

Е. Н. Аввакумова, Л. Н. Кац, М. Г. Шамцян

**Цитохимическое исследование распределения полисахаридов
у клубеньковых бактерий в клубеньках и чистой культуре**

Известно, что существует связь между интенсивностью азотфиксации клубеньковыми бактериями и накоплением углеводов, в частности крахмала, в клубеньках бобового растения (Neumann, 1952; Bergersen, 1957 и др.). Интенсивность симбиотической азотфиксации у клубеньковых бактерий обычно связывают с наличием в клубеньках бактероидных форм (Имшенецкий, 1961; Virtanen, 1945; Neumann, 1952, а, в, и др.). Поэтому представляет интерес выявить различия в тонком строении, физиологии и химическом составе «нормальных» палочковидных и бактероидных форм клубеньковых бактерий в процессе развития бобового растения—симбионта, связав их с интенсивностью симбиотической азотфиксации. Последняя бывает наивысшей в фазах бутонизации и цветения (Федоров, Ласло, 1956; Петросян, 1959 и др.).

Цитохимические исследования полисахаридов у клубеньковых бактерий в клубеньках бобового растения немногочисленны. Поэтому задачей настоящего исследования, проведенного с помощью цитохимических методов, было изучение наличия и распределения полисахаридов у клубеньковых бактерий в клубеньках в связи с развитием бобового растения—симбионта, а также в чистой культуре на питательной среде.

Материалы и методика

Объектом исследования служили бактерии из клубеньков люцерны полевого посева (при естественной зараженности их клубеньковыми бактериями), а также бактерии, выделенные из клубеньков подопытных растений в чистую культуру. Культуру клубеньковых бактерий поддерживали на бобовом агаре с 1% сахарозы или на бобовом отваре с 1% глюкозы. Для

цитологического и цитохимического исследования клубеньки отбирали один раз в 10 дней, начиная с фазы 3—4 настоящих листьев и до периода полного созревания семян у люцерны (всего 8 раз за вегетацию). Препараты-мазки приготавливали из взвеси чистой культуры бактерий, а препараты-отпечатки со срезов верхней, средней и нижней частей клубенька.

Для описания общей морфологии культуры использовали окраску метиленовым синим, для выявления клеточной стенки—кристаллический фиолетовый после протравы танином по Гутштейну, для ядерных элементов—реакцию Фельгена и раствор Гимзы после солянокислого гидролиза, для волютина—окраску по Мейеру, для липопротеидных телец—метод Имшенецкого (Пешков, 1955).

Для цитохимического определения полисахаридов применяли реакцию Шифф-йодная кислота (ШИК). Контролем служила реакция ШИК после ацетилирования. Для уточнения природы ШИК-положительных веществ проводили бромирование или экстракцию липидов смесью метилового спирта, эфира и хлороформа при нагревании. В случае, если окраска реактивом Шиффа в этих условиях не снижалась, ее относили за счет полисахаридов, в обратном случае—за счет липидов. Для выявления метахроматической субстанции, т. е. веществ главным образом полисахаридной природы применяли окрашивание толуидиновым синим при разных значениях рН, а также тионином по методу Шморля. Для выявления кислых мукополисахаридов использовали окраску альциановым синим по Стидменту, для гликогена—окраску йодным раствором Люголя или кармином по Бесту, для липидов—судан черный по Мак-Манусу и реакцию Лилли с Шифф-надмуравьиной и Шифф-надуксусной кислотами, для белков—прочный зеленый при рН 2,2 по Олфарту и Гешвинду. Большинство цитохимических методов воспроизведено по Пирсу (1962).

Кроме того, фиксированные препараты обрабатывали ферментами: лизоцином (для выявления мукополисахаридов), гиалуронидазой (для выявления гиалуроновой кислоты) и пепсином (для выявления белков).

Препараты просматривали со световым микроскопом.

МБИ-9. Фотографирование проводили на микрофотоустановке ФМН-3 с окуляром $\times 15$ и объективом $\times 100$ МИ при увеличении $\times 2000$.

Обсуждение полученных результатов. Цитологические особенности клубеньковых бактерий люцерны

В чистой культуре на бобовом агаре с сахарозой клубеньковые бактерии люцерны имели форму палочек длиной 3—4 мк, окрашивающихся метиленовым синим чаще только в полярных участках. При специальных методах окраски в каждой клетке можно обнаружить по 1—2 нуклеоида, хорошо дифференцированную оболочку, иногда капсулу. Кроме того, в каждой клетке имеется по 2 метахроматически окрашенных гранулы волютина, по 2 липопротеидных тельца, а также гранулы, дающие ШИК-реакцию.

