

PRODUCTION OF MICROBIAL PREPARATIONS: SYMBIOTIC BACTERIA OF LEGUMES AS AN EXAMPLE

Summary

In agricultural practice microbial preparations (inoculants) are used to control plant pathogens and pests (biological control), particularly in the integrated and ecological agriculture, and to stimulate growth and yields of crops. Inoculants containing symbiotic bacteria of legumes were used as an example to describe a technology of production of microbial bio-preparations. This technology includes the following stages: - collection of various microbial strains, - maintenance and quality testing of these strains, - proliferation of microorganisms and purity control, - preparation of carriers (powdered peat or brown coal), - mixing of bacterial cultures with carriers and packaging. In this review the importance of the purity control of bacterial cultures during the entire technological process has been emphasized.

WYTWARZANIE PREPARATÓW MIKROBIOLOGICZNYCH NA PRZYKŁADZIE BAKTERII SYMBIOTYCZNYCH ROŚLIN MOTYLKOWATYCH

Streszczenie

W praktyce rolniczej preparaty (szczepionki) mikrobiologiczne stosowane są przede wszystkim w ochronie roślin do ograniczenia rozwoju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), zwłaszcza w rolnictwie integrowanym i ekologicznym, oraz do stymulowania wzrostu i plonowania roślin. Na przykładzie szczepionek zawierających bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych opisano technologię wytwarzania biopreparatów mikrobiologicznych. Technologia ta obejmuje następujące etapy: - zgromadzenie kolekcji różnych szczepów drobnoustrojów, - kontrolowanie czystości i jakości tych szczepów, - wieloetapowe rozmnażanie mikroorganizmów i kontrolowanie czystości uzyskiwanej biomasy, - przygotowywanie nośnika (drobno zmielony torf lub węgiel brunatny), - mieszanie biomasy bakterii z nośnikiem i konfekcjonowanie szczepionki. W opracowaniu podkreślono konieczność kontrolowania prawidłowości przebiegu procesów rozmnażania bakterii, a zwłaszcza zachowania warunków sterylności w całym ciągu technologicznym.

1. Wprowadzenie

Ocenia się, że biomasa mikroorganizmów w glebach stanowi około 85% całej biomasy wszystkich organizmów żyjących w tym środowisku i aż 90% dwutlenku węgla (CO₂) powstającego w glebach ma pochodzenie drobnoustrojowe. Dane te świadczą o dużej aktywności metabolicznej i ogromnym znaczeniu mikroorganizmów dla większości procesów zachodzących w środowisku glebowym [2, 3, 6, 9, 10]. Do najważniejszych funkcji organizmów glebowych należą:

1. Rozkład i mineralizacja materii organicznej (resztek organicznych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego) [3, 9, 16]. W procesach tych oprócz mikroorganizmów ważną rolę odgrywa także fauna glebowa (dżdżownice, roztocza), która przyczynia się do rozdrabniania i mieszania tych resztek z glebą, w wyniku czego ułatwiany jest rozkład i mineralizacja materii organicznej przez mikroorganizmy, czyli bakterie i grzyby glebowe. Rozkład resztek organicznych jest bardzo ważny nie tylko ze względu na uwalnianie mineralnych form składników odżywczych, które stanowią ważne źródło pokarmu dla roślin uprawnych, ale również dlatego, że w wyniku procesów mikrobiologicznej transformacji materii organicznej tworzona jest próchnica glebowa, której zawartość w glebie jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o zdolności gleby do magazynowania wody i składników pokarmowych, a także o fizycznej strukturze (gruzełkowatość, wymiana gazowa) gleby.

2. Rozkład i detoksykacja różnych substancji zanieczyszczających gleby (ksenobiotyków) [10]. Udział w procesach

detoksykacji mają przede wszystkim mikroorganizmy glebowe. Ich niezwykle bogactwo, duża aktywność i zdolności przystosowawcze powodują, że nie tylko środki ochrony roślin, powszechnie stosowane w nowoczesnym, intensywnym rolnictwie, ale również inne substancje, np. zanieczyszczenia przemysłowe, ulegają mikrobiologicznemu rozkładowi do związków prostszych, na ogół mniej aktywnych biologicznie.

