microbiology Standards for Waters. *J. Food Protect.* 41, (4), 304-308.
- MORSE, S.A., JONES, B.V. and LYSKO, P.G. (1980) Pyocin Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* Mechanism of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18, (3), 416-423.
- MOSS, R.B. and LEWISTON, N.J. (1980) Immune Complexes and Humoral Response to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 121, 23-29.
- NAKAHARA, H., ISHIKAWA, T., SARAI, Y., KONDO, I. and MITSUHASHI, S. (1977a) Frequency of Heavy-Metal Resistance in Bacteria from Inpatients in Japan. *Nature* 266, 165-167.
- NAKAHARA, H., ISHIKAWA, T., SARAI, Y., KONDO, I., KUZUKE, H. and SILVER, S. (1977b) Linkage of Mercury, Cadmium, and Arsenate and Drug Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, (4), 975-976.
- NAKAMURO, K., YOSHIKAWA, K., SAYATO, Y. and KURATA, H. (1978) Comparative Studies of Chromosomal Aberration and Mutagenicity of Trivalent and Hexavalent Chromium. *Mut. Res.* 58, 175-181.

- NELSON, J.D., BLAIR, W., BRICKMAN, F.E. and COLWELL, R.R. (1973) Biodegradation of Phenylmercuric Acetate by Mercury-Resistant Bacteria. *Appl. Microbiol.* 26, (3), 321-326.
- NELSON, J.D. and COLWELL, R.R. (1975) The Ecology of Mercury-Resistant Bacteria in Chesapeake Bay. *Microbial Ecol.* 1 (4), 191-218.
- NESTMAN, R., MATULA, T.I., DOUGLAS, G.R., BORA, K.C. and KOWBEL, D.J. (1979) Detection of the Mutagenic Activity of Lead Chromate Using a Battery of Microbial Test. *Mut. Res.* 66, 357-365.
- NICAS, T.I. and HANCOCK, R.E.W. (1980) Other Membrane Protein H1 of Pseudomonas aeruginosa: Involvement in Adaptive and Mutational Resistance to Ethylenediaminetetraacetate, Polimixin B, and Gentamicin. *J. Bacteriol.* 143, (2), 872-878.
- NOBLE, W.C. and SAVIN, J.A. (1966) Steroid Cream Contaminated with Pseudomonas aeruginosa. *Lancet* i, 347-349.
- NORD, C.E., WADSTROM, T. and WRETLIND, B. (1975) Antibiotic Sensitivity of Two Aeromonas and Nine Pseudomonas Species. *Med. Microbiol. Immunol.* 161, 89-97.
- NORRIS, P.R. and KELLI, D.P. (1977) Accumulation of Cadmium Cobalt by Saccharomyces cerevisiae. *Can. J. Microbiol.* 99, 317-324.

- NORRIS, P.R. and KELLI, D.P. (1979) Accumulation of Metals by Bacteria and Yeast. Development in Industrial Microbiol. 20, 27. Ed Society for Industrial Microbiology.
- NOVICK, R.P. (1980) Plasmids Sci. Amer. 243, (6), 102-115.
- NOVICK, R.P., CLOWES, R.C., COHEN, S.N., CURTIS III, R., DATTA, N. and FALKOW, S. (1976) Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids: A Proposal. Bacteriol Rev. 40, (1), 168-189.
- NOVICK, R.P. and ROTH, C. (1968) Plasmid-Linked Resistance to Inorganic Salts in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol 95, 1335-1342.
- NUGENT, M.E. and DATTA, N. (1980) Transposable Gentamicin Resistance in IncW Plasmids from Hammersmith Hospital. J. Gen. Microbiol. 121, 259-262.
- OGAWARA, H. (1981) Antibiotic Resistance in Pathogenic and Producing Bacteria, with Special Reference to β -lactam Antibiotics. Microbiol. Rev. 45, (4), 591-619.
- OHKAWA, I., KAGEYAMA, M. and EGAMI, F. (1973) Purification and Properties of Pyocin S2. J. Biochem. 73, 281-289.
- OHKAWA, I., MARUO, B. and KAGEYAMA, M. (1975) Preferential Inhibition of Lipid Synthesis by the Bacteriocin Pyocin S2. J. Biochem. 78, 213-223.

