

ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ МОРФОЛОГИЧЕСКИ АТИПИЧНЫХ ФОРМ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

В. К. ШИЛЬНИКОВА, И. Ю. ИГНАТОВА, Г. А. КОТЛЯРОВА,
Н. Д. КОНСТАНТИНОВА

(Кафедра микробиологии ТСХА, Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР)

Биологическая фиксация атмосферного азота, в частности симбиотическая, является важным источником поступления азота в почву. Поскольку клубеньковые бактерии определяют в конечном счете эффективность симбиоза, исследование особенностей их индивидуального развития, в том числе полиморфизма, может стать теоретической основой управления их жизнедеятельностью при производственном культивировании.

Полиморфизм клубеньковых бактерий в значительной степени зависит от способов их существования в природе (сапрофитизм в отсутствие бобового растения и симбиотрофные взаимодействия с растением-хозяином).

В течение жизненного цикла клетки клубеньковых бактерий меняют форму и размеры. В основе активного симбиоза, а возможно, и нарушения дифференцировки клеток растения-хозяина, ведущего к неэффективному симбиозу, лежит явление последовательного воздействия на клетки растения форм клубеньковых бактерий, характеризующихся уникальными биохимическими и структурными особенностями. Так, в условиях активного симбиоза с растением-хозяином клубеньковым бактериям обычно присущи бактероидные формы. В условиях же сапрофитного существования и в период начала установления и завершения симбиотрофных взаимодействий клубеньковым бактериям, как правило, присущи палочковидные и кокковидные формы.

По данным многих авторов, бактероиды являются дефектными по клеточной стенке. Так, Джордан [16] указывает, что они могут быть получены путем блокирования хотя бы одного из этапов синтеза клеточной стенки. Исследуя механизм данного процесса, Джордан и Коултер [17] пришли к заключению, что ослабление ригидности клеточной стенки обусловлено снижением содержания в ней ионов магния и что следствием этого является образование вздутых и вяжущих при трансформации палочковидных форм клубеньковых бактерий в бактероиды. Понятия бактероиды и сферопласты они отождествляют. Люис [21] считает, что клетки клубеньковых бактерий, по-видимому, теряют способность к делению при сохранении способности роста, и именно это приводит к превращению их в раздутые бактероиды.

Бергерсен и Бриггс [9] обнаружили, что бактероиды клубеньковых бактерий сои в

искусственной среде вовсе не имеют клеточных стенок. Швингхаммер [28] предполагает наличие двух видов бактероидов: бактероидов-сферопластов с дефектом клеточной стенки, полученных в искусственных условиях под действием каких-либо ингибиторов, и истинных бактероидов, без дефекта клеточной стенки, полученных в естественных и искусственных условиях без воздействия ингибиторов. Как утверждает З. М. Яковлева [7], утолщение стеночных мембран у бактероидов, а также их отсутствие свидетельствуют о разной степени L-трансформации у клубеньковых бактерий при условии локализации их в ткани растений.

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению важнейших в симбиозе бактероидных форм, многие вопросы, в частности строение клеточной стенки, способность этих форм к репродукции, возможность их получения *in vitro* и т. д., все еще остаются не до конца ясными. Разноречивые данные существуют и по вопросу, связанному с судьбой бактероидов в ткани растения-хозяина. Наиболее вероятным на сегодняшний день фактом следует считать их превращение в кокковидные клетки при дегенерации клубенька. Есть мнение, что эта форма клубеньковых бактерий наиболее обычна для существования в почве [6]. Среди кокковидных вариантов особый интерес представляют мелкие элементарные формы. Их называют L-формами [10], гонидиями [18], фильтрующимися формами [8], артроспорами [6, 22].

Итак, в жизненном цикле клубеньковых бактерий существуют различные морфологические формы, физиологические проявления которых могут резко меняться как на разных стадиях своего развития, так и в зависимости от преобладающих внешних условий. Наличие разнообразных форм в цикле развития, несомненно, является одним из вариантов биологической реакции бактерий, способствующей выживанию и сохранению вида в условиях действия некоторых физических, химических и биологических факторов [3].

Поскольку клубеньковые бактерии длительно сохраняют свою жизнеспособность, несмотря на отсутствие у них спорообразования, можно предположить, что они должны иметь в онтогенезе формы, устойчивые к неблагоприятным факторам внешней среды. Такой способностью к перси-

стенции обладают *L*-формы, которые можно рассматривать как одну из форм, характеризующую возможность сохранения вида в природе.

