

Sobre la presencia del *Azotobacter agilis* en Norte y Sud América

(Con 3 figuras)

Por SANTOS SORIANO (*)

I. — INTRODUCCIÓN

BEIJERINCK (1901), empleando el medio usado por WINOGRADSKY (1893) en su estudio sobre la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, y trabajando en condiciones de aerobiosis, descubrió la existencia de una nueva clase de bacterias provistas, al estado libre, de la mencionada propiedad, para las cuales creó el género *Azotobacter*. En él incluyó dos especies: *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter agilis*, el primero aislado de suelos y el segundo de agua de los canales de Delft, Holanda.

LIPMAN (1903-1904) en Norte América aisló de suelos dos nuevas especies: *Azotobacter Vinelandii* y *Azotobacter Beijerinckii*, el primero más parecido a *Azotobacter agilis* por la formación de un

(*) La primera parte de este trabajo fué efectuada por el autor, como becado de la FUNDACIÓN GUGGENHEIM, en el Laboratorio de Bacteriología agrícola, Escuela de Agricultura de la Universidad de Wisconsin, Madison, Wis. U.S.A. y en la FUNDACIÓN HOOPER, Escuela de Medicina de la Universidad de California, San Francisco, Cal., U.S.A. La segunda parte fué realizada en el Instituto Bacteriológico del Dep. Nac. de Higiene, Buenos Aires y en el Laboratorio de la Cátedra de Microbiología agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a las autoridades de la FUNDACIÓN GUGGENHEIM, y a los Profesores Dr. EDWIN B. FRED, Decano de la Escuela de Graduados de la Universidad de Wisconsin, Dr. KARL F. MEYER, Director de la FUNDACIÓN HOOPER, Dr. C. B. VAN NIEL, Jefe del Laboratorio de Microbiología de la Estación Marina de Hopkins, dependiente de la Universidad de Stanford, California, U.S.A. y Dr. ALFREDO SORDELLI, Director del Instituto Bacteriológico del Dep. Nac. de Higiene, Buenos Aires, por todas las facilidades que le fueron acordadas, en las citadas instituciones, para la realización del trabajo.

pigmento difusible amarillo verdoso, y el segundo más cercano de *Azotobacter chroococcum*. Otras formas de *Azotobacter* descriptas posteriormente fueron: *Azotobacter Woodstownii*, *Azotobacter hilgardii*, *Azotobacter smyrnii*, *Azotobacter vitreum* y recientemente *Azotobacter indicum* (STARKEY, 1939). A excepción, posiblemente, de la última, hoy día sólo son reconocidas generalmente como buenas especies las cuatro primeras mencionadas. Debe notarse sin embargo que en la última edición del libro de BERGEY (1939), *Azotobacter Vinelandii* aparece considerada como un sinónimo de *Azotobacter agilis*, sin aportar para ello mayores fundamentos y a pesar de las conclusiones en contra de esa opinión establecidas por los trabajos de KLUYVER y VAN REENEN y de WINOGRADSKY.

De todas las mencionadas, *Azotobacter chroococcum* es considerada como la especie más típica del grupo y tiene aparentemente una gran difusión en los suelos en la naturaleza. *Azotobacter Vinelandii* y *Azotobacter Beijerinckii* fueron también encontradas en los suelos pero no con la frecuencia del anterior.

En cuanto a *Azotobacter agilis*, su presencia pareció por mucho tiempo estar restringida al lugar de donde fué aislado la primera vez. KLUYVER, el sucesor de BEIJERINCK en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Politécnica de Delft, en unión con VAN REENEN (1933) aislaron nuevamente de aguas del mismo origen, nuevas cepas del microorganismo en cuestión, cuyo cultivo inicial había sido, según parece, perdido.

Los nuevos aislamientos carecían, sin embargo, de la propiedad de formar pigmento en los medios de cultivo, si bien todas las demás características eran iguales al organismo descrito por BEIJERINCK. Poco más tarde, el mismo KLUYVER, en unión con VAN DEN BOUT (1936) pudieron aislar, nuevamente, de aguas del mismo origen, cepas formadoras de pigmento, considerando entonces a la forma anterior como una variedad de ésta, y designándola con el nombre de *Azotobacter agilis* var. *atypica*.

