

OBSERVACION DIRECTA DE LA MICROFLORA DEL SUELO

POR EL METODO DE ROSSI-CHOLODNY-CONN

POR LUIS A. GARASSINI (*)

(CON TRES LÁMINAS Y DOS FIGURAS EN EL TEXTO)

Los conocimientos de la microbiología del suelo que se han venido acumulando después de la época pasteuriana, han permitido llegar a conocer algunas de las funciones del sistema edafobiológico del suelo e interpretar ciertas acciones específicas en los fenómenos que ocurren en la evolución de la materia.

Winogradsky con sus primeros estudios que datan del año 1889 y sus últimos trabajos desde el año 1925 hasta la fecha, podemos decir que ha inaugurado una nueva época en esta rama poco cultivada de la Microbiología, dándole un impulso que podrá ser el principio del verdadero conocimiento de ese micromundo del suelo, en especial del suelo agrícola.

Los medios de cultivo artificiales, no permiten aún identificar completamente la verdadera microflora del suelo, debido a que muchos gérmenes no encuentran el medio favorable de vida, no manifestándose por lo tanto en los cultivos de laboratorio.

Esto es en realidad lo que impide el conocimiento de algunas formas microbianas que viven en ese habitat, desempeñando un rol no conocido y a cuyo estudio se dedican ya en todas partes del mundo una cantidad de investigadores.

El elemento suelo es el más rico y variado en población microbiana, debido al ciclo biológico fatal de la materia que en él se realiza, en cuya transformación toman parte activa la microflora y microfau-

(*) Ingeniero agrónomo. Jefe de Trabajos prácticos de Microbiología agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata. Bacteriólogo del Instituto Nacional de la Nutrición (Buenos Aires).

na que lo compone. Su estudio merece un capítulo aparte en la microbiología agrícola para llegar a conocer la función que cada uno de ellos desempeñan y poder con su ayuda obtener el máximo beneficio en nuestras tierras de cultivo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con el descubrimiento del elegante método de observación directa de los gérmenes del suelo efectuada casi simultáneamente por Rossi (10) y por Cholodny (1), se pudo llegar a conocer formas que habitan el suelo y que no se habían observado aún en los medios de cultivo artificiales, siendo por lo tanto rápidamente adoptado por todos los que se dedican a esta clase de disciplina.

Conn (4) insinuó la idea de poder observar los microbios del suelo directamente, empleando la siguiente técnica: 0,5 gr., de suelo se colocan en un tubo de ensayo y se le agrega 4 ó 5 ml. de gelatina fijadora, se mezcla bien y se efectúa un frotis, extendiendo la preparación hasta una superficie de 1 cm²; se deja secar, se hace actuar el colorante durante un minuto, se lava y se observa con lente de inmersión.

La solución de gelatina fijadora se prepara disolviendo 0,15 gr. de gelatina en un litro de agua destilada entibiada, se distribuye en tubos de ensayo más o menos 5 ml., y se esteriliza.

Este autor utiliza preferentemente para colorear, el rosa de bengala (1 gr. de colorante rosa de bengala, disuelto en 100 ml. de agua destilada con 5% de fenol y 0,01 gr. de Cl₂Ca.); Conn siguió trabajando y modificando su propio método inicial, aunque la importancia es muy relativa, pues solamente da una idea de los grupos de gérmenes que predominan.

Winogradsky, en 1935 (13) modificó el método de Conn efectuando suspensiones de suelo de la manera siguiente: 1 gr. de tierra (considerada seca) se coloca en un tubo de ensayo y se le agrega 4 ml. de agua destilada, se agita durante 5 minutos, se deja en reposo 30 segundos y se decanta la suspensión, pasándola a un tubo de centrifuga; al precipitado que queda en el tubo de ensayo se le agrega dos veces 3 ml. de agua destilada, agitando cada vez un minuto y dejando decantar 30 segundos, volcando también cada vez en el tubo de centrifuga. En esta forma se obtiene 10 ml. de suspensión en el tubo de centrifuga. Después del tercer lavaje quedará en el tubo de ensayo

el primer depósito de tierra; en el tubo de centrífuga se formará el segundo depósito. El tercer depósito se obtiene volcando la mitad de la suspensión del tubo de centrífuga, en otro tubo igual, en el que después de centrifugar se obtendrá el tercer depósito. Se efectúa luego un preparado microscópico de cada depósito y de cada suspensión y se colorea con eritrosina fenicada (eritrosina al 1 % y fenol al 5 %).