В старой культуре и на бобовом отваре с 1% глюкозы наблюдалось образование увеличенных клеток иногда неправильной, разветвленной формы—бактероидов, имеющих длину 6—7 мк. Каждая бактериоидная клетка содержит от 1 до 3 нуклеоидов. Количество волютиновых гранул в одной бактериоидной клетке—2—3 и липопротеидных телец—3—5.

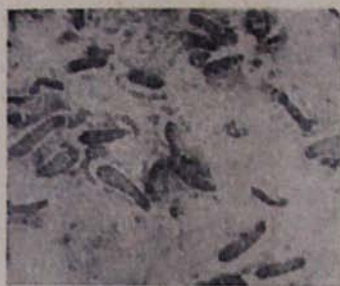


Рис. 1. Бактероидные клетки в средней части клубенька люцерны. Фиксация жидкостью Буэна. Окраска по Густейну. Видна капсула и оболочка клетки $\times 2000$.

В клубеньках люцерны длина «нормальных», палочковидных форм достигает 5—6 мк, бактериоидных—9—17 мк. Бак-

тероиды бывают разветвленной формы или имеют вид слабо изогнутых палочек, утолщенных с одного конца (рис. 1). В разных частях клубенька бактериодные клетки неодинаковы. Верхняя растущая часть клубенька содержит в основном,

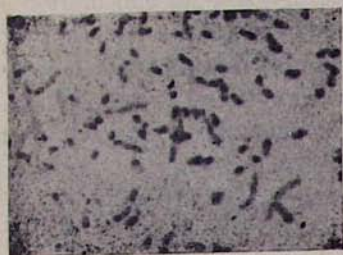


Рис. 2. Бактериодные клетки в верхней части клубенька. Фиксация жидкостью Карнуа. Окраска НСI—Гимза. Видны нуклеоиды $\times 2000$.



Рис. 3. Бактериодные формы в средней части клубенька. Фиксация Карнуа. Окраска НСI—Гимза. $\times 2000$. Видны нуклеоиды.

мелкие палочковидные формы и в небольшом количестве бактериоды (рис. 2), число которых увеличивается по мере развития растения-симбионта. В средней части клубенька, окрашенной в розовый цвет, почти все клетки бактериодные (рис. 3), начиная с периода образования клубеньков. В основании клубенька на ранних стадиях развития растения бактериодные клетки такие же, как и в середине клубенька, иногда более раздутые, а начиная с периода цветения люцерны, бактерии разрушаются, их цитоплазма лизируется. Количество нуклеоидов, волютина и липопротеидных телец на каждую бактериодную клетку больше, чем на каждую палочковидную (рис. 2,3).

Таким образом, цитологическое исследование показало значительный полиморфизм клубеньковых бактерий. Соотношение между «нормальными», палочковидными и бактериодными формами бактерий в клубеньке, а также цитологические особенности тех и других изменяются в зависимости как от возраста культуры, так и от фаз развития растения-симбионта.

Интенсивность симбиотической азотфиксации у клубеньковых бактерий многие исследователи связывают с наличием в клубеньках бактериоидных форм (Имшенецкий, 1961; Virtanen, 1954; Нейтапп, 1952, а, в и др.). Однако другие исследователи (Красильников, 1948; Almon, 1933 и др.) рассматривают бактериоиды, как инволюционные формы, не способные к делению и не участвующие в симбиотической азотфиксации.

В наших предыдущих исследованиях также было показано, что бактериоиды можно считать вполне жизнеспособными, они имеют дифференцированные нуклеоиды и все основные внутриклеточные включения, как и «нормальные» палочковидные клетки (Петросян, Аввакумова, 1963, 1964).

Природа и распределение полисахаридов у клубеньковых бактерий в клубеньках люцерны.

Цитохимические исследования клубеньковых бактерий в клубеньках за вегетацию представлены в табл. I.

Как известно, реактив Шиффа в реакции ШИК открывает соединения, содержащие две смежные гликолевые группы в положении 1,2, т. е. практически окрашивает полисахариды, нейтральные мукополисахариды, мукопротеиды и некоторые липиды (Пирс, 1962). Отрицательная или резко сниженная реакция ШИК после ацетилирования и положительная после бромирования и экстракции липидов позволила предположить углеводную, а не липидную природу ШИК-положительных веществ в клеточной оболочке, цитоплазме и внутрицитоплазматических гранулах.

