

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A DIVERSOS
AGENTES ANTIMICROBIANOS EN CEPAS SALVAJES DE Pseudomonas
aeruginosa AISLADAS DE AGUAS Y SUELOS DE CATALUÑA.

Trabajo presentado por
Ana M^oMARQUES VILLAVECCHIA
para optar al grado de
licenciado.

Ana M^o Marques

Barcelona Octubre 1977.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701477836

Antes de proceder a la exposición de este trabajo, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Maria Dolores SIMON PUJOL, Profesor Adjunto Interino de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por su dirección, consejo y apoyo , que lo han hecho posible.

Quiero expresar mi agradecimiento al Prof.Dr. Guillermo SUAREZ FERNANDEZ por haber permitido la realización del mismo en la Cátedra de Microbiología siendo su titular y al Prof.Dr.Manuel VENTIN HERNANDEZ por su orientación y ayuda.

Agradezco la colaboración del Dr. Francisco CONGREGADO, M°Angeles CALVO y M°José ESPUNY, así como a todos mis compañeros del laboratorio por estímulo que en todo momento me han ofrecido.

INDICE

	Pag.
Objeto e interés	1
Introducción	3
- Descripción de la especie	3
- Hábitat	4
- Agentes antimicrobianos	6
- Posibles implicaciones sanitarias	11
Plan de trabajo	13
Material y métodos	14
- Aguas	14
- Suelos	14
-Métodos de enriquecimiento	15
-Métodos de aislamiento	15
-Identificación	17
-Antibiograma.....	24
Resultados	28
Discusión	49
Conclusiones	55
Bibliografía	57

OBJETO E INTERES

1. OBJETO E INTERES

La introducción de los antibióticos como terapéutica de enfermedades infecciosas, produjo un cambio radical en la medicina. Muchas de las enfermedades consideradas crónicas y a menudo fatales, se pudieron prevenir o curar con antibióticos. Sin embargo, el uso abundante y frecuentemente indiscriminado de los mismos, tanto en medicina como en agricultura y ganadería, se acepta como la mayor fuerza selectiva, en el aumento de la incidencia de resistencias a los agentes antimicrobianos en los microorganismos y más concretamente en las bacterias Gram negativas, (MICHEL-BRIAND et al., 1975; COOKE, 1976).

Desde el punto de vista epidemiológico, es interesante conocer el nivel de resistencia a los antibióticos de las bacterias aisladas de los medios naturales, pudiendo tener un valor significativo como indicador del uso masivo de agentes antimicrobianos en toda la naturaleza, (FONTAINE et al., 1976).

Numerosos trabajos han señalado que una cantidad apreciable de bacilos Gram negativos aislados de aguas y de suelos de distintas procedencias, son resistentes a uno o más antibióticos, (JOLY et al., 1976), y que esta resistencia es, en algunos casos, transferible mediante procesos de recombinación genética (SYKES y RICHMOND, 1970).

Esta resistencia transferible, de las bacterias aisladas de la naturaleza, presenta el problema de la posibilidad del intercambio de plásmidos a este nivel, (JOLY et al., 1976).

Diversos autores señalan la posibilidad de que pueda existir un intercambio efectivo de plásmidos entre bacterias entéricas humanas y animales y bacterias de hábitat acuático (SMITH , 1970 y 1971).

Trabajos recientes indican que los bacilos Gram negativos son responsables de la mayoría de las infecciones hospitalarias que presentan problemas de antibioterapia muy particulares (TURGEON , 1977).

Al analizar los datos bibliográficos obtenidos y observar la importancia de su significado y problemática actual , consideramos interesante iniciar el estudio de la resistencia a los agentes antimicrobianos de cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de aguas y suelos en nuestra región.

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

2.1. DESCRIPCION DE LA ESPECIE

El incremento de la incidencia de las infecciones hospitalarias por P. aeruginosa y su problemática antibioterapia, ha hecho que el estudio de este microorganismo y su sensibilidad y resistencia a diversos agentes antimicrobianos, haya sido tomado con gran interés en la actualidad (CARSON et al., 1972; MICHEL-BRIAND et al., 1974).

Este microorganismo se halla clasificado en la Parte 7 (DOUDOROFF y PALLERONI, 1974) del MANUAL DE BERGEY, 8ª ed., que incluye bacilos y cocos aerobios Gram negativos.

En esta Parte, está incluida la familia PSEUDOMONADACEAE.

El género tipo es Pseudomonas aeruginosa cuyas principales características son:

Bacilos, 0,5-0,8 por 1,5-3,0 μm , aislados, en parejas o en cadenas cortas. Móvil, con flagelos polares monotricos.

Pigmento fluorescente difusible y un pigmento derivado de la fenacina soluble, PIOCIANINA (azul en medios neutro y alcalino, rojo en medio ácido), producido por la mayoría de las cepas en medio apropiado. Son muy raras las cepas que no produzcan nunca pigmento. Algunas cepas además excretan un pigmento rojo oscuro.

Obligatoriamente aerobio, excepto en medios con Nitratos. Temperatura óptima de crecimiento a 37°C. Crecimiento

hasta 41°C, pero no a 4°C.

Puede ser aislada de suelos y de aguas, particularmente de medios enriquecidos para bacterias desnitrificantes. Comunmente aislado de muestras clínicas. Agente causal del "pus azul", origen del sinónimo piociánico. Ocasionalmente patógeno para plantas.

El contenido G+C del ADN es 67 moles %. El traspaso de genes por medio de la conjugación y la transducción ha sido demostrado en esta especie.

2.2. HABITAT

2.2.1. SUELOS

La presencia de microorganismos en el suelo es muy abundante, influyendo de forma notable en el desarrollo del mismo (BROCK, 1976).

El medio ambiente que se halla bajo la influencia de las raíces de los vegetales se denomina Rizosfera (RICHARDS, 1974) y es en esta zona en la que según GRAY y WILLIAMS (1975) se encuentra el mayor número de microorganismos, especialmente Gram negativos. CROSSE, en 1968, señala que especies del género Pseudomonas son abundantes en la rizosfera, pudiendo estar como simples saprófitos o como potencialmente patógenos.

2.2.2. AGUAS

La frecuente presencia de P.aeruginosa en aguas tanto

fluviales , estancadas como potables, ha sido puesta de manifiesto por LEVIN y CABELLI (1972). Debido a esta abundancia, algunos autores (HIGHSMITH y ABSHIRE, 1975) han indicado un posible uso de P.aeruginosa como un indicador de contaminación fecal en aguas potables insuficientemente tratadas.

Las concentraciones de este microorganismo en ciertos tipos de aguas superficiales requiere especial atención, pudiendo servir de reservorio para este potencial patógeno.

La presencia de este bacilo también ha sido puesta de manifiesto en piscinas, siendo causante de infecciones, sobretodo en verano (FITZGERALD et al., 1969) .

La existencia de este germen oportunista es de gran importancia , señalan CARSON et al. en 1975, puesto que es capaz de sobrevivir en medios muy pobres y en presencia de gran número de germicidas, pudiendo ser fuentes de contaminación.

2.2.3. AMBIENTE HOSPITALARIO

En estudios actuales, muchos autores han demostrado que los bacilos Gram negativos eran los responsables de la mayoría de las infecciones adquiridas en hospitales. Entre los bacilos aislados , la presencia de P.aeruginosa se ha incrementado, creando problemas sobretodo en enfermos con bajas defensas (MICHEL-BRIAND et al., 1975).

Este germen puede hallarse presente en el tubo digestivo, en el árbol traqueo-bronquial, en la piel, en las vías

urinarias y también en enfermos con quemaduras (EDMONDS et al.,1972; MICHEL-BRIAND et al.,1975; TURGEON,1977).

A parte de la problemática presente en los hospitales debido a la presencia abundante de P.aeruginosa, otro peligro es la posible actuación como reservorio de resistencias a antibióticos, pudiéndose transmitir las resistencias al medio ambiente por medio tanto de los enfermos, como de las aguas residuales (FONTAINE et al.,1976).

2.3. AGENTES ANTIMICROBIANOS

2.3.1. ANTECEDENTES HISTORICOS Y DEFINICION

Los primeros estudios sobre este tema son realizados por PASTEUR y JOUBERT en 1877, observando y describiendo los antagonismos entre microorganismos.

El punto clave en la historia de los antibióticos, fue el aislamiento de la Penicilina por FLOREY et al.(1939), partiendo de cultivos de Penicillium chrysogenum, basándose en la observación hecha por FLEMING (1929), que descubrió la inhibición del crecimiento de Staphylococcus por filtrados de caldos de cultivo de Penicillium y que al mismo tiempo, estos filtrados no eran perjudiciales para las células animales.

La primera definición de antibiótico fue la de WAKSMAN (1945) que los define como sustancias químicas producidas por microorganismos, con capacidad para matar o inhibir el crecimiento de bacterias u otros microorganismos.

La producción de antibióticos está esquemáticamente representada en la gráfica (Fig.1), donde podemos ver que más de un 50% se debe a los actinomicetos (KURYLOWICZ et al.,1976).