В нашей работе ставилась задача получения различных морфологических атипичных форм клубеньковых бактерий, в том числе и *L*-форм, с целью их сравнения с аналогичными формами, встречающимися в природе.

Исследование *L*-форм представляет не только теоретический, но и практический интерес с точки зрения выяснения их роли в онтогенезе клубеньковых бактерий, а также установления возможности *L*-трансформации как механизма, определяющего способность к выживанию клубеньковых бактерий в почве.

Получение путем искусственных воздействий морфологически атипичных форм в свою очередь может пролить свет на природу устойчивости клубеньковых бактерий к неблагоприятным условиям почвы, на причины наблюдаемых некоторыми исследователями фактов высокой термостойкости клубеньковых бактерий, служит основанием для рекомендаций режима приготовления производственных бактериальных препаратов. Исследование особенностей морфологически атипичных форм может иметь значение и для выяснения их связи с естественными природными формами, такими как бактериоиды и артроспоры.

Разработка простых и надежных методов получения морфологически атипичных форм может также позволить решить ряд вопросов, имеющих большое практическое значение, например, выяснение устойчивости клубеньковых бактерий к фагам, воздействие которых, как известно, является чрезвычайно нежелательным при производстве нитрагина.

Способность к *L*-трансформации — свойство, присущее многим, если не всем видам бактерий [4]. Руководствуясь этой предпосылкой, мы попробовали воспроизвести процесс *L*-трансформации у клубеньковых бактерий. Первым этапом нашей работы явилась попытка получения *L*-форм с помощью классических для патогенных микроорганизмов приемов, которая для клубеньковых бактерий не дала положительных результатов [2]. Возможно, это связано с приспособленностью клубеньковых бактерий к метаболитам почвенных микроорганизмов, в частности к антибиотикам, вырабатываемым актиномицетами.

Образование *L*-форм связано с нарушением синтеза или разрушением муреиновой структуры клеточных стенок. В литературе имеются данные о *L*-трансформирующем действии некоторых аминокислот [12, 13, 26]. Так, воздействие глицина основано на замещении *L*-аланина в пептидной цепи мурамовой кислоты клеточной стенки [4]. Для клубеньковых бактерий глицин, вполне вероятно, может служить *L*-трансформирующим агентом, поскольку он содержится в значительных количествах в клеточном соке бобовых растений.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов были взяты следующие культуры клубеньковых бактерий: *Rhizobium leguminosarum* 245a и 2246; *Rhizobium meliloti* 441, 34 и L5-30; *Rhizobium lupini* 359 и 400.

Опыты проводили на среде Исварана [15] с содержанием агара 1,3%, так как *L*-трансформация происходит обычно в условиях полутвердых сред [20]. В качестве *L*-индуктора применяли глицин в концентрациях 4; 2; 1; 0,5; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,001%. Трехсуточную быстрорастущую и пятисуточную медленно растущую культуры высевали на чашки Петри со средой Исварана с перечисленными концентрациями глицина и культивировали в течение 1 мес при 28°. Кроме того, применяли раздельное и комбинированное воздействия лизоцима, пенициллина и глицина, вызывающие эффект индукции *L*-форм у некоторых грамположительных бактерий [23]. В этом случае концентрации были следующими: лизоцим — 1; 10 и 100 мкг/мл; пенициллин — 200; 500 и 1000 Ед/мл; глицин — 0,1; 0,2%. Поскольку образование сферопластов может предшествовать в определенных условиях процессу *L*-трансформации [4, 5], была предпринята попытка получения *L*-вариантов клубеньковых бактерий после стадии образования сферопластов, которые получали методами, разработанными Вейсом [25], Коном [19] и Мейером [24], в модификации С. Я. Дитяткина [1] для *E. coli*. Сферопласты клубеньковых бактерий штаммов 245a, 400 и L5-30 высевали на агаризованную (1,3% агара) среду Кларка и Мальфа [11] с градиентами концентраций глицина 0—0,3%; солевого стабилизатора в форме хлористого натрия 0—0,5%; нормальной лошадиной сыворотки 0—10%; пенициллина 0—100 Ед/мл и лизоцима 0—100 мкг/мл.

Подготовку чашек Петри со средой и высев полученных сферопластов проводили следующим образом.