Однако в некоторых клетках цитоплазматические гранулы не давали реакции ШИК после бромирования и экстракции липидов. Вместе с тем они окрашивались, хотя и слабо, суданом черным и иногда давали положительную реакцию по методу Лилли, т. е. содержали липиды. Таким образом, в клетках клубеньковых бактерий ШИК-положительные внутрицитоплазматические гранулы неодинаковы по составу, они могут содержать полисахариды и могут иметь липидную природу.

Распределение полисахаридов у клубеньковых бактерий (палочковидных и бактериоидных форм) в клубеньках за вегетацию

[illegible]

Для дальнейшей дифференциации ШИК-положительных веществ в клетках клубеньковых бактерий их обрабатывали ферментами. После обработки препаратов гиалуронидазой в отдельные периоды вегетации люцерны реактив Шиффа не окрашивал оболочку клетки у клубеньковых бактерий, а в период цветения люцерны нарушалась диффузная окраска цитоплазмы, и в ней обнаруживались неокрашенные перерывы. Это дало основание полагать, что в клеточной оболочке, а иногда и в цитоплазме клубеньковых бактерий присутствует гиалуроновая кислота. Обработка препаратов лизоцимом полностью снимала или сильно снижала окраску клеточной стенки реактивом Шиффа. В некоторых случаях это относилось и к цитоплазме. Так как основным субстратом действия лизоцима является мурамовая кислота (основной компонент мукополисахаридов), то это позволяет заключить о наличии мукополисахаридов в клеточной стенке, а, возможно, даже и в цитоплазме.

В наших исследованиях обращает на себя внимание отсутствие ШИК-положительных веществ в капсуле. Метакроматическое окрашивание толудиновым синим в кислой среде и окрашивание альциановым синим, характерные для кислых мукополисахаридов, позволили обнаружить последние только в самом внутреннем узком слое капсулы, окаймляющем клеточную стенку. Возможно, это объясняется легкой вымываемостью мукополисахаридов из остальной части капсулы.

К полисахаридам, которые могут давать реакцию ШИК, кроме мукополисахаридов, можно отнести гликоген. Последний при окрашивании йодным раствором Люголя и кармином по Бесту обнаруживался во внутрицитоплазматических гранулах, а в некоторых случаях, в цитоплазме.

Сравнительное исследование палочковидных и бактериоидных форм клубеньковых бактерий в клубеньках люцерны показало, что палочковидные клетки отличаются от бактериоидных более интенсивной реакцией ШИК, отсутствием диффузной окраски цитоплазмы в некоторые периоды вегетации растения-симбионта и меньшим количеством гликогена.

В распределении полисахаридов в различные фазы развития люцерны отчетливых изменений не наблюдалось. Тем

не менее некоторые различия были отмечены. Так, в период полной бутонизации не обнаружено диффузной окраски цитоплазмы реактивом Шиффа, в то время как в остальные периоды цитоплазма окрашивалась диффузно, особенно у бактериоидных форм. Диффузная окраска цитоплазмы в период 7—9 настоящих листьев и в период созревания люцерны, по-видимому, связана с присутствием гликогена (окраска цитоплазмы раствором Люголя), напротив, в период цветения она зависит от мукополисахаридов (отрицательная реакция ШИК после лизоцима и гиалуронидазы). Гликоген обнаруживался в виде отдельных цитоплазматических гранул или диффузно в цитоплазме во все фазы развития растения, кроме фазы бутонизации, когда он не выявлялся с помощью цитохимических тестов. Гиалуроновая кислота найдена в оболочке клетки также во все фазы развития растения симбионта, в фазу бутонизации она не обнаруживалась. Липиды присутствовали в бактериях в виде внутрицитоплазматических гранул до стадии бутонизации, на последующих стадиях развития люцерны липидные гранулы в цитоплазме отсутствовали.

Цитохимические исследования полисахаридов у клубеньковых бактерий, особенно в клубеньках бабового растения, немногочисленны. Берджерсен (Bergersen, 1955) Галибьевская и Сипневская (Golebiowska, Sypniewska, 1962) обнаружили гликоген в бактериоидах у клевера и люпина при окраске их раствором Люголя. Проведенное нами исследование показало некоторое несоответствие в распределении гликогена в клетках бактерий при окраске их различными методами (табл. I). Это несоответствие возможно отнести за счет вторичного перераспределения гликогена при фиксации спиртом (окраска по Бесту).