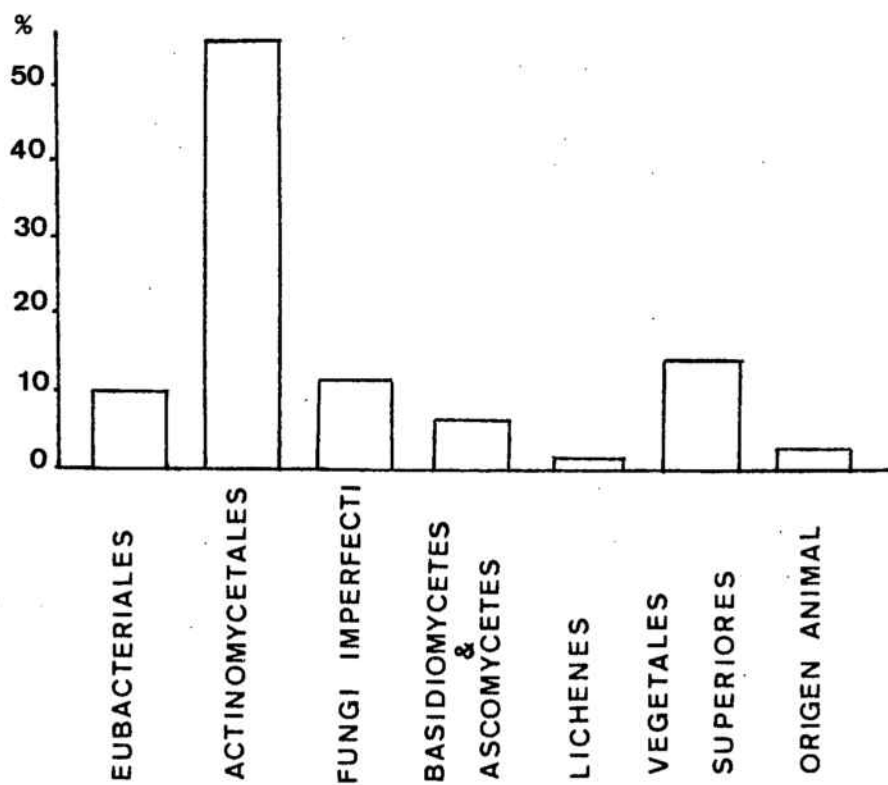


Figura 1. Origen de los antibióticos.

2.3.2. CLASIFICACION Y MODO DE ACCION

Se ha visto que no existe correlación ninguna entre la síntesis de antibióticos y la clasificación taxonómica de las especies microbianas (KURYLOWICZ et al., 1976).

Estos mismos autores señalan que a su vez se ha comprobado que una misma estructura química puede ser sintetizada por distintos caminos y que una misma clase química puede tener distintos cuadros de acción, mientras que efectos iguales pueden ser producidos por compuestos de estructura muy diferente.

Existen numerosos intentos de clasificación siguiendo unos criterios básicos como origen, estructura química, actividad biológica, toxicidad, pudiendo nombrar a título de ejemplo las realizadas por SHEMYAKIN et al., 1961, WAKSMAN y LECHEVALIER, 1962, UMEZAWA, 1964, CORONELLI, 1970 y YONEHARA, 1970.

La acción de los antibióticos se realiza a nivel celular, en contacto íntimo con las bacterias, pudiéndose unir a distintos constituyentes celulares tales como enzimas, ribosomas, ácidos nucleico ..etc., sin unirse a los otros constituyentes; siendo la toxicidad selectiva de los antibióticos para los microorganismos la propiedad fundamental de este grupo de fármacos (BROCK, 1976).

2.4. RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

Progresivamente el uso de agentes antimicrobianos ha actuado como fuerza selectiva, sobreviviendo solamente los

microorganismos mas resistentes (DOWDING et al.,1977; FOZ, 1977).

En la práctica, la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos es consecuencia de un doble proceso; en primer lugar, ocurre un cambio genético que suele afectar a una proporción escasa de células bacterianas, a las que confiere la capacidad de resistencia, y que sucede al margen de cualquier intervención del antibiótico; sigue a ello la selección de estas variantes resistentes, determinada por el empleo de antibióticos que eliminan las bacterias sensibles de aquella especie. Consecuentemente sólo se desarrolla una población bacteriana resistente a un antibiótico en presencia del mismo (FOZ,1977).

Los mecanismos bacterianos que conducen a la adquisición de resistencias a los antibióticos , son debidos siempre a cambios genotípicos. Son variaciones de baja frecuencia que sólo seran significativas en el caso que actue un factor de selección, señala el mismo autor.

Estos cambios genotípicos pueden ser originados por distintos procesos:

- MUTACION: Es un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen por substitución de un par de bases por otro, o por delección de un segmento de ADN. Esta variación no tiene sentido adaptativo, aparece al hazar y es de baja frecuencia.

El papel de la mutación en la aparición de cepas bacterianas resistentes tiene poca importancia cuantitativa (KURYLOWICZ, 1976)

- RECOMBINACION GENETICA: Se produce cuando existe un intercambio, entre dos bacterias , de material genético. Este intercambio puede tener lugar mediante tres procesos:
 - Transformación bacteriana. Es la transferencia génica por medio de ADN libre y soluble que haya sido liberado de una bacteria donadora o bien se haya extraído de la misma, a una bacteria receptora (SCHLEGEL, 1975). Desde el punto de vista práctico su importancia es limitada pues parece ser un hecho excepcional "in vivo", en condiciones naturales.
 - Transducción por bacteriófagos. Es la transferencia por medio de un bacteriófago de un pequeño fragmento de ADN bacteriano de una bacteria a otra. Este proceso puede afectar tanto al material cromosómico como al extracromosómico. Se ha observado que es un fenómeno bastante frecuente, pudiéndose poner de manifiesto su existencia en diversos casos (FOZ, 1977).
 - Conjugación. Es un tipo de recombinación genética que implica el contacto célula-célula. Una célula, el donador, transmite información genética a la otra, el receptor (BROCK, 1976).

La transferencia de grandes segmentos de cromosoma bacteriano, e incluso de su totalidad, es característico de la conjugación; por la transformación y la transducción el paso de material cromosómico queda limitado a pequeños fragmentos (FOZ, 1977).

2.5. POSIBLES IMPLICACIONES SANITARIAS

El uso masivo de antibióticos ,tanto en medicina como en veterinaria y agricultura, conduce a la aparición de cepas, patógenas o no, resistentes a la mayoría de los antibióticos empleados en clínica, siendo necesaria una continua búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos efectivos (COOKE, 1976).

Entre los factores que influyen en la aparición de resistencias citamos:

- Cambios genotípicos cromosómicos o extracromosómicos, inducidos o no por condiciones externas.
- Masivo y no siempre justificado uso de antibióticos en terapéutica y en producción de animales y alimentos.
- Capacidad de algunas bacterias, incluyendo algunas saprofitas, de transmitir resistencias a otras a través de factores de resistencia.
- Incremento de viajes internacionales contribuyendo a la diseminación de cepas resistentes en grandes distancias (KURYLOWICZ, 1976).

A nivel epidemiológico, es interesante conocer el grado de resistencia a los antibióticos de las bacterias aisladas de los medios naturales (JOLY et al., 1976).

Este mismo autor señala que numerosos trabajos han demostrado que sea cual fuere el origen del agua, una cantidad apreciable de bacilos Gram negativos aislados de

este agua son resistentes a uno o más antibióticos y que esta resistencia es a menudo transferible por conjugación.

En los géneros que poseen su hábitat en el medio ambiente, la transferencia de plásmidos a microorganismos potencialmente patógenos es altamente inconcebible. Sin embargo la transferencia de factores genéticos puede existir en especies cuyo hábitat tanto puede estar en el hombre como en la naturaleza, tal es el caso de P.aeruginosa. El contacto de este género con los antibióticos puede representar un grave peligro (VAN DIJCK et al., 1976).

SYKES y RICHMOND (1970), señalan en sus experiencias, que la transferencia de resistencias a antibióticos, que ha sido hallada con frecuencia dentro de la familia ENTEROBACTERIACEAE, puede ocurrir también entre cepas de P.aeruginosa y miembros de dicha familia.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, realizamos el presente trabajo, el cual en esta primera fase comprende el aislamiento e identificación de cepas de P.aeruginosa procedentes de muestras de suelos y aguas y el estudio de la resistencia de estos microorganismos a diversos agentes antimicrobianos.

PLAN DE TRABAJO

3. PLAN DE TRABAJO

- Toma de muestras
- Aislamiento y cultivo de las presuntas cepas de Pseudomonas aeruginosa.
- Identificación.
 - .Caracteres morfológicos.
 - .Pruebas bioquímicas.
- Antibiograma
- Interpretación de los resultados.

MATERIAL Y METODOS

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. AGUAS

El presente trabajo se ha realizado con muestras de aguas procedentes de ríos, fuentes, pozos y pantanos, en Catalunya durante el período Octubre 1976 - Septiembre 1977, efectuándose la toma a unos 10 cm de la superficie.

El material se ha recogido en frascos Sovirel de 250 ml, estériles, tomándose unos 200 ml. Los frascos no se llenaron del todo para poder agitar bien el contenido antes de realizar las siembras.

El análisis se realizó lo antes posible, una vez tomadas las muestras. De no ser factible esto, se conservaron en refrigerador a 4°C. y también se mantuvieron a esta temperatura durante transportes largos.

4.2. SUELOS

Las muestras de suelo estudiadas procedían de ciudades y de zonas rurales de Catalunya, tomándose de la zona rizosférica.

Con las muestras obtenidas se siguió la técnica de POCHON y TARDIEUX (1962), depositándose 10 g de suelo en frascos Sovirel de 250 ml con 200 ml de solución de Pirofosfato sódico al 0,1 % estéril, agitando fuertemente para facilitar la disgregación de las partículas.

