



О.И. БЕРШОВА

микро
ЭЛЕМЕНТЫ
и
ПОЧВЕННЫЕ
микро
Организмы



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
им. Д. К. ЗАБОЛТНОГО

О. И. БЕРШОВА

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ И ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ



НИКОВА
ДУК

КИЕВ — 1967

Монография посвящена выяснению действия микроэлементов на почвенные микроорганизмы (бактерии, актиномицеты, грибы), изменению их количества в почве, а также морфолого-функциональным особенностям и влиянию этих изменений на высшие растения. Показано действие микроэлементов на образование биологически активных веществ — витаминов группы В, гетероауксина.

Рассчитана на микробиологов, химиков, агрохимиков.

Ответственный редактор *Л. И. Рубенчик*

ВВЕДЕНИЕ

Одним из интересных и важных разделов современной биологии является изучение особой роли физиологически активных веществ, действующих в биологических процессах в ничтожно малых количествах и необходимых для возникновения определенных процессов в клетках живых организмов.

К этой категории веществ можно отнести и микроэлементы, основываясь на их способности активизировать сложные биопроцессы растительного и животного мира.

Обычно микроэлементы (Mn, B, Cu, Mo, Zn, Co, Fe, J) входят в состав клеток живых существ в очень малых количествах и необходимы им для определенной функциональной деятельности, а в некоторых случаях — и для существования. Большинство из них находится в составе ферментативных систем организмов, играя важную роль в жизнедеятельности растений и животных.

Проявление положительного действия микроэлементов на рост и продуктивность сельскохозяйственных растений послужило основанием для использования их в сельском хозяйстве в качестве микроудобрений. Применение таких микроудобрений, в состав которых входят металлы Mo, Mn, B, Cu, Zn, имеет практически важное значение в народном хозяйстве страны и способствует повышению урожайности многих сельскохозяйственных растений и улучшению качественного состава продукции растениеводства. Применение микроэлементов в животноводстве и птицеводстве обеспечивает устранение ряда заболеваний животных и повышает продуктивность этой отрасли сельского хозяйства.

Широкий размах химизации земледелия в СССР требует расширения производства и применения микроудобрений, которые, не заменяя минеральных удобрений, характеризуются особой специфичностью действия — повышением биохимической активности организмов (Пейве, 1963).

Значительная роль микроэлементов в сельском хозяйстве и все растущие масштабы их применения выдвигают вопрос всестороннего изучения механизма их действия для рационального использования.

Значение микроэлементов в жизни растений, животных и человека выяснилось в должной степени только в последние десятилетия. Еще недавно считали, что для нормального существова-

ния организмов достаточно основных четырех элементов: углерода, водорода, кислорода, азота — так называемых органогенов, а также некоторых зольных элементов — Ca, K, Mg, P, S, Fe. Все же остальные элементы, находимые при анализах в составе клеток, считались случайными, поступившими в организм с потребляемой водой.

Однако усовершенствование метода анализа малых количеств различных элементов, методов очистки солей и сред для искусственного выращивания растений и микроорганизмов, а также применение радиоактивных изотопов привело к критике установившихся взглядов и накоплению данных, показывающих необходимость для нормального функционирования организмов еще многих, кроме перечисленных, элементов. К числу таких в первую очередь были отнесены Mn, B, Zn, Cu, а затем ряд других (Mo, Co и другие).

Работы В. И. Вернадского (1940) и А. П. Виноградова (1952) показали, что в составе клеток живых существ содержится большинство известных химических элементов, связанных непосредственно с жизнедеятельностью клетки. Позже работы ряда ученых многих стран подтвердили, что каждый из этих элементов выполняет ту или иную функцию в жизни организма. Особое действие микроэлементов на обмен веществ организмов отмечено буквально во всех областях биологии: у высших растений и микроорганизмов, животных и человека.

Существует огромное, все увеличивающееся количество работ как советских, так и зарубежных авторов, посвященных микроэлементам. Однако значительная часть этой литературы содержит главным образом констатацию их действия, значения для разных организмов и указывает на практически полезные результаты, полученные от их применения во многих областях народного хозяйства. Что же касается раскрытия роли микроэлементов в различных биопроцессах, механизма их влияния на клетку, то данный вопрос не вполне выяснен. Только в последние годы исследователи начали интересоваться теоретической основой действия микроэлементов, поскольку современное состояние уровня наук (биологии, биохимии, физики, физико-химии), в аспекте которых проходит изучение микроэлементов, таково, что позволяет проводить более углубленное, комплексное исследование и разработку теоретических основ данного вопроса. Знание же путей действия микроэлементов даст возможность сознательно управлять ими в обмене веществ живых организмов.

В литературе разных стран эти элементы, необходимые для живых организмов в ничтожно малых количествах, называют различно: микроэлементы, trace elements, oligoelement, micronutrient, microelement, rare element, minor element. Употребляемая терминология отражает их свойства действовать в низких концентрациях и быть необходимыми в питании организмов.

Однако в последнее время в связи с открытием их роли в важных биологических процессах начинает исчезать первоначальное значение данного термина и возникает его новый смысл. Так, этим термином подчеркивается не столько количественное содержание химического элемента, сколько его эргический характер, поскольку особенности действия микроэлементов в физико-биологических процессах проявляются в том, что они своим участием существенно влияют на течение этих процессов как биохимические активаторы. Поэтому, по мнению некоторых авторов, «микроэлемент» по существу своему является понятием биологическим или физиолого-биохимическим (Троицкий, 1960).

Действие микроэлементов служит интересным примером того, как отдельные минеральные элементы уподобляются или несут функции сложных органических соединений с высоко специализированным действием в живой клетке.

Повышение урожая при применении микроэлементов обычно связывают с их влиянием на растения. Многочисленные работы физиологов растений подтверждают это положение. Однако при оценке такого действия не принимается во внимание другой важнейший фактор среды, в которой произрастают растения, — микроорганизмы. Не учитывается взаимосвязь их и изучаемого организма, несмотря на то, что в данное время взаимное влияние низших и высших растений показано многими исследователями. Таким образом, в данном случае не принимается во внимание один из важнейших факторов, влияющих на рост и развитие растений.

Плодородие почвы в определенной мере зависит от обитающей в ней микрофлоры. Еще основоположники научного почвоведения Докучаев и Костычев, а затем и многие другие придавали особое значение биологическим факторам (растениям и микроорганизмам) в процессах почвообразования. Исследования последних десятилетий в области почвенной микробиологии показали не только правильность положений этих ученых, но значительно расширили и углубили первоначальное представление о роли микроорганизмов в создании почвенного плодородия.

Как известно, в почве широко распространены многочисленные и разнообразные группы микроорганизмов: бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей, дрожжей, простейших и других. Все эти группы в проявлениях своей жизнедеятельности активно участвуют в почвенных процессах. Количество их велико: в 1 г некоторых почв находятся миллиарды клеток. Эта огромная, населяющая почву биомасса обладает высокой биохимической активностью. Непрерывно синтезируя и разлагая большие количества разнообразных органических и минеральных веществ, эти микроорганизмы обогащают почву продуктами метаболизма.

Изучению взаимоотношений высших растений и микроорганизмов посвящены многочисленные работы, в той или иной мере касающиеся отдельных вопросов этой проблемы (Lochhead a. Burton, 1953; Березова, 1953, 1953а; Доросинский, 1953; Мишустин, 1954, 1956; Красильников, 1958; Смалий, 1963).

В ризосфере растений отмечено большое количество микроорганизмов. Скопление их в зоне корней объясняется определенными взаимоотношениями с высшими растениями. Как установлено, в процессах роста корни выделяют различные органические и минеральные соединения (сахара, органические кислоты, спирты, альдегиды, витамины, аминокислоты, фосфатные и азотные соединения). Эти вещества могут служить источниками питания почвенных микроорганизмов, способствуя их активному развитию вокруг корней. Кроме того, микроорганизмы используют отмершие ткани растений (корневые волоски, клетки эпидермиса и др.). В свою очередь микроорганизмы играют важную роль в питании растений, подготавливая и снабжая их основными и дополнительными продуктами.

Микрофлора, осуществляя распад и синтез многочисленных органических и минеральных веществ в почве, обуславливает круговорот основных биогенных элементов (N, C, P, S, Fe). Эти процессы, возникающие в результате деятельности различных групп микроорганизмов со специфическими (нитрифицирующие, азотфиксирующие), а также неспецифическими функциями, широко распространены в почве.

Во всех этих процессах промежуточные и конечные формы некоторых образующихся веществ служат как непосредственными продуктами питания растений, так и переходными формами к последующим, также нужным для растений соединениям.

Непосредственно действующим на растения началом в почве является группа биотических веществ, в большинстве своем образующихся микроорганизмами. К таким относятся ферменты, витамины, ауксины, гормоны, аминокислоты, пуриновые основания, пигменты и другие вещества. О наличии этих веществ в почве, их усвоении и определенном действии на растения свидетельствуют работы Локхеда (Lochhead a. Burton, 1953), Красильникова (1958), Смалия (1963). Микрофлора, образующая биотические вещества, разнообразна, и почти каждый вид ее синтезирует то или иное из этих веществ. Развиваясь и продуцируя эти соединения, микроорганизмы активируют рост и другие жизненные процессы растений. В почве происходит непрерывный обмен этих веществ, разрушаемых и заново синтезируемых различными микроорганизмами.

Из сказанного видно, какую огромную роль играют микроорганизмы в плодородии почвы и какие сложные взаимоотношения существуют между ними и растениями.

Микроорганизмы, как и высшие растения, реагируют на внесение в почву удобрений, органических и минеральных. Увеличивается их число — усиливается активность. Внесение микроудобрений, являющихся биостимуляторами, не может не действовать непосредственно на микрофлору почвы, усиливая ее размножение и биологическую активность. Интенсификация же разнообразнейших биопроцессов в свою очередь положительно отражается на произрастании высшего растения.

Таким образом, положительное действие микроэлементов на растение может возникать как результат косвенного их действия, изменяющего активность микрофлоры.

Не исключая возможного прямого действия микроэлементов на растения, мы останавливаем внимание на этой, мало известной взаимосвязи, проявляющейся между микроэлементами, микроорганизмами и растениями.

Данная работа посвящена вопросу действия микроэлементов на микроорганизмы, в частности на микроорганизмы ризосферы сельскохозяйственных растений. В ней уделено особое внимание изучению взаимосвязи между микроэлементами, микроорганизмами и высшими растениями.

ЧАСТЬ I

РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Разнообразие сфер действия микроэлементов, их многогранное влияние на физиологические функции растительных и животных организмов объясняется многими исследователями их участием в тонких реакциях клеточного обмена, главным образом в ферментативных процессах.