3. Kształtowanie właściwości fizycznych (warunki wodno-powietrzne) gleb [2, 4, 9, 16]. Udział mikroorganizmów w kształtowaniu właściwości fizycznych gleb polega przede wszystkim na przyczynianiu się do formowania gruzełkowej struktury gleby. Produkty przemiany materii, takie jak różnego rodzaju śluz wytwarzane przez bakterie oraz substancje produkowane przez strzępki grzybów, także mikoryzowych (glomaliny), przyczyniają się do zlepiania cząstek glebowych, czyli formowania się gruzełków glebowych, które korzystnie oddziałują nie tylko na rozwój korzeni roślin, ale także powodują zwiększenie odporności gleb na erozję wodno-powietrzną.

4. Ograniczanie rozwoju szkodników i patogenów roślin [1, 7, 9, 12]. Działalność ta związana jest przede wszystkim z występowaniem w glebie konkurencji, m.in. o pokarm, pomiędzy jej mieszkańcami, a także zjawiskiem antagonizmu i nadpasożytnictwa. Na przykład, wiele bakterii glebowych hamuje rozwój grzybów fitopatogennych produkując różnego rodzaju substancje antybiotyczne lub enzymy rozkładające strzępki grzybów. Z kolei niektóre grzyby glebowe mają zdolność pasożytowania na nicieniach i owadach.

5. Tworzenie układów symbiotycznych z roślinami [8, 11, 12]. Najlepiej znanym przykładem symbiozy mikroorganizmów glebowych z roślinami jest współżycie bakterii brodawkowych (rizobiów) z roślinami motylkowatymi. Wymiana składników odżywczych pomiędzy partnerami tej symbiozy odbywa się w brodawkach korzeniowych, w których bytujące tam rizobia przekazują roślinie motylkowatej azot (który pobrały z atmosfery) w zamian za cukry jako źródło energii niezbędnej bakteriom do przeprowadzania procesu redukcji azotu atmosferycznego. Proces ten jest więc bardzo korzystny zarówno z ekologicznego jak i rolniczego punktu widzenia. Uprawa roślin motylkowatych nie wymaga na ogół stosowania nawożenia azotowego. Innym rodzajem symbiozy jest mikoryza, czyli symbioza wielu gatunków grzybów glebowych z korzeniami roślin. W tym przypadku grzyb mikoryzowy nie ma zdolności do asymilacji azotu atmosferycznego, a jego współpraca z rośliną polega przede wszystkim na ułatwianiu partnerowi pobierania wody i soli mineralnych, a także na ochronie korzeni przed grzybami chorobotwórczymi. Mikoryza jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie; tworzą ją zarówno drzewa leśne (ekto-mikoryza) jak i rośliny zielne (endomikoryza), w tym większość roślin uprawnych.

Badania prowadzone od wielu dziesięcioleci nad wyżej wymienionymi zagadnieniami i procesami zachodzącymi w glebach przy udziale mikroorganizmów miały na celu nie tylko wyjaśnianie ich natury, często bardzo skomplikowanej, ale także aspekty praktyczne. W praktyce rolniczej preparaty (szczepionki) biologiczne stosowane są przede wszystkim w ochronie roślin do ograniczania rozwoju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), zwłaszcza w rolnictwie integrowanym i ekologicznym, oraz do stymulowania wzrostu i plonowania roślin. Chociaż zakres praktycznego wykorzystywania biopreparatów jest ciągle mały, ma on jednak tendencje wzrostowe. Przykładowo Tomalak [14] podaje, że w 2004 roku wartość rynku preparatów biologicznych (opartych na makroorganizmach i mikroorganizmach) stosowanych w ochronie roślin wyniosła tylko 2,1% wartości ogólnej rynku środków ochrony roślin, ale w roku bieżącym udział ten prognozowany jest na 4,4%. Wzrastające zapotrzebowanie na biopreparaty związane jest prawdopodobnie głównie z rozwojem proekologicznych metod uprawy roślin, w tym rolnictwa ekologicznego [5]. O ile rejestracja biologicznych środków ochrony roślin, zwłaszcza opartych na wirusach, bakteriach i grzybach, odbywa się prawie identycznie jak chemicznych środków ochrony, czyli wymagana jest szczegółowa ocena ich oddziaływań ekotoksykologicznych [14], o tyle wymagania te nie są stosowane w odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych rejestrowanych na potrzeby rolnictwa ekologicznego, m. in. jako środki poprawiające właściwości gleby. Wykorzystują to niektórzy producenci lub dystrybutorzy różnych biopreparatów wprowadzając na rynek w naszym kraju produkty, których jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia pozostawiania wiele do życzenia.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie zasad wytwarzania biopreparatów mikrobiologicznych i kontroli ich jakości, na przykładzie szczepionek zawierających bakterie symbiotyczne (rizobia) roślin motylkowatych.