Para fijar las partículas de tierra, Winogradsky agrega una solución de agar que forma una película en la superficie, utilizando 0,1 % de agar en frío para las suspensiones y para los depósitos 1 % de agar en caliente.

Esta modificación al método de Conn por Winogradsky, es también de importancia relativa, pues sólo se llega a identificar bien las colonias de *Azotobacter*.

Sin embargo, a pesar de esto, fué un estímulo para que algunos investigadores que vieron un nuevo horizonte con los estudios de este investigador ruso se orientaran en la consecución de un verdadero « método directo », ya que Winogradsky había observado en forma casi directa algunos de los organismos del suelo.

Rossi y Ricardo (10), parece ser, fueron los primeros que consiguieron observar en forma directa los microorganismos del suelo, empleando una técnica completamente distinta a las conocidas hasta entonces.

El método de estos investigadores consiste en aplicar directamente porta-objetos en la tierra, valiéndose de láminas de metal clavadas en la misma, que limitan un paralelepípedo de tierra; en esta forma se evita su desprendimiento y la mantiene comprimida. Tres caras del paralelepípedo de tierra se hallan limitadas por tres láminas de metal clavadas en el suelo y la cuarta, que es donde se aplica el porta-objeto, se abre con una lámina provista de un mango en ángulo recto con la misma, en tal forma que se pueda clavar y luego con un movimiento de tracción provocar la separación del pan de tierra; se aprovecha entonces para colocar los porta-objetos contra el pan de tierra.

Después de un corto tiempo, se retiran los porta-objetos del suelo, se secan por el calor, se fijan y se colorean con eritrosina fenicada, se lavan y se observan con lente de inmersión.

Koffman (8) ideó también un método, basado en las cualidades de los distintos colorantes, especialmente para observar la microfauna, pero a causa de lo complicado del procedimiento, su uso no se ha generalizado.

La modificación de Cholodny al método de Rossi es simplemente

en el tiempo de contacto de los porta-objetos con el suelo, pues mientras Rossi los retira al poco tiempo de colocados, Cholodny los deja durante un tiempo mayor. La técnica seguida por Cholodny es la siguiente: se efectúa un corte vertical en el suelo con un instrumento cortante y separando ligeramente el pan de tierra coloca a los porta-objetos, dejando una pequeña parte de los mismos a flor de tierra 1 cm. más o menos y se deja en contacto durante dos semanas, al fin de cuyo tiempo los extrae removiendo con cuidado el suelo de la cara contraria donde se va a efectuar la coloración. De esta manera los porta-objetos se hallan directamente en contacto con el suelo y para retirarlos se despegan cuidadosamente evitando arrastrar la superficie, previamente indicada para efectuar la preparación con un movimiento de tracción. Se dejan secar, se fijan, se colorean con eritrosina.

Conn, introduce una modificación al método de Rossi-Cholodny, colocando muestras de suelos en pequeños vasos provistos de tapas y luego introduce en la tierra dos porta-objetos de la misma manera que lo hace Cholodny en el suelo.

En esta forma se trabaja con mayor comodidad y además se puede controlar perfectamente las condiciones de ambiente en el laboratorio, como también investigar el efecto de algunos tratamientos en el suelo, como ser, agregado de distintas sustancias, y los agentes atmosféricos, humedad, temperatura, etc.; cosa imposible de efectuar en el campo.

La coloración de los preparados la efectúa con rosa de bengala en lugar de eritrosina, aconsejada por Winogradsky.

Rosa de bengala.....	:	1 gr.
Cl ₂ Ca.....		0,01 gr.
Fenol (sol. acuosa al 5%).....		100 ml.