Las recientes investigaciones de WINOGRADSKY (1938) efectuadas en aguas superficiales, en Francia, pusieron de manifiesto que *Azotobacter agilis* tiene una distribución mucho mayor de la que se le atribuía anteriormente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los del citado investigador con respecto a la amplia difusión de la especie mencionada en la naturaleza.

II. — MATERIAL Y MÉTODOS

Siendo *Azotobacter agilis* una bacteria que se encuentra en las aguas superficiales, como lo demostraron los trabajos de BELJERINCK, KLUYVER y colaboradores, y WINOGRADSKY, se utilizaron, para ponerlo de manifiesto, numerosas muestras de aguas de lagos, lagunas, ríos, canales, arroyos y charcos. Los ensayos efectuados se dividieron en dos partes: 1º) los realizados en Norteamérica con agua de los lagos Mendota (Madison, Wisconsin), Lowe Crystal Spring Reservoir y San Andrés Reservoir (San Francisco, California), U. S. A.; a los cuales se unió una muestra de barro activado y otra de agua de cloacas obtenidas de la planta de depuración de aguas de la ciudad de Madison, Wis.; 2º) los que se efectuaron en Buenos Aires, República Argentina, en que se utilizó muestras de agua de diversas lagunas, ríos, canales, arroyos y charcos recogidas en la provincia de Buenos Aires, especialmente en los alrededores de la ciudad del mismo nombre; se incluyó también en este caso una muestra de agua de cloacas de la ciudad y otra de barro activado preparado en el laboratorio.

Tanto en U. S. A. como en la Argentina fueron examinadas también diversas muestras de tierras con el objeto de comprobar la eventual presencia en las mismas del microorganismo buscado.

Debido a la insuficiente concentración en que las células de *Azotobacter agilis* se encuentran en los materiales examinados, no ha sido posible efectuar los aislamientos por siembra directa en los medios sólidos. Los cultivos de enriquecimiento se hicieron en el medio aconsejado por WINOGRADSKY para lo cual se empleó una solución cinco veces más concentrada que la fórmula simple siguiente: fosfato monopotásico 1 — fosfato bipotásico 0,2 — sulfato de magnesio 0,6 — cloruro de sodio 0,4 — cloruro férrico 20 % : 3 gotas — sulfato de manganeso 20 % : 2 gotas — solución húmica (según BURKE) : 2-3 gotas — agua 1 litro. La solución $5 \times$ se diluyó en la proporción de 1:4 en el momento de efectuar la siembra con la misma agua a examinar, la cual se utilizó en cantidad de unos 50 a 100 ml. Paralelamente a la anterior se empleó también una modificación de la fórmula original de WINOGRADSKY, en la cual, el cloruro férrico se reemplaza por una sal orgánica de hierro, a cuyo efecto se usó el citrato de hierro en escamas.

El estudio de la morfología se hizo: 1º) sobre las colonias en cajas de PETRI, observándolas con gran aumento, después de cubrirlas con un cubre-objeto; 2º) efectuando preparados de adhesión en cámara

húmeda por el método de HENNEBERG, y 3º) por coloración del material de los cultivos desarrollados en agar estría.

Los caracteres de los cultivos fueron estudiados en la forma corriente, usando en lo posible los métodos aconsejados por el Comité de Bacteriólogos Norteamericanos (S.A.B.). Especialmente fueron observados: 1º) los caracteres de las colonias en cajas de PETRI con agar de medio de WINOGRADSKY usando alcohol etílico, glucosa o manita, como fuente de carbono; 2º) las características del desarrollo en tubos de agar estría, y 3º) las del desarrollo en tubos de medio líquido de WINOGRADSKY.

De las características fisiológicas fué estudiada especialmente la capacidad de utilización de distintas fuentes carbonadas, en la forma aconsejada por WINOGRADSKY (1938) probándose las siguientes sustancias: alcoholes etílico y butílico, sales de calcio de los ácidos: acético, propiónico, láctico, butílico y benzoico y finalmente: glucosa y manita. Las sustancias mencionadas fueron agregadas a los medios básicos (líquido o agar lavado, minerales) en concentraciones de 0,3 - 0,6 %, para el alcohol etílico, 0,3 % para el alcohol butílico, butirato y acetato de calcio, glucosa y manita, y 0,2-0,25 % para el benzoato de calcio.

III. — RESULTADOS

La parte de los ensayos efectuados en U. S. A. (*) dió los resultados que se consignan en el cuadro N.º 1.