4.3. METODOS DE ENRIQUECIMIENTO

De acuerdo con la técnica propuesta por DUTKA (1975) , se toman 50 ml de agua filtrándose por membrana de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Una vez terminado este proceso, se toma el filtro y se divide en cuatro partes, colocando cada una de ellas en un tubo con 10 ml de TRYPTIC SOY BROTH (Difco) para su enriquecimiento (HART et al., 1976 y 1977). La composición del medio es:

Bacto-tryptone	17 g
Bacto-soytone	3 g
Bacto-dextrose	2,5g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato bipotásico	2,5g
Agua dest.	1000 ml

El medio se esteriliza a 120° durante 15 minutos.

En el caso de las muestras de suelo, se tomó 1 ml de suspensión con pipeta estéril para la inoculación de los tubos con TRYPTIC SOY BROTH , pasándose a incubar junto con los procedentes de las aguas, durante 24 - 48 horas a 42°C.

4.4. METODOS DE AISLAMIENTO

La siembra se realiza en un medio selectivo especial para el desarrollo y la diferenciación de Pseudomonas. Se

añade 0,03 g de Ceftriaxona por litro de medio de cultivo para inhibir el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos Gram negativos no deseados.

Este medio sólido, PSEUDOSEL AGAR (Merck), también favorece la formación de pigmentos y la difusión de los mismos, produciéndose un color verde-marrón, debido a la presencia de piocianina, soluble en cloroformo y fluoresceína, fluorescente y soluble en agua, pigmentos típicos del microorganismo estudiado.

La composición del medio de cultivo es la que aquí detallamos :

Peptona	20	g
Cloruro magnésico	1,4	g
Sulfato potásico	10	g
Agar	13,6	g
Ceftriaxona	0,3	g
Agua dest.	1000	ml

pH final 7,2-7,4

Se prepara el Pseudosel Agar ajustándose el pH y esterilizándose a 120°C, durante 15 minutos.

A partir de los tubos con crecimiento positivo, los cuales agitamos para lograr una mayor homogeneidad, tomamos con pipeta estéril 1 ml de cultivo, sembrando en superficie en la placa de Petri con asa de Digralsky.

Se seleccionó la cantidad de 1 ml, aun cuando parecía en principio excesiva, para la inoculación de las placas de

bido a que se obtuvieron mejores resultados al estar las placas sometidas a una fuerte deshidratación en su incubación a 42°C, durante 2 - 7 días.

Una vez observado el crecimiento de colonias sospechosas de ser P.aeruginosa se pasa a realizar su identificación.

La conservación de los microorganismos se lleva a cabo en tubos de agar Pseudosel inclinado y una vez obtenido crecimiento, se guardan en nevera a 4°C, efectuándose periódicamente resiembras.

4.5. IDENTIFICACION

Para su identificación se siguieron los criterios expuestos por HUGH y GILARDI (1974), DOUDOROFF y PALLERONI (1974), COWAN (1974) y TURGEON (1977).

En todas las pruebas de aislamiento e identificación se usaron los correspondientes controles negativos y positivos empleándose en este último caso una cepa de P.aeruginosa suministrada gentilmente por los laboratorios FIDES y otra de la colección de nuestro laboratorio.

4.5.1. TINCIÓN DE GRAM

El procedimiento seguido es el clásico, preparándose los reactivos según señala COWAN (1974).

4.5.2. MOVILIDAD

Para su observación se recurrió al método de la "gota

pendiente" tal como describe HARRIGAN (1968) y posterior comprobación en un medio de cultivo semiblando de los empleados en la realización de las pruebas bioquímicas.

4.5.3. TINCION DE FLAGELOS

La observación de esta característica morfológica se realizó según la técnica de RHODES (1958).

4.5.4. OXIDASA

La prueba de la oxidasa se realizó de acuerdo con la técnica de KOVACS (1956).

La composición del reactivo utilizado es la siguiente :

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina	1 g
Agua destilada	100 ml

Conservándose en frasco oscuro durando dos semanas, en ne vera.

La lectura de la prueba se realiza tomando una colonia con el asa que colocamos encima de papel de filtro. Seguidamente se añade una gota del reactivo preparado.

En los cultivos oxidasa positivos, aparece a los 5-10 segundos una coloración púrpura. Una reacción positiva retardada se manifiesta a los 10-60 segundos por la aparición del mismo color y debe tomarse como negativa cualquier otra reacción posterior.

4.5.5. CATALASA

Siguiendo la técnica descrita por HARRIGAN (1968), tomamos una colonia con el asa y la colocamos sobre papel de filtro, dejando caer una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes sobre la misma e inmediatamente aparece una efervescencia causada por la formación de oxígeno libre, en los cultivos positivos, en forma de burbujas de gas.

4.5.6. PRODUCCION DE ACIDO A PARTIR DE GLUCOSA

Para realizar su estudio se sigue la técnica descrita por HARRIGAN (1968).

Medio base:

Agua de peptona	1000 ml
Glucosa	10 g
Indicador (Reac. Andrade) 1%	10 ml

Reactivo de Andrade:

Fucsina	1 g
Hidróxido sódico 1N	16 ml
Agua destilada	100 ml

Se deja la solución en reposo durante la noche a temperatura ambiente, si la fucsina no se ha decolorado hasta tomar un color pajizo, se añaden 1,2 ml de solución de hidróxido sódico.

El pH final del medio se ajusta a 7,1-7,3 y se esteriliza a 110°C durante 20 minutos.

La lectura se realiza observando el cambio de color aparecido en el medio, debido al viraje del indicador por la producción de ácido, tomando un color rosado en caso de ser positiva la prueba.

4.5.7. HIDROLISIS DE LA GELATINA

Para realizar su estudio utilizamos una modificación de la técnica de LAJUDIE y CHALVIGNAC (1956). El medio está formado por:

Peptona	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro sódico	5 g
Gelatina	30 g
Agua dest.	1000 ml
	pH final 7,2

Se prepara el caldo nutritivo al cual se adiciona la gelatina calentando hasta lograr su fusión total, ajustando posteriormente el pH a 7,2-7,4.

Se entuba y se esteriliza a 110°C durante 20 minutos. La inoculación se hace por picadura incubando a 37°C durante una semana.

La lectura se realiza manteniendo los tubos en la nevera 30 minutos, siendo positiva la prueba cuando el cultivo permanece líquido.

4.5.8. REDUCCION DE NITRATOS

Para efectuar esta prueba se usa el medio de agua de peptona con nitratos, descrito por COWAN (1974) que consiste en:

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Agua dest.	1000 ml

Ajustando a un pH de 7,2.

El medio se distribuye en tubos provistos de campana de Durham y se esteriliza en el autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Los tubos inoculados se incuban a 37°C durante 2-7 días.

Para realizar la lectura preparamos:

8 g de Ac.sulfanílico en 1000 ml de Ac.acético 5N
5 g de α -naftilamina en 1000 ml de Ac.acético 5N

Añadiendose 1 ml de cada uno de los dos reactivos en to dos los tubos preparados para la lectura.

La presencia de nitrito se manifiesta por la aparición de un color rojo, en el plazo de unos minutos. El resultado negativo debe confirmarse añadiendo al tubo una pequeña cantidad de polvos de Zinc. El desarrollo del color rojo indica la presencia de nitrato y por ello que no ha tenido lugar la reducción.

Si al añadir Zinc no aparece color es que no queda nitrato, el cual se ha reducido por el cultivo más allá del estado de nitrito. La presencia de gas en la campana de Durham indica la formación de Nitrógeno gaseoso, por tanto la completa reducción del nitrato.

4.5.9. HIDROLISIS DE LA ARGININA

El medio utilizado es el descrito por THORNLEY (1960). La composición de este medio es la siguiente:

Peptona	1	g
Cloruro sódico	5	g
Fosfato bipotásico	0,3	g
Agar	3	g
Rojo fenol	0,01	g
Monoclorhidrato de arginina	10	g
Agua dest.	1000	ml

pH final 7,2

Se esteriliza a 115°C durante 20 minutos.

La lectura se realiza observando el cambio de color del medio, que toma tonos rojizos debido a la formación de amoníaco procedente de la hidrólisis, en el caso de que sea positivo.

4.5.10. DESCARBOXILACION DE LA LISINA Y FORMACION DE SULFURO DE HIDROGENO

Para poder apreciar estas propiedades del microorganismo,

se utiliza un medio sólido de Merck cuya composición es:

D(+)-xilosa	3,5	g
L(+)-lisina	5	g
D(+)-lactosa	7,5	g
Cloruro sódico	5	g
Extracto de levadura	3	g
Desoxicolato sódico	2,5	g
Tiosulfato sódico	6,8	g
Citrato de Amonio y Hierro(III)	0,8	g
Rojo fenol	0,08	g
Agar	13,5	g
Agua destilada	1000	ml

pH final del medio 7,3-7,5.

55 gramos del producto se suspenden en 1000 ml de agua destilada, dejándose en reposo 15 minutos, calentando rápidamente a continuación hasta ebullición. Tras un breve borboteo, se enfría rápidamente en agua. La ebullición prolongada es perjudicial y por lo tanto ha de evitarse.

Las placas se incuban 24-48 horas a 37°C.

Las bacterias que descarboxilan la lisina a cadaverina, se reconocen por la presencia de un color rojo purpúreo alrededor de las colonias, lo cual se debe a una elevación del valor del pH.