Cholodny (2) consiguió observar gérmenes del suelo en forma directa y sin coloración, ideando una prensa especial para suelo, *soil press*, por medio de la cual y sobre un porta-objeto consigue formar una pequeña cámara húmeda, *soil chamber* en cuyo interior desarrolla, según este autor, bacterias, hongos, actinomicos y protozoarios, pudiéndose observar cómodamente el desarrollo y sus características morfológicas *in vivo*.

Cholodny sugiere la posibilidad de poder con este método obtener cultivos puros de los microorganismos que aparecen dentro de esa « cámara de tierra » y aislarlos en forma directa.

Ziemiecka, Jadwiga (15) aplica el método Rossi-Cholodny-Conn, utilizando porta-objetos con diversas sustancias orgánicas, *Coated slides*, para poder apreciar la influencia de los mismos sobre los distintos grupos de gérmenes que lo habitan.

En esta forma pudo observar la reacción que produce en los microorganismos la naturaleza química de las sustancias orgánicas agregadas. Por otra parte con este método llegó a controlar la influencia que las condiciones externas tiene sobre ellos (oxígeno, temperatura y humedad), como también el predominio de las formas según las características del suelo (rico, pobre, ácido o neutro).

Soriano, S. (12) simplificó en forma práctica, el principio del método Cholodny, eliminando, como dice el autor, toda clase de técnica complicada.

El procedimiento ideado por Soriano, consiste en provocar una cámara húmeda en porta-objetos excavados, depositando en su interior una pequeña cantidad de tierra en la parte central de la concavidad y luego cerrando con un cubre-objeto mediante una leve presión.

Mediante este sencillo método, Soriano ha podido observar con grandes aumentos filamentos de Actinomicetas, grandes y pequeños cocos de Winogradsky, bacterias específicas de la celulosa y bastoncitos del tipo *Corynebacterium*.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se ha seguido el método de observación directa de Rossi-Cholodny, con la modificación introducida por Conn, la cual consiste en colocar porta-objetos en un vaso de vidrio con muestra de suelo a examinar como indica la figura 1, en la misma forma que aconseja Cholodny en el terreno; de esta manera, además de la comodidad que reporta esta modificación, es posible un exacto control de los fenómenos atmosféricos y la investigación de los efectos producidos en el suelo por los tratamientos artificiales.

En el presente trabajo se ha podido comprobar que la técnica de Conn se simplifica si en lugar de utilizar vasos de vidrio, se emplean cajas de Petri de 100 mm. de diámetro, como lo indica la figura 2. Se llena la caja de Petri con la muestra de tierra y luego con un porta-objeto se homogeniza ligeramente la superficie hasta obte-

ner un plano más o menos uniforme. Esta operación no es necesaria cuando la muestra de suelo es más bien suelta, pues con unos pequeños golpes en el borde de la caja se consigue tener una superficie más o menos uniforme. Los porta-objetos se aplican sobre la superficie de la tierra y luego se hace un leve frotamiento con el dedo índice en toda su extensión, hasta que el contacto con el suelo de la cara opuesta sea completo. En una caja de Petri de 100 mm. de diámetro se

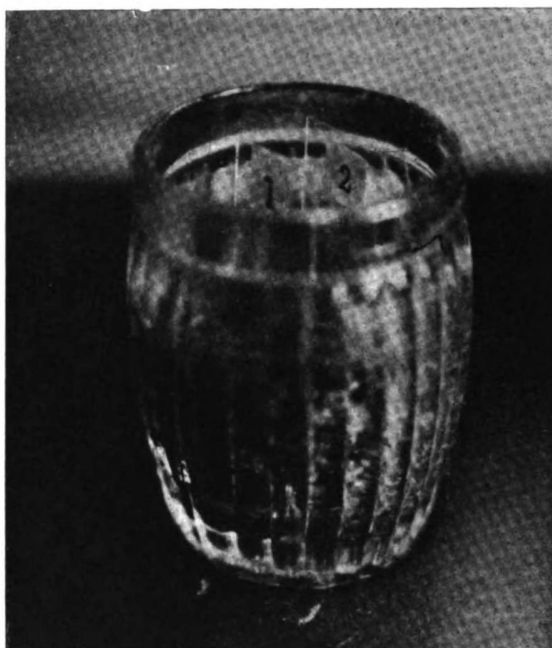


Fig. 1. — Modificación de Conn al método de Rossi-Cholodny

pueden colocar dos porta-objetos, como lo indica la figura 2. En el interior de la tapa de la caja de Petri, se colocan unos discos de papel de filtro humedecidos para mantener la humedad. Estos papeles es conveniente que sean de diámetro algo mayor, para evitar su caída; en esta forma se obtiene un ambiente húmedo favorable para el desarrollo de las bacterias.