2. Wytwarzanie preparatów mikrobiologicznych

Wdrożenie do produkcji każdego preparatu zawierającego mikroorganizmy (które najczęściej odbywa się po

wcześniejszym jego opatentowaniu lub zgłoszeniu wzoru użytkowego) wymaga wieloletnich badań laboratoryjnych i w warunkach „pół-techniki”, które obejmują zwykle następujące etapy [7, 8, 11, 12, 13, 17].

2.1. Zgromadzenie kolekcji czystych kultur mikroorganizmów

W przypadku bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych różnorodne szczepy tych bakterii wyodrębnia się najczęściej z brodawek korzeniowych wymienionych roślin. Czyste, czyli pozbawione innych drobnoustrojów, kultury wyodrębnionych bakterii należy następnie poddać identyfikacji w oparciu o cechy morfologiczne ich komórek i kolonii oraz właściwości fizjologiczno-biochemiczne lub wykorzystując do tego celu najnowsze techniki molekularne. W odniesieniu do rizobiów ważne jest również przeprowadzenie biotestów z roślinami motylkowatymi, w których określane jest powinowactwo wyodrębnionych izolatów do tworzenia układów symbiotycznych z poszczególnymi rodzajami tych roślin. Nie stwierdzono bowiem dotychczas występowania w glebach uniwersalnego gatunku bakterii symbiotycznych, czyli gatunku tworzącego brodawki na korzeniach wszystkich rodzajów i gatunków roślin motylkowatych. W tabeli przedstawiono nazwy występujących w naszych glebach rizobiów oraz roślin, z którymi tworzą symbiozę.

Tabela. Rodzaje oraz najważniejsze gatunki bakterii brodawkowych i rośliny, z którymi tworzą symbiozę
Table. Genera and main species of root-nodule bacteria and their hosts

Rodzaj/gatunek	Roślina-gospodarz
Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i>	
biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lathyrus, Lens</i>
" <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
" <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
Sinorhizobium	
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
Bradyrhizonium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lupinus</i>

Należy też zaznaczyć, że wymienione gatunki bakterii brodawkowych charakteryzują się dużą specyficznością symbiotyczną w stosunku do rośliny-gospodarza. Na przykład *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* tworzy symbiozę tylko z korzeniami koniczyny, a *S. meliloti* tylko z korzeniami lucerny. Z tego też powodu w praktyce szczepionki rizobiowe produkowane są oddzielnie dla każdej rośliny motylkowatej. We wspomnianych wyżej biotestach określa się również efektywność symbiotyczną poszczególnych izolatów, m.in. w oparciu o takie cechy jak wygląd i liczba brodawek na korzeniach czy aktywność enzymu nitrogenaza (ilość związanego azotu) [6]. Znajomość tych cech jest oczywiście bardzo ważna ze względów praktycznych, ponieważ do produkcji szczepionek rizobiowych wybierane są szczepy najefektywniejsze pod względem symbiotycznym. Zidentyfikowane i scharakteryzowane szczepy bakterii lub innych mikroorganizmów przechowywane są (w 4°C) na pożywkach agarowych, uformowanych w postaci skosów w probówkach laboratoryjnych. Utworzona