- OMS (1977) Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos. 28º Informe. Serie de informes técnicos 610. Ginebra.
- OMS (1978) Vigilancia para prevenir y combatir los riesgos sanitarios provocados por las Enterobacterias resistentes a los antibióticos. Serie de informes técnicos 624. Ginebra.
- OSMAN, M.A. (1965) Pyocin Typing of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Pathol. 18, 200-202.
- PALLERONI, N.J. (1975) General Properties and Taxonomy of the Genus Pseudomonas. 1-36. En: Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Richmond, M. H. John Willey and Sons. London.
- PARKER, M.T. (1978) Microbiological Facilities for the Surveillance and Control of the Spread of Infection in Hospitals. 35-41. En: Proven and Unproven Methods in Hospital Infection Control. Proc. Int. Workshop at Baiersbronn. Germany. Ed Daschner, F. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- PASH, J.H. (1974) Food and other Sources of Pathogenic Microorganisms in Hospital. A Review. J. Milk. Food Technol. 37, (10), 487-493.
- PENNINGTON, J.E. (1979) Immunotherapy of Pseudomonas aeruginosa Infection. 192-217. En: Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. New York.

- PETRILLI, F.L. and DE FLORA, S. (1977) Toxicity and Mutagenicity of Hexavalent Chromium on Salmonella typhimurium. Appl. Environ. Microbiol. 33, (4), 805-809.
- PICHINOTY, F., AZOULAY, E., COUCHOUD-BEAUMONT, P. LE MINOR, L., RIGANO, G., BIGLIADI-ROUVIER, J. et PIECHAUD, M. (1969) Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: Resultats. Ann. Inst. Pasteur. 116, 27.
- PINNEY, R.J. (1977) Pharmaceutical Significance of Plasmid-Mediated Mercury Resistance. J. Pharm. Pharmac. 29, 70p.
- PINNEY, R.J. (1978) Survival of Plasmid-Containing Strains of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in Phenylmercuric Nitrate and Thiomer-sal. J. Pharm. Pharmac. 30, 228-232.
- POCHON, J. et TARDIEUX, P. (1962) Techniques d'analyse en Microbiologie du sol. Editions de la Tourelle. St.Mandé. La Tourelle. France.
- POHL, P., GUYSELS, G., THOMAS, J., MOURY, J., CHASSEUR, M.L. et VAN ROBAEYS, G. (1977) Résistance aux antibiotiques et aux métaux et pouvoir colicinogène de la flore bactérienne des eaux. Med. Maladies Infect. 7, (7), 334-338.
- POHL, P., LAUB-KUPERSZTEIN, R., THOMAS, J., MOURY, J. et VAN ROBAEYS, G. (1974) Resistance au mercure et aux antibiotiques chez les Enterobacteries pathogenes. Med. Mal. Infect. 4, (11), 569-573.

- POHL, P. et THOMAS, J. (1977) Utilisation des antibiotiques en production animale et risques d'apparition des souches résistantes chez l'homme. Ann. Méd. Vét. 121, 249-255.
- PROPST, C. and LUBIN, L. (1979) Light-Mediated Changes in Pigmentation of Pseudomonas aeruginosa Cultures. J. Gen. Microbiol. 113 261-266.
- PRUIT, B.A. and LINDBERG, R.B. (1979) Pseudomonas aeruginosa Infections in Burn Patients. 339-366. En: Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.
- RAMOS CORMENZANA, A. (1979) Taxonomía Bacteriana. 85-98. Universidad de Granada.
- REBER, H., HEITZ, M. and VAN DEN BERGH, A. (1978) Pseudomonas Infections in Surgical and Medical Clinics. 27-29. En: Proven and Unproven Methods in Hospital Infection Control. Proc. Int. Workshop at Baiersbronn. Germany. Ed Daschner, F. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- REEVES, P. (1965) The Bacteriocins. Bacteriol. Rev. 29, (1), 24-45.
- REPARAZ, J. (1977) Evolución de la sensibilidad de Pseudomonas aeruginosa frente a fosfomicina, carbenicilina, gentamicina, tobramicina y colistina. Farmaes IV, (134), 170-174.