La ventaja de esta modificación es en el momento de retirar los porta-objetos, puesto que no hay ningún peligro de arrastrar la superficie de contacto con la tierra, dificultad que se puede presentar con el procedimiento de Conn.

El presente trabajo se ha realizado siguiendo la técnica descrita; el tiempo de contacto de los porta objetos con el suelo fué de 15 días. Se colocaron además porta-objetos en los lugares de extracción de las muestras, efectuándose en esta forma una comparación de los

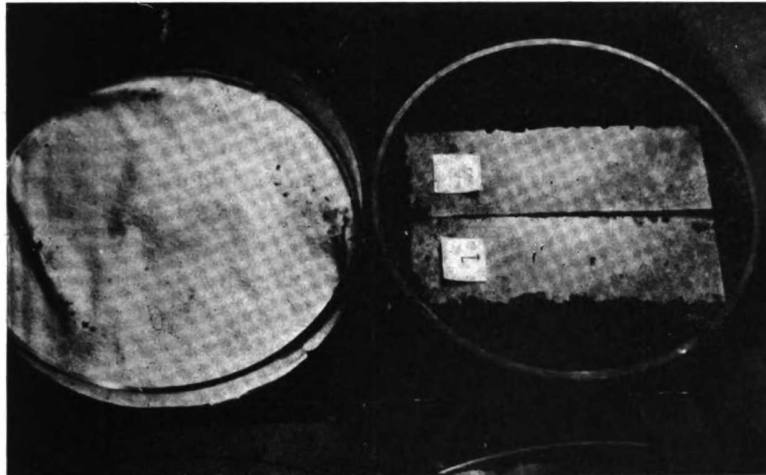


Fig. 2. — Variación del método de Conn, adoptada en el presente trabajo

resultados obtenidos en el Laboratorio y los que se han obtenido directamente en el terreno.

La coloración de los preparados se efectuó con eritrosina fenicada, aconsejada por Winogradsky. Conn cree más conveniente el uso del rosa de bengala, no utilizado aquí.

SUELOS ESTUDIADOS

Las muestras de suelos utilizadas en el presente trabajo, fueron obtenidas en la Facultad de Agronomía de La Plata, teniendo especial cuidado en elegir material de estudio que presentara alguna diferenciación no solamente en la contextura del terreno sino también por la vegetación existente.

La muestra n° 1 corresponde a tierra del Jardín de dicha Facultad, tierra que poco antes había sido abonada con estiércol.

La muestra n° 2 se tomó de un alfalfar de 3 años, en la parte donde el desarrollo era más denso.

La muestra n° 3 corresponde a tierra de huerta (cultivo de habas).

La muestra n° 4 fué tomada de los campos de crianza de la misma Facultad, en donde se había cultivado trigo por varios años consecutivos.

Las muestras de tierra se extraían después de eliminar de la superficie del suelo la vegetación existente y a medida que se tomaban, se colocaban en el mismo lugar 4 porta-objetos estériles, siguiendo la técnica de Rossi-Cholodny más arriba descripta.

Las muestras eran llevadas al local del Laboratorio y luego de preparar las cajas de Petri con el material de estudio como se ha indicado ya, se colocaban 2 porta-objetos estériles, siguiendo la técnica mencionada.

Las cajas eran colocadas en una cámara húmeda improvisada con una campana de vidrio sumergida en un recipiente con agua, obteniendo en esa forma un ambiente de relativa humedad constante, puesto que el factor humedad es de capital importancia para el desarrollo de los gérmenes del suelo.