CUADRO N.º 1

Resultados de la investigación de Azotobacter agilis en aguas y tierras en U. S. A.

Origen de las muestras	Número de muestras examinadas	Número de muestras que dieron desarrollo de			
		<i>Azotobacter agilis</i>	<i>Azotobacter Vinelandii</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Otras especies de <i>Azotobacter</i>
Aguas de lagos ...	20	5	—	2	—
Agua de cloacas ..	1	1	—	—	—
Barro activado	1	—	—	—	1
Tierras	14	—	—	14	—

(*) Una noticia de esta parte de las experiencias apareció en *Science*, Vol. 89, N.º 2320, págs. 563-564, año 1939.

De las 22 muestras de aguas examinadas (incluyendo la de agua de cloacas y la de barro activado), 6 dieron desarrollo positivo para *Azotobacter agilis*. De la muestra de barro activado se consiguió aislar una forma semejante, aunque no idéntica, a *Azotobacter Beijerinckii* formadora de un débil pigmento anaranjado-rojizo no difusible. De las 14 tierras, ninguna dió positiva para la especie en estudio, aunque de todas pudo aislarse alguna de las formas identificables como *Azotobacter chroococcum*.

El resultado comparativo del empleo del medio de cultivo original dado por WINOGRADSKY, con cloruro férrico, y la modificación introducida en este trabajo usando en su reemplazo el citrato de hierro, puede verse en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 2

Comparación entre el medio original de Winogradsky y el medio modificado, para el enriquecimiento de *Azotobacter agilis*.

N°	Origen de las muestras	Medio original de Winogradsky	Medio modificado	Observaciones
1	Lago Mendota (Madison, Wis, U. S. A.) Muestra N° 1	—	+	Hay desarrollo antes en el medio modificado.
2	Idem, Muestra N° 2	+	+	
3	Idem, Muestra N° 3	—	+	
4	Agua de cloacas (Madison, Wis.)	+	+	Antes en el medio modificado.
5	Lower Crystal Spring Reservoir (San Francisco, California)	—	+	
6	San Andrés Reservoir (San Francisco, Calif.)	+	+	Antes en el medio modificado.

Número total de muestras examinadas en ambos medios: 22.

En el cuadro anterior se observa que el empleo del medio modificado permite comprobar la presencia de *Azotobacter agilis* en un mayor número de casos, como lo atestiguan las muestras N° 1, 3 y 5 en que se obtuvo un resultado positivo con el medio de citrato de hierro y negativo con el de cloruro férrico. Además en las muestras

Nº 2, 4 y 6, el desarrollo en los frascos de enriquecimiento fué visible siempre antes en el medio modificado que en el original.

Los resultados de los ensayos hechos en Buenos Aires, están resumidos en el cuadro Nº 3, donde puede verse que, de las 12 muestras de aguas, una de aguas cloacales y una de barro activado examinadas para la presencia de *Azotobacter agilis*, 11 resultaron positivas.

CUADRO Nº 3

Resultados de la investigación de *Azotobacter agilis* en aguas y tierras en Buenos Aires, República Argentina

Origen de las muestras	Número de muestras examinadas	Número de muestras que dieron desarrollo de			
		<i>Azotobacter agilis</i>	<i>Azotobacter Vinelandii</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Otras especies de <i>Azotobacter</i>
Aguas de lagunas, ríos, canales, arroyos y charcos ...	12	9	—	3	—
Agua de cloacas ..	1	1	—	—	—
Barro activado	1	1	—	—	—
Tierras	20	—	—	20	—