Поэтому в последние годы работа над объяснением действия микроэлементов переходит в область биохимии и физической химии. Новейшие приемы исследований металлоферментов, применяемые в последнее время (спектрофотометрия, спектрография, полярография, диализ, электронная оптика, изотопы и др.), дали убедительные доказательства каталитического действия металлов в ферментах.

В этих исследованиях приводятся различные объяснения действия металлов, причем авторы используют в качестве тест-объектов для наблюдения ферментных реакций наравне с растительными тканями микробные популяции. Эти наблюдения производятся как с клеточным материалом, так и с внеклеточными суспензиями. Как следствие многочисленных исследований в этой области появились в печати не только статьи, но и большие работы обзорного порядка, касающиеся роли металлов в отдельных ферментных системах и в группах ферментов. На основании этих работ становится ясной роль металлов в жизни клетки, тесно связанная с их каталитическим действием в ферментах.

К таким обзорам, посвященным общим вопросам катализа ферментов металлами и рассмотрению их действия в различных реакциях, относятся работы Неджера (Najjar, 1951), Макэльской и Незона (McElroy a. Nason, 1954), Незона (Nason, 1958). Другие авторы изучают действие отдельных металлов в определенных группах ферментов. Так, Велли (Vallee, 1955, 1960) рассматривает возможности вхождения цинка в металлоферменты. Николас (Nicholas, 1957, 1957a) делает обзор функций металлов в флавопротеинах и метаболизме азота у растений. Работа Ларди (Lardy, 1951) посвящена вопросу действия металлов в реакциях с фосфатами, Зингера и Кирнея (Singer a. Kearney, 1954) — в

окислительных металлоферментах. Гард и Вилькоккс в большом обзоре (Gurd a. Wilcox, 1956) сообщают об особых комплексных образованиях между металлопротеинами, пептидами и аминокислотами.

Некоторые авторы сосредоточивают свое внимание на вопросах действия металлоферментов в области биохимии растений. К таким относятся работы Власюка (1952, 1962), Власюка и его сотрудников (1960, 1961, 1964), Школьника (1960, 1963, 1964), Хьюитта (Hewitt, 1951), Шаррера (Schagger, 1955).

Действию микроэлементов на микроорганизмы посвящены обзоры Левалли, Старки (Lavollay, 1955; Starkey, 1955).

Заслуживают должного внимания интересные работы Пейве (1960, 1961, 1961a, 1963, 1965), где автор систематизировал данные о микроэлементах, участвующих в ферментах, а также данные об участии микроэлементов в изменениях органических и минеральных веществ почв.

Сведения о практическом значении микроэлементов в жизни растений и животных обобщены в монографии Стайлса (1949).

Многочисленные литературные данные и широкий размах работ по микроэлементам как в СССР, так и за рубежом убеждают в том, что изучение металлоферментов и других органических комплексных соединений с металлами является в настоящее время одной из интереснейших проблем биохимии и физиологии низших и высших растений.

РОЛЬ МЕТАЛЛА В ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМАХ

Изучение роли металла в ферментных системах шло в двух направлениях. Представители первого направления — Варбург и Кристиан (Warburg a. Christian, 1943) и другие — старались познать действие металла, применяя в исследовании ряд веществ-ингибиторов, тормозящих его влияние в системе ферментов. Степень этого торможения, а также природа ингибитора давали возможность судить о роли металла. Однако выводы из этих исследований делались на основании логических рассуждений и априорных заключений, что является недостатком данного метода.

Другим направлением является исследование в области химии белков. Благодаря новым методам стала возможной изоляция высокоочищенных протеинов, однородных по физиологическим критериям, что в свою очередь дало возможность исследовать также и металл, тесно соединенный с ними и содержащийся обычно в определенных количествах на единицу протеина. В табл. I приведены примеры количественного содержания металла, связанного с протеином. Наиболее хорошо изучены по отношению к определенным ферментным системам железо, медь, марганец и в последнее время цинк, молибден и кобальт.

Т а б л и ц а 1
Количество металла в протеине (по Vallee,
1955)

Протеины	Металл	В мкг на г протеина
Гемоцианин	Cu	2450
Цитохром С	Fe	4300
Альдегидоксидаза	Mo	160
Ксантинооксидаза	Mo	300
Аргининтрансфосфорилаза	Mn	2670
Алкогольдегидрогеназа	Zn	180

Положение о металлах как катализаторах ферментных реакций исходит из ранней концепции металлических катализаторов в химических реакциях. Однако когда металл соединяется непосредственно с белковой частью фермента (с молекулой или частью молекулы), что определяет специфичность катализа, тот же процесс идет несравненно активнее. Таким примером может служить окисление аскорбиновой кислоты, катализируемое медью. Этот же процесс значительно, примерно в 1000 раз, ускоряется при соединении меди с оксидазой аскорбиновой кислоты. При этом не образуется перекиси водорода, что показывает изменения в самом ходе процесса (Николаев, 1959; Nason, 1958). Другим примером может служить разложение солями железа перекиси водорода. Более активно этот процесс протекает под действием железосодержащего фермента (Lehninger, 1950). Активность железа возрастает в 10^{10} раз, когда оно входит в геминный комплекс.

Декарбоксилирование оксалоацетата катализируется многими металлами, в том числе и марганцем. При наличии же комплексных соединений с марганцем этот процесс идет гораздо быстрее (Najjar, 1951). Таких примеров можно привести очень много. Объясняется это тем, что ионы металла, связанные с протеином, действуют эффективнее в переносе электронов. Активность микроэлементов возрастает при этом в сотни тысяч, а иногда даже в миллион раз по сравнению с их ионным состоянием.

Важными вопросами в области биохимии являются: каким образом при комбинации со специфическим протеином возникает эта способность металлов катализировать ферментные реакции; природа связей, позволяющих специфически присоединять металлы, а также переносить электроны в определенном направлении от системы протеинов к другим органическим группам.

Согласно данным Неджера (Najjar, 1951), все ферменты по содержанию в них металлов можно классифицировать на следующие группы:

1) действительные металлоферменты, в которых имеется опре-

деленная абсолютная специфичность металла, где он связан и неотделим от белка;

2) металлоферменты, где нет определенной специфичности в связях металла и белка и первый может более или менее диссоциировать;

3) ферменты, не активируемые металлоионами и не содержащие металлов.

К первой группе относятся окислительные ферменты, каталитическая активность которых усиливается с валентным изменением иона меди, цитохромы с железом, подвергающимся обратимым валентным изменениям, карбоангидразы с цинком и некоторые другие ферменты.

Свойства металла в этих ферментах определяются его положением как катализирующего центра металло-протеинового комплекса. Эти соединения отличаются стабильностью. Действие металла тут специфично.

Вторая группа металлоферментов характеризуется слабой специфичностью металла: большинство ферментов этой группы активируется более чем одним металлом, например, фосфоглюкомутазу активируют магний, марганец, кобальт и никель, энولاзу — магний, марганец, цинк, лецитиназу *Clostridium welchii* — кобальт, цинк, марганец (Zamesnik et al., 1947). Стабильность соединений этой группы ферментов с разными металлами различна. Металл может быть связан с различными молекулами фермента, которые благодаря этому получают возможность перемещения. От перемещения этих групп и связей с металлом зависит активность фермента. Так, в аргиназе α -аминогруппа или карбоксильная группа или они обе могут быть вовлечены в металлокомплекс.

На основании изучения пептидных ферментов этой группы Смитом (Smith, 1949) выдвинуты три положения, определяющие активность ферментов:

1) активные ферментно-субстратные комплексы образуются с определенными химическими связями;

2) связь между молекулой субстрата и фермента образуется через металл;

3) две связи, образуемые металлом и ферментом, должны быть в противоположных сторонах пептидного соединения.

Разные авторы относят действие металла в ферментах к изменению рН среды, благоприятном в определенных значениях для действия отдельных металлов.

К иной группе органометаллосоединений, по Неджеру (Najjar, 1951), относятся так называемые «металлосубстраты», в которых металл соединен с субстратом, подверженным действию фермента.

Местом прикрепления металла в таких соединениях является поверхность субстрата, и действует он таким образом, как поляр-

ная группа последнего. Одной из форм металлосубстратов являются хелатные комплексы. Показано, что в соединениях такого рода может изменяться электрополярный момент, причем увеличивается их сродство к ферменту. Также возможно изменение полярных групп субстрата в другую конфигурацию, при этом они должны находиться в пределах орбиты притяжения определенных группировок на поверхности фермента. Может также происходить то и другое вместе. В таких положениях могут функционировать несколько металлов, заменяя один другого. Эти металлы должны мало отличаться своими атомными свойствами (весом, ионной зарядкой, радиусом, потенциалом и другими свойствами).

Металлы могут образовывать сходные хелатные комплексы с субстратом. Таким хелатам не обязательно иметь подобные конфигурации, но все же необходимо, чтобы их полярные группы могли помещаться в пределах орбиты притяжения на поверхности фермента. Хорошим примером этих соединений может быть аргиназа. Этот фермент активируется Mn, Fe, Co, Ni. Эти элементы, являясь членами последовательного ряда, схожи по атомным свойствам. И хотя их комплексы с субстратом несколько разнятся в электронной конфигурации и типом связи, они все катализируют аргиназу. Примеров подобного рода много: β -кето-кислоты, E-лейцин и др.

Активность металлосубстратных комплексов различна в зависимости от металла. Так, в аргиназе более активен комплекс с Co, чем с Fe, Mn, Ni, в карбоксилазе — с Mn, чем с другими металлами.

Велли (Vallee, 1955) считает главным критерием измерения физиологической значимости определенных металлионов степень увеличения ферментной активности при их добавлении. Он делит органометаллические соединения на две группы: металлопротеины и металлопротеиновые комплексы. В первых металл может быть естественно и неотделимо связан с белком. К ним относятся металлоферменты. Во вторых металл может быть замещен другим элементом и отделен от белка. К последним относятся металлоферментные комплексы, проявляющие ферментную активность соответственно свойствам различных входящих в них металлов.

Автор уделяет большое внимание характеристике этих ферментных соединений, определяя их свойства и различия. В основном металлоферменты имеют постоянное соотношение металла к белку, являющееся интегральным числом с постоянным стехиометрическим положением специфически действующего металла. Отделение металла сильно действующими средствами ведет к потере активности фермента или к коренному изменению соединения.

Металлоферментные комплексы характеризуются свободным

соединением с металлом, стехиометрические соединения являются менее жесткими, чем в металлоферментах. Отсутствует строгая пропорциональность в содержании металла, который легко удаляется при диализе, не приводя к потере активности фермента.

Собственные экспериментальные исследования Велли посвящены изучению роли цинка в металлопротеинах.