A los 15 días se retiraban los porta-objetos colocados en contacto con las muestras de tierras y se fijaban los microorganismos a la llama directa y luego, según lo aconseja Winogradsky, eran coloreados con eritrosina fenicada durante 5 minutos. Los porta-objetos coloreados eran observados con lente de inmersión.

RESULTADOS

La aplicación del método de observación directa puede ser apreciado observando las microfotografías que se han obtenido de los preparados estudiados en este trabajo. No hay duda alguna que el presente método puede servir como índice de la riqueza microbiana de una muestra de suelo. No se encontraron colonias mezcladas sino aisladas, como puede verse en las láminas respectivas; Cholodny ha encontrado muy pocas veces microorganismos mezclados.

La variedad de formas microbianas es más acentuada en las muestras de suelo con cultivo de leguminosas (muestras n° 2 y 3) encontrándose también Clostridios y, en pequeña cantidad, Actinomicetas.

En tierra de jardín abonada con estiércol (muestra n° 1) predominan principalmente las Actinomicetas, las cuales desempeñan posiblemente un rol importante en el último estado de la transformación de la materia orgánica. Las Actinomicetas fructifican, dando, como

puede verse en las microfotografías n^o 1-2-3-15-20, largas cadenas de cocos que pueden llegar a confundirse con los estreptococos.

El cuadro microbiano varía, parece ser, cuando hay gran cantidad de micelio de hongos; las bacterias disminuyen lo mismo que las Actinomicetas, por lo que su presencia podría determinar una de las etapas en la transformación de la materia: la primera o la última.

Los cocos y cocobacilos son de mayor importancia que las formas alargadas, especialmente esporulados, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. mycoides*. Los *Nitrosococcus* de Winogradsky que actúan sobre las sales amoniacales son de gran importancia agronómica, puesto que sin su intervención el N. no sería asimilado por las plantas verdes; encontramos además los típicos representantes de los fijadores aerobios del N. atmosférico: el *Azotobacter*.

Muestra n^o 1. — Tierra de jardín. Predominan pequeños cocobacilos, se observa variedad de formas, pero siempre tendiendo a la forma coco. La colocación varía, ya sean agrupados o aislados unos de los otros. Se encuentran además pequeñísimos diplococos, apenas visibles al microscopio con 1.000 aumentos.

En todos los preparados de esta muestra hay gran cantidad de Actinomicetas y trozos de filamentos de hongos que ocupan varios campos del microscopio, abundan trozos negros de tamaño muy grande, algunos redondeados, otros amorfos (figs. 4 y 5) (materia orgánica?), y además algunos esporos de *Alternaria*.

Muestra n^o 2. — Tierra con cultivo de leguminosa (alfalfa). En los preparados se observa gran abundancia de micelio de *Actinomicetas*, sueltos y ramificados; micelio de hongo con pequeñas cabezuelas en forma de fructificaciones, gran cantidad de pequeñas y grandes colonias de bastoncitos sueltos o formando cadenas; colonias de pequeños cocos y se encuentran también esporos de *Alternaria*. Algunos gérmenes se disponen como puntuaciones equidistantes, posiblemente capsulados. Se observa también micelio de *Actinomicetas* adherido al micelio de hongo, como si lo parasitara. En estos preparados predominan visiblemente colonias de bastoncitos.

Muestra n^o 3. — Tierra de huerta (cultivo de habas): gran cantidad de *Actinomicetas* y fructificaciones de las mismas; no se observa abundancia de gérmenes como en las muestras anteriores, colonias de pequeños y grandes cocos (*Azotobacter*) se observan además cocobacilos y bastoncitos muy gruesos y largos; fructificaciones de *Oidium* sp., trozos amorfos coloreados y gérmenes esporulados.

Muestra n^o 4. — Tierra con cultivo de trigo. En estos preparados

se observa gran cantidad de micelio de hongo, las fructificaciones de Actinomicetas no son tan abundantes aquí como en los últimos dos ensayos. Abundancia de esporos de *Fusarium* (figs. 22 y 23) hay además colonias de grandes cocos no observados en las muestras anteriores, los cocos pequeños son escasos. La impresión general es de que abundan gérmenes de tamaño mayor a todos los demás preparados, ya sean bastones o cocos; se observan también grandes diplococos.