- RICHARDS, R.M.E. (1975) In Vitro Erradication of Pseudomonas aeruginosa. 271-323. En: Resistance of Pseudomonas aeruginosa. Ed Brown, M.R.W. John Willey and Sons. London.
- RICHMOND, M.H. (1975a) R-Factors in Man and his Environment. 27-34. En: Microbiology 1974. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.
- RICHMOND, M.H. (1975b) Antibiotic Inactivation and its Genetic Basis. 1-34. En: Resistance of Pseudomonas aeruginosa. Ed Brown, M.R.W. John Willey and Sons. London.
- RINGE, L.M. and DRAKE, C.H. (1952) A Study of the Incidence of Pseudomonas aeruginosa from Various Natural Sources. J. Bacteriol. 64, 841-845.
- ROBERTS, F.J. (1980) A Review of Positive Blood Cultures: Identification and Source of Microorganisms and Patterns of Sensitivity to Antibiotics. Rev. Infect. Dis. 2, (3), 329-339.
- ROBERTS, N.A., GRAY, G.W. and WILKINSON, S.G. (1970) The Bactericidal Action of Ethylenediaminetetra-acetic Acid on Pseudomonas aeruginosa. Microbios 2, (7-8), 189-208.
- RODRIGUEZ, V. and BODEY, G.P. (1979) Epidemiology, Clinical Manifestations, and Treatment in Cancer Patients. 368-409. En: Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.

- ROYLE, P.L., MATSUMOTO, H. and HOLLOWAY, B.W. (1981) Genetic Circularity of Pseudomonas aeruginosa PAO Chromosome. *J. Bacteriol* 145, (1), 145-155.
- SAKAGUCHI, T., HORIKOSHI, T. and NAKAJIMA, A. (1978) Uptake of Uranium from Seawater by Microalgae. *J. Ferment. Technol.* 56, (6), 561-565.
- SANCHEZ-BUENAVENTURA, J., BORRAS SALVADOR, R. y GARCIA SABATER, J. (1972) Propiedades biológicas, significación clínica y sensibilidad "in vitro" a los antibióticos de la Pseudomonas aeruginosa. *Med. Españ.* 67, 129-135.
- SANDELL, E.B. (1959) Chromium. 388-392. En: *Colorimetric Metal Analysis*. Ed Intersciences Publishers 3. New York.
- SANDVICK, O. (1960) Serological Comparison between Stains of Pseudomonas aeruginosa from Human and Animal Sources. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 48, 56-60.
- SAXENA, J. and HOWARD, P.H. (1977) Environmental Transformation of Alkylated and Inorganic Forms of Certain Metals. 185-226. En: *Advances in Applied Microbiology*, Vol 21. Ed Perlman, D. Academic Press. New York.
- SCHABERG, D.R., TOMPKINS, L.S., RUBENS, C. and FALKOW, S. (1980) R-Plasmids and Nosocomial Infection. 43-56. En: *Plasmids and Transposons. Environmental Effects and Maintenance Mechanisms*. Ed Stuttard, C. and Rozee, K. R. Academic Press. New York.

- SCHINDLER, P.R., METZ, H. and HELLWING, R. (1978) Pseudomonas aeruginosa in Swimming Pool Waters. Zbl.Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B167, 462-469.
- SCHOTTEL, J., MANDAL, A., TOTH, K., CLARK, D. and SILVER, S. (1974a) Mercury and Mercurial Resistance Determined by Plasmids in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Proc. of the Int. Conf. on Transport of Persistent Chemicals in Aquatic Ecosystems. II 65-73. Natl. Res. Com. of Canada. Ottawa.
- SCHOTTEL, J., MANDAL, A., CLARK, D. and SILVER, S. (1974b) Volatilisation of Mercury Organomercurials Determined by Inducible R-Factor Systems in Enteric Bacteria. Nature 251, 335-337.
- SCHROTH, M.N., CHO, J.J., GREEN, S.K. and KOMINOS, S.D. (1977) Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in Agricultural Areas. 1-29. En : Pseudomonas aeruginosa : Ecological Aspects and Patient Colonization. Ed Young, V. M. Raven Press. New York.
- SCHWARTZ, D. (1977) Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion Médecine-Sciences. Paris.
- SEALE, T.W., THIRKILL, H., TARPAY, M., FLUX, M. and RENNERT, O.M. (1979) Serotypes and Antibiotic Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Isolates from Single Sputa of Cystic Fibrosis Patients. J. Clin Microbiol. 9, (1), 72-78.