Обсуждая свойства металлопротеинов, Незон (Nason, 1958) уподобляет функции металлов действию витаминов. Он указывает также, что не все комбинации металлов с субстратом и ферментом достаточны для получения биологически активных соединений. Необходимы связи со специфическими металлами. Так, некоторые металлы, образуя комплексы с ферментами, тормозят их активность, как это происходит в случае эналазы при соединении с Ni, Be, Ca. Активация же этого фермента получается при соединении с Mn, Mg, Zn, дающими крепкие связи с ферментом. К металлам-активаторам многих ферментов автор относит Mn, Fe, Cu, Zn, Co, Mo и указывает на их роль в процессах цикла Кребса и многих других.

Хьюитт (Hewitt, 1958), Арнон (Arnon, 1952) обсуждали возможность активирования одного фермента несколькими металлами, в том числе и не необходимыми для его действия. Они приходят к выводу, что наличие металла в среде изменяет ее, что отражается на активности фермента. Отдельные металлы действуют на среду по-разному, что также влияет в большей или меньшей мере на катализ процессов.

Незон (Nason, 1958) выдвигает рабочую гипотезу, объясняющую случаи, когда действие отдельных ферментов происходит в отсутствие металлов (как это наблюдалось в экспериментах с некоторыми плесневыми грибами при удалении из их среды отдельных микроэлементов); по его мнению, имеются протеины относительно простой структуры, синтез которых может протекать даже в отсутствие некоторых основных реакций, необходимых для построения более сложных протенновых молекул. Основные же реакции невозможны без наличия определенных металлов. В этих случаях наблюдается усиление функций одних ферментов и полное угнетение других.

Обобщая функции металлов в ферментных системах, Незон указывает на свойства металлов:

1. Fe, Cu, Mo — металлы, тесно связанные с электрононесной системой. Они имеют способность усиливать действие промежуточных передатчиков электронов в окислительно-восстановительных реакциях и действуют как «электронные передатчики» от протеинов к другим системам. Чем объясняется способность именно этих металлов усиливать катализ окислительно-восстановительных реакций в комбинации со специфическим

протенином, какая природа связи этих металлов с протейнами и многое другое, является в данное время еще мало известным.

2. Mn, Mg функционируют главным образом в группах перелаточных ферментных реакций, обычно с участием фосфатов. Образуя хелатные структуры, они содействуют образованиям ферментно-субстратного комплекса и результирующих промежуточных реакций.

3. Mn и Zn функционируют в общих ферментных декарбонизационных и гидролитических реакциях. Механизм их действия мало изучен. Вероятно, они образуют необходимые структуры с субстратом, то есть соединяют субстрат с протенином. Другим применением являются комбинации металла с ферментом, ускоряющие действие последнего.

ХЕЛАТНЫЕ ОБРАЗОВАНИЯ

В развитии изучения металлоферментов большую роль сыграл метод моделей. Непосредственное наблюдение таких моделей некоторых ферментов делало более понятным их термодинамические свойства, абсорбционную способность, структурные особенности и др. Указанный метод был использован многими исследователями и применен также при изучении так называемых хелатов. Открытие этих соединений сделало большой сдвиг в исследованиях действия металлов в ферментных реакциях. Хелаты имеют особую двухстороннюю форму связи металла с органическим веществом. Эта форма (chelate — клешневидная) послужила поводом для их названия. В таких комплексных соединениях металл (в большинстве случаев Fe, Cu, Mn, Mo, Co, Zn и др.) соединен с атомами и группами атомов молекулы органического вещества. Хелаты бывают относительно простые и более сложные с двойными и большими хелатными связями. Впервые хелаты описаны в 1938—1940 гг. после чего появились более детальные исследования этих соединений, проведенные Кальвиным, Мертэллом, Николаевым и многими другими (Calvin, 1954; Николаев, 1959). Полный обзор свойств хелатов сделан Мертэллом и Кальвиным (Martell a. Calvin, 1952).

Интересными свойствами этих соединений, привлекающими внимание исследователей, являются их устойчивость и каталитическая способность в биологических реакциях.

Факторами, влияющими на стабильность хелат, являются свойства связывающего металла (его радиус, энергия орбиты и т. д.). Изучение металлокомплексов и особенно хелатов дало новые экспериментальные подтверждения и новые теоретические обоснования толкованию действия металлов в ферментах, металлосубстратах и металлопромежуточных соединениях, как и в металлоферментных ингибиторах.

Группируют хелаты по их способности переноса ионов и другим физико-химическим факторам.

О значении хелат в биологии можно судить по их участию в таких чрезвычайно важных реакциях, как реакции гемина, хлорофилла, и многих других процессах.

Каталитические функции хелат Кальвин (Calvin, 1954) делит на два типа: 1) реакции, идущие в направлении изменения, переноса, чередования и вибрации энергетических систем (то есть изменения эффекта энтропии); 2) электронные изменения.

Примером может служить фосфатаза, содержащая марганец или магний, соединенные с ферментом хелатными связями. Медь в соединении с пиридоксалем хелатными связями участвует в реакциях переаминирования. Этот элемент образует стабильные хелаты с O_2 и N_2 . Известны хелатные соединения, активирующие молекулярный водород. Марганец, вступая в подобные связи с аденозинди- и трифосфатом, меняет константу диссоциации соединения (Cohn, 1954). Некоторые ферментные реакции не могут идти без хелатных связей.

Активность хелатных соединений в значительной степени зависит от их структурных связей. Так, удлинение цепи связанных атомных групп ведет к возрастанию активности, так же, как и образование циклических конфигураций, включающих поц-комплесообразователь. Незначительные изменения состава соединения отражаются на активности комплекса. Связь между структурой и активностью доказана в физхимии; это положение распространяется на все металлы — как сильные, так и слабые активаторы.

Каталитическое действие комплексных соединений существенно отличается от действия простых ионов и так же, как и действие ферментов, основано на образовании в ходе реакций промежуточных соединений, что, однако, не исключает возможности в некоторых случаях им быть только инициаторами в цепной реакции (Calvin, 1954; Николаев, 1959).

Большую ясность в строение металлоорганических комплексов и зависимость их действия от стехиометрических положений внес Клотц (Klotz, 1954; Клотц, 1956), дополнивший своими исследованиями имеющиеся уже материалы по данному вопросу. Он указывает на определенные типы связей металла с молекулой протеина при образовании различных комплексов. Металл связывается с различными группами и отдельными атомами, составляющими боковые цепи белковой молекулы. При обзоре свойств полярных концов этих цепей выяснилось, что такими являются карбоксильные, имидозольные, фосфорные, α - и γ -аммонийные, фенольные, сульфгидрильные и другие группы. Металл может быть связан с любой из боковых цепей белка.

Клотц останавливается на трех положениях, определяющих

значение металла в комбинации с протеином или простетической группой, действующего как катализатор.

1. Каталитические свойства металла зависят от специфичности протеина. Примером могут служить окислительно-восстановительные ферменты, содержащие медь и железо как необходимый металл. Тут протеин способствует стабильности низких валентностей и переносу электронов в реакциях.

2. Металл изменяет свойство белка путем изменения заряда протеина, то есть при электростатическом действии. Такое действие подтверждено Клотцем при титровании протеина, связанного с различными металлами. Седезивен (Sadasivan, 1952) также подтвердил такое положение, продемонстрировав влияние изменений соотношения цинка и магния для фосфатазной активности. В данном случае имело место изменение pH в щелочных и кислых пределах, оптимальных для действия фермента. Таким образом, наличие отдельных металлов, помимо их прямого действия, может изменять условия внешней среды, влияющие на фермент.

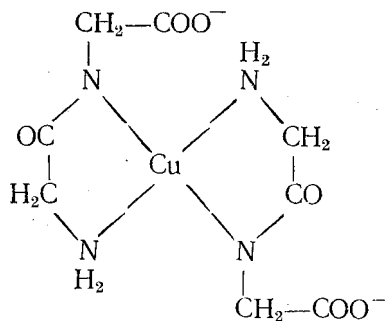
3. При взаимодействии металла и протеина действие металла на протеин отмечается в многочисленных положениях, которые могут резко меняться при изменении связей в конфигурации молекулы, меняющей электростатический эффект. Возможные блокировки групп боковых цепей протеина (например, сульфгидрильных) действуют на связь с металлом, отражаясь на активности фермента.

Большой интерес вызывает то, что добавление металла может оказать глубокий эффект на ферментативную активность даже тогда, когда металл не входит непосредственно в состав фермента, но будет находиться на поверхности молекулы. В таком случае металл действует как «мостик» между ферментом и субстратом. Такова его роль в большинстве реакций декарбоксилирования и гидролиза.

Куртней и др. (Courtney et al., 1957), изучавшие активность металлокомплексов и зависимость от строения, пришли к выводу, что большую роль в этих реакциях играет образование циклических металлоорганических соединений.

Мессен (Massey, 1953) показал, что такие анионы, как сульфаты, бораты, селенаты, эффективны в активации свободной от солей кристаллической фумаразы. В этом случае электростатическое действие металлов на протеины может возникать и от анионов.

В очень обстоятельном обзоре Гарда и Вилькокса (Gurd a. Wilcox, 1956), посвященном вопросу образования комплексных соединений металла и различных органических соединений (протеинов, пептидов и аминокислот), даются интересные структурные формулы возможных связей. В качестве примера приводим связь Cu^{++} в глицинкомплексе:



Связи металлов в реакциях гидролиза описаны Геллерманом и Стоком (Hellerman a. Stock, 1938) для аргиназной активности и в системах пептидаз для различных пептидов. В последнем случае имеет место образование хелатных комплексов между металлом и субстратом. Причиной ускорения гидролиза под влиянием металла могут служить стабилизация благодаря образовавшемуся комплексу переходных групп в реакциях и увеличение благодаря катионам локализованных концентраций OH.

Действие металлов на ферменты может осуществляться многообразно: единичными и групповыми реакциями.

Изучая образование каталитически активных групп ферментов, Торчинский (1961) полагает, что SH-группы, содержащиеся в белке, могут вступать во взаимодействие с различными катионами, особенно с цинком. Эти связи имеют значение для поддержания структуры фермента (например, алкогольдегидрогеназы). Ион металла, соединенный с серой меркаптидной связью, обладает способностью образовывать дополнительные соединения с различными функциональными группами (карбоксыльными, азотистыми и другими) боковых цепей белка. В результате этого возникают свободные клешневидные комплексы, соединяющие различные участки белковой молекулы, что обеспечивает активную конфигурацию ферментов.