CONCLUSIONES

El método de Rossi-Cholodny es una ayuda eficaz para el conocimiento de la microflora del suelo, cuando es auxiliado por los cultivos artificiales de Laboratorio en medios selectivos, siguiendo la técnica trazada por Winogradsky para el análisis microbiológico de suelos, en cajas de Petri con sílice gelatinosa; en esta forma se llegaría a tener una visión más amplia de la actividad microbiana de ese medio.

La comprobación de las formas existentes mediante las técnicas de estos autores podría servir para clasificar la bondad de un suelo, a pesar de que no es posible solamente por la morfología, una diferenciación cualitativa de los microorganismos.

Este método permite observar especialmente Actinomicetas y Hongos, lo que podría servir para estudiar los procesos sexuales de los mismos, muy en especial en estos últimos. Se puede aplicar además para comprobar la presencia de *Azotobacter* y Clostridios en un suelo determinado.

El problema más inmediato que se presenta en esta rama de la microbiología, es de llegar a conocer la verdadera función que cada uno de los gérmenes desempeña. No hay duda de que esto podría llegar a aclarar la nebulosa oscura que aún encierra la actividad microbiana del suelo agrícola.

Summary. — The present work is concerned with the bibliographic revision of the methods for the direct observation of the soil microorganisms, and following the technics given by Rossi-Cholodny-Conn, four soil samples taken from Faculty of Agronomy National University of La Plata, are examined.

Conn's modification to this method has been here simplified with good results adopting Petri dishes of glass beakers as indicated by the author.

In the four soil samples examined, a differentiation of forms is observed,

particularly in soils cultivated with leguminosas. In garden soils manured with dung, Actinomycetas predominate principally, on the contrary in samples taken from soil cultivated with wheat, fungi spores and miceliums are found in greater proportions.

BIBLIOGRAFIA

1. CHOLODSKY, N. 1930. *Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora*, en *Arch. f. Mikrobiol.*, I, 620-625.
2. — 1934. *A soil chamber as a method for the microscopic study of the soil microflora*, en *Ibid.*, 5 (1): 148-156.
3. CONN, H. J. 1913. *The distribution of bacteria in various Types*, en *Jour. Amer. Soc. Agron.*, 5, 218-221.
4. — 1918. *The microscopic study of bacteria and fungi in soil*, en *New York Agr. Exp. Sta., Tech. Bull.* n° 64.
5. — 1928. *On the microscopic method of studying bacteria in soil*, en *Soil Science*, 26, 257-259.
6. — 1932. *A microscopic study of certain changes in the microflora of soil*, en *New York State Agric. Exp. Sta., Tech. Bull.* n° 204.
7. DEMETER KARL, J. 1933. *Ueber die Brauchbarkeit von Cholodnysmikroskopische « Aufwuchsplattenmethode » bei Mikrobiologischen Boden-Untersuchungen*, en *Zentralbl. f. Bakt.*, II, Abt. Bd. 88, 17/22, 384-392.
8. KOFFMAN, M. 1928. *Eine Methode zur direkten Untersuchung der Mikrofauna und der Mikroflora des Bodens*, en *Zentrbl. f. Bakt.*, 2 Abt., 75, 28-45.
9. — 1931. *Weiteres zur Methode der direkten Untersuchung der Mikrofauna und Mikroflora des Bodens*, en *Zentrbl. f. Bakt.*, 2 Abt., 85, 1-11.
10. ROSSI, G. y S. RICARDO. 1927. *L'ésame microscopie e bateriologico diretto del terreno agrario*, en *Nouv. Ann. dell Agr.*, 7, 457-470.
11. ROSSI, G. M. 1929. *Il terreno agrario nella teoria e nella realta*, en *L'Italia Agr.*, n° 4, Apr.
12. SORIANO, S. 1933. *Método de observación directa de la microflora y microfauna del suelo en cámara húmeda*, en *Rev. Arg. de Agronomía*, t. I, n° 1, pág. 39 y sigs.
13. WINOGRADSKY, S. 1925. *Etudes sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode*, en *Ann. Inst. Pasteur*, 39 (4): 229-254.
14. — 1932. *Etudes sur la microbiologie du sol. 5^a. mémoire: Analyse microbiologique du sol. Principes d'une nouvelle méthode*, en *Ibid.*, 48 (1): 89-134.
15. ZIEMIECKA, JADWIGA. 1934. *The use of a modified Rossi-Cholodny technic for studying the organisms that decompose certain organic compounds in soil*, en *Zentrbl. f. Bakt.*, II, Abt. 9, 379-394.