В каждую чашку Петри стерильно вносили по 10 мл агаризованной (1,3% агара) среды Кларка и Мальфа, после чего ее немедленно (до застывания агара) ставили наклонно под углом 15° к горизонту. В оставшееся количество среды, соблюдая правила асептики, добавляли в соответствии с вариантами опыта указанные ниже *L*-трансформирующие средства воздействия. Затем в чашки Петри с застывшей агаризованной средой заливали по 10 мл среды с *L*-индукторами и ставили их горизонтально. Через 2—3 дня после подготовки среды на нее высевали свежеполученные сферопласты исследуемых штаммов и культивировали в течение 3 нед при 28°.

Варианты питательных сред приведены в таблице.

Контроль за изменением культуральных и морфологических признаков осуществляли ежедневно с помощью фазово-контрастной микроскопии (объектив 90×, окуляр 15×) на микроскопе марки Leitz.

Для электронномикроскопического исследования колонии, вырезанные с кусочками

**Питательные среды,
используемые для культивирования,
в процессе получения морфологически
атипичных форм клубеньковых бактерий**

Вариант среды	Основная среда Кларка и Мельфа	Пенициллин	Глицин	Лизоцим	Хлористый натрий	Нормальная лосадная сычужка
1	+	+	—	—	—	—
2	+	+	+	—	—	—
3	+	+	+	+	—	—
4	+	+	+	+	+	—
5	+	+	+	+	+	—
6	+	—	+	—	—	—
7	+	—	+	—	—	—
8	+	—	+	+	+	—
9	+	—	+	+	+	+
10	+	—	—	+	—	—
11	+	—	—	+	+	—
12	+	—	—	+	+	+

агара, фиксировали 2,5% глютаровым альдегидом на какодилатном буфере (рН 7,2) с 0,5 моль сахаразы и 0,01 моль $MgCl_2$ в течение 1 ч при 4°. Для получения большего контраста в фиксирующий раствор добавляли 0,5 мл 0,1% очищенного рутения.

Трижды отмытые в какодилатном буфере клетки фиксировали в 1% растворе OsO_4 на том же буфере с добавлением 0,5 мл 0,1% раствора рутения в течение 18 ч.

Вновь трижды отмытые какодилатным буфером клетки клубеньковых бактерий обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, а затем в абсолютном ацетоне. Обезвоженные клетки заключали в аралдит (фирма «Serva»).

Ультратонкие срезы клеток клубеньковых бактерий получали на ультрамикротоме III-LKB-8800. Съемку производили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100B.

При исследовании поверхности клеток клубеньковых бактерий и локализации поверхностных структур использовали метод сканирующей электронной микроскопии с применением микроскопов «Jeol (JSM-50A)» и «Hitachi».

Результаты и их обсуждение

При концентрации глицина от 0,5% и выше рост исследуемой культуры полностью подавлялся. Длительное пассирование на среде Исварана при концентрации 0,05 и 0,01% практически не ингибировало роста культуры и не вызывало существенных изменений культуральных и морфологических признаков.

Экспериментальным путем была выявлена оптимальная для L-индукции концентрация глицина — 0,1%. При пассировании же различных штаммов клубеньковых бактерий с возрастанием концентраций аминокислоты от 0,1 до 0,3% культуральные и

морфологические свойства клеток существенно не отличались от таковых в вариантах с концентрацией глицина 0,1%. Кроме того, нами была отмечена различная реакция исследуемых штаммов на L-трансформирующее воздействие глицина. Так, максимальные изменения культуральных и морфологических признаков происходили у штаммов 245а, 441, 400 и L5-30.

Через 2—3 недели после высева на среду Исварана с добавлением глицина (0,1%) на ее поверхности образовывались колонии, заметно отличающиеся по культуральным свойствам от обычных. Они имели уплотненный центр, однако не вступающий в агар, и ажурную периферию. У *Rhizobium leguminosarum*, штамм 245а, край колонии нечетко очерчен, как бы более разрежен по консистенции. Просматривалась гранулярная структура (рис. 1, а). Обычного для клубеньковых бактерий обилия слизи не было. Аналогичная картина наблюдалась для клубеньковых бактерий люпина, штамм 400 (рис. 1, в). Однако их колонии характеризовались более широкой периферической зоной, не имели слизистого покрова, в тонкодисперсной структуре этой зоны бессистемно располагались группы гранул. Результаты микроскопического анализа клеток из данных колоний показали наличие атипичных форм. У штамма 245а обнаружались клетки в виде разбухших ис-