El tiosulfato sirve como substancia reaccionante y la sal de Hierro (III) como indicador de formación de sulfuro de

Hidrógeno que se hace visible por la precipitación de Sulfuro de Hierro negro en las colonias positivas.

4.5.11. ANTIBIOGRAMA

El medio utilizado para la realización de los correspondientes antibiogramas es Agar MUELLER HINTON (Merck) cu yos componentes son los siguientes:

Infusión de carne	5 g
Hidrolizado de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	12,5 g
Agua dest.	1000 ml

pH final del medio a 35°C, 7,4.

36,5 gramos del producto se suspenden en 1000 ml de agua destilada dejándose en reposo 15 minutos. A continuación se calienta hasta ebullición. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 115°C, distribuyéndose en las placas hasta obtener un grosor de 4 mm y una vez solidificadas están listas para su uso de acuerdo con la técnica de KIRBY-BAUER (BAUER et al., 1966).

Para preparar el inóculo tomamos un cultivo de 18-20 horas y lo diluímos hasta 1/10.000 en solución salina estéril.

La siembra se realiza por la técnica de inundación de las placas, dejándose secar 30 minutos. A continuación

se añaden 2 ml de inóculo, repartiéndolo por toda la superficie. El líquido sobrante se retira con pipeta estéril.

Transcurridos 15 minutos de la inoculación de las placas, se colocan los discos impregnados con los distintos agentes antimicrobianos. Para lograr la predifusión del antibiótico en el agar, las placas se mantienen a temperatura ambiente durante otros 15 minutos.

Posteriormente se llevan las placas a la estufa para la incubación durante 16-18 horas a 37°C.

Los discos empleados en nuestras experiencias son los que se indican en la Tabla I.

La interpretación de estas medidas se ha hecho de acuerdo con los datos recomendados por FDA y la N.C.C.L.S., tal como indican MATSEN y BARRY (1974). Fosfocina, Tobramicina y Colistina lo han sido según los datos suministrados por las casas comerciales. Estos parámetros vienen indicados en la Tabla II.

Existe una correlación aproximada entre el diámetro de los halos de inhibición y la CMI, señalan MATSEN y BARRY (1974), debiendo ser confirmada la sensibilidad de un microorganismo frente a un agente antimicrobiano, por el método de las diluciones. La resistencia es, por otra parte, siempre significativa.

TABLA I. Relación de discos de antibióticos empleados para la realización de los antibiogramas.

AGENTE ANTIMICROBIANO	CODIGO	POTENCIA DEL DISCO
AMPICILINA (3)	(AM)	10 µg
CARBENICILINA (3)	(CB)	50 µg
CEFALOTINA (3)	(CF)	30 µg
CLOROMICETIN (3)	(C)	30 µg
COLISTINA (1)	(CL)	10 µg
ESTREPTOMICINA (3)	(S)	10 µg
FOSFOCINA (2)	(FO)	80 µg
FURADANTINA (3)	(FM)	300 µg
GENTAMICINA (3)	(GM)	10 µg
KANAMICINA (3)	(K)	30 µg
AC.NALIDIXICO (3)	(NA)	30 µg
NEOMICINA (3)	(N)	30 µg
SULFADIACINA (3)	(SD)	300 µg
TETRACICLINA (3)	(TE)	30 µg
TOBRAMICINA (1)	(NN)	10 µg

(1) - BBL

(2) - C.E.P.A.

(3) - DIFCO

TABLA II. Interpretación del antibiograma según el diámetro del halo de inhibición.

	RESISTENTE*	INTERMEDIO*	SENSIBLE*
AMPICILINA	≤11	12 - 13	≥14
CARBENICILINA	≤12	13 - 14	≥15
CEFALOTINA	≤14	15 - 17	≥18
CLOROMICETINA	≤12	13 - 17	≥18
COLISTINA	≤ 8	9 - 10	≥11
ESTREPTOMICIA	≤11	12 - 14	≥15
FOSFOCINA	≤11	12 - 14	≥15
FURADANTINA	≤14	15 - 18	≥19
GENTAMICINA	≤12	-	≥13
KANAMICINA	≤13	14 - 17	≥18
AC.NALIDIXICO	≤13	14 - 18	≥19
NEOMICINA	≤12	13 - 16	≥17
SULFADIACINA	≤12	13 - 16	≥17
TETRACICLINA	≤14	15 - 18	≥19
TOBRAMICINA	≤11	12 - 13	≥14

(*)- Datos expresados en mm

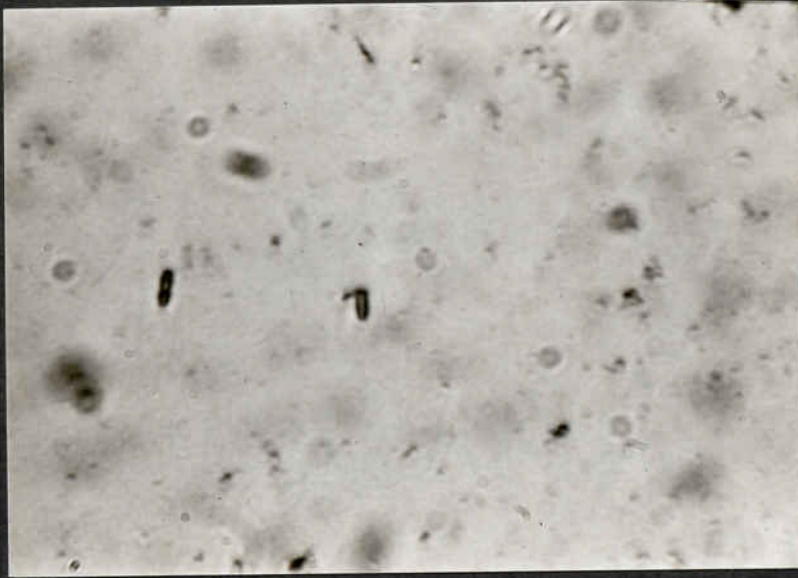
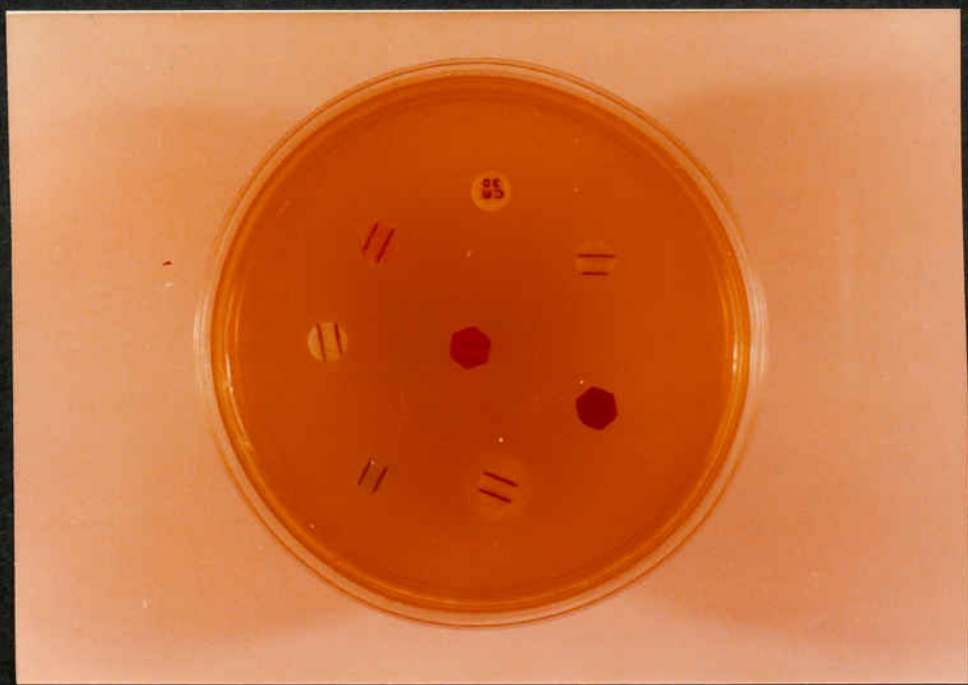
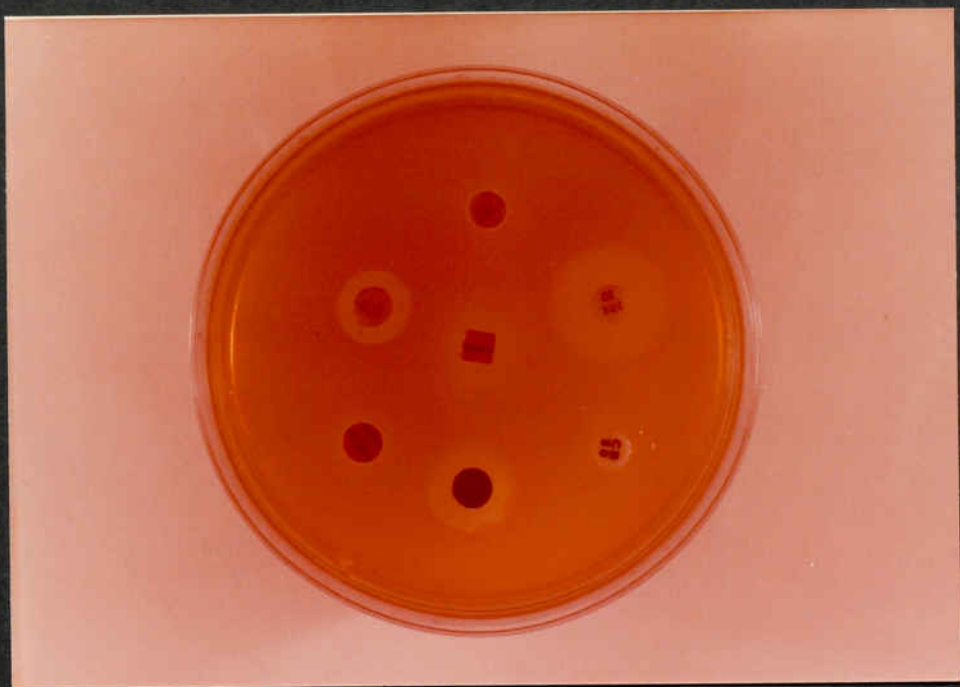


FOTO I. Tinción de flagelos según la técnica de RHODES (x1000)



FOTO II. Aislamiento de P.aeruginosa en Pseudoseal Agar



FOTOS III y IV. Antibiograma de una cepa de P.aeruginosa

RESULTADOS

5. RESULTADOS

En la Tabla III se presentan los datos correspondientes al número de muestras de aguas y de suelos analizadas, el número de muestras de las cuales se aisló e identificó P.aeruginosa y sus respectivos porcentajes.