В работах, доложенных на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г., много внимания уделялось функциональному взаимодействию между металлами и ферментами. Шведские ученые Мальмстрем, Розенберг, Линдског (1961), исследуя активные центры некоторых ферментов, указывают на роль определенных металлов в этих центрах. Приводя уже известную из работ Неджера (Najjar, 1951) и др. классификацию металлоферментов, данные авторы приводят тонкие особенности, неизвестные до сих пор, в различии действия металлов и природы их соединений с белками. Эти данные показывают, что нет прочно установленных границ в отношениях металл—белок, но имеются многочисленные отступления от ранее установленных соотношений. Так, исследования эролазы показали,

что этот фермент активируется в соотношении 1:1 иона металла к ферменту в специфическом центре. Принадлежит к типичным металлоферментам, эндолаза имеет свои особенности, отличаясь от них силой взаимодействия металла с этим центром. Иной фермент — карнизоназа — стабилизируется по отношению к тепловой денатурации ионами Mn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Cd^{++} , Zn^{++} . Стабилизация и активация осуществляется тут присоединением металлов к различным участкам фермента. Для карнизоназы необходимы ионы двух различных металлов. Ионы одного из них функционируют в процессах в качестве кофермента, а ионы другого принимают участие в создании третичной структуры белка. По-видимому, активация, стабилизация и торможение этого фермента могут осуществляться различными лигандными группами, участвующими в различных типах взаимодействия. Так, Ca^{++} связывается с кислородом, и наиболее существенными лигандами для него являются СОО-группы. Для присоединения Mn^{++} показан хелатный комплекс с присоединением лигандного атома азота.

Об этих же свойствах карнизоназы говорится и в докладе на V Международном конгрессе биохимиков Вильямса (1961), работавшего в Оксфорде. Автор устанавливает зависимость химических свойств катионов и их влияние на структуру белка с определенными группами белковых цепей белка и их характерными связями. Например, цинк связывается обычно с серосодержащими группами, что обуславливает его активность. Ионы металла влияют на свойства белковой молекулы, воздействуя на окружающие группы белка химическими связями или посредством возникающих по соседству с ионом электростатических полей. Он изменяет конфигурацию белковой молекулы, а также химическое поведение групп, находящихся на расстоянии от катиона.

В свою очередь белок изменяет свойства иона металла, снабжая его добавочными группами, образующими координационные комплексы. Эти группы связываются с различной силой и располагаются в окружающем ион пространстве в различных симметричных или асимметричных сочетаниях.

В позднейших исследованиях ионы металла используются как металлометки при изучении действия ферментов.

Автор приводит данные поляризуемости катионов. Так, металлы переходной группы поляризуются преимущественно в октаэдрических комплексах. Интересны сопоставления того же автора распространения ионов металлов в биологических системах и в земной коре, сходные с результатами исследований в СССР биогеохимических провинций, проводимых Ковальским (1959, 1963).

Обширное обозрение, посвященное также механизму действия микроэлементов в ферментах, принадлежит Макэлю и

Незону (McElroy a. Nason, 1954). Авторы рассматривают природу металлопротеиновых взаимоотношений и влияние различных факторов среды на этот комплекс. Они считают, что основной чертой металлоорганических комплексов является количественное интегральное отношение металла к белку, также диссоциирующее или недиссоциирующее соединение металла в ферменте. В первом случае металл является неспецифическим активатором. Приводя известные уже нам данные Клотца и других авторов, Макэльской и Незон объясняют влияние металла на фермент его электростатическим действием. Металлы могут также действовать, устраняя тормозящие фермент вещества. Интересный пример такого косвенного действия приводит Смит (Smith, 1953) на лейцинаминопептидазе.

Заслугой Макэльской и Незона является попытка систематизировать ферменты, в состав которых входят определенные металлы. Так, они приводят ферменты по группам (табл. 2, 3, 5). Как видно из табл. 2, большинство ферментов этой группы связано с Mn и Mg, альдолаза дрожжей и *Clostridium* активируется Co, Fe, и Zn. Последний активирует также энолазу.

Таблица 2

Ферменты, активирующие метаболизм углеводов (по McElroy a. Nason, 1954)

Ферменты	Металлы, входящие в состав ферментов
Глюкокиназа	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Гексокиназа	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Фосфоглюкокиназа	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Фосфоглюкомутаза	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Cr ⁺⁺
Дрожжевая и <i>Clostridium</i> альдолаза	Fe ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Zn ⁺⁺
Фосфоглицеринкиназа	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Энолаза	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺
Киназа янтарной кислоты †	Mg ⁺⁺ , Rb ⁺

Однако в последние годы список названий этой и других групп дополнен большим количеством ферментов, в составе которых найдены металлы; дополнен также состав металлов, катализирующих ферментные реакции.

О роли ионов металлов в переносе фосфатов в ферментных реакциях сообщают также Ларди (Lardy, 1951), Малер (1957) и др. Металл принимает непосредственное участие в окислительном фосфорилировании. Одна из основных теорий, объясняющая это явление, состоит в том, что в части циклического процесса при восстановлении аденозинтрифосфата (АТФ) имеет

Таблица 3

Действие металлов в реакциях фосфорилирования (по *McElroy a. Nason, 1954*)

Ферменты	Металлы, соединенные с ферментом
Аденозинкиназа	Mg^{++} , Mn^{++}
Аргининкиназа	Ca^{++} , Mn^{++}
ДФП-киназа	Mg^{++} , Mn^{++}
Люцифераза	Mg^{++} , Mn^{++}
Дрожжевая апираза	Mn^{++}
Глутаминотрансфераза	Mn^{++}
Киназа дифосфо-СоА	Mg^{++} , Mn^{++}

Таблица 4

Ферменты, в реакциях которых участвуют металлы и АТФ (по *Lardy, 1951*)

Фермент	Акцептор фосфора	Активирующий металл
Гексокиназа дрожжей	Глюкоза Фруктоза Манноза	Mn^{++} , Mg^{++}
Фосфоглюкокиназа	Глюкозо-1-фосфат	Mn^{++} , Mg^{++}
PO_4 -глицеринфосфофераза	d-3- PO_4 -глицерат	Mn^{++} , Mg^{++}
Пируватфосфофераза	Пируват	Mn^{++}
Аденозинкиназа (дрожжевая)	Аденозин	Mn^{++}
Аргинин-фосфофераза	Аргинин	Mn^{++}
ДФП-фосфофераза	ДФП	Mn^{++}

место связывание фосфата. При дальнейшем окислении фермента при наличии акцепторной системы происходит фосфорилирование аниона, связанного с металлом. Одновременно с этим происходит перенос фосфата на акцептор с образованием пиродифосфатной связи, то есть окислительное фосфорилирование.

В табл. 4 приведены ферменты, в реакциях которых участвует металл и АТФ, являющаяся донатором простых фосфорных групп. Тут, как и в предыдущих группах, ферменты связаны главным образом с Mg и Mn . Меньшее их количество содержит Zn , Co , Cr , Al , Ca .

В литературе имеются указания на необходимость Mn , Mg для активности пиродифосфатазы и апиразы дрожжей. Гидролиз эфиров фосфорной и пиродифосфорной кислот также протекает с

Таблица 5

Металлы, активирующие ферменты цикла лимонной кислоты
(по McElroy a. Nason, 1954)

Ферменты	Металлы, соединенные с ферментом
Пирувикарбоксилаза	Mg^{++} , Mn^{++}
Пирувикоксидаза	Mg^{++} , Mn^{++}
Оксиацетикдекарбоксилаза	Mg^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Mn^{++}
Изоцитрикодегидрогеназа	Mg^{++} , Mn^{++}
Оксалдосуцциникдекарбоксилаза	Mn^{++}
α -кетоглотаратоксидаза	Mg^{+} , Mn^{++}
Сукциникдегидрогеназа	Ca^{++} , Al^{++} , Cr^{++}
Маликфермент	Mn^{++} , Co^{++}

участием ионов металлов. Са и Мп активируют аденозинтрифосфатазу, являясь частью простетической группы данного фермента. Лента и Ринл (Lenta a. Rienl, 1960), работавшие с ферментными препаратами ДФПН-окислительной системы митохондрий, установили необходимость железа для усиления катализа. Изучению металлсодержащих фосфатидов посвящены работы Бойченко с сотрудниками (1963, 1964). Можно было бы привести еще много примеров подобного рода, свидетельствующих об участии металлов в важнейших ферментных реакциях переноса фосфора. Как видно из сказанного, в данных реакциях главная роль принадлежит Mg и Mn.

Другие исследователи подтверждают каталитическое действие Mo на гидролиз особых органофосфатных соединений, ведущих к образованию комплексов с субстратом как первому шагу в разрыве фосфатных связей.

Краус и Спект (Krauss a. Specht, 1959) успешно применяли при массовом выращивании водорослей некоторые микроэлементы. Они объясняют полученное положительное действие необходимым участием последних в ферментативных реакциях клетки. Авторы приводят сводку ферментов, в действии которых принимают участие металлы. Таких ферментов указано около 40, некоторые из них уже упоминались в сводке Макэльской. Этот список значительно полнее, чем приведенный Макэльсом, однако не отражает всего количества металлоферментов, открытых к тому времени. Так, в обстоятельном изложении особенностей ферментов Диксона и Уэббса (1961) приведено название 659 ферментов, из которых 220 отмечены как имеющие в своем составе металлы в активных группах или в другом положении связи. Большая часть новонайденных ферментов еще не достаточно изучена в отношении наличия в них металлов.

В настоящее время известно уже более тысячи ферментов. С открытием новых ширятся знания об участии металлов в их реакциях.

ФЕРМЕНТЫ, ИМЕЮЩИЕ В СВОЕМ СОСТАВЕ МЕТАЛЛ

Окислительно-восстановительные ферменты

Согласно Михлину (1956), Пейве (1960) и др., к данным ферментам относятся сравнительно хорошо известные: железопорфириновые — каталаза, пероксидаза, цитохромы и цитохромоксидаза, железо в которых находится в простетической группе, тесно связано с ферментом и принимает участие в переносе электронов, и медьсодержащие ферменты. Изменение валентности меди в них связано также с переносом электронов. Атом меди рыхло связан с ферментом и удаляется при диализе с цианидами.

Обычно роль меди в окислительных ферментах строго специфична. Однако в некоторых случаях она может быть заменена другими металлами. Так, Кертеc (Kertes, 1952) замещал медь в тирозиназе кобальтом, никелем и ванадием, которые, однако, были менее активны. Автор объясняет это явление комплексной системой тирозиназы, действие которой при окислении моногидрофенолов проходит в несколько этапов. В отдельные процессы при этом включаются свободные катионы. Данное явление может служить примером возможного действия разных металлов в одном типе реакций, а также действия металлов в одном каком-либо звене реакции.