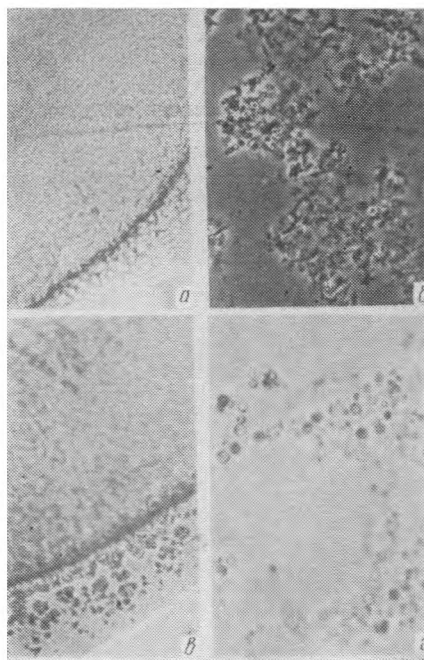


Рис. 1. Одномесячная культура клубеньковых бактерий гороха — штамм 245а (вверху) и люпина — штамм 400, на среде Исварана с 0,1% глицина. Фазовый контраст.

а, в — край колонии, $\times 100$; б — морфологически атипичные формы, $\times 900$; з — стадия незавершенной L-трансформации, $\times 450$.

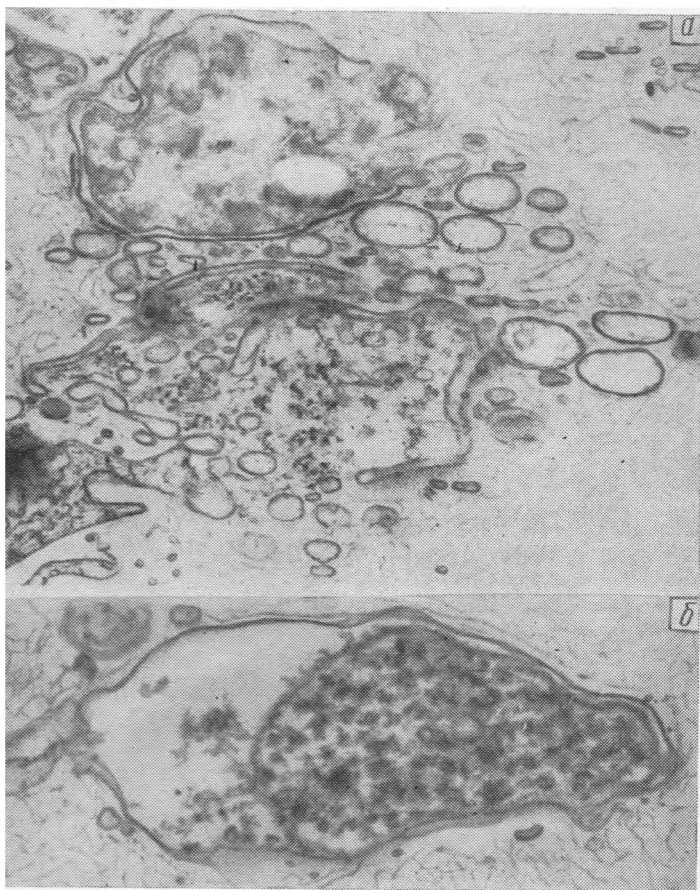


Рис. 2. Ультратонкие срезы однемесячной культуры клубеньковых бактерий на среде Исварана с 0,1 % глицина.
 а — гороха — штамм 245а; $\times 42000$; б — люпина — штамм 400, $\times 42000$.

кривленных палочек, шаровидные разных размеров и бесформенные (рис. 1, б). Более значительные изменения морфологии наблюдались у клубеньковых бактерий люпина, штамм 400 (рис. 1, г). В данном случае клетки имели выраженную шаровидную форму, характеризовались различной оптической плотностью. Палочковидные формы практически отсутствовали. Неодинаковая оптическая плотность структурных компонентов свидетельствует о разной степени лизиса в отдельных клетках бактериальной популяции. Такая морфологическая картина обычно наблюдается в процессе незавершенной *L*-трансформации.