EXPLICACIÓN DE LAS MICROFOTOGRAFÍAS

(Aumento \times 400)

Muestra n° 1

- 1 Fructificaciones de Actinomicetas.
- 2 y 3 Micelio y fructificaciones de Actinomicetas.
- 4 y 5 *Nitrosocystis* de Winogradsky ?

Muestra n° 2

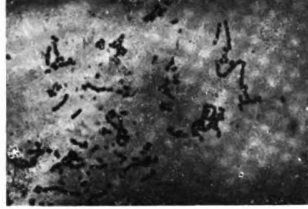
- 6 Microcolonia de grandes bastones, dispuestos en línea (probablemente *B. cereus* o *B. mycoides*).
- 7 Microcolonia de bastoncitos formando velo en empaladizada (*Bactoderma* de Winogradsky ?).
- 8-9 y 10 Microcolonia de bastoncitos.
- 11 y 12 Microcolonia de Clostridios.
- 13 Microcolonia de cocos (*Azotobacter*).
- 14 Microcolonia de pequeños cocos, algunos en división (marcados con la flecha), y fructificaciones de Actinomicetas.
- 15 Micelio y fructificaciones de Actinomicetas.

Muestra n° 3

- 16 Bastoncitos pequeños, al parecer esporulados de puntas redondeadas.
- 17 Microcolonia de bastoncitos.
- 18 Microcolonia de esporulados (*Clostridium pasteurianum* ?).
- 19 y 20 Micelio y fructificaciones de Actinomicetas.
- 21 Microcolonia de cocos (*Azotobacter* ?).

Muestra n° 4

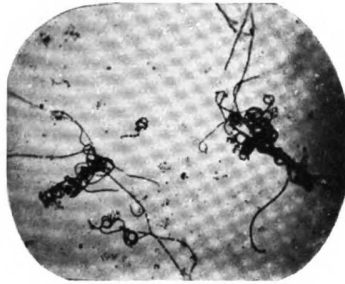
- 22 Esporos de *Fusarium* sp.
- 23 Micelio y esporos de *Fusarium* sp.
- 24 Microcolonia de bastoncitos (*B. cereus*, *B. Mycoides* ?).
- 25 y 26 Microcolonia de cocobacilos.
- 27 Microcolonia de pequeños bastoncitos.