- SEIDLER, R.J., ALLEN, D.A., LOCKMAN, H., COLWELL, R.R. JOSEPH, S.W. and DAILY, O.P. (1980) Isolation, Enumeration and Characterization of Aeromonas from Polluted Waters Encountered in diving Operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, (5), 1010-1018.
- SEYFRIED, P.L. and FRASER, D.J. (1980) Persistence of Pseudomonas aeruginosa in Chlorinated Swimming Pools. *Can. J. Microbiol.* 26, (3), 350-355.
- SHERRIS, J.C. and WASHINGTON II, J.A. (1980) Laboratory Test in Chemotherapy. General Considerations. 446-452. *En: Manual of Clinical Microbiology*. Ed Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. A.S.M. Washington D.C.
- SHIMADA, K. (1978) Removal of Hexavalent Chromium by Chromium-Resistant Bacteria. Scientific Reports of the Research Project "Environment Cleaning by Microorganisms 1974-1977". 379-382. Supported by the Ministry of Education. Japan.
- SHIMADA, K. (1979) Effects of Sixvalent Chromium on Growth and Enzyme Production of Chromium-Resistant Bacteria. US-Japan-Intersociety Microbiology Congress.
- SHOOTER, R.A., FAIERS, M.C., COOKE, E.M., BREADEN, A.L., and O'FARREL, S.M. (1971) Isolation of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella from Food in Hospitals, Canteens and Schools. *Lancet* 390-392.

- SHOOTER, R.A., GAYA, H., COOKE, E.M., KUMAR, P., PATEL, N., PARKER, M.T., THOM, B.T. and FRANCE, D.R. (1969) Food and Medicaments as Possible Sources of Hospital Strains of Pseudomonas aeruginosa. *Lancet* 1227-1229.
- SIDBERRY, H.D. and SADOFF, J.C. (1977) Pyocin Sensitivity of Neisseria gonorrhoeae and its Feasibility as an epidemiological Tool. *Infect. Immun.* 15,(2),628-637.
- SILVER, S., SCHOTTEL, J. and WEISS, A. (1976) Bacterial Resistance to Toxic Metals Determined by Extracromosomal R Factors. *Proc. of the Third Int. Biodegradation Symp.*
- SIMON-PUJOL, M.D., ESPUNY TOMAS, M.J., CONGREGADO, F., and MARQUES, A.M. (1980) Heavy Metal Tolerance of antibiotic Resistant Gram-negative Bacteria Isolated from Seawater. *Microbios Letters* 15, 151-157.
- SIMON-PUJOL, M.D., MARQUES, A.M., RIBERA, M. and CONGREGADO, F. (1978) Drug Resistance of Chromium-Tolerant Gram-negative bacteria Isolated from a river. *Microbios Letters* 7, 139-144.
- SLACK, M.P.E. (1981) Antipseudomonal β -lactams. *J. Antimicrob. Chemother.* 8, 165-170.
- SMITH, D.H. (1967) R Factor Mediate Resistance to Mercury Nickel and Cobalt. *Science* 156, 1114-1116.

- SMITH, H.W. (1970) Incidence in River Water of Escherichia coli Containing R Factors. Nature 228, 1286-1288.
- SMITH, H.W. (1971) Incidence of R⁺ Escherichia coli in Coastal Bathing Waters of Britain. Nature 234, 155-156.
- SMITH, H.W. (1978) Arsenic Resistance in Enterobacteria : its Transmission by conjugation and by Phage. J. Gen. Microbiol. 109, 49-56.
- SNOW, G.A. (1977) Mechanisms of Action of Antibiotics. 123-136. En : Pharmaceutical Microbiology. Ed Hugo, W. B. and Russell, A.D. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- SOKOL, P.A., OHMAN, D.E. and IGLEWSKI, B.H. (1979) A more Sensitive Plate Assay for Detection of Protease Production by Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 9, (4), 538-540.
- SRINIVASAN, V.A., KOTEESWARAN, A., VENUGOPALAN, A.T., NACHIMUTHO, K. and BLAPRAKASAM, R.A. (1975) Biochemical Studies, Antibiotic Sensitivity and Aeruginocine Typing of Pseudomonas aeruginosa of Poultry Origin . Cheiron 4, (2), 91-95.
- SRINIVASAN, V.A., VENUGOPALAN, A.T., ALBERT, A. and BLAPRAKASAM, R.A. (1977) Epidemiological Correlates and Antibiotic Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa of Poultry Origin. Indian Vet. J. 54, 969-973.

- STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M. and ADELBERG, E.A. (1977)
Microbiología. Ed. Aguilar.
- STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. and DOUDOROFF, M. (1966)
The Aerobic Pseudomonas: A Taxonomic Study. J. Gen.
Microbiol. 43, 159-271.
- STANISICH, V.A. and RICHMOND, M.H. (1975) Gene Transfer
in the Genus Pseudomonas. 163-190. En: Genetics and
Biochemistry of Pseudomonas. Ed Clarke, P.H. and Rich-
mond, M.H. John Willey and Sons. London.
- STEERE, A.C. and MALLISON, G.F. (1975) Handwashing Practi-
ces for the Prevention of Nosocomial Infections. Ann.
Int. Med. 83, 683-690.
- STEVENS, G.S. and OTTOLENGHI, C.O. (1977) Pyocin Sensitivi-
ty of Pseudomonas aeruginosa Pretreated with Antibiotics.
Can. J. Microbiol. 23, (5), 583-588.
- STICHT-GROH, V. (1979) Training of Pseudomonas aeruginosa
Infection by the Use of Commercial Antisera and Pyocin
Production and the Evaluation of the results on the
Basis of the X² Test. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.
A244, 240- 250.
- STINNETT, J.D., GILLELAND, H.E. and EAGON, R.G. (1973)
Proteins Released from Cell Envelopes of Pseudomonas
aeruginosa on Exposure to Ethylenediaminetetraacetate :
Comparison with Dimethylformamide-Extractable Proteins.
J. Bacteriol. 114, (1), 399-407.

- STOVELAND, S., ASTRUC, M., LESTER, S.N. and PERRY, R. (1979)
The Balance of Heavy Metals through a Sewage Treatment
Works. II Chromium, Nickel and Zinc. *Sci. Total Environ.*
12, 25-34.
- STRANDBERG, G.W., SHUMATE II, S.E. and PARROTT, J.R. (1981)
Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals: Accum-
ulation of Uranium by Saccharomyces cerevisiae and
Pseudomonas aeruginosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 41,
(1), 237-245.
- STURTEVANT, A.B., CASSELL, G. and FEARY, T.W. (1971)
Incidence of Infections Drug Resistance Among Fecal
Coliforms Isolated from Raw Sewage. *Appl. Microbiol.*
21, (3), 487-491.
- STURTEVANT, A.B. and FEARY, T.W. (1969) Incidence of In-
fections Drug Resistance among Lactose-Fermenting Bac-
teria Isolated from Raw and Treated Sewage. *Appl.*
Microbiol. 18, (5), 918-924.
- SUMMERS, A.O. and JACOBY, G.A. (1977) Plasmid-Determined
Resistance to Tellurium Compounds. *J. Bacteriol.* 129,
(1), 276-281.
- SUMMERS, A.O., JACOBY, G.A., SWARTZ, M.N., McHUGH, G. and
SUTTON, L. (1978) Metal Cation and Oxyanion Resistan-
ces in Plasmids of Gram-negative Bacteria. 128-131.
En: *Microbiology 1978*. Ed Schlessinger, D. A.S.M.
Washington D.C.