Это подтверждают и результаты электронномикроскопических исследований (рис. 2, а, б). Клубеньковые бактерии как гороха, штамм 245а, так и люпина, штамм 400, имеют частично нарушенную клеточную стенку, у них идет процесс отслоения протопласта от клеточной стенки, происходит выброс мембранных структур, что характерно для начального этапа *L*-трансформации.

На рис. 3 представлены клетки клубеньковых бактерий гороха, штамм 245а, вы-

ращенные на среде Исварана с добавлением 0,1 % глицина. Снимки получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. На фоне искривленных палочковидных форм видна мелкая шаровидная клетка (рис. 3, а). Следует обратить внимание на формирование почки у делящихся клеток (рис. 3, б). Вероятной причиной отпочковывания является локальное ослабление клеточной стенки вследствие нарушения образования перегородок, связанное, по-видимому, с *L*-трансформирующим воздействием глицина.

Попытки получения последующих этапов *L*-трансформации с помощью глицина не дали положительных результатов. Не удалось и стабилизировать культуру исследуемых штаммов. Уже во 2-м пассаже мы наблюдали значительное угнетение роста клубеньковых бактерий. Введение в среду, содержащую глицин 0,5 % солевого стабилизатора в форме хлористого натрия и 10% нормальной лошадиной сыворотки также не влияло на характер роста и стабилизацию культуры.

Процесс реверсии проходил очень легко. Уже в 1-м пассаже у штамма 245а и во

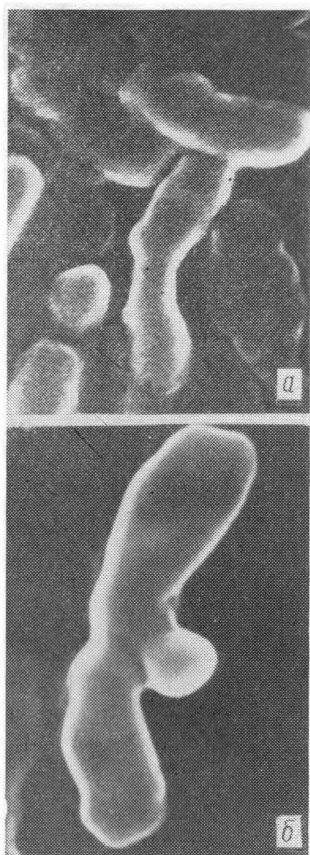


Рис. 3. Одномесячная культура клубеньковых бактерий гороха — штамм 245а на среде Исварана с 0,1 % глицина. Сканирующая микроскопия.

а — клетки палочковидной и округлой формы, $\times 6000$; б — отпочковывание клетки, $\times 18000$.

2-м пассаже у штамма 400 при исключении глицина из состава среды морфологически атипичные формы превращались в обычные палочковидные.

Муралитические ферменты, к которым относится лизоцим, способствуют образованию сферо- и протопластов. Этот процесс может привести в конечном счете к образованию *L*-вариантов бактерий [11]. В наших опытах комбинированное воздействие различных концентраций лизоцима, пенициллина и глицина либо приводило к полному ингибированию роста, либо не вызывало изменения культуральных и морфологических признаков исследуемых штаммов.

В варианте с градиентом концентраций пенициллина 0—100 Ед/мл мы не наблюдали угнетения роста ни у одного из исследуемых штаммов. Клетки по морфологии практически не отличались от интактных бактериальных форм. Это еще раз подтверждает, что пенициллин не вызывает

L-трансформирующего эффекта у клубеньковых бактерий.

В варианте с градиентом концентраций лизоцима 0—100 мкг/мл было отмечено незначительное угнетение роста популяции клубеньковых бактерий. При микроскопировании культур этого варианта обнаружено, что 70 % клеток популяции представляют собой сферические формы — сферопласты, 30 % — разбухшие палочки. Это говорит о том, что лизоцим также не оказывал *L*-трансформирующего эффекта на исследуемую культуру.