w ten sposób kolekcja, określana też jako kultury muzealne, wymaga ciągłej troski o zachowanie czystości i dobrej jakości zgromadzonych kultur mikroorganizmów. W ramach troski o dobry stan kolekcji konieczne jest na przykład okresowe, zwykle co 6 miesięcy, przeszczepianie czyli przenoszenie kultur drobnoustrojów na świeże pożywki, m.in. po to aby kultury te nie obumarły. Częste przeszczepianie mikroorganizmów na nowe podłoża hodowlane może powodować jednak pewne niekorzystne zmiany w ich fizjologii, a nawet morfologii. Aby temu zapobiec kultury drobnoustrojów można przechowywać również w zamrożeniu (krioprotekcja) w roztworze glicerolu lub w formie liofilizowanej biomasy (hodowli) mikroorganizmów. Każdy zakład zajmujący się produkcją preparatów mikrobiologicznych powinien posiadać taką kolekcję odpowiednich mikroorganizmów.

2.2. Rozmnażanie bakterii

Wytworzenie jakiegokolwiek handlowego preparatu z żywymi kulturami drobnoustrojów wymaga odpowiedniego ich rozmnożenia. Proces ten rozpoczyna się od wyboru z kolekcji szczepu o najkorzystniejszych cechach, w przypadku bakterii symbiotycznych będzie to zwykle izolat charakteryzujący się dużą efektywnością symbiotyczną i konkurencyjnością, czyli zdolnością do zasiedlania i indukowania brodawek na korzeniach rośliny motylkowatej. Kultura wybranego izolatu powinna być odmłodzona, tzn. przeszczepiona na świeży skos agarowy i po odpowiedniej inkubacji namnożona biomasa przenoszona jest ze skosu do jałowej pożywki płynnej znajdującej się w jałowej kolbie szklanej zamkniętej korkiem z waty. Kolba taka (np. o poj. 1 l zawierająca 300 ml pożywki) umieszczana jest zwykle na wytrząsarce w celu napowietrzania podłoża, co sprzyja szybkiemu rozmnożeniu się hodowanego mikroorganizmu. Sprzyja temu również prowadzenie hodowli w optymalnej temperaturze. Na przykład bakterie symbiotyczne rozmnaża się w temp. 28°C. Na tym etapie uzyskuje się tzw. „kulturę mateczną”. W kolejnych etapach chodzi o dalsze rozmnożenie mikroorganizmów w wyniku ich przenoszenia do pojemników hodowlanych (fermentorów) zawierających coraz większe objętości sterylnych pożywek. Liczba tych etapów uzależniona jest oczywiście od skali produkcji. Na przykład przy małej skali produkcji hodowla z kolby przenoszona jest w sposób jałowy do fermentora o poj. 5-10 l, a z niego do fermentora produkcyjnego o poj. 50-100 l. W przypadku niektórych biopreparatów, np. zawierających *Bacillus thuringiensis*, skala produkcji jest bardzo duża, z wykorzystaniem fermentorów o objętości 100 000 litrów [11, 12]. Fermentory są urządzeniami, w których rozmnażanie mikroorganizmów odbywa się w sposób kontrolowany, jałowy i optymalny. Częścią centralną fermentora jest zbiornik, najczęściej wykonany ze stali nierdzewnej, który wyposażony jest w agregaty umożliwiające wyjąłowanie wprowadzanej do niego pożywki płynnej oraz jej napowietrzanie i utrzymywanie stałej (optymalnej) temperatury w czasie całego procesu hodowlanego. Rozmnażanie mikroorganizmów w fermentorach trwa zwykle kilka dni i kończy się, kiedy gęstość hodowli osiąga 10^8 - 10^{10} komórek bakteryjnych w 1 ml pożywki. Bardzo ważną czynnością, od której zależy finalna jakość wytwarzanego biopreparatu jest kontrolowanie czystości hodowli mikroorganizmu na każdym z ww. etapów przenoszenia i powiększania objętości hodowli. Zakażenie hodowli rozmnażanego drobnou-