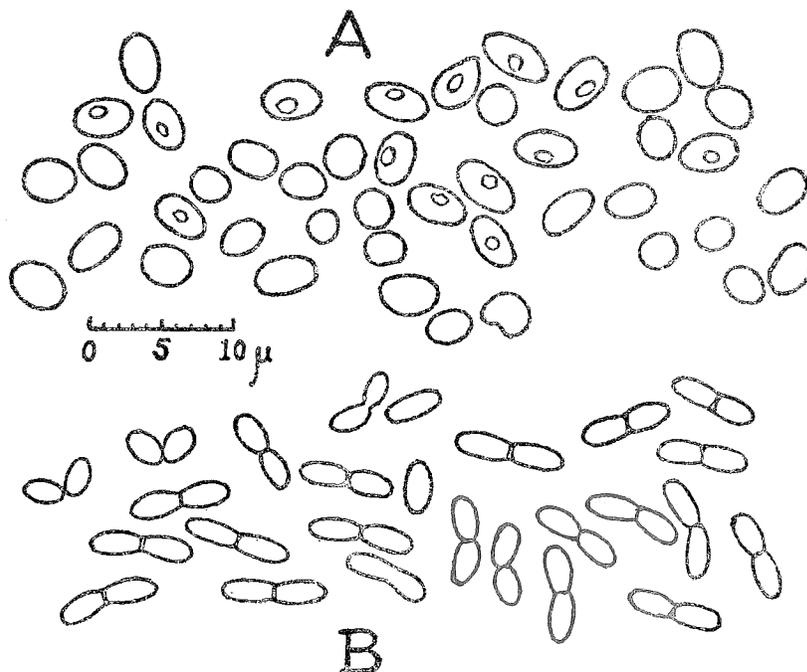
Ninguna de las 20 muestras de tierras estudiadas dieron desarrollo de *Azotobacter agilis*, si bien de todas, como en la experiencia hecha en U. S. A., logró aislarse algún representante de *Azotobacter chroococcum*.

En conjunto, de las 32 muestras de aguas superficiales examinadas en U. S. A. y en la República Argentina, 14, permitieron aislar el *Azotobacter agilis*.

De los distintos orígenes ya mencionados, lograron aislarse más de 50 cepas de bacterias identificables como *Azotobacter agilis*. A poco de avanzar en su estudio sistemático, pudo establecerse que existen por lo menos tres formas distintas de la mencionada especie, a saber:

- 1) La forma típica, formadora de pigmento difusible, bautizada originariamente como *Azotobacter agilis* por BEIJERINCK.
- 2) La forma atípica, no formadora de pigmento, considerada por KLUYVER y VAN DEN BOUT como una variedad de la anterior.
- 3) Una nueva forma, igualmente no generadora de pigmento, pero que se diferencia además de las dos anteriores por utilizar manita como fuente carbonada.

Pudo observarse también que existen en realidad numerosas formas algo distintas unas de otras, no sólo por sus caracteres morfológicos, sino también por poseer algunas de ellas un ligero pigmento no difusible, de tinte variado, generalmente grisáceo o rojizo. El estudio sistemático detallado de todas las cepas de *Azotobacter*, aisladas durante esta investigación, así también como el de las variaciones relativamente estables observadas durante el cultivo de las mismas, será objeto de una comunicación posterior.



A: *Azotobacter agilis*; B: *Azotobacter Vinelandii*. Dibujos hechos con cámara clara de cultivos efectuados en agar de Winogradsky con alcohol. Aumento $\times 2.000$.

Todas las cepas aisladas de aguas superficiales en U. S. A. correspondieron a las formas no generadoras de pigmento difusible, comprendidas en el 2º y 3º grupo, y sólo las aisladas de la muestra de agua cloacal resultó corresponder a la típica forma original descrita por BELJERINCK. En los ensayos hechos en Buenos Aires, pudo aislarse de nuevo la forma típica, no solamente partiendo de agua de cloacas, sino también de distintas muestras de aguas de lagunas, charcos, etc., y de una muestra de barro activado. Además se aislaron numerosas cepas no formadoras de pigmento.

La forma típica produce un característico pigmento de color amarillento-verdoso en los medios de cultivo y desarrolla bien en medios sólidos. En los cultivos viejos en agar estría se forma una

coloración violada que parece ser característica. Las otras formas presentan un desarrollo visiblemente menor en los medios sólidos y no producen en ellos el pigmento difusible; en medios líquidos suelen formar un débil pigmento dorado.

Las formas aisladas se caracterizan por su extrema movilidad, lo cual justifica plenamente la denominación específica de *agilis*; con frecuencia las células giran alrededor de un mismo punto, describiendo una circunferencia, que por su vertiginoso movimiento parece ser continua. Las células son de tamaño relativamente grande y aparecen como grandes cocos dispuestos en forma de diplococos muy poco más largos que anchos. Sus dimensiones, deducidas de ampliaciones fotográficas tomadas inicialmente con 200 diámetros, alcanzan a $2,4-3,0 \times 2,5-4,5 \mu$. Los cultivos usados para las mediciones fueron hechos en agar de WINOGRADSKY, con 1 % de agar, 0,5 % de alcohol etílico y solo una pequeña cantidad de creta.