Капсульным полисахаридом у многих бактерий является гиалуроновая кислота (Кац, 1964; Кац, Волкова, 1966; Salton, 1960 и др.). Хемри и Винсент (Humphrey, Vincent, 1959) обнаружили глюкуроновую кислоту (продукт гидролиза гиалуроновой кислоты) и в капсулах некоторых клубеньковых бактерий; у клубеньковых бактерий люцерны она отсутствовала. В наших исследованиях слабая окраска внутреннего слоя капсулы альциановым синим позволяет предпола-

гать присутствие гиалуроновой кислоты или какого-либо другого кислого мукополисахарида в капсуле клубеньковых бактерий люцерны.

Обнаруженные изменения в содержании и распределении полисахаридов и липидов по фазам развития растения-симбионта не всегда повторялись из года в год. Только отсутствие гликогена в период бутонизации—цветения (период наибольшей азотфиксации) было закономерным во всех исследованиях 1961—1963 гг. Берджерсен (1955), Голибьевская и Сипневская (1962) также отметили отсутствие гликогена в бактероидах активных клубеньков и накопление в неактивных, что можно объяснить недостатком азота, нарушением соотношения углерода и азота при неэффективном симбиозе.

Природа и распределение полисахаридов у клубеньковых бактерий в чистой культуре

Исследования проводились на культуре 5- и 20-суточного роста (табл. 2).

Таблица 2
Распределение полисахаридов у клубеньковых бактерий люцерны в чистой культуре

Реакции и окраски	5-суточная культура				20-суточная культура			
	капсула	оболочка клетки	цитоплазма	гранулы цитоплазмы	капсула	оболочка клетки	цитоплазма	гранулы цитоплазмы
Реакция ШИК	—	++	—	+	—	+	—	—
Ацетилирование—ШИК	—	++	—	+	—	+	—	—
Бромирование—ШИК	—	++	—	+	—	+	—	—
Лизоцим—ШИК	—	—	—	+	—	+	—	—
Гиалуронидаза—ШИК	—	—	—	+	—	+	—	—
Альциановый синий	++	++	—	—	++	+++	—	—
Раствор Люголя	—	—	—	—	—	—	—	—
Судан черный	—	—	—	+	—	—	—	+
Липопротеиды (по Имшенецкому)	—	—	—	+	—	—	—	+
Прочный зеленый pH 2,2	—	—	+	+	—	—	+	+
Пепсин—прочный зеленый pH 2,2	—	—	—	—	—	—	—	+

У молодой культуры реактив Шиффа интенсивно окрашивал полярные гранулы, слабее окрашивалась оболочка клетки (рис. 4). Ни предварительное ацелирование, ни экстракция липидов растворителями, ни обработка гиалуронидазой или лизоцимом не снимали положительной ШИК-реакции полярных гранул. Вместе с тем гранулы окрашивались суданом и прочным зеленым, переваривались пепсином и давали окраску на липопротеиды. Все это дало основание полагать, что полярные гранулы в молодой культуре образованы липопро-теидами.



Рис. 4. Клубеньковые бактерии в чистой культуре (5 суток роста). Фиксация спиртом. Окраска Шифф-йодная кислота $\times 2000$. Окрашена оболочка клетки и цитоплазматические гранулы.

Рис. 5. Клубеньковые бактерии в чистой культуре (20 суток роста). Фиксация ацетоном. Окраска альциановым синим. Окрашены оболочка клетки и внутренний слой капсулы $\times 2000$.

В старой культуре реакцию ШИК давали оболочка клетки и редко полярные гранулы. Вместе с тем полярные гранулы четко выявлялись при окраске суданом, прочным зеленым и по методу Имшенецкого. В отличие от молодой культуры они окрашивались также раствором Люголя. Таким образом, полярные гранулы в старой культуре клубеньковых бактерий образованы липопротеидами, как и в молодой культуре, но по составу не идентичны им (окрашиваются Люголем и, как правило, не дают реакции ШИК).