- SUMMERS, A.O. and LEWIS, E. (1973) Volatilization of Mercuric Chloride by Mercury-Resistant Plasmid-Bearing Strain of Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 113, (2), 1070-1072.
- SUMMERS, A.O., SCHOTTEL, J., CLARK, D. and SIMON, S. (1975) Plasmid-Borne Hg (II) and Organomercurial Resistance. 219-226. En: Microbiology 1974. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.
- SUMMERS, A.O. and SILVER, S. (1978) Microbial Transformations of Metals. Ann. Rev. Microbiol. 32, 637-672.
- SUZUKI, T. and IINO, T. (1980) Isolation and Characterization of Multiflagellate Mutants of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 143, (3), 1471-1479.
- TAGG, J.R. and MUSHIN, R. (1973) Pyocin-Sensitivity Testing as a means of Typing Pseudomonas aeruginosa. J. Med. Microbiol. 6, 559-563.
- TAMARO, M., BANFI, E., VENTURINI, A. y MONTE-BRAGADIN, C. (1975) I composti del cromo esavalente sono mutageni per i batteri. Atli XVII Congresso Nazionale Soc. Ital. Microbiologia 411-415. Padova.
- TERADA, Y., SUGIYAMA, S. and ORIKASA, M. (1977) Serological Typing of Pseudomonas aeruginosa Grouping of Serotypes. Jpn. J. Exp. Med. 47, (3), 203-208.

- THOMAS, E.T., JONES, L.F., SIMAO, E., SOLE-VERNIN, C. and FARMER III, J.J. (1975) Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in General Hospital, a Four-Year Study. *J. Clin. Microbiol.* 2, (5), 397-402.
- THOMASSEN, M.J., DENKO, C.A., BOXERBAUM, B., STERN, R.C. and KUCHENBROD, P.J. (1979) Multiple Isolates of Pseudomonas aeruginosa with Differing Antimicrobial Susceptibility Patterns from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* 140, (6), 873-880.
- TIMONEY, J.F., PORT, J., GILES, J. and SPANIER, J. (1978) Heavy-Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New York Bight. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, (3), 465-472.
- TORTORICI, M.P. (1980) In Vitro Sensitivity Patterns of Gram-negative Aerobic Bacteria to Tobramycine and Gentamicin in Three Community Hospitals. *NITA J.* 3, (1), 23-25.
- TRUETA RASPALL, J. (1938) El tratamiento de las fracturas de guerra. Biblioteca Médica de Cataluña 19. Barcelona.
- TSELENTIS, J., CORDOSSIS, Th., KOSMIDIS, J., LAMBROPOULOS, S. and MELISSINOS, K. (1981) Comparative Activity and β -lactamase Stability of Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin, Mezlocillin and Cefotaxime. *J. Antimicrob. Chemother.* 8, 317-321.
- TUCKER, F.L., WALPER, J.F., APPLEMAN, M.D. and DONOHUE, J. (1962) Complete Reduction of Tellurite to Pure Tellurium Metal by Microorganisms. *J. Bacteriol.* 83, 1313-1314.

- TURGEON, P.L. (1977) Tobramicine : comparaison avec la gentamicine et la carbeniciline à l-égard de 200 souches sérotipées de Pseudomonas aeruginosa. L'union Medicale du Canada 106, 46-50.
- UCHIDA, Y., ENOMOTO, N. and MIYAGUCHI, M. (1971) On the Heavy Metal Contents in Marine Products from Ariake Sea. Agri. Bull. Saga Univ. 32, 45-49.
- URATANI, Y. and KAGEYAMA, M. (1977) A Fluorescent Probe Response to the Interaction of Pyocin R1 with Sensitive Cell. J. Biochem. 81, 333-341.
- VALLEE, B.L. and ULMER, D.U. (1972) Biochemical Effects of Mercury, Cadmium and Lead. A. Rev. Biochem. 41, 91-128.
- VAN DIJCK, P.J. and VAN DE VOORDE, H. (1979) Course of Antibiotic Sensitivities in Escherichia coli and Staphylococcus aureus from Animals. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. B169, 519-529.
- VASIL, M.L., LIU, P.V. and IGLEWSKI, B.H. (1976) Temperature-Dependent Inactivating Factor of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A. Infect. Immun. 13, (5), 1467-1472.
- VENITT, S. and LEVY, L.S. (1974) Mutagenicity of Chromates in Bacteria and its Relevance to Chromate Carcinogenesis. Nature 250, 493-494.
- VERDER, E. and EVANS, J. (1961) A Proposed Antigenic Schema for the Identification of Strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 109, 183-195.