Comparativamente a estos cultivos se estudiaron también dos cepas de *Azotobacter Vinelandii*: una proveniente del laboratorio del Profesor E. B. FRED, Departamento de Bacteriología Agrícola de la Universidad de Wisconsin, Madison, Wis. y otra del laboratorio del Prof. C. B. VAN NIEL, Hopkins Marine Station, Pacific Grove, California, U. S. A. (*). Ambos cultivos producen un fuerte pigmento fluorescente amarillo-verdoso y crecen muy bien en presencia de manita. Morfológicamente, aparecen como diploblastos alargados y el movimiento es más lento que el de *Azotobacter agilis*. Las dimensiones del cultivo de Wisconsin son de $1,4 - 1,8 \times 2,5 - 4,0 \mu$.

IV. — CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten deducir las conclusiones siguientes:

1. — La modificación del medio de WINOGRADSKY reemplazando el cloruro férrico por una sal orgánica como el citrato de hierro, ha resultado muy conveniente para la obtención de los cultivos de enriquecimiento de *Azotobacter agilis*.

2. — De 20 muestras de agua de lagos, examinadas en Norteamérica para la presencia de *Azotobacter agilis*, pudo ponerse de manifiesto dicho microorganismo en el 25 % de los casos, en la cantidad empleada de unos 50 a 100 ml. De 12 muestras de diversas clases de aguas examinadas en la República Argentina, con el mismo objeto, el 75 % dió resultado positivo. En conjunto, de las

(*) El autor agradece a los Profs. E. B. FRED y C. B. VAN NIEL, su gentileza, por haberle facilitado los mencionados cultivos.

32 muestras de aguas superficiales estudiadas, casi el 44 % demostró contener *Azotobacter agilis*, en el volumen examinado de 50 a 100 ml.

3. — La mayor parte de las cepas de *Azotobacter agilis* aisladas de aguas superficiales corresponden a la forma considerada como var. *atypica* por KLUYVER y VAN DEN BOUT. Ninguna de las cepas aisladas en Norteamérica del mencionado origen y sólo algunas de las aisladas en la República Argentina corresponden a la forma originariamente descripta por BELJERINCK.

4. — En las dos muestras de aguas cloacales examinadas fué encontrada la forma típica del *Azotobacter agilis* formadora de pigmento difusible. En una sola de las dos muestras de barro activado estudiadas se encontró también la forma típica de la mencionada especie.

5. — En ninguna de las muestras de aguas y tierras examinadas fué posible aislar *Azotobacter Vinelandii*; en base a este resultado, es presumible que la difusión de esta especie en la naturaleza sea muy limitada.

De algunas muestras de aguas superficiales fué posible aislar también *Azotobacter chroococcum* y de una muestra de barro activado estudiado en Norteamérica fué posible obtener una forma de *Azotobacter* semejante, aunque no idéntica, a *Azotobacter Beijerinckii*.

De todas las muestras de tierra examinadas en este trabajo se aisló invariablemente alguna de las formas de *Azotobacter* identificable como *Azotobacter chroococcum*; de ninguna de ellas pudo aislarse *Azotobacter agilis*; este último resultado confirma una vez más la naturaleza del «habitat» eminentemente acuático de la última especie mencionada.

6. — Además de la forma de *Azotobacter agilis* originariamente descripta por BELJERINCK, formadora de pigmento difusible y que no utiliza manita, y de la que fué considerada por KLUYVER y VAN DEN BOUT como *Azotobacter agilis* var. *atypica*, incapaz de formar pigmento pero que tampoco utiliza manita, se encontraron algunas cepas, estudiadas en este trabajo, no generadoras de pigmento difusible pero capaces de dar un buen desarrollo utilizando manita como fuente de carbono.

7. — *Azotobacter agilis* puede considerarse como una especie distinta de *Azotobacter Vinelandii*, a juzgar especialmente por sus caracteres morfológicos y sus dimensiones bien diferentes y algunas otras características secundarias, como el tinte adquirido por los cultivos envejecidos, violado en la forma generadora de pigmento

en *Azotobacter agilis* y amarillo-canario o verdoso en *Azotobacter Vinelandii*, y la forma particular del movimiento de sus células, mucho más activo en la primera de las especies nombradas.