Las Tablas IV y V muestran los resultados de los distintos caracteres morfológicos y pruebas bioquímicas que permiten la clasificación de las cepas aisladas como P.aeruginosa.

El resultado del antibiograma de los microorganismos estudiados se expresa en la Tablas VI y VII.

Los porcentajes de sensibilidad y resistencia a los distintos agentes antimicrobianos de las cepas de P.aeruginosa aisladas de muestras de aguas y de suelos se expresan en las Tablas VIII y IX.

TABLA III. Porcentajes de cepas de P.aeruginosa aisladas de muestras de agua y de suelo

	n° muestras analizadas	n° muestras <u>P.aeruginosa</u> (+)	%
AGUAS	150	41	27,3
SUELOS	100	11	11

TABLA IV. Identificación de las cepas aisladas de aguas.

CEPAS	Mov.	Gram	Oxid.	Cat.	Gluc.	NO ₃	Gela.	Arg.	Lis.	SH ₂	42°C	Pig.
9.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
9.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
12.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
25.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
25.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
25.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
25.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
29.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
29.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
32.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
32.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
32.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
42.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
42.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
42.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
43.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
43.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
43.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
43.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
57.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
57.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
57.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
57.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
60.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
60.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

CEPAS	Mov.	Gram	Oxid.	Cat.	Gluc.	NO ₃	Gela.	Arg.	Lis.	SH ₂	42°C	Pig.
60.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
60.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
64.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
64.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
64.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
64.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
70.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
70.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
71.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
74.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
74.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
74.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
74.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
75.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
75.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
75.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
75.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
76.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
76.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
76.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
85.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
90.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
90.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
90.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
95.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
102.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
102.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
102.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
102.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
104.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
104.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

CEPAS	Mov.	Gram	Oxid.	Cat.	Gluc.	NO ₃	Gela.	Arg.	Lis.	SH ₂	42°C	Pig.
105.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
105.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
105.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
106.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
107.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
107.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
107.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
107.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
109.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
109.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
110.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
110.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
110.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
110.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
113.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
116.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
117.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
117.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
117.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
117.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
118.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
118.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
118.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
118.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
125.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
125.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
125.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
126.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
126.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
126.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

CEPAS	MOV.	Gram	Oxid.	Cat.	Gluc.	NO ₃	Gela.	Arg.	Lis.	SH ₂	42°C	Pig.
126.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
130.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
135.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
138.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
139.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
139.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
139.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
139.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
140.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
140.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
140.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
142.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
142.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
142.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
142.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
143.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
143.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
143.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
143.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
144.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
144.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
144.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
147.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
147.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
147.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
147.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
149.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
149.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

TABLA V. Identificación de las cepas aisladas de suelos.

CEPAS	Mov.	Gram	Oxid.	Cat.	Gluc.	NO ₃	Gela.	Arg.	Lis.	SH ₂	42°C	Pig.
33.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
37.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
37.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
37.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
40.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
40.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
51.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
51.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
59.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
59.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
62.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
62.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
62.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
62.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
63.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
63.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
63.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
63.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
78.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
78.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
78.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
78.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
79.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

CEPAS	Mov.	Gram	Oxid.	Cat.	Gluc.	NO ₃	Gela.	Arg.	Lis.	SH ₂	42°C	Pig.
79.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
79.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
79.4	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
84.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
84.3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
86.1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
86.2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Mov. (Movilidad)

Gram (Tinción de Gram)

Oxid. (Oxidasa)

Cat. (Catalasa)

Gluc. (Producción de ácido a partir de la glucosa)

NO₃ (Reducción de los nitratos)

Gela. (Hidrólisis de la gelatina)

Arg. (Hidrólisis de la Arginina)

Lis. (Descarboxilación de la lisina)

SH₂ (Formación de sulfuro de hidrógeno)

42°C (Crecimiento a 42°C)

Pig. (Producción de pigmentos en Pseudosel agar)

CEPAS	(FO)	(NN)	(CB)	(GM)	(TE)	(CL)	(SD)	(C)	(FM)	(N)	(NA)	(S)	(K)	(CF)	(AM)
60.2	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	S	I	R	R
60.3	S	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
60.4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
64.1	R	S	I	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
64.2	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	I	S	R	R
64.3	S	S	I	S	S	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
64.4	S	S	R	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
70.1	S	S	S	S	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
70.2	I	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R
71.1	R	S	I	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
74.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
74.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
74.3	I	S	I	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
74.4	S	S	R	S	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R	R
75.1	I	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R
75.2	R	S	R	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
75.3	R	S	I	S	R	S	S	R	R	I	R	R	I	R	R
75.4	R	S	R	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
76.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
76.2	I	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
76.4	R	S	I	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
85.1	R	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
90.1	R	S	R	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R	R
90.2	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	I	R	R	R
90.3	R	S	R	S	R	S	R	P	R	I	R	R	R	R	R
95.1	I	S	R	S	R	S	I	R	R	S	P	I	R	R	R
102.1	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R
102.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
102.3	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	R	I	R	R

CEPAS	(FO)	(NN)	(CB)	(GM)	(TE)	(CL)	(SD)	(C)	(FM)	(N)	(NA)	(S)	(K)	(CF)	(AM)
102.4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
104.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
104.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
105.1	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	I	R	R	R
105.2	R	S	I	S	R	S	I	R	R	R	R	I	R	R	R
105.3	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
105.4	I	S	S	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
106.3	R	S	R	S	I	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
107.1	R	S	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
107.2	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R
107.3	R	S	R	S	I	S	I	R	R	I	R	R	R	R	R
107.4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
109.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
109.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
110.1	R	S	R	S	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
110.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
110.3	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
110.4	R	S	R	S	I	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
113.2	R	S	I	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R
116.4	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
117.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
117.2	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R
117.3	R	S	R	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
117.4	R	S	R	S	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R	R
118.1	R	S	I	S	R	S	I	R	R	I	R	S	R	R	R
118.2	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R
118.3	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
118.4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
125.1	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
125.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R

CEPAS	(FO)	(NN)	(CB)	(GM)	(TE)	(CL)	(SD)	(C)	(FM)	(N)	(NA)	(S)	(K)	(CF)	(AM)
125.3	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
126.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
126.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
126.3	R	S	R	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
126.4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
130.4	S	S	R	S	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R	R
135.2	R	S	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
138.1	R	S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R
139.1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
139.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
139.3	R	S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R
139.4	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
140.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
140.2	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
140.3	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
142.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
142.2	R	S	R	S	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R
142.3	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	P	R	R
142.4	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
143.1	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
143.2	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
143.3	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
143.4	R	S	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
144.1	R	S	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
144.2	R	S	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
144.3	R	S	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
147.1	R	S	R	S	R	R	S	R	R	I	I	R	R	R	R
147.2	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R

TABLA VIII. Porcentajes de sensibilidad y resistencia a los distintos agentes antimicrobianos de las cepas de P.aeruginosa aisladas de muestras de aguas.

	SENSIBLE (%)	INTERMEDIO (%)	RESISTENTE (%)
FOSFOCINA	14,78	7,83	77,39
TOBRAMICINA	98,26	-	1,74
CARBENICILINA	7,83	16,52	75,65
GENTAMICINA	89,56	4,35	6,09
TETRACICLINA	1,74	6,09	92,17
COLISTINA	89,58	2,6	7,82
SULFADIACINA	29,56	18,26	52,18
CLOROMICETINA	-	-	100
FURADANTINA	-	-	100
NEOMICINA	19,13	35,65	45,22
AC.NALIDIXICO	-	-	100
ESTREPTOMICINA	2,6	11,3	86,1
KANAMICINA	0,87	3,48	95,65
CEFALOTINA	-	-	100
AMPICILINA	-	-	100

TABLA IX. Porcentajes de sensibilidad y resistencia a los distintos agentes antimicrobianos de las cepas de P.aeruginosa aisladas de muestras de suelos.