stroju innymi mikroorganizmami, np. w kulturze matecznej, może bowiem doprowadzić do zdominowania, a nawet całkowitego wyeliminowania z hodowli właściwego drobnoustroju w dalszych etapach. Jest to szczególnie ważne w przypadku takich bakterii jak rizobia, które charakteryzują się znacznie wolniejszym tempem rozmnażania (podziału komórek) niż inne bakterie, np. z rodzaju *Pseudomonas* lub *Bacillus*. W zależności od przyjętej technologii produkcji biopreparatu, uzyskana w fermentorze biomasa mikroorganizmów jest odseparowywana od płynu hodowlanego lub, jak to ma miejsce w przypadku szczepionek rizobio- wych, cała hodowla wykorzystywana jest w dalszym etapie produkcji, w którym następuje wymieszanie zawiesiny bakterii z nośnikiem.

Wcześniej wspomniano, że nie produkowane są szczepionki zawierające mieszaninę wszystkich gatunków bakterii symbiotycznych. Teoretycznie wytworzenie takiej szczepionki jest możliwe, ale w praktyce jest to bardzo trudne. Przede wszystkim, dlatego że nie można rozmnażać wszystkich tych bakterii jednocześnie, tzn. w mieszaninie, ponieważ prawie każdy gatunek ma inne wymagania pokarmowe i charakteryzuje się różnym tempem rozwoju (podziału komórek). Na przykład wszystkie gatunki z rodzaju *Bradyrhizobium* rozwijają się w pożywkach płynnych znacznie wolniej niż inne gatunki bakterii symbiotycznych i w związku z tym w hodowlach mieszanych zostałyby one zdominowane, a nawet wyeliminowane przez gatunki szybko rosnące [8, 11, 14, 16, 18]. To samo dotyczy wszystkich innych grup bakterii i grzybów. W tym miejscu należy poddać w wątpliwość rzetelność informacji podawanych przez producentów i dystrybutorów niektórych preparatów mikrobiologicznych znajdujących się aktualnie w handlu. Podaje się m.in., że preparaty te zawierają nawet 80 gatunków bakterii i grzybów, które dodatkowo należy samemu rozmnożyć! Prawidłowe rozmnożenie tylu gatunków w mieszance wydaje się bardzo mało prawdopodobne, tym bardziej że proponowana metoda rozmnażania tych mikroorganizmów nie zapewnia żadnych warunków jałowości, a więc i jakości, standaryzacji oraz bezpieczeństwa uzyskiwanego w ten sposób produktu.

2.3. Nośnik, jego przygotowanie i konfekcjonowanie

Większość biopreparatów mikrobiologicznych produkowana jest w postaci preparatów stałych, suchych (liofilizowanych) lub wilgotnych. Tylko nieliczne mają postać płynną. W obydwu przypadkach mikroorganizmy wymieszane są z nośnikiem, którego rolą jest zapewnienie możliwie jak najlepszych warunków do przeżywania mikroorganizmów w preparacie handlowym, oraz jak najefektywniejszego sposobu jego aplikacji. W przypadku szczepionek rizobio- wych liczne badania wykazały, że takie materiały jak drobno zmielony i odkwaszony torf lub pył węgla brunatnego są doskonałymi nośnikami, zapewniającymi nie tylko odpowiednie warunki do przeżywania bakterii symbiotycznych, ale także dobre przyklejanie się szczepionki do nasion roślin motylkowatych [11-18]. Małe porcje (100-500 g) zmielonego torfu lub pyłu węglowego umieszczone w woreczkach foliowych poddawane są następnie procesowi sterylizacji za pomocą promieni gamma lub w autoklawie, w celu wyeliminowania zanieczyszczających je drobnoustrojów. Wyjąłowane porcje nośnika zaszczipiane są w następnej kolejności małymi porcjami (15-30ml) hodowli bakterii symbiotycznych z fermentora i tak przygotowane porcje szczepionki po dokładnym wymieszaniu inkubowa-

ne są przez około 2 tygodnie w temp. 28°C w celu dalszego rozmnożenia się bakterii na nośniku. Po tym czasie kontrolowana jest jakość wybranych losowo porcji szczepionki z każdej partii produkcyjnej i jeśli spełniają one określone standardy, tzn. zawierają odpowiednio dużo bakterii symbiotycznych (10^8 - 10^9 komórek/g) i mało lub wcale drobnoustrojów zanieczyszczających, to takie szczepionki mogą być skierowane do handlu.