ФЛАВОПРОТЕИНЫ

Перечисленные ферменты и их связь с металлами были известны давно. Новое в познании другой группы окислительно-восстановительных ферментов принесло открытие участия металлов во флавопротеиновом катализе. Альбертом (Albert, 1953) и другими было показано, что некоторые металлы являются специфическими составными частями флавопротеиновых ферментов, которые впоследствии на этом основании начали называться металлофлавопротеинами. Эти ферменты осуществляют ряд окислительно-восстановительных реакций путем переноса электронов. В аэробных условиях первым восстановителем в цепи реакций обычно является субстрат, а конечным — кислород. Эта цепь в большинстве случаев состоит из нескольких звеньев. Центральным звеном в ней являются флавопротеины, то есть ферменты, содержащие в качестве простетической группы нуклеотидные производные рибофлавина. Вследствие

особенной структуры флавопротеины чрезвычайно легко окисляются и восстанавливаются веществами, окислительно-восстановительный потенциал которых лежит в соответствующем пределе. Существует ряд флавопротенинов с металлом в простетической группе.

Изучение флавопротеинов облегчается получением «искусственных» металлопротеинов, обладающих некоторыми свойствами естественных аналогов (Malher, 1953; Малер, 1957). Флавопротеины катализируют важнейшие реакции клетки, например окислительное дезаминирование аминокислот, окисление восстановленных форм ди- и трифосфопиридиннуклотидов, дегидрирование оксикислот и многое другое (Nason, 1958). Малер (1957) считает, что изучение металлофлавопротеинов является преддверием к познанию сложной системы «истинного» переноса электронов. Николасом (Nicholas, 1957) и другими было показано, что металл данных ферментов находится в определенных соотношениях с рибофлавиновой частью простетической группы. Опыты с удалением его путем диализа и применения цианида с последующим испытанием свойств полученного препарата показали, что последний теряет активность, которая могла быть восстановлена путем предварительного введения соответствующего металла.

Впоследствии было обнаружено большое число металлофлавопротеинов, в составе которых находятся железо, молибден, медь и марганец.

Участие железа в флавиновых ферментах, восстанавливающих цитохром *c* с использованием ДФПН как донатора электронов, показали Малер и Елоу (Mahler a. Elow, 1954). В отсутствие железа восстановление цитохрома *c* сильно задерживается. По их наблюдениям, железо необходимо для осуществления массового переноса электронов от флавинового компонента к цитохрому.

Тоттер с сотрудниками (Totter et al., 1953), де Ренцо и др. (de Renzo et al., 1954), Мэклер и др. (Mackler et al., 1954) показали, что молибден является существенной частью флавопротеина — ксантиноксидазы.

Незон и Ивенс (Nason a. Evans, 1953), Николас и др. (Nicholas et al., 1954) нашли, что тот же металл служит для образования редуктазы нитратов у *Neurospora crassa*.

Металлопротеины являются главными ферментами в метаболизме азота высших и низших растений. Кроме того, всевозможные изменения форм соединений азота в почве, связанные с ее плодородием, также зависят от этих ферментов. Поэтому рассмотрим некоторые ферменты этого типа.

Ассимиляция нитратного азота растениями является результатом восстановительных реакций, изменяющих валентность азотного атома от 5 до 3. Металлофлавопротеины катализируют

этот процесс до получения нитрита, гидроксилamina и свободного азота.

Нитратредуктаза. Конституентом этого фермента, осуществляющего редукцию NO_3 в NO_2 , является молибден, изменяющийся в этой реакции следующим образом: $\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+} \rightarrow \text{Mo}^{3+}$. Простетическая группа данного фермента — флавинадениндинуклеотид. В ферментативном процессе происходит восстановление этого соединения как специфического донатора электронов. Ряд опытов с применением диализа и металлосвязующих веществ подтвердил вхождение молибдена в нитратредуктазу. Последняя обнаружена также в бесклеточных экстрактах *Neurospora crassa* и *Aspergillus niger*. В отсутствие молибдена в клетках накапливается NO_3 и свободные аминокислоты (Mulder, 1948; Nicholas, 1950).

Нитратредуктаза высших растений отличается от фермента *B. coli* некоторыми особенностями восстановления краски, употребляемой как донатор электронов (Nicholas a. Nason, 1954).

В опытах Николаса и Незона (1954) с различными фракциями протеина *B. coli* и *Neurospora* было показано, что специфическая активность фермента увеличивается параллельно с содержанием в нем молибдена. Это также было подтверждено Ивенсом (Evens, 1956), который показал, что Mo^{99} (радиоактивный) аккумулируется в нитратредуктазе. Механизм действия металла исследователи относят к его участию в переносе электронов от восстанавливаемого флавина к нитратам.

Дальнейшие исследования показали, что восстановление нитратов (бесклеточных экстрактов *E. coli*) является промежуточным процессом с участием цитохрома *b*, показывающим наличие геминного железа. В спектрофотометре наблюдалось окисление цитохрома *b* при ферментном восстановлении нитратов. Следовательно, железо также принимает участие в молибдофлавопротеиновых системах в восстановлении нитратов. По механизму действия нитратредуктазы различных организмов мало различаются между собой. Как указывает Николас (Nicholas, 1959), изменения наблюдаются только в ходе восстановления пиридиннуклеотидов.

Нитритредуктаза впервые была обнаружена в бесклеточных экстрактах *Bact. pyocyaneum* и *Bac. pumilis*. Было показано, что NO_2 восстанавливается ферментом до NH_3 . Она также найдена у *Neurospora* и некоторых других растений. Установлено, что для восстановления 1 моль нитритов до NH_3 используется 3 моль DPNH или TPNH.

Для максимальной активности данного фермента, как и приведенной ниже гипонитритредуктазы, требуется кроме Mo также Fe и Cu в соединении с флавином, а также марганец. При этих реакциях имеет место фосфорилирование (Medina a. Nicholas, 1957).

Гипонитритредуктаза — флавопротеин, восстанавливающий гипонитрит до гидроксилamina. В состав его входит UPNH как электронный донатор. Для максимальной активности также требует Cu и Fe. Фермент обнаружен у *Neurospora crassa* Мединой и Николасом (Medina a. Nicholas, 1957a).

Гидроксиламинредуктаза восстанавливает гидроксилamin до NH_3 . Для активного действия требуется марганец. Обнаружен впервые у бактерий, затем у *Neurospora crassa* и высших растений.

Амониумдегидрогеназа является как бы следующим ферментом по пути восстановления азотных соединений. Ход денитрификационных процессов, осуществляемых микроорганизмами, исследовался на культурах почвенных денитрификаторов Николасом (Nicholas, 1957a). Бесклеточные экстракты бактерий могли редуцировать NO_2 до окислов азота и свободного азота. Обнаруженные катализирующие ферменты оказались флавопротеинами, ведущими реакции с восстановлением ди- и трифосфатпиридиннуклеотида и активируемые Cu и Fe. Те же авторы исследовали процессы нитрификации, осуществляемые *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. Работа проводилась с накопительными культурами (очевидно, не очищенных) этих организмов. Специфическими реакциями показано, что медь является конституентной частью окислительного фермента этих бактерий.

Ферменты, обуславливающие азотфиксацию, также относят к флавопротеинам. Используя меченый азот (N^{15}), Берис и Вильсон (Burriss a. Wilson, 1956) и др. обнаружили ряд последовательных ферментативных превращений азотных соединений в процессах ассимиляции свободного азота азотобактером, клубеньковыми бактериями, *Clostridium pasteurianum*, водорослями и другими микроорганизмами. По мнению авторов, при этих процессах требуется молибден, который может быть частично заменен W и V (Bortels, 1930; Horner et al., 1942).

На участие молибдена в системе фиксации азота указывают многие авторы, в том числе Бортельс (Bortels, 1930), Иенсен (Jensen, 1948), Виртанен (Virtanen, 1952). Однако этот вопрос, несмотря на многие годы исследований, все еще не ясен.

Интересную теорию относительно этого процесса выдвигает Робертс (Roberts, 1959), работающий по выяснению механизма азотфиксации азотобактера. Он пришел к убеждению, что нитрогеназа — фермент, катализирующий фиксацию азота, имеет в своем составе металл, на поверхности которого связывается газообразный азот (N_2). Таким образом, первым этапом в фиксации азота является процесс адсорбции его металлом, который может быть Mo или Fe, имеющими на орбите свободный атом d, с которым осуществляется связь N_2 . Поскольку азотобактер нуждается в молибдене, очевидно, этот металл связывает N_2 .

За такую же возможность высказывается и Винфильд (Winfield, 1955), полагая, что в первой стадии фиксации участвует металл в системе азот — ферментный комплекс. В последующих стадиях метаболизма азота участвует гидрогеназа, содержащая железо.

С азотфиксирующей системой связывают фермент гидрогеназу. Клетки фиксирующих азот бактерий обычно обладают значительно большей гидрогеназной активностью. Гидрогеназа, по мнению некоторых авторов, участвует в дальнейшем метаболизме фиксированного азота. Молибден показан как конститuent гидрогеназы азотобактера и других азотфиксаторов. Однако дефицит железа изменяет это положение. Некоторые гидрогеназы, кроме Mo, содержат также Fe и Mn. Есть указания, что гидрогеназа *Clostridium pasteurianum* — молибдофлавопротеин и что требуемый им Mo необходим для восстановления цитохрома *c*. Все же Николас не находит прямой связи этих двух систем — азотфиксирующей и дегидрогеназной.

Картрайт и Кейн (Cartwright a. Cain, 1959) сообщают о восстановлении ряда нитробензойных кислот бесклеточными экстрактами бактерий (видов *Pseudomonas*) в соответствующие аминокислоты. Предполагается, что восстановление обусловлено ферментом нитроредуктазой, стимулируемой Mn^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} .

Кроме упомянутых, металлофлавопротеины обуславливают ряд других реакций.

Ксантиноксидаза имеет в своем составе молибден, который содержится в ферменте в таком соотношении: 1 атом Mo — 2 молекулы флавина. Металл не отделяется диализом.

В состав металлофлавопротеинов Николас (1957) включает также много других ферментов, таких, как альдегидоксидаза, ацилкоэнзимдегидрогеназа, цитохром-*c*-редуктаза, дифосфо-пирдиннуклеотидоксидаза и др.

Интересно отметить, что такие различные реакции, как редуктаза нитратов, окисление жирных кислот, окисление пуринов и восстановление дикарбоксидов, в которых участвует металл, по мнению многих исследователей, проходят в сходных ферментативных процессах. Направление этих реакций как бы определяет вхождение в фермент ионов металла. Общие свойства этих реакций заключаются в системе переноса электронов, в котором особо важную роль играют медь, молибден и железо.

Таким образом, в состав рассмотренных ферментов входят четыре металла: молибден, железо, медь и марганец. Чаще всего находят два первых металла, во многих случаях некоторые ферменты содержат одновременно молибден и железо.

Рассматривая данные ферменты, нельзя не остановиться на исследованиях последних лет, посвященных участию металлов в переносе электронов. Грин (1961), Грин и Гриффикс и др.