Наибольшие изменения морфологических и культуральных признаков были в вариантах с добавлением глицина. Имело место значительное угнетение роста культуры при увеличении концентрации этой аминокислоты (рис. 4, а). В зоне ингибирования наблюдали рост изолированных колоний с незначительным количеством слизи. При просмотре в фазовом контрасте край колоний был ажурным, структура колоний приобрела определенную «исчерченность», что подтверждало реакцию культуры на воздействие *L*-трансформирующих агентов. Микроколонии состояли из разбухших палочек, большого количества овоидов различных размеров и оптической плотности

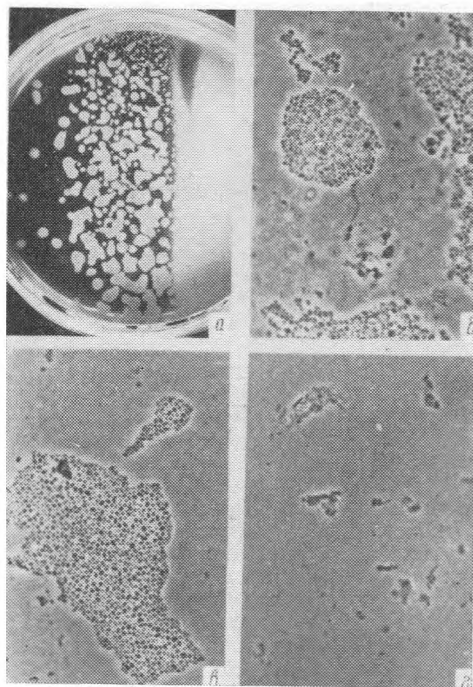


Рис. 4. Популяции клубеньковых бактерий гороха — штамм 245а и люпина — штамм 400 на минеральной среде с градиентом концентраций глицина от 0 до 0,3 %. Фазовый контраст.

а — характер ингибирования роста культуры на чашках Петри. Слошной рост переходит в рост изолированных колоний и заканчивается в зоне полного угнетения по мере увеличения концентрации глицина; б, в — микроколонии, состоящие из различных овоидов, $\times 450$; г — формы несбалансированного роста, $\times 450$.

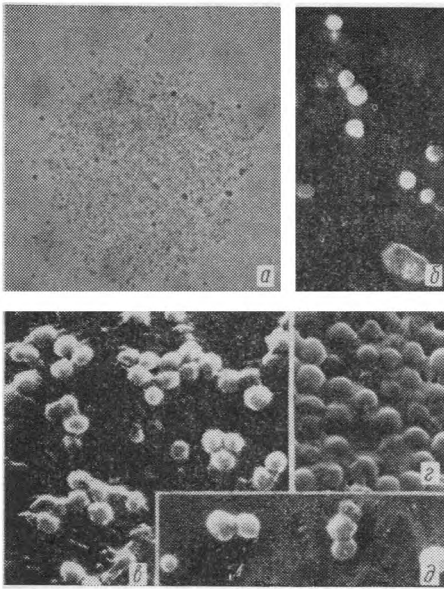


Рис. 5. Клубеньковые бактерии люцерны — штаммы L-5-30 (а) и 441 (б—д) на среде Кларка и Мальфа.

а — на среде с градиентом концентраций глицина от 0 до 0,3% и лизоцима от 0 до 100 мкг/мл. Фазовый контраст, $\times 900$; б—д — на среде с градиентами концентраций глицина от 0 до 0,3%. Сканирующая микроскопия, $\times 3000$ (в), $\times 2500$ (б, в, д).

(рис. 4, б, в). Добавление в состав среды солевого стабилизатора не влияло на морфологические и культуральные свойства культуры. Внесение же в среду нормальной лошадиной сыворотки, по-видимому, создавало благоприятные условия для реверсии (рис. 4, г). Совместное воздействие

лизоцима и глицина (среды 7 и 8) способствовало формированию очень мелких, едва различимых невооруженным глазом колоний, состоящих из мелкогранулярных элементарных форм (при просмотре в фазовом контрасте, $\times 900$; см. рис. 5, а).

При сканировании поверхности клеток аналогичных микроколоний клубеньковых бактерий люцерны, полученных при тех же условиях воздействия, четко просматривались сферопластоподобные формы различных размеров (рис. 5, б—д).