	SENSIBLE (%)	INTERMEDIO (%)	RESISTENTE (%)
FOSFOCINA	-	-	100
TOBRAMICINA	100	-	-
CARBENICILINA	-	-	100
GENTAMICINA	83,3	-	16,7
TETRACICLINA	-	-	100
COLISTINA	90	-	10
SULFADIACINA	23,3	6,7	70
CLOROMICETINA	-	-	100
FURADANTINA	-	-	100
NEOMICINA	-	3,3	96,7
AC.NALIDIXICO	-	-	100
ESTREPTOMICINA	-	-	100
KANAMICINA	-	-	100
CEFALOTINA	-	-	100
AMPICILINA	-	-	100

La FIGURA 2 presenta gráficamente los resultados obtenidos en el estudio de la resistencia de cepas de P.aeruginosa , aisladas de aguas, frente a diferentes agentes antimicrobianos.

En la FIGURA 3 se representan valores correspondientes a las muestras de suelo analizadas.

Figura 2. Resistencia y sensibilidad de P.aeruginosa procedentes de aguas, frente a 15 agentes antimicrobianos.

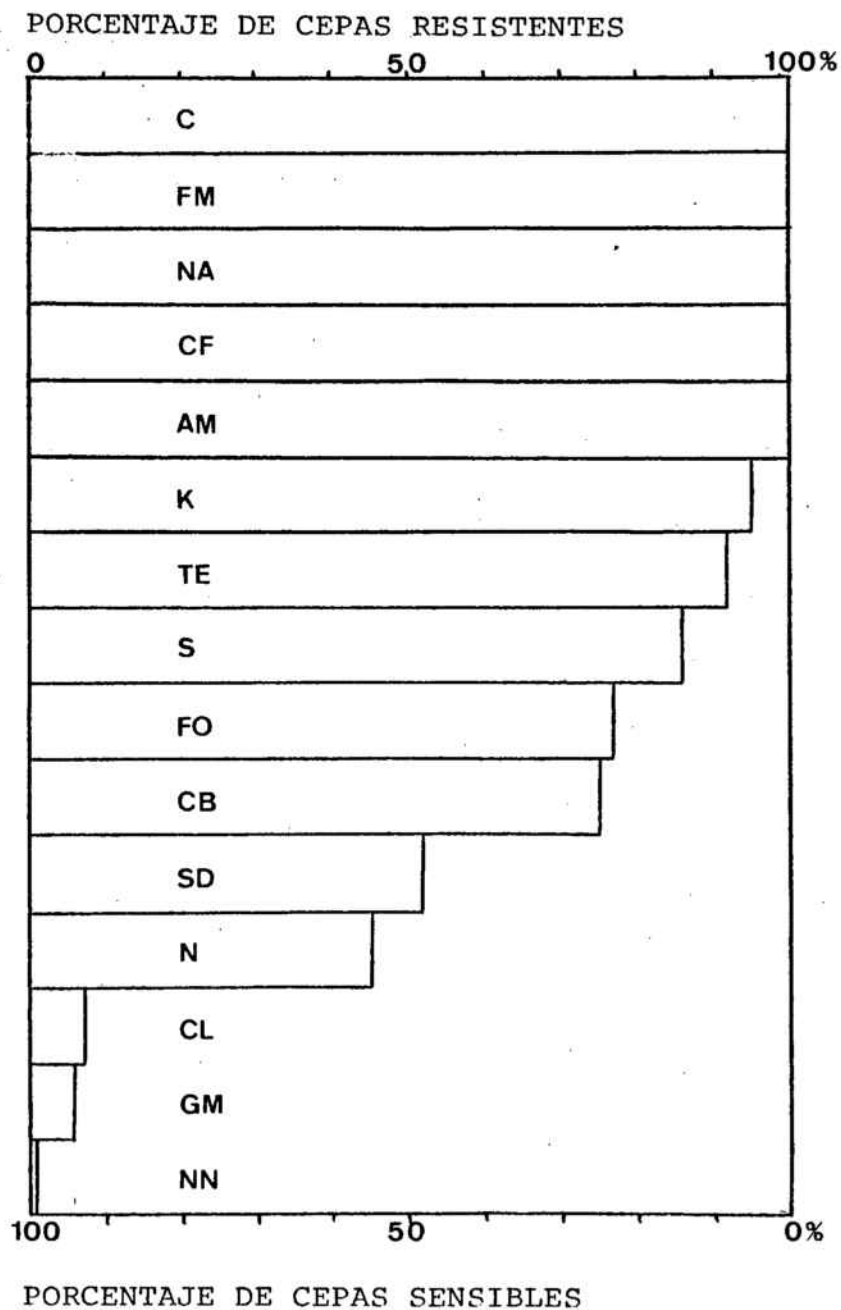
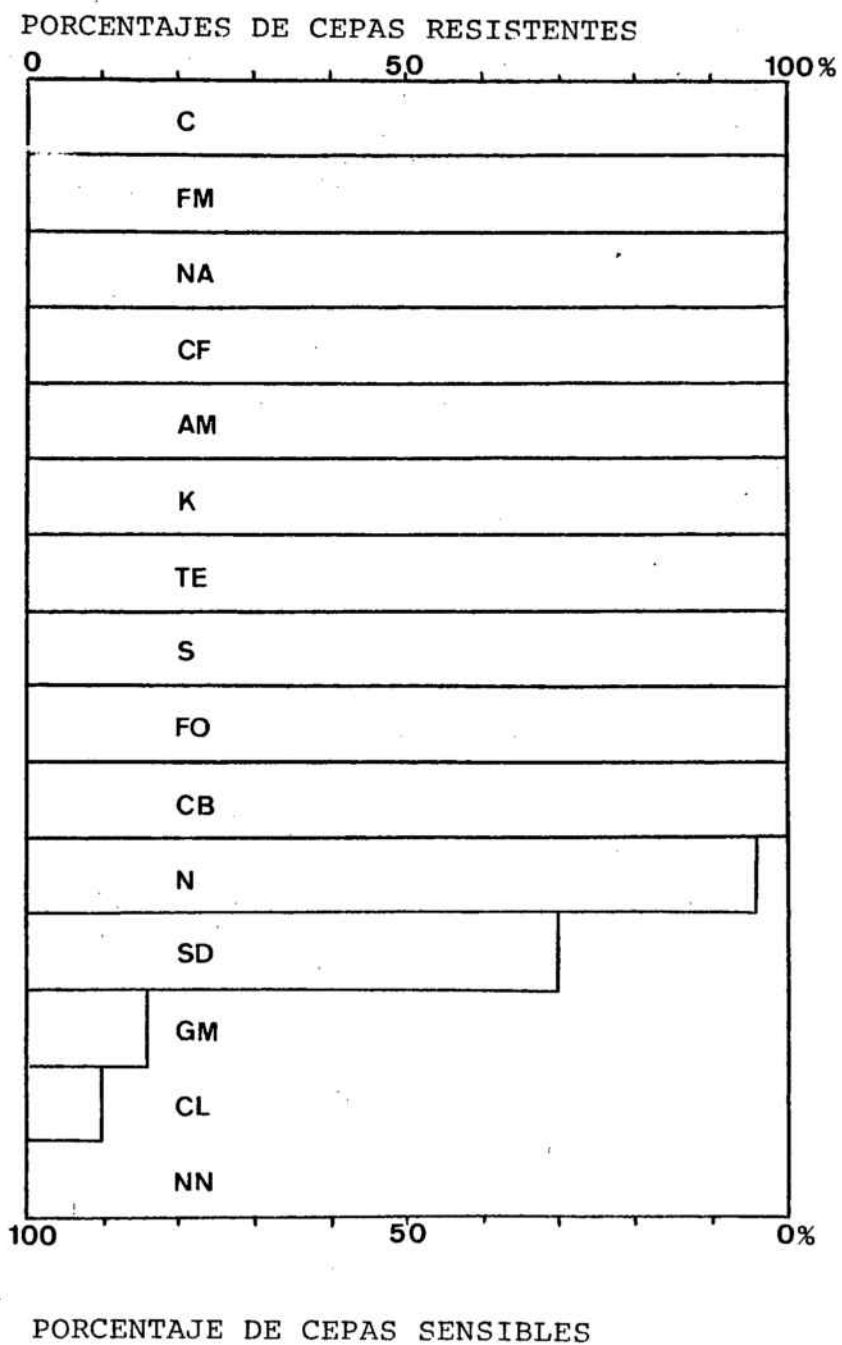


Figura 3. Resistencia y sensibilidad de P.aeruginosa procedentes de suelos, frente a 15 agentes antimicrobianos.



DISCUSSION

6.DISCUSION DE RESULTADOS

El medio selectivo de elección en el presente trabajo es Pseudosel Agar debido a sus características adecuadas y a los datos suministrados por diferentes autores:

Según DWIGHT (1972) Pseudosel Agar con 0,03% de Cetrimida es un medio satisfactorio para aislar e identificar P.aeruginosa, estimulando a su vez la producción de pigmentos que ayudan a su identificación.

HART et al.(1976 y 1977) recomiendan un enriquecimiento inicial en TRYPTIC SOY BROTH, en especial con inóculos pequeños, debido a la posible acción inhibitoria de la Cetrimida sobre diluciones altas del microorganismo, pudiendo realizar posteriormente el cultivo y aislamiento en Pseudosel Agar a 42°C.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestras experiencias, podemos confirmar que la técnica estudiada por estos dos autores ha resultado adecuada a nuestro trabajo. El 100% de las cepas aisladas como posibles P.aeruginosa en el análisis presuntivo han sido identificadas como tales(SIMON-PUJOL et al.,1977).