(1961), докладывая на V Международном биохимическом конгрессе о структуре и функциях субклеточных частиц, дают уже вполне определенную схему цепи переноса электронов в окислительно-восстановительных реакциях клетки от субстрата к ДПП и дальше на молекулярный кислород. В этой цепи компонентами служат FeNH (не геминное) и Cu, связанные с флавопротеинами и цитохромом *a*.

До недавнего времени изучение способности комплексов металлов к переносу электронов ограничивалось главным образом исследованием цитохромов. В данных наблюдениях показано разнообразие типов и широкий диапазон окислительно-восстановительных потенциалов хелат переходной группы. Новейшие методы изучения — выделение очищенных фрагментов цепочки транспорта электронов, спектроскопическое наблюдение за изменением валентности металлов, изучение спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) — сделали возможным оценку роли не входящих в гем железа и меди в переносе электронов.

Баррон (1954), Малер (1957), Николас (Nicholas, 1957) приходят к следующему заключению о многосторонней роли металла в упомянутых ферментных реакциях:

а) он стабилизирует промежуточные соединения при восстановлении или окислении флавопротеинов и, таким образом, увеличивает время и устойчивость этого промежуточного вещества, благодаря чему возможен более эффективный перенос последующих электронов на молекулы акцептора, а также стабилизирует свободные радикалы флавинов;

б) металлы связывают простетическую часть с флавином путем образования хелатных структур;

в) металлы могут связывать флавин с двумя молекулами акцептора, благодаря чему создается возможность внутримолекулярного перемещения электронов в пределах одной молекулы;

г) благодаря наличию металла сходные структуры с незаполненными электронами могут вступать во взаимодействие, причем осуществляется перенос электронов между двумя системами (субстрат — акцептор);

д) металлы образуют «мостики» в электронных взаимоотношениях между различными частями молекулы;

е) изменяя валентность, обуславливают восстановительные реакции каталитической системы;

ж) изменяют окислительно-восстановительный потенциал системы;

з) наличие ионов металла сообщает особую гибкость системе, осуществляющей перенос электронов с ДПП-N на цитохромную систему, обеспечивая разнообразные добавочные пути переноса электронов при ферментативных процессах.

Гидролитические ферменты

Особое внимание исследователей, изучавших металлоферменты, было уделено изучению пептидаз, взятых в качестве моделей. Особенно интересны в этом отношении работы Смита и Девиса (Smith a. Davis, 1954) и др. по изучению кинетики энзимных реакций металлопептидаз. Авторы исходят из положения, что металл в данных случаях действует как связь между ферментом и субстратом. Работы проводили с очищенными препаратами пролидазы и лейцинаминопептидазы, полученными в кристаллическом виде. Была показана специфическая роль марганца в этом первом ферменте: добавление марганца действовало в сильной степени как стабилизатор в реакциях. Опыты показали, что марганец специфически связан хелатной связью с сульфгидрильными группами субстрата.

При изучении свойств другого фермента — лейцинаминопептидазы, гидролизующего амиды аминокислот и пептидов, была показана сильная активация марганцем и магнием. Этот фермент находится в животных и растительных клетках.

Изучение карбоксипептидаз выявило интересные особенности их свойств. Велли, Раплеи и др. (Vallee, Rupley et al., 1960) изучали роль металлов в этом ферменте. Ими было показано, что фермент, содержащий Zn^{++} , не теряет своей активности при замещении цинка кобальтом. Добавление Co^{++} в избытке, сверх определенного стехиометрического количества, приводит к дальнейшему повышению активности фермента.

В подтверждение этого Фольк и Гледнер (Folk a. Gladner, 1960) показали, что *n*-карбоксипептидаза может быть активирована добавлением Co^{++} без замещения им цинка. Возможным объяснением указанного явления могло быть создание новых активных центров при соединении Co^{++} с белком, возможно, функционирующих по иному механизму. Также вероятно, что молекулы карбоксипептидазы существуют в различных конфигурационных состояниях, среди которых есть часть неактивных, переходящих в активную форму при добавлении Co .

Интересные данные о карбоксипептидазе сообщают Колеман и Велли (Coleman a. Vallee, 1960). Удаление цинка, входящего в апофермент, целиком инактивировало фермент. Активность была восстановлена добавлением металлов в хелатных комплексах, прежде всего цинка. Однако кобальт, марганец, никель и железо могли также заменить цинк, причем кобальт был даже эффективнее последнего. Данное явление приписывается изменению рН среды, различного при каждом катионе. Цинк в апоферменте имеет двухсторонние связи, но только одна сторона связи обуславливает активность фермента. Кобальт и цинк помещаются на определенной стороне поверхности фермента, но

могут менять места прикрепления, что также отражается на активности фермента.

О результатах своих последних работ в изучении карбоксипептидазы А Велли (1961) докладывал на V Международном конгрессе биохимиков. Новейшими достижениями в области изучения ферментов является установление активного центра различных ферментов. Автор нашел, что в активный центр этого фермента входит один атом цинка, атом азота (принадлежащий α-амино), атом серы из остатка цистеина. Заменяя цинк ионами других металлов, он получал различные металлокарбоксипептидазы, специфичность ферментативного действия которых зависела от природы замещенного иона металла. Например, карбоксипептидазы, содержащие ионы различных металлов первого ряда, проявляют различия в скорости реакции ($\text{Co} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Fe}$) при воздействии на разные пептидазы. Ферменты же, содержащие металлы второй подгруппы ($\text{Cd} > \text{Hg} > \text{Pb}$), не обладают пептидазной активностью, но обнаруживают эстеразную активность. Это, по-видимому, является результатом соединения металла с другими группировками молекулы.

Некоторые веские соображения о структуре и функциях проэоолитических ферментов на том же V Международном биохимическом конгрессе высказывает Нейрат (1961). При изучении «активного центра ферментов» (что является новой актуальной проблемой в изучении этих соединений) показана функциональная связь каталитически активных групп и групп, определяющих специфичность фермента. В активную группу прокарбоксипептидазы А включен цинк или иной элемент первого переходного ряда. Цинк связан с сульфгидрильной группой апофермента и рассматривается как часть активного центра.

Из доклада на V конгрессе Мальстрома, Розенберга и Линдскога (1961) можно заключить, что карбоангидраза является также металлоферментом. В последнее время удалось отделить Zn^{++} от этого фермента и заменить его Co^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , но не другими металлами. Прочность связывания этих металлов с ферментом различная. Одной из лигандных групп соединения металла является HS.

Кроме упомянутых ферментов, свойства которых подлежали тщательному изучению, в литературе имеется много интересных сведений о металлоферментах иного направления.

Так, Ганзалес (Gunsalus, 1954) сообщает о реакциях гидролитического типа, в которых марганец является кофактором для цитратного десмолиза. Эта реакция может служить примером действия хелатного соединения марганца с группами фермента. Данные исследования производились с бесклеточными экстрактами *Streptococcus faecalis* и *E. coli*, имеющими ферменты, расщепляющие цитраты в ацетат и оксалацетат.

Такие работы показывают на возможность глубокого изуче-

ния роли металла в ферментных процессах, что в конечной цели приведет к полному познанию действия металлоферментов.

Существующая в данное время литература по исследованию металлоферментов указывает на следующие возможные пути их активации ионами металла:

- 1) металл входит в активный центр фермента;
- 2) металл может функционировать как связующий мостик между ферментом и субстратом, находясь в соединении с обоими и удерживая, таким образом, субстрат около активного центра фермента. В этом случае может быть два положения: металл активирует субстрат, образуя во многих случаях хелатные связи, и действует как связь;
- 3) металлы могут изменять константы равновесия ферментативных реакций в сторону, благоприятную для ее осуществления. Это может быть:
 - а) когда металл соединяется с субстратом, уже являющимся металлосубстратом. Концентрация металла при этом возрастает, что изменяет равновесие системы;
 - б) металл может образовывать комплекс с промежуточным продуктом реакции, что также изменяет равновесие;
- 4) поливалентные катионы вызывают изменение поверхностного заряда белковой части молекулы, что влияет на ход реакции;
- 5) ионы металла могут удалять ингибитор;
- 6) могут вытеснять неактивные ионы в ферментах;
- 7) металлы, сами по себе неспособные активировать фермент, могут вытеснить истинный активатор из соединений, не входящих в состав активных группировок фермента, и тем самым приблизить его к активному центру последнего.

Все сказанное не исчерпывает возможных влияний металла. Что же касается активации ферментных реакций, то она сводится в основном к ускорению ферментных реакций и стабилизации устанавливающегося в ходе процессов равновесия.

МЕТАЛЛЫ В НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

Действие микроэлементов не исчерпывается участием в ферментных реакциях. Как выяснилось, они играют также роль в таких важнейших соединениях клетки, как нуклеиновые кислоты.

Нуклеиновые кислоты клеточных структур имеют огромное значение для жизни клетки, являясь неотъемлемой составной частью клетки растений, животных и микроорганизмов.

Известно, что металлы взаимодействуют с нуклеокислотами и нуклеотидами. В литературе имеются указания, что нуклеиновые кислоты, выделенные из различных источников, содержали

одни или несколько металлов (Zittle, 1946; Stern a. Steinberg, 1938).

Сообщалось также о том, что некоторые металлы действуют на структурные и функциональные изменения хромосом. На способность металлов образовывать связи с РНК, а также с рибонуклеазой указывают Фриден (Frieden, 1958) и другие (Desreux et al., 1962).

Кирби (Kirbi, 1957, 1958) нашел, что диоксирибонуклеиновые кислоты связаны с протеинами регулируемыми металлосвязями. На это же указывает Хаген (Hagen, 1960), применявший X-иррадиацию для обработки диоксирибонуклеиновых кислот. Он также нашел металлы, связывающие ДНК и протеин.

Работы Уоррена, Уокера и Велли (Warren, Wacker, Vallee, 1959) говорят в пользу участия микроэлементов в структуре и функциях нуклеиновых кислот. Упомянутые авторы проводили исследования, придерживаясь строгой методики тщательной очистки сред и препаратов от микроэлементов. Систематическое исследование нуклеиновых кислот, изолированных из разных растительных и животных тканей, показало значительные содержания крепко связанных с ними металлов — Fe, Co, Cu, Zn, Ca, Sr. Их тут было больше, чем в естественных материалах, откуда были получены РНК. Так, в 1 г РНК *Euglena gracilis* были найдены металлы (в мкг): Cr — 76, Mn — 73, Ni — 60, Al — 32, Ca — 920, Fe — 180, Cu — 190, Zn — 650, Mg — 400. Такие же и несколько большие количества их были найдены и в различных тканях животных. Из всех выделенных поражают особенно большие количества Ca, Mg, Fe, Cu и Zn.

Тесная связь металла с молекулой РНК доказана диализом, не удалившим его из препаратов. Металлы были найдены также и в ДНК, однако концентрации их были намного меньше, чем в РНК.