V. — RESUMEN

Azotobacter agilis BEIJERINCK, es una bacteria aerobia capaz de fijar el nitrógeno atmosférico y que se encuentra habitualmente en las aguas superficiales. Fué descubierta por BEIJERINCK en 1901 en el agua de los canales de Delft, Holanda, después de lo cual no volvió a ser encontrada sino en 1933 y en 1936, años en que KLUYVER y VAN REENEN y KLUYVER y VAN DEN BOUT, respectivamente, lograron aislarla de nuevo del mismo lugar en que fué hallada por sus descubridores.

WINOGRADSKY en 1938, la aisló también de aguas superficiales en Francia. Hasta entonces es curioso que no haya sido aislada en otros lugares del mundo, a pesar de que debía presumirse su gran difusión en la naturaleza.

En 1938, utilizando las técnicas recomendadas por BEIJERINCK, por KLUYVER y colaboradores y especialmente por WINOGRADSKY, el autor del presente trabajo logró encontrar también *Azotobacter agilis* en U. S. A. en distintas muestras de aguas de lagos y en una muestra de aguas cloacales.

En este trabajo se comunica el hallazgo del *Azotobacter agilis* en la República Argentina, donde fué encontrado en numerosas muestras de aguas de ríos, lagunas, charcos, etc., recogidas en los alrededores de Buenos Aires y se compara la frecuencia con que los ensayos dieron resultado positivo en las experiencias efectuadas en Norteamérica y en la Argentina.

La técnica empleada en el presente trabajo consiste en la utilización del medio sintético recomendado por WINOGRADSKY, en el cual se usa alcohol etílico como fuente de carbono. Se modificó la composición original reemplazando el cloruro férrico por una sal orgánica como el citrato de hierro. El porcentaje de resultados positivos aumentó así en forma apreciable.

De 20 muestras de aguas de lagos, una muestra de aguas cloacales y una de barro activado, examinadas en Madison, Wis., y en San Francisco, California, U. S. A., sobre la presencia de *Azotobacter agilis*, 6 (27 %) dieron resultado positivo. De 12 muestras de aguas de ríos, lagunas y charcos, una de aguas cloacales y una de barro activado, examinadas en Buenos Aires, República Argentina, 11 (78 %) resultaron positivas. En total, de las 36 muestras exami-

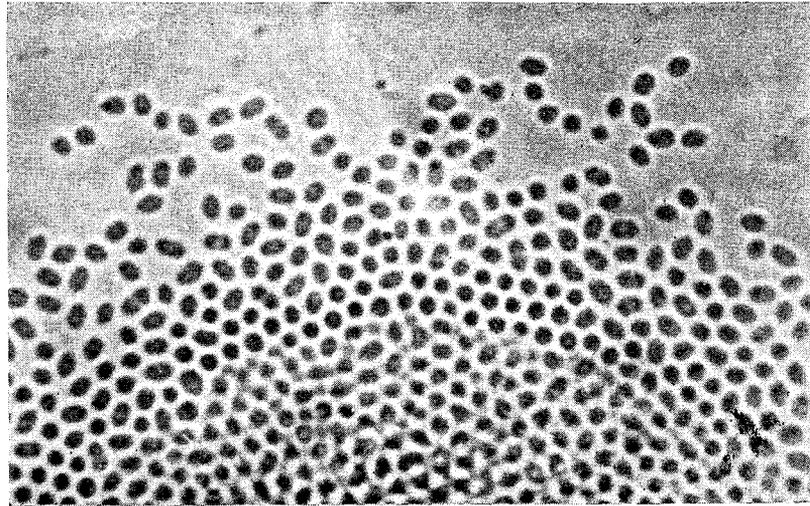


FIG. 1. — *Azotobacter agilis* Beijerinck. Borde de una colonia desarrollada en superficie en agar de Winogradsky con alcohol etílico. Aumento: $\times 1.000$.