Как у молодой, так и у старой культуры клубеньковых бактерий в оболочке клетки, по-видимому, имеется гиалуроновая кислота (отрицательная реакция ШИК после гиалуронидазы). Гиалуроновая кислота или другие кислые мукополи-

сахариды содержатся также и в капсуле (слабое окрашивание альциановым синим), (рис. 5).

В результате сравнительного изучения клубеньковых бактерий в чистой культуре выясняется, что они отличаются от бактерий в клубеньках растения-симбионта не только по своим цитологическим особенностям, но и по природе и распределению в клетках полисахаридов.

Изменения в наличии и локализации полисахаридов в процессе развития клубеньковых бактерий в чистой культуре иные, чем изменения у клубеньковых бактерий в процессе симбиоза.

Выводы

1. Изучение распределения полисахаридов у клубеньковых бактерий люцерны показало, что кислые мукополисахариды локализованы во внутренней части капсулы, гналуоновая кислота присутствует в оболочке клетки, а иногда диффузно распределена в цитоплазме, гликоген—в виде внутрицитоплазматических гранул или диффузно в цитоплазме.

2. Сравнительное исследование бактериоидов и «нормальных» палочковидных форм клубеньковых бактерий в клубеньках люцерны выявило, что первые характеризуются большими размерами, измененной формой, большим числом нуклеондов, волютиновых гранул и липопротеидных телец на одну бактериальную клетку и большим содержанием гликогена.

3. Исследование клубеньковых бактерий на разных стадиях развития люцерны показало, что в период бутонизации, т. е. в период наибольшей азотфиксации, наблюдается закономерное отсутствие у них гликогена.

4. Клубеньковые бактерии люцерны в чистой культуре отличаются от бактерий в клубеньках цитологическими особенностями и характером внутриклеточного распределения полисахаридов и липопротеидов.

Ե. Ն. ԱՎԿՈՒՄՈՎԱ, Լ. Ն. ԿԱՅ, Մ. Գ. ՇԱՄՅԱՆ

**ՊԱԼԱՐԱՐԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՊԱԼԱՐԻԿՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ՄԱՔՈՒՐ
ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐՈՒՄ ՊՈԼԻՍԱԿԱՐԻԳՆԵՐԻ ՏԵՂԱՐԱՇԽՄԱՆ
ԲԶՋԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Հայտնի է, որ պալարաբակտերիաների կողմից ազոտոֆիքսման ինտենսիվության և թիթեռնածաղկավոր բույսերի պալարիկներում ածխաջրերի, մասնավորապես օսլայի կուտակման միջև գոյություն ունի սերտ կապ:

Հայտնի է նաև, որ ազոտոֆիքսման ինտենսիվությունը առավելագույնի է հասնում թիթեռնածաղկավոր բույսի կոկոնակալման-ծաղկման շրջանում:

Դրա համար էլ հետաքրքրություն են ներկայացնում պալարաբակտերիաների բջիջներում պոլիսախարիդների կազմի և տեղաբաշխման վերաբերյալ հետազոտությունները, կապված թիթեռնածաղկավոր բույսի զարգացման տարրեր փուլերի հետ: Կիրառելով պոլիսախարիդների, գլիկոզների, թթու մուկոպոլիսախարիդների, ճարպերի որոշման համար հատուկ բջջաքիմիական մեթոդներ և դրանք համաեղևելով ֆերմենտներով (հիալուրոնիդազա, լիզոցիմ, պեպսին), մշակման մեթոդների հետ, հայտնաբերվել են որոշ օրինաչափություններ պալարաբակտերիաներում պոլիսախարիդների տեղաբաշխման վերաբերյալ: Այսպես, թթու մուկոպոլիսախարիդները տեղաբաշխված են կապսուլի ներքին մուսում, հիալուրոնաթթուն՝ բջջապատում, գլիկոզներ դիֆուզ կամ ներբջջապալազմատիկ հատիկավորումների ձևով բաշխված է բջջապալազմայում:

Առվույտի պալարիկներում պալարաբակտերիաների ձողաձև և բակտերոիդ ձևերի համեմատական բջջաբանական և բջջաքիմիական ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ բակտերոիդ բջիջների համար հատկանշական են մեծ չափերը, մեծ թվով նուկլեոիդները, վոլյուտինի հատիկներն ու ճարպասպիրտակուցային մարմնիկները, ինչպես նաև գլիկոզների բարձր պարունակությունը:

Առվույտի կոկոնակալման շրջանում պալարաբակտերիաների բջիջներում գլիկոզներ բացակայում է:

Պալարիկներում գտնվող պալարաբակտերիաները իրենց մաքուր կուլտուրաներից տարբերվում են կառուցվածքային ա-

ռանձնահատկություններով և պոլիսախարիդների ու մարգարտի-
տակուցային նյութերի ներքցային տեղաբաշխման բնույթով:

E. N. Avvakumova, L. N. Kats, M. G. Shamtsian

Cytochemical examination of the distribution of polysaccharides in nodule bacteria of plant nodules and in pure culture

Summary

Acid mucopolysaccharides, hyaluronic acid and glycogen have been found out in nodule bacteria of the alfalfa by cytochemical methods, peculiar to polysaccharides, glycogen, acid mucopolysaccharides, lipids etc. as well as by treating them with various enzymes (hyaluronidase, lysozyme and pepsin).

The bacteroid forms of nodule bacteria in plant nodule are distinguished by their large size, ramified form, a large number of nucleoids, volutinous granules and lipoprotein inclusions per bacterial cell with a higher content of glycogen.

During the budding period of the alfalfa, i. e. in time of the most intensive fixation of nitrogen, a regular absence of glycogen in bacteria is observed.

The nodule bacteria in pure culture are distinguished from bacteria in plant nodules by their cytological and cytochemical peculiarities.

ЛИТЕРАТУРА

- Имшенецкий А. А. 1961. Эволюция биологической фиксации азота. Сб.: V Международный биохимический конгресс, Симпозиум, 3, АН СССР, 141.
- Կաժ Լ. Ն. 1964. Цитологическое и цитохимическое исследование капсулы и оболочки клетки. «Микробиология», 33, 5, 836.
- Կաժ Լ. Ն., Волкова Н. А. 1966. Цитологическое и электронномикроскопическое исследование капсулы некоторых бактерий. «Микробиология», 35, 4, 660.
- Красильников Н. А. 1948. Определитель бактерий и актиномицетов. Изд. АН СССР.
- Պետրոսյան Ա. Ս. 1959. Экологические особенности клубеньковых бактерий в Армянской ССР. Сельхозгиз, Ереван.

- Петросян А. П., Аввакумова Е. Н. 1963. Цитохимические особенности клубеньковых бактерий: Материалы конф. по сельскому и почвен. микробиол. 2—6 окт. 1961, Ташкент, Изд. АН Узб. ССР, 205.
- Петросян А. П., Аввакумова Е. Н. 1964. О цитологических и цитохимических изменениях клубеньковых бактерий в клубеньках. ДАН Арм ССР, 39, 1, 49.
- Пешков М. А. 1955. Цитология бактерий. Изд. АН СССР.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия. ИЛ.
- Федоров М. В., Ласло Д. 1956. Азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий гороха и вики в клубеньках в разные фазы развития бобового растения. Изв. тимиразевск. сельхоз. акад., 2, 61.
- Almon L. 1933. Concerning the reproduction of bacteroides. Ztbl. Bact. Parasit. Abt. II, 87, 13/16, 289
- Bergersen F. I. 1955. The cytology of bacteroids from root nodules of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*). I. Gen. Microbiol. 13, 3, 411.
- Bergersen F. J. 1957. The occurrence of a previously unobserved polysaccharide in immature infected cells of root nodules of *Trifolium ambiguum* M. Austral. J. Biol. Sci., 10, 1, 17
- Golebiewska I., Sypniewska U. 1962. Studies on the development cycle of *Rhizobium lupini* in root nodules. Acta microbiol. polon. 11, 4, 313
- Heumann W. 1952a. Über das Abhängigkeits-verhältnis zwischen Hämoglobin-Stärke-Bakteroidvorkommen und Stickstoffbindung in den Wurzelknöllchen der Erbse. "Naturwissensch.", 39, 3, 67.
- Heumann W. 1952b. Über wesen und Bedeutung der Bacterioide in den Wurzelknöllchen der Erbse. "Naturwissensch.", 33, 3, 66.
- Humphrey B. A., Vincent I. M. 1959. Extracellular Polysaccharides of *Rhizobium*. I. Gen. Microbiol. 21, 3, 477
- Salton M. R. I. 1960. Surface Layers of the bacterial cell. The Bacteria, London, NY, 1, 97
- Virtanen A. 1945. Symbiotic nitrogen fixation. Nature, 155, 3947, 747