Las pruebas morfológicas y bioquímicas ensayadas para todas las cepas confirmaron su identificación de acuerdo con los criterios de COWAN (1974), DOUDOROFF y PALLERONI (1974), GILARDI (1976) y TURGEON (1977) usándose para

este estudio solamente aquellos microorganismos considerados como típicos, ya que actualmente la existencia de cepas no pigmentadas o con características especiales está siendo objeto de algunos estudios y no existen aun criterios taxonómicos bien determinados (AJELLO et al., 1976).

Se realizó el antibiograma de las cepas de P.aeruginosa aisladas tanto de suelos como de aguas, analizándose los resultados obtenidos, comparándose los datos según los criterios de SCHWART (1972).

La acción de AMPICILINA sobre las P.aeruginosa aisladas de aguas y suelos coincide en nuestro trabajo, encontrándose una resistencia del 100%. Este valor está de acuerdo con los resultados de JOLY et al., (1976) en cepas aisladas de aguas y los de JACOBY (1975), AJELLO et al., (1976) y GILARDI (1971 y 1976) en cepas aisladas de ambiente hospitalario.

El porcentaje de resistencia a la CARBENICILINA hallado en las cepas aisladas de aguas difiere significativamente ($\alpha = 5\%$) del de las procedentes del suelo, siendo superior el segundo.

Nuestros valores están de acuerdo con los obtenidos por JOLY et al., (1976) para cepas aisladas de aguas.

Tanto los trabajos publicados por diversos autores de cepas clínicas (JACOBY, 1975; AJELLO et al., 1976; GILARDI, 1971 y 1976) como los realizados con cepas proceden-

tes de aguas (JOLY et al., 1976) coinciden con nuestras experiencias al hallar un 100% de resistencia a CEFALOTINA.

Los resultados más recientes de AJELLO et al., (1976) y de GILARDI (1976) indican la existencia de un 100% de resistencia a CLOROMICETINA, dato que también se obtiene en nuestra investigación. Sin embargo, JOLY et al., (1976) hallan en muestras de aguas unos porcentajes bastante inferiores.

El nivel de resistencia a COLISTINA aparece como uno de los más bajos. Entre los valores hallados en aguas y suelos no existe diferencia significativa ($\alpha = 5\%$).

Los datos bibliográficos existentes para este antibiótico no son siempre coincidentes, así MICHEL-BRIAND et al., (1975) cifra esta resistencia en un 20%, mientras que GILARDI (1971 y 1976) y AJELLO et al., (1976) sólo aislaron microorganismos sensibles.

Para FOSFOCINA se ha encontrado un mayor número de cepas resistentes procedentes de suelos que de aguas, siendo esta diferencia significativa al 5%.

GOMEZ LUS et al., (1971) señalaban que Fosfocina junto con Carbenicilina, Gentamicina y Colistina, era uno de los antibióticos más eficaces frente a P.aeruginosa. Sin embargo se ha de tener en cuenta que estos datos han su-

frido modificaciones apreciables en los últimos años.

El 100% de resistencias a FURADANTINA obtenido tanto en aguas cómo en suelos está de acuerdo con los resultados de GILARDI (1971 y 1976) que indican la posibilidad de usar este dato para la identificación de este microorganismo.

En el estudio efectuado por TURGEON (1977) comparando las diferentes actividades de antibióticos frente a P.ae-ruginosa, observa que GENTAMICINA es bastante activa frente a este microorganismo, siendo sólo superada por Tobramicina, lo que concuerda con nuestros resultados, a pesar de haber hallado diferencias significativas entre los porcentajes ($\alpha = 5\%$).

Por otra parte hay que señalar que estos datos se hallan dentro de los límites habituales señalados por la literatura (JACOBY, 1975; MICHET-BRIAND et al., 1975).

Para KANAMICINA y AC. NALIDIXICO, nuestros valores coinciden con los encontrados en la bibliografía y en especial con los más recientes de GILARDI (1976).

El estudio estadístico de los porcentajes de resistencia a NEOMICINA en nuestras experiencias indica que existe una diferencia significativa ($\alpha = 5\%$), siendo superiores los datos de cepas procedentes de suelos.

Nuestros valores son superiores a los hallados por GILARDI (1971 y 1976) y AJELLO et al., (1976), sin embargo

debemos señalar que estos autores trabajan con cepas procedentes del medio hospitalario.

Los porcentajes de resistencia a SULFADIAZINA son significativamente distintos ($\alpha = 5\%$), siendo más alto el obtenido en microorganismos procedentes de suelos. Estos resultados son ligeramente superiores a los publicados por JOLY et al., (1972), en su trabajo con cepas aisladas de aguas.

GOLDSTEIN (1977), halla un 70% de cepas resistentes en medio hospitalario, mientras que en las aisladas en medio urbano arrojan cifras inferiores.

Para ESTREPTOMICINA el estudio estadístico indicó que existía diferencia significativa ($\alpha = 5\%$) entre nuestros datos, siendo superiores aquellos conseguidos por muestras de suelos.

El porcentaje hallado en las muestras de aguas coincide con los datos de GILARDI (1971) y JACOBY (1975), siendo ligeramente inferiores los publicados por AJELLO et al., (1976).

TETRACICLINA dió porcentajes de resistencia muy elevados y entre los cuales no se evidenció la existencia de diferencias significativas ($\alpha = 5\%$).

También obtienen valores muy altos GILARDI (1971), JACOBY (1975) y AJELLO et al., (1976).

No se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($\alpha = 5\%$) entre los datos de nuestro estudio de la resistencia a TOBRAMICINA. Debemos señalar que los porcentajes más bajos son los obtenidos con este antibiótico, estando de acuerdo con los trabajos de KURYLOWICZ (1976) y TURGEON (1977), en los que se pone de manifiesto la gran eficacia de este agente antimicrobiano.

GARROD et al., (1976) destacan también la actividad de este antibiótico que es superior a la de Gentamicina, manteniéndose esta propiedad incluso frente a cepas Gentamicin-resistentes.

En toda la bibliografía revisada no hemos hallado ningún trabajo de este tipo realizado con suelos, sólo HARRIS y WOODLINE (1967) abordan ligeramente el problema, no encontrando explicación a los elevados porcentajes de resistencias al no poder relacionarlas con ningún factor del suelo e indicando que podría ser su causa la contaminación.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. De las 150 muestras de agua analizadas, se aisló P.aeruginosa en un 27,3% de casos.
2. En 100 suelos, el porcentaje de muestras de las que se aisló P.aeruginosa fue del 11%.
3. Todas las cepas aisladas como posibles P.aeruginosa en el análisis presuntivo fueron confirmadas en su identificación.
4. El 100% de las P.aeruginosa se mostraron resistentes frente a Ampicilina, Cefalotina, Cloromicetina, Furadantina y Ac Nalidíxico.
5. Los porcentajes de resistencia a Carbenicilina, Fosfocina, Kanamicina y Tetraciclina, de las cepas de P.aeruginosa aisladas están comprendidos entre 75-100%.
6. Se obtienen valores intermedios, 52,18-70%, para la resistencia a Sulfadiazina en las cepas de P.aeruginosa estudiadas.
7. Las cepas de P.aeruginosa aisladas de aguas presentan un porcentaje de resistencia a Neomicina de 45,2% , mientras que en las aisladas de suelos el porcentaje de resistencia es del 96,7%.

8. Las cepas de P.aeruginosa presentan porcentajes de resistencia a Colistina y Gentamicina comprendidos entre 6,09 y 16,7%.
9. Los menores índices de resistencia se obtiene con Tobramicina.
10. En general las cepas de P.aeruginosa aisladas de sue los presentan porcentajes de resistencia más elevados que las de aguas.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- AJELLO, W.G. y HOADLEY, A.W. (1976). "Fluorescent Pseudomonas nads capable of growth at 41°C but distinct from Pseudomonas aeruginosa". J.Clin.Microbiol., 4, (5) 443.
- BAUER, A.W, KIRBY, M.M., SHERRIS, J.C. y TURK, M. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". Amer.J.Clin.Pathol., 45, 493.
- BROCK, T.D. (1976). "Biología de los microorganismos". Ed. Omega, Barcelona.
- CARSON, L.A., FAVERO, M.S., BOND W.W. y PETERSEN, N.J. (1972). "Factors affecting comparative resistance of naturally occurring and subcultured Pseudomonas aeruginosa to disinfectants". Appl.Microbiol., 23, (5), 863.
- CARSON, L.A., PETERSEN, N.J., FAVERO, M.S., DOTO, I.L., COLLINS, D.E. y LEVIN, M.A. (1975). "Factor influencing detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa by most probable number and membrane filtration techniques". Appl.Microbiol., 30, (6), 935.
- COOKE, M.D. (1976) "Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater and marine shellfish". Antimicrob.Agents Chemother., 9, (6), 879.
- COOKE, M.D. (1976). "Antibiotic resistance among coli form fecal coliform bacteria isolated from the freshwater Mussel Hyridella menziesii". Antimicrob.Agents Chemother., 9, (6), 885.
- COOKE, M.D. (1976). "Antibiotic resistance in coliform and faecal coliform bacteria from natural waters and effluents". N.Z.J.Marine & Freshwater Research, 10, (3), 391.