- VERON, M. (1961) Sur l'agglutination de Pseudomonas aeruginosa : Subdivision des groupes antigeniques 0:2 et 0:5. Ann. Inst. Pasteur 101, (3), 456-459.
- WALLICK, H. and HENALIN, D. (1974) Cefoxitin, a Semisynthetic Cephamycin Antibiotic : Susceptibility Studies. Antimicrob. Agents Chemother. 2, (1), 25-32.
- WARGO, E.J. (1973) Microbial Contamination of Topical Ointments. Amer. J. Hosp. Pharm. 30, 332-335.
- WASHINGTON II, J.A. and SUTTER, V.L. (1980) Dilution Susceptibility Test : Agar and Macro-Broth Dilution Procedures. 453-458. En : Manual of Clinical Microbiology. Ed Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. A.S.M. Washington D.C.
- WEAST, R.C. (1976-77) Handbook of Chemistry and Physics. Ed Weast, R.C. 57 edición.
- WEIS, A.A., SCHOTTEL, J.L., CLARK, D.L., BELLER, R.G. and SILVER, S. (1978) Mercury and Organomercurial Resistance with Enteric, Staphylococcal and Pseudomonad Plasmids. 121-124. En : Microbiology 1978. Ed Schlessinger, D. A.S.M. Washington D.C.
- WHITBY, J.L. and RAMPLING, A. (1972) Pseudomonas aeruginosa Contamination in Domestic and Hospital Environments. Lancet i, 15-17.

- WHITING, R.F., SITCH, H.F. and KOROPATNICK, D.J. (1979) DNA Damage and DNA Repair in Cultured Human Cells Exposed to Chromate. *Chem. Biol. Interac.* 26, 267-280.
- WILKINSON, S.G. (1967) The Sensitivity of Pseudomonads to Ethylenediaminetetraacetic Acid. *J. Gen Microbiol.* 47, 67-76.
- WILKINSON, S.G. (1968) Studies on the Cells Walls of Pseudomonas Species Resistant to Ethylenediaminetetraacetic Acid. *J. Gen Microbiol.* 54, 195-213.
- WILKINSON, S.G., GALBRAITH, L. and LIGHTFOOT, G.A. (1973) Cell Walls, Lipids and Lipopolysaccharides of Pseudomonas Species. *Env. J. Biochem.* 33, 158-174.
- WILSON, I.C. and DEAN, A.C.R. (1977) Thallium Sensitivity and Tolerance in Klebsiella pneumoniae. *Microbios Letters* 5, 85-92.
- WOOD, J.M. (1974) Biological Cycles for Toxic Elements in the Environment. *Science* 183, (4129), 1049-1052.
- WRIGHT, Ch., KOMINOS, S.D. and YEE, R.B. (1976) Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa Recovered from Vegetable Salads. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, (3), 453-454.
- YOUNG, L.S. (1979) Recent Advances in the Therapy of Pseudomonas aeruginosa Infection. 311-337. En: Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Ed Doggett, R.G. Academic Press. New York.

- YOUNG, V.M. (1977) Introduction. XI-XVII. En: Pseudomonas aeruginosa: Ecological Aspects and Patient Colonization. Raven Press. New York.
- YOUNG, L.S. and ARMSTRONG, D. (1972) Human Immunity to Pseudomonas aeruginosa. I In-Vitro Interaction of Bacteria, Polymorphonuclear Leukocytes, and Serum Factors. J. Infect. Dis. 126, (3), 257-276.
- YOUNG, V.M. and MOODY, M.R. (1974) Serotyping of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 130suppl., S47-S52.
- YU, P.K.W. and WASHINGTON II, J.A. (1977) Antimicrobial Susceptibility of Gentamicin-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Mayo Clin. Proc. 52, (12), 802-805.
- ZABRANSKY, R.J. and DAY, F.E. (1969) Pyocine Typing of Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 17, (2), 293-296.
- ZANON, V., MARCHON, J.L., AMAZONAS, Z.Z. and ROCHA, S. (1975) Resistência Bacteriana e consumo de antibióticos no hospital Universitario Antônio Pedro U.F.F. Rev. Brasil Med. 32, (3), 145-151.