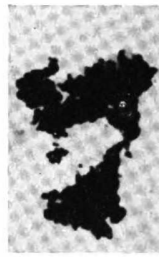
1



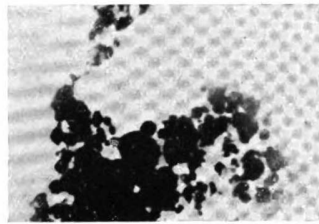
2



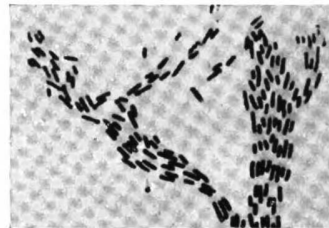
3



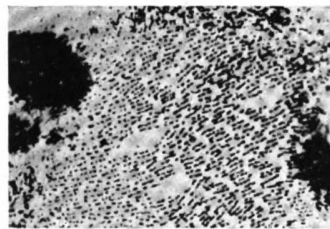
4



5



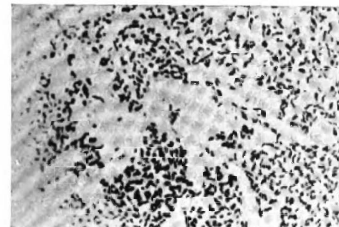
6



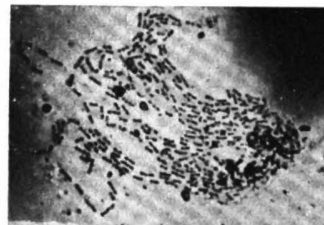
7



8



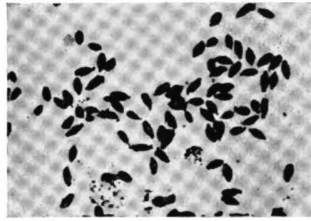
9



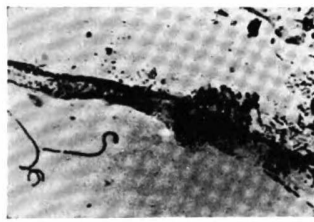
10



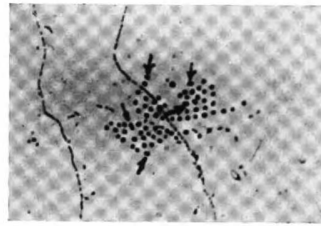
11



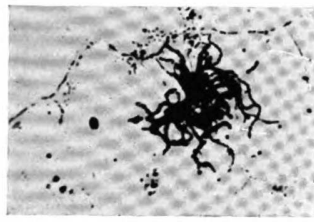
12



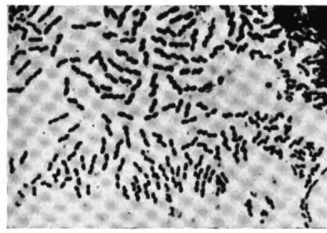
13



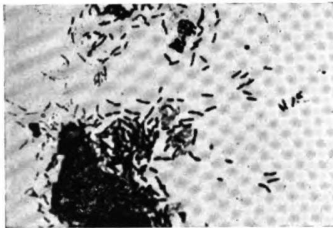
14



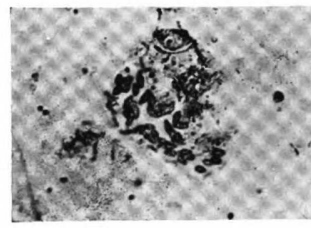
15



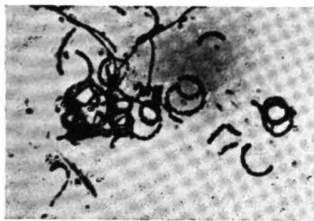
16



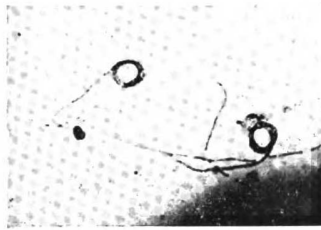
17



18



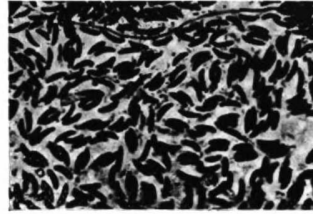
19



20



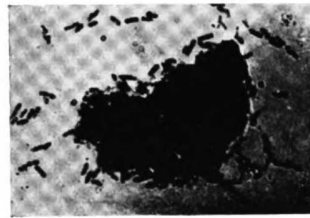
21



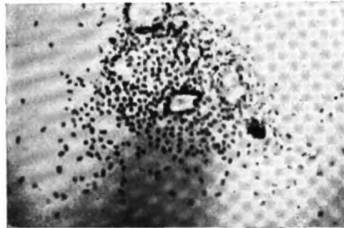
22



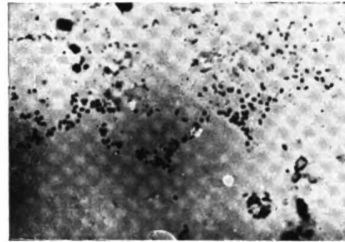
23



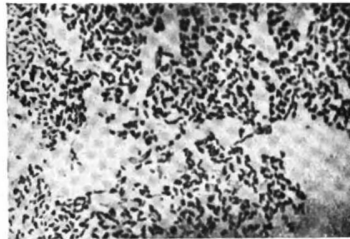
24



25



26



27