- CORONELLI, C. (1970). "Proposal for a chemical classification of antibiotics". En "Antibiotics a critical review". Ed. KURYLOWICZ, 1976.
- COWAN, S.T. (1974). "Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria". Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- CROSSE, J.E. (1968). "Plant pathogenic bacteria". En "The ecology of soil bacteria". Ed. Gray y Parkinson, Liverpool Univ. Press, Liverpool.
- DOUDOROF, M. y PALLERONI, N.J. (1974) "Genus I. Pseudomonas". En "Bergey's manual of determinative bacteriology". Williams & Wilkins Co., Baltimore
- DOWDING, J. y DAVIES, J. (1975). "Mechanisms and origins of plasmid-determined antibiotic resistance". En "Microbiology-1974". Ed. Schlessinger, A.S.M., Washington.
- DUTKA, B.J. (1975). "Methods for microbiological analysis of water, wastewaters and sediments". I.W.D., Applied Research Division, Canada centre for Inland Waters, Burlington, Ontario.
- DWIGHT, W.L. y STEWART, P. (1972). "Evaluation of Pseudoseal Agar as an aid in the identification of Pseudomonas aeruginosa". Appl. Microbiol., 23, (2), 377.
- EDMONDS, P., SUSKIND, R.R., MACMILLAN, B.C. y HOLDER, I.A. (1972). "Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in a Burns Hospital: Evaluation of serological, bacterophage and pyocin typing methods". Appl. Microbiol., 24, (2), 213.
- EDMONDS, P., SUSKIND, R.R., MACMILLAN, B.C. and HOLDER, I.A. (1972). "Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in a Burns Hospital: Surveillance by a combined typing system". Appl. Microbiol., 24, (2), 219.

- FITZGERALD, G.P. y der VARTANIAM, M.E. (1969). "Pseudomonas aeruginosa for the evaluation of swimming Pool chlorination for the and Algicides". Appl. Microbiol., 17, (3), 415.
- FLEMING, A. (1929). "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae". British J. experimental pathology, 10, 226.
- FLOREY, H.W. (1939). "Antibiotics". En "Antibiotics, a critical review". (1975), Ed. Kurylowicz, A.S.M. Washington.
- FONTAINE, T.D. y HOADLEY, A.W. (1976). "Transferable drug resistance associated with coliforms isolated from hospital and domestic sewage". H.L.S., 13, (4), 238.
- FOZ, A. (1977). "La resistencia bacteriana a los antibióticos". Real Academia Medicina Barcelona.
- GARROD, L.P., LAMBERT, H.P., O'GRADY, F., WATERWORTH, P. (1973) "Antibiotic and Chemotherapy". Longman Group Ltd., London.
- GILARDI, G.L. (1971) "Characterization of Pseudomonas species Isolated from Clinical specimens". Appl. Microbiol., 21, (3), 414.
- GILARDI, G.L. (1971). "Antimicrobial susceptibility as a diagnostic aid in the identification of non-fermenting Gram-negative bacteria". Appl., Microbiol., 22, (5), 821.
- GILARDI, G.L., (1976). "Identification of non-fermentative Gram-negative bacteria". Comunicación personal.

- GOLDSTEIN, F.W. (1977). "Mécanismes de résistance aux sulfamides et au triméthoprime". Bull. Inst. Pasteur, 75, (2), 102.
- GOMEZ LUS y RUBIO CALVO. (1971). Comunicación al III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona.
- GRAY, T.R.G. y WILLIAMS, S.T. (1975) "Soil microorganisms". Longman Group Ltd., London.
- HARRIGAN, W.F. y McCANCE, M.E. (1968). "Métodos de laboratorio en Microbiología". Ed. Academia, Zaragoza.
- HARRIS, P. y WOODLINE? (1967). "Antidiotic resistance of soil bacteria". Plant & Soil, 27, (2), 167.
- HART, A., MOORE, K.E. y TALL, D. (1976). "A comparison of the British Pharmacopeia (1973) and United States Pharmacopeia (1975) methods for detecting Pseudomonads" J. Appl. Bacteriol., 41, 235.
- HART, A. y KITE, P.E. (1977). "Comparison of four selective agars for the isolation of Pseudomonads". Appl. Environ. Microbiol., 33, (5), 1209.
- HIGHSMITH, A.K. y ABESHIRE, R.L. (1975). "Evaluation of a Most-Probable Number technique for the enumeration of P. aeruginosa". Appl. Microbiol., 30, (4), 596.
- HUGH, R. y GILARDI, G., (1976). "Pseudomonas". En "Manual of Clinical Microbiology". A.S.M., Washington.
- JACOBY, G.A. (1975) "Properties of R Plasmids in Pseudomonas aeruginosa". En "Microbiology-1974". Ed. Schlessinger, A.S.M., Washington.
- JOLY, B. y CLUZEL, R. (1975). "Role des métaux lourds et de leurs dérivés dans la sélection de bacilles a Gram négatif résistants aux antibiotiques". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 126B, 51.

- JOLY, B., CLUZEL, R., HENRI, Ph. y BARJOT, J. (1976). "La résistance de Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques et aux métaux lourds: CMI et transferts". Ann. Microbiol., (Inst. Pasteur), 127B, 57.
- KOVACS, N. (1956). "Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction". Nature, 178, 703.
- KURYLOWICZ, J., CHONOWSKI, W., RACZNSK-BOJANOWSKA, K y KOWSZYK-GINDIFER, Z. (1976). "antibiotics, a critical review". Polish Medical Publ., A.S.M., Washington.
- LAJUDIE, J. y CHALVIGNAC, A. (1956). Ann. Inst. Pasteur, 90, 359. En "Techniques d'analyse en Microbiologie du sol". (1962) Ed. La Tourelle, St. Mandé.
- LEVIN, M.A. y CABELLI, V.J. (1973) "Membrane filter technique for enumeration of Pseudomonas aeruginosa". Appl Microbiol., 24, (6), 864.
- MATSEN, J.M. y BARRY, A.L. (1974). "Susceptibility Testing: Diffusion test procedures". En "Manual of clinical Microbiology". A.S.M., Washington.
- MICHEL-BRIAND, Y., DUPONT, M.J. y PERRET, T. (1975). "Action des antibiotiques sur le bacille pyocyanique, influence du serotype et de la localisation dans la résistance". Biomedicine, 23, 218
- MICHEL-BRIAND, Y., JOUVENOT, M. y PERRET, T. (1975) "La résistance bactérienne aux antibiotiques: résistance a la Carbenicilline au cours des années 1972-1973. (Variations et mécanismes)". 99° Cong. Nat. Sociétés Savantes, Fasc. III, 85.
- PASTEUR, L. y JOUBERT, J.F. (1877). "Charbon et septicémie". C.R. Acad. Sci. Paris, 85, 101. En "Antibiotics, a critical review". (1976)., Ed. Kurylowicz. A.S.M., Washington.

- POCHON, J. y TARDIEUX, P. (1962). "Techniques d'analyse en Microbiologie du sol". Ed. La Tourelle, St. Mandé.
- PHODES, M.E. (1958). "The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method". *J. Gen. Microbiol.*, 18, 639.
- RICHARDS, B.N. (1974). "Introduction to the soil ecosystem". Longman Inc., New York.
- SCHLEGEL, H.G. (1975). "Microbiología general". Ed. Omega, Barcelona.
- SCHWARTZ, D. (1972). "Méthodes statistiques a l'usage des medecins et des biologistes". Ed. Flammarion, Paris.
- SHEMYAKIN, M.M., KHOKHLOV, A.S., KOLOSOV, M.N., BERGELSON, L.D., ANTONOV, V.K. (1961). "Chemistry of antibiotics". Ed. Acad. Sci., URRS, Moscou.
- SIMON-PUJOL, M.D., MARQUES, A., ESPUNY TOMAS, M.J., CONGREGADO F. (1977). "Estudio de la resistencia a los antibióticos de cepas salvajes de *Pseudomonas aeruginosa*". VI Congreso Nacional Microbiología, Santiago de Compostela.
- SMITH, H.W. (1970). "Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R factors". *Nature*, 228, 1286.
- SMITH, H.W. (1971). "Incidence of R⁺ *Escherichia coli* in coastal Bathing waters of Britain". *Nature*, 234, 155.
- SYKES, R.B. y RICHMOND, M.H. (1970). "Intergeneric transfer of a beta-lactamase Gene between *P. aeruginosa* and *E. coli*". *Nature*, 226, 952.
- THORNLEY, M.J. (1960) "The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism". *J. Appl. Bact.*, 23, 27.
- TURGEON, P.L. (1977). "Tobramycine: comparaison avec la Gentamicine et la Carbenicilline a l'égard de 200

sérotypées de Pseudomonas aeruginosa". L'Union Médicale du Canada, 106, 46.

UMEZAVA, H. (1964). "Recent advances in chemistry and biochemistry of antibiotics". Microbial Chem. Research Foundation.

VAN DIJCK, P. y van der VORDE, H. (1976). "Sensitivity of environmental microorganisms to antimicrobial Agents". Appl. Environ. Microbiol., 31, (3), 332.

WAKSMAN, S.A. (1945) "Microbial antagonisms and antibiotic substances". The Commonwealth Fund., New York. En "Antibiotics, a critical review". (1976), Ed. Kurylowicz A.S.M., Washington.

WAKSMAN, S.A. y LECHEVALIER, H.A. (1962). "The Actinomycetes. III. Antibiotics of actinomycetes". The Williams & Wilkins, Co., Baltimore.

YONEHARA, H. (1970). "Tentative classification of antibiotics by chemical structure". En "Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 2". Proceedings of the 6th International Congress of Chemotherapy Univ. Tokyo Press, Tokyo.