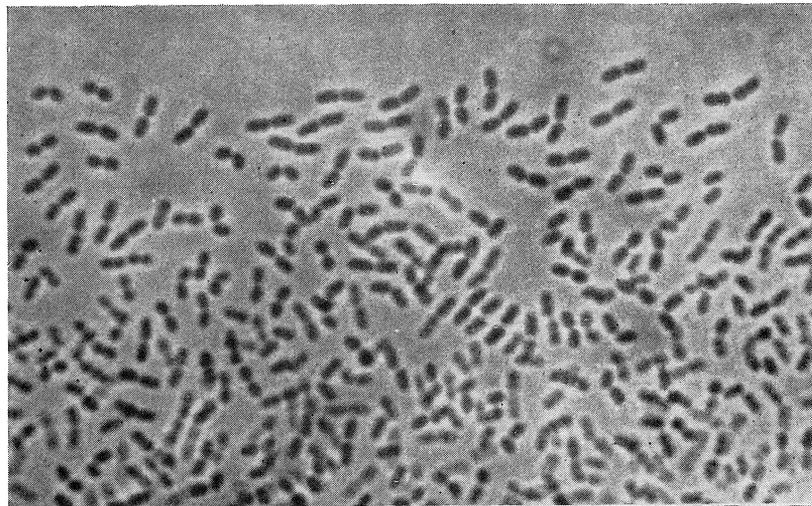


FIG. 2. — *Azotobacter Vinelandii* Lipman, cultivado en las mismas condiciones citadas en la leyenda de la fig. 1. Aumento: $\times 1.000$.

nadas, 17, o sea el 47,2 %, mostraron contener *Azotobacter agilis* en la cantidad examinada de 50 a 100 ml.

Además de la forma típica descrita por BEIJERINCK, productora del característico pigmento amarillo-verdoso, que luego se torna violado, fué encontrada con mayor frecuencia la forma no productora de pigmento denominada por KLUYVER y VAN DEN BOUT *Azotobacter agilis* var. *atypica*. Se encontraron, además, otras formas algo distintas de las anteriores, pero que pueden ser consideradas provisoriamente como pertenecientes a la misma especie.

Azotobacter agilis es una bacteria de tamaño grande ($2,4-3,0 \times 2,5-4,5 \mu$), no esporulada, que se reconoce fácilmente en los preparados microscópicos en vivo por su activa movilidad. La forma típica produce un pigmento difusible, aunque existen diversas otras formas que solo son capaces de producir débil pigmento o están totalmente desprovistas de esa propiedad. Se distingue con relativa facilidad de *Azotobacter Vinelandii*, la cual es una especie muy vecina, por la diferencia del ancho de sus células, que es en ésta bastante menor ($1,4-1,8 \times 2,5-4,0 \mu$). Se asemeja sin embargo a esta especie, y ha sido con frecuencia confundida con ella, por la producción del pigmento amarillento difusible.

En opinión del autor, *Azotobacter agilis* es una buena especie, y debe ser separada de *Azotobacter Vinelandii*, de la cual aparece como un sinónimo en la reciente edición del libro de BERGEY.

BIBLIOGRAFIA

- BEIJERINCK, M. W., 1901. *Zentralbl. f. Bakt.* II Abt. Bd. 7: 561-582.
- BERGEY D. H., R. S. BREED, E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS. 1939. *BERGEY'S, Manual of Determinative Bacteriology*.
- KLUYVER, A. J., and B. T. VAN DEN BOUT. 1936. *Arch. f. Mikrobiol.*, 7: 261.
- and W. J. VAN REENEN. 1933. *Arch. f. Mikrobiol.*, 4: 280-300.
- LIPMAN, J. G., 1903. *N. J. Agr. Exp. Sta. Ann. Report.* 24: 217-285.
- 1904. *Ibid.*, 25: 237-289.
- 1909. *Science.* 29: 941.
- and BURGESS, 1915. *Zentralbl. f. Bakt.* II Abt. Bd. 44: 504.
- LÖHNIS, E. und T. WESTERMANN. 1909. *Zentralbl. f. Bakt.* II Abt. Bd. 22: 234-254.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC. *Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria.* Geneva, N. Y.
- STARKEY, R. L. and P. R. DE. 1939. *Soil Sc.* 47: 329-343.
- WINOGRADSKY, S., 1893, *Compt. Rend. Acad. Sci.* 116: 1385-1388; 1894, 118: 353-355; 1894-5, *Ann. Sci. Biol.* 3: 297-352; 1902, *Centralbl. f. Bakt.* II, 9: 43-54, 107-112.
- 1938. *Ann. Inst. Pasteur.* 60: 351-400.