Сопоставляя количество металла с величинами фосфатных групп РНК разных источников, авторы отметили относительное постоянство их соотношений, равное 1:50. Все это дает им основание утверждать специфичность взаимоотношений между найденным металлом и РНК. Они считают, что металлы входят в неизвестные в данное время группировки элементов в составе РНК и при определенных условиях, вероятно, будет возможно достигнуть функционирования РНК при одном специфическом металле.

Новым в выяснении потенциальных возможностей РНК является то, что металлы могут обслуживать связи этих нуклеиновых кислот с протеиновыми частями (остатками) молекулы.

Авторы выдвигают гипотезу о координационных хелатных комплексах в составе РНК между металлом и пуринами и пиримидиновыми основаниями РНК через азот азотных оснований. Они высказывают предположение, что металл в РНК стабили-

зирует конфигурацию молекулы, связывая пурины или основные пиримидины или те и другие через ковалентные связи. Это означает, что металлы могут принимать участие в функциональном отношении в синтезе протеина и даже передаче генетических свойств клетки.

В подтверждение вышеприведенных данных Виндер и Денневи (Winder a. Denneny, 1959) сообщают о результатах культивирования *Mycobacterium smegmatis* в среде с недостаточным количеством цинка и железа. Кроме плохого роста авторы констатировали относительно малое содержание РНК, что в свою очередь вызывало задержку синтеза ДНК и протеина. При добавлении к уже выросшей культуре недостающих металлов происходит резкое увеличение ДНК, повышение фракции неорганических фосфатов, что свидетельствует о торможении использования богатых энергией фосфорных соединений. В этих культурах замедлено также использование кислоторастворимой фракции, содержащей нуклеотиды и флавины.

Некоторые авторы указывают на зависимость передачи наследственных свойств микроорганизмов от микроэлементов. Так, Сарачек (Sarachek, 1959) сообщает о действии марганца на передачу дыхательной недостаточности у неделящихся популяций дрожжей. Под действием марганца возникало большое число мутационных вариантов с измененным типом дыхания. Автор считает, что с помощью марганца происходит индукция наследственной черты и что мутагенное действие марганца связано с изменением нормального синтеза белка в клетке.

На другой тип индукции указывают Мрхем и Смит (Mrkham a. Smith, 1954), работавшие с бактериофагом. Определялось поступление продуктов бактериофага в лизогенные культуры бактерий, обуславливавшее дальнейшие свойства бактериофаголизиса. На передачу этих свойств влияли некоторые факторы: облучение ультрафиолетовыми лучами, некоторые восстанавливающие вещества и микроэлементы. Оказалось, что переключение от пробактериофага к образованию бактериофага тесно связано с балансом определенных катионов — Cu , Co , Mn , которые могут быть причиной индукции продуктов бактериофага в лизогенные культуры.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Основой всех биохимических процессов является трансформирование химической энергии в биоэнергию живого вещества. Этот процесс протекает в определенном направлении, и конечным результатом трансформирования является снижение энергии активации биохимических реакций. Последнее необходимо для осуществления основных биохимических превраще-

ний — процессов большой сложности и больших скоростей (Брей, Уайт, 1958).

Биоорганихимические системы клеток живых организмов по природе своих химических связей слабо активны. Обычные условия внешней среды (температура, атмосферное давление, кислотность и др.) также не благоприятствуют течению в них синтеза и распада сложных органических веществ. Для активирования процессов необходимо вмешательство ферментов, в активных центрах которых в большинстве случаев содержится металл. (Это, например, наблюдается в случае биологического окисления). Таким образом, такие металлы являются биохимактиваторами, принимающими участие в снижении величины энергии активации системы.

Ионы металла имеют большой запас энергии и большую величину электроотрицательности, что необходимо для деформирования электронных оболочек, комплексобразования и сгущения электронной плотности, обуславливающих их действие. Снижение энергии активации биологических систем происходит при смещении (или сгущении) их электронной плотности посредством индукционного эффекта. При этом реагирующие молекулы приходят в возбужденное состояние. Такую роль играют микроэлементы 4-го периода Менделеевской системы. Наиболее изученные из них — Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn. Энергетические возможности этих микроэлементов имеют ряд особенностей, обуславливающих их активное участие в физиолого-биохимических процессах, особенно в процессах биологического окисления. Они обладают большой потенциальной валентностью в возбужденном состоянии, проявляют большой индукционный эффект, особенно в системах с бидентальными связями. Большинство этих элементов обладает парамагнитными свойствами, что также играет роль в действии микроэлементов. Эти элементы имеют незаполненные валентные оболочки с большими побочными квантовыми числами, способствующими их участию в свободных радикальных реакциях в качестве инициаторов. Электроны указанных микроэлементов способны при возбуждении диспергировать (разобщаться) и переходить на другие энергетические уровни, то есть другие электронные орбиты. Вследствие сближенного расположения энергетических уровней, то есть вследствие близости их свойств, электроны легко могут размещаться по ним даже при слабом возбуждении. Поэтому потенциальная валентность в возбужденном состоянии может значительно увеличиваться, что отражается на активности микроэлементов.

В комплексных соединениях с микроэлементами возникает индукционный эффект, передающийся по всей цепи сопряженных связей, что увеличивает потенциал системы, создавая равномерное возбуждение всех звеньев сложных органоминеральных соединений.

Что касается других микроэлементов, особенно бора, то возможно, что механизм его активации основан на замещении его вакантных слоев парой электронов соседнего элемента с образованием эффективных связей, увеличивающих валентные возможности микроэлементов.

Суммируя все вышеизложенное, можно сказать, что основное физико-химическое действие ионов металла как катализаторов в биоорганоконплексах заключается в том, что они приводят в возбужденное состояние электроны внутрикомплексной биоорганической системы благодаря сгущению вокруг себя электронной плотности. Последняя возникает в результате отрицательного индукционного эффекта. Эти физико-химические реакции снижают энергию активации всей взятой системы, что дает возможность протекать в естественных условиях исключительно сложным биопроцессам при большой скорости.

Что касается действия малых концентраций микроэлементов, так не соответствующих сложным реакциям, в которых они участвуют, то имеется основание полагать, что микроэлементы в форме внутренних комплексов инициируют (дают первый толчок) цепному процессу последовательных реакций. В этом процессе участвует цепь возникающих свободных радикалов, из которых только первый возникает под воздействием микроэлементов, а в дальнейших стадиях реакции микроэлементы не принимают участия, так как начавшаяся цепная реакция сама создает условия, необходимые для возникновения одного звена за другим без того, чтобы при каждом из них участвовал специальный микроэлемент. Надо полагать, что при начальной передаче энергии субстрату микроэлемент разрушается (или изменяется), а затем вновь восстанавливается (по примеру цистеината железа в окислительной системе). Таким образом, получается «пульсирующее» состояние, обуславливающее трансформирование малыми дозами микроэлементов большого запаса химической энергии в энергию живого вещества (Бартон, 1959).

ЧАСТЬ II

ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Влияние микроэлементов на растительные организмы до последних десятилетий изучали главным образом на высших растениях, и только в незначительном количестве работ были использованы микроорганизмы. По мнению некоторых исследователей, действие микроэлементов легче проследить на высших растениях, чем на микроорганизмах, поскольку прирост биомассы у первых более заметен. Однако скорость роста микробных популяций дает возможность более быстро получать ответы на поставленные вопросы. Это делает микробные тесты, использованные в опытах, более простыми и удобными. Видимо, поэтому изучение влияния микроэлементов в начальной своей стадии наряду с высшими растениями проводилось также и на микроорганизмах.

Начатые в конце XIX и начале XX ст. исследования, сначала очень разрозненные, носящие характер случайных открытий, все же показали, что основными микроэлементами, необходимыми для микроорганизмов, являются Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, B, Co. Их количественное потребление обычно зависит от особенностей испытываемого организма.

Кроме воздействия на увеличение общей массы клеток микроэлементы действуют и на другие функции организма, на его морфолого-культуральные свойства, количество и качество образуемых им веществ, на ферментативные процессы. Часто микроэлементы нужны для функционального действия отдельных ферментов и для других процессов, от которых во многих случаях может зависеть проявление основных функций организма. Так, Мульдер (Mulder, 1939, 1948) не отмечал действия меди на рост азотобактера, но культуральные свойства этой бактерии изменялись в среде без данного элемента. Фостер и Ваксман (Foster a. Waksman, 1939, 1939a) нашли, что отсутствие цинка послужило причиной потери способности *Rizophus nigricans* усваивать углеводы, но наряду с этим отмечалось усиление образования им фумаровой кислоты. Согласно Фостеру (Foster, 1949), отсутствие цинка, железа, меди и марганца в среде при-

водило не только к уменьшению роста плесневых грибов, но и к накоплению таких промежуточных продуктов метаболизма, как фумаровая и лимонная кислоты.

Первыми микроорганизмами, использованными в качестве тест-объектов в опытах с микроэлементами, были плесневые грибы *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*. Такой выбор объектов, видимо, был обусловлен их отзывчивостью на микроэлементы, при применении которых заметно усиливались не только рост, но и физиологические функции этих микроорганизмов. Почти вся литература первых лет исследований относится к этим объектам и только в последние десятилетия начинают поступать сведения о действии микроэлементов на бактерии, актиномицеты и микроскопические водоросли.

Существенной особенностью в действии микроэлементов являются их относительно малые дозы, необходимые для культивирования бактерий. Такие малые количества микроэлементов во многих случаях находятся в среде как загрязнения, поступающие с минеральными солями, органическими соединениями и даже стеклом посуды, в которой ведут опыты. Эти случайные поступления микроэлементов в среду в некоторых случаях могут не только мешать постановке опыта, но и искажать получаемые данные, давая разноречивые результаты. Понадобилось немало времени, чтобы понять необходимость особых предосторожностей в технике исследований микроэлементов, исключающих возможность загрязнения сред для роста микроорганизмов. Особенно это относится к опытам, в которых исключают тот или иной элемент из среды для выяснения его необходимости в питании микробов.

Если обратиться к истории развития данного вопроса, то одним из первых исследователей в этой области можно считать Пастера, показавшего важность минерального питания микроорганизмов добавлением соли в среду для их выращивания. Затем Ролан (Raulin, 1869), работая с *Aspergillus niger*, вносил в среду железо и цинк. Недостаток этих элементов заметно воздействовал на рост и продуктивность гриба. Многочисленные работы Жавилье и Бертрана (Javillier, 1914; Bertrand, Javillier, 1911, 1912; Bertrand, 1912, 1913) подтвердили выводы предыдущего автора, установив, что кроме названных элементов марганец и медь также необходимы для нормального развития и образования конидий этого гриба. Необходимость цинка в дальнейшем была подтверждена Стейнбергом (Steinberg, 1919, 1935). Этот же автор показал участие молибдена в редукции нитратов у бактерий (Steinberg, 1936).