3. Podsumowanie

Na przykładzie szczepionek zawierających bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych opisano technologię wytwarzania biopreparatów mikrobiologicznych. Technologia ta obejmuje następujące etapy: - zgromadzenie kolekcji różnych szczepów drobnoustrojów, - kontrolowanie czystości i jakości tych szczepów, - wieloetapowe rozmnażanie mikroorganizmów i kontrolowanie czystości uzyskiwanej biomasy, - przygotowywanie nośnika (drobno zmielony torf lub węgiel brunatny), - mieszanie biomasy bakterii z nośnikiem i konfekcjonowanie szczepionki. W opracowaniu podkreślono konieczność kontrolowania prawidłowości przebiegu procesów rozmnażania bakterii, a zwłaszcza zachowania warunków sterylności w całym ciągu technologicznym.

4. Literatura

- [1] Deacon J.W.: Biological control of the take-all by *Phialophora radicola* Cain., EPPO Bull., 1976, 6(4) : 297-308.
- [2] Gajda A. et al.: Relations between microbiological and biochemical properties of soil under different agrotechnical conditions and its productivity. Polish J. of Soil Sc., 2000, 33 : 55-60.
- [3] Gajda A., et al. Soil quality evaluation of alternative and conventional management systems in the Great Plains. In: "Assesment methods for soil carbon", Eds. R. Lal et al., Lewis Publishers, New York, 2001, pp. 381-40.
- [4] Kandeke E., Murer E.: Aggregate stability and soil microbial processes in a soil with different cultivation. Geoderma, 1993, 56 : 503-513.
- [5] Kuś J., Jończyk K.: Rozwój rolnictwa ekologicznego w Polsce. J. Res. Applic. Agricult. Eng., 2009, 54(3) : 178-182.
- [6] Martyniuk S.: Systemy biologicznego wiązania azotu. Nawozy i Nawożenie 2002, 1 : 264-277.
- [7] Martyniuk S., Martyniuk M.: Selection and testing of microorganisms antagonistic toward *Cephalosporium gramineum*. Bulletin PAN, Biological Sciences, 2001, 49 (4) : 371-374.
- [8] Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M.: Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. Acta. Soc. Bot. Pol. 2005, 74 : 83-86.
- [9] Nannipieri P., et al.: Management od soil microbiota. In: "Biological Resource Management", Eds. Balazs E. et al., Springer, Germany, 2000, pp. 237-255.
- [10] Panhurst C.E., Rogers S.L., Gupta V.S.R.: Microbial parameters for monitoring soil pollution. In: "Environmental Biomonitoring", Eds. J.M. Lynch and A. Wiseman, Cambridge University Press, UK, 1998, pp. 46-69.
- [11] Report on expert consultation on legume inoculant production and quality control. FAO, Rome, 1991, pp. 1-145.
- [12] Sobiczewski P.: Bakterie wykorzystywane w produkcji roślinnej. W: „Biotechnologia roślin”, Ed. Maleszy S., PWN Warszawa, 2009, s.172-213.
- [13] Strzelec A.: Symbiotyczne wiązanie azotu. Cz. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki *Rhizobium* dla roślin Motylkowatych. Post. Nauk Roln., 1988, 4(88) : 17-30.
- [14] Stephens J.H.G., Rask H.M.: Inoculant production and formulation. Field Crop Res., 2000, 65 : 249-258.
- [15] Tomalak M.: Rynek biologicznych środków ochrony roślin i przepisy legislacyjne. Streszczenia – 50. Sesja Naukowa IOR, 2010, s. 44-45.
- [16] Tompson J.A.: Legume inoculant production and control. W: FAO Raport, Rome, Italy, 1991, pp. 15-32.
- [17] Vessey J.K.: Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Pant and Soil, 2003, 255 : 571-586.
- [18] Vincent J.M.: A manual for practical study of root-nodule bacteria., Blackwell Scientific Publicatins, Oxford, 1970.