Попытки стабилизации сферопластоподобных и элементарных форм не привели к положительным результатам. Культуры-ревертаны были получены во 2-м пассаже в вариантах сред 5, 9 и 12 при выведении из их состава всех *L*-индукторов. А в вариантах 2, 6, 10 и 11 реверсия была достигнута лишь в 3-м пассаже. В остальных вариантах ее достигнуть не удалось. Как показали наши исследования, при изолированном и комбинированном воздействии ряда факторов, точка приложения которых — структуры клеточных стенок, можно получить более или менее значительные изменения структурной организации клубеньковых бактерий, обусловленные, вероятно, нарушением структур клеточной стенки. Такие изменения обычно сопутствуют образованию сферопластов под влиянием лизоцима, форм незавершенного цикла *L*-трансформации под влиянием глицина, элементарных форм при совместном воздействии лизоцима и глицина. Вместе с тем под воздействием группы факторов, которое в преобладающем числе случаев приводило к образованию *L*-форм большинства видов бактерий, получить стабильные *L*-варианты клубеньковых бактерий нам не удалось. По-видимому, это связано с особенностями пептидогликанового слоя у клубеньковых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дитяткин С. Я. Биологически активная ДНК λ . — ЖМЭИ, 1965, № 9, с. 6—10. — 2. Игнатова И. Ю. О возможности получения *L*-форм клубеньковых бактерий с помощью общепринятых *L*-трансформирующих средств воздействия. — Докл. ТСХА, 1980, вып. 263, с. 131—134. — 3. Пешков М. А. Сравнительная цитология сине-зеленых водорослей, бактерий и актиномицетов. М.: Наука, 1966. — 4. Тимakov В. Д., Каган Г. Я. *L*-формы бактерий и семейство *Mucorlosmataceae* в патологии. М.: Медицина, 1973. — 5. Федорова Г. И. Образование колоний из протопластов *V. megatherium*. — Микробиол., 1965, вып. 8, с. 36—39. — 6. Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. — 7. Яковлева З. М. Бактериоды клубеньковых бактерий. Новосибирск: Наука, 1975. — 8. Alton L., Baldwin I. L. — *J. Bacteriol.*, 1933, vol. 26, p. 229—234. — 9. Bergersen F. J., Briggs M. J. — *J. Gen. Microbiol.*, 1958, vol. 19, N 3, p. 482—490. — 10. Gabezas de Herrera E. — *An. Edafol.*

Physiol. Veg., 1956, vol. 15, p. 167—169. — 11. Clark D. T., Maalfe O. — *J. Mol. Biol.*, 1967, vol. 23, p. 99—112. — 12. Dienes L. — *J. Bacteriol.*, 1953, vol. 66, p. 274—278. — 13. Dienes L., Weinberger H. — *Bacteriol. Revs.*, 1951, vol. 15, p. 245—258. — 14. Gooder H. — In: L. Guze. Baltimore, 1968, p. 4. — 15. Iswaran V. — *Sci. a. Culture*, 1970, vol. 36, N 6, p. 316—319. — 16. Jordan D. C. — *Bacteriol. Revs.*, 1972, vol. 26, N 2, p. 119—141. — 17. Jordan D. C., Coulter W. H. — *Canad. J. Microbiol.*, 1965, vol. 11, N 4, p. 709—720. — 18. Kaš V. — *Zbl. Bakteriöl., Parasitenkunde, Infektionskrankh. u. Hyg.*, 1928, Abt. 2, Bd 76, N 8/14, S. 260—270. — 19. Kohn A. — *J. Bacteriol.*, 1960, vol. 79, p. 697—706. 20. Landman O. E., Ginoza H. S. — *J. Bacteriol.*, 1961, vol. 81, p. 875—881. — 21. Lewis J. M. — *J. Bacteriol.*, 1938, vol. 35, p. 573—578. — 22. Löhnis F., Hansen R. — *J. Agric. Res.*, 1921, vol. 20, N 7, p. 543—551. — 23. Madoff S., Burke M. E., Dienes L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*,

1967, vol. 143, p. 755—759.—24. Meyer R., Mackal R., Tao M., Evans E. — J. Biol. Chem., 1961, vol. 236, p. 1141—1143. — 25. Richard L. Weiss. — J. Bacteriol., 1976, vol. 128, N 2, p. 668—670. — 26. Rubio-Huertas M., Gonzales-Vaz-gues C. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, vol. 79, p. 626—634. — 27. Ryter A., Kellenberger E., Birch-Ander-sen A. — Naturforsch., 1958, Bd 13, S. 597—598. — 28. Schwinghamer E. A. — Canad. J. Microbiol., 1968, vol 14, p. 355—361.

Статья поступила 10 августа 1981 г.

SUMMARY

Under isolated or combined action of a number of L-inductors on nodule bacteria in vitro, morphologically atypical forms have been obtained which are versions of different stages of L-transformation process: spheroplast—under the action of lysozyme; forms of incomplete L-transformation process—under the action of glycine, elementary structures—under combined action of lysozyme and glycine. The methods of obtaining the mentioned forms are described in details.