В конце XIX ст. теория благоприятного действия малых количеств минеральных элементов нашла свое признание. Но вопрос о специфичности действия отдельных элементов еще не поднимался. Действие микроэлементов объяснялось их необхо-

цностью в реакциях организма, борющегося с неблагоприятными факторами существования. Только после работ Ролана, Бертрана и Жавилье действие микроэлементов было признано, и они стали рассматриваться как физиологические катализаторы в организмах.

Успех работ указанных авторов в значительной мере исходил от впервые примененной ими очистки сред от микроэлементов. Методы же очистки в те годы были весьма несовершенны.

Интересна возникшая в то время дискуссия о действии цинка и железа. Одни приписывали это действие косвенному влиянию данных элементов на среду; другая же сторона стремилась показать, что цинк непосредственно действует на *Aspergillus niger*, активируя его ферменты и усиливая использование углеводов. Последнее положение удалось подтвердить классическими опытами Жавилье, разделившего очищенную среду на две части. В одну из них он добавил цинк. *Aspergillus niger* развился в среде с цинком и не рос без него. В этих же опытах было показано, что цинк не мог быть заменен другим металлом.

Доказательство необходимости микроэлементов для грибов усложнилось тем, что количество необходимых элементов для различных особей не всегда одно и то же не только для различных видов, но даже в пределах штаммов одного и того же вида. Все же Стейнберг (Steinberg, 1935, 1936) пытался установить относительные количества металла, требуемые для оптимального роста *Aspergillus niger*. Эти дозы, по его мнению, были следующими: Fe—0,2, Zn—0,18, Cu—0,04, Mn—0,02, Mo—0,02 мг/л. В дальнейшем Фостером (Foster, 1949) было подтверждено, что железо, цинк, медь и марганец необходимы для роста всех плесневых грибов. Однако оптимальные дозы, рекомендованные им, были сильно изменены впоследствии другими авторами.

Лавали (Lavallay, 1955), работая с *Aspergillus niger*, пытался экспериментально установить соотношение между дозировками микроэлементов в среде и получаемой эффективностью роста микроорганизмов. Он предложил формулу, выражающую математическое отношение между ростом и дозой микроэлемента. Однако такого рода выражение отношений микроорганизма к среде нам кажется неправильным, поскольку при росте может играть роль множество неучтенных в формуле факторов.

В обширных обозрениях, касающихся влияния микроэлементов на грибы (Foster, 1939, 1949; Perlman, 1949; Лилли и Барнет, 1953), отмечается многогранность этого действия. Микроэлементы действуют на интенсивность и характер роста, пигментацию, продукцию различных веществ: витаминов, антибиотиков, ферментов.

В исследованиях последних лет начинают фигурировать иные

микроэлементы, причем их действие сказывалось не только на росте, но и на многочисленных функциях разных микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Грибы. Как уже было сказано, исследования, проведенные в последние десятилетия, показали, что ионы металлов играют важную роль в росте и жизнедеятельности микроорганизмов. Были также достигнуты некоторые успехи в понимании действия ионов на обмен их веществ.

В своих работах Стейнберг (Steinberg, 1945) утверждал, что минеральное питание плесневых грибов схоже с таковым у зеленых растений, что они, как и последние, нуждаются в микроэлементах. Действительно, многими авторами отмечалось влияние микроэлементов на рост грибов. Существующие относительно этого данные очень разнообразны, так как они обычно относятся к опытам с различными видами и штаммами, различными дозами микроэлементов, средами и условиями опыта.

Первые опыты, показавшие необходимость микроэлементов для роста и прибавки веса мицелия *Aspergillus niger*, принадлежали уже упомянутым Ролану, Жавилье, Бертрану. Первый из них пишет о «замечательном факте действия малых количеств цинка, способных образовывать большие количества органического вещества мицелия» (Raulin, 1869). По мнению Ролана, действие цинка и железа на гриб очень схоже, хотя каждый из них отправляет свою специальную функцию и замена одного другим недопустима. Он придерживался взгляда на эти элементы как на необходимые питательные вещества (компоненты среды), а не биологические стимуляторы.

Рихард (Richard, 1897), работавший с различными дозами цинка, железа, кобальта, никеля, алюминия, марганца, пришел к заключению, что малые дозы некоторых из них увеличивают сухой вес гриба в 2—4 раза. Работая с очищенными от микроэлементов средами, Стейнберг (Steinberg, 1919) также подтвердил необходимость цинка для *Aspergillus niger*, почти не росшего без этого элемента и усиливавшего рост в 2000 раз при его внесении.

Подобные данные были получены в отношении того же микроорганизма Бортельсом, Робергом и Гольмиком (Bortels, 1927; Roberg, 1931; Golmick, 1936). Усиление роста *Aspergillus niger* от применения марганца, цинка и отчасти бора наблюдали также Горбах с сотрудниками (Gorbach et al., 1957, 1957a).

Изменение формы углеводного питания в синтетических средах не влияло на потребность этого же гриба в микродозах железа, меди, цинка, марганца, молибдена (Steinberg, 1919,

1939, 1942). По данным того же автора, особенно заметно на рост гриба действие цинка, который не мог быть заменен другими микроэлементами. На споруляцию гриба больше действовала медь. Фишер (Fischer, 1942) говорит о необходимости для роста гриба цинка, меди, железа, марганца в среде, источником углерода которой является крахмал. В среде же с арабогалактозой необходим молибден.

Кроме влияния упомянутых микроэлементов, наблюдалось также олигодинамическое действие на данный гриб ванадия, заметно усиливающее его рост даже при наличии в среде других элементов (Bertrand, 1941, 1942).

Большие исследования в области действия микроэлементов принадлежат Мульдеру (Mulder, 1939, 1954, 1957). Им была подтверждена, с применением современных методов очистки сред, необходимость Fe, Zn, Cu, Mo для роста и спорообразования *Aspergillus niger* и других видов аспергиллов — *Aspergillus flavus* и *Aspergillus glaucus*, а также *Rhizopus nigricans*.

Изучая специфическое действие цинка и других тяжелых металлов (Fe, Mo, Mn, Cu) на рост и физиологические особенности *Rhizopus nigricans* в очищенной от микроэлементов среде, Фостер и Ваксман (Foster a. Waksman, 1939) пришли к выводу, что данные элементы необходимы грибу, особенно цинк, наличие которого в среде заметно изменяло физиологические особенности этого микроорганизма и без которого он не рос. Говоря об элементах пластических и функциональных, авторы относят цинк как к одной, так и другой категории, то есть считают, что этот элемент служит пластическим веществом, а также сильным и необходимым катализатором ферментативных реакций.

Действие цинка на различные виды *Rhizopus* отмечено многими исследователями. Этот элемент, ускоряя рост и образование спор, увеличивал вес мицелия в синтетической среде с глюкозой (Waksman a. Foster, 1938; Lockwood, 1940; Albert et al., 1947).

Сравнивая действие смесей микроэлементов, в которые входили Zn, Mn, Cu, на рост гриба, Нильсен (Nielsen, 1940) находит подобие с действием на него ростовых веществ. Усиление роста грибов из рода *Fusarium* при действии цинка отмечает Центмаер (Zentmeyer, 1944).

Грибы других семейств также положительно реагировали на микроэлементы. *Mucor ramannianus* мог расти на среде с определенными источниками азота только при наличии в среде Cu, Mo, Li, V.

Мойер и Коджил (Moyer a. Coghille, 1946) отмечают необходимость микроэлементов при росте *Penicillium notatum* и *Penicillium chrysogenum* в синтетических очищенных средах. Особенно заметно было действие цинка. Гораздо позднее, при

усовершенствовании технологии получения пенициллина, изучалось действие марганца на *Penicillium chrisogenum*, значительно повышавшего рост этого гриба и использование им сахаров. Оптимальной дозой являлись 0,004% сернистого марганца (Шаместникова, 1960). При добавлении цинка к очищенной среде, содержащей витамины и аминокислоты, рост *Phycomyces blakesleanus* увеличивался вдвое (Leonian a. Lilly, 1940), в то время как другие микроэлементы не действовали.

Опыты Бланка, Езекиля (Blank, 1941; Ezekiel, 1945) с *Phycomatotrichum omnivorum*, изучавших действие отдельных микроэлементов в синтетической очищенной среде, показали, что только цинк, марганец и железо увеличивали образование мицелия; кобальт, никель, медь, кадмий и алюминий угнетали его рост. Рост *Neurospora crassa* усиливался при добавлении следов Zn, V, Mo, Mn, Fe, Cu (Ryan, 1943).

Большим вкладом в изучение действия молибдена были работы Николаса (Nicholas, 1957). Культивируя *Neurospora crassa* на среде без Mo, автор наблюдал значительное снижение роста мицелия; добавление молибдена к такой плохо растущей культуре уже через 2 дня восстанавливало вес мицелия до 95% веса контроля. Однако добавление молибдена к гомогенату мицелия не имело действия.

В России первые работы по исследованию действия микроэлементов принадлежали Буромскому (Буромский, 1912; Buromsky, 1913). Работая с очищенными средами, он испытывал влияние солей Zn, Mg, Ca, K, Na на развитие *Aspergillus niger*. Им также отмечено значительное увеличение роста мицелия гриба и необходимость для этого цинка.

Дальнейшие исследования Васильева (Васильев, 1930; Wasilliew, 1935) показали, что действие цинка как стимулятора можно обнаружить уже в первые дни роста гриба. В этом случае лучшие результаты были получены при наличии в среде глюкозы, янтарной или лимонной кислот.

Подобное действие цинка, увеличивающее в два раза вес мицелия, наблюдали также Буткевич (1957), Буткевич, и Барина (1932). Полученные ими данные были настолько убедительны, что авторы рекомендовали применение определенных доз этого элемента для промышленного производства лимонной кислоты.

Большая работа в отношении действия цинка и других микроэлементов, о которых речь будет ниже, проведена в двадцатых годах Костычевым, работавшим также с *Aspergillus niger*.

Все эти данные относительно необходимости меди, цинка и железа для роста *Aspergillus niger* подтверждены позднейшими исследованиями (Упитис, 1961), проведенными при тщательной очистке сред от металлов. В этих условиях гриб совершенно не рос. Внесение их способствовало активному росту и спорообра-

ованию гриба. Взятые элементы, по мнению автора, специфичны, и ни один из них не может быть заменен другим.

Применение радиоактивного цинка расширило наши представления о его действии. Так, Гезер (Geser, 1962) проследил поглощение этого элемента клетками упомянутого гриба в ходе его развития. Поглощение цинка начиналось с прорастания конидий. Усиливая рост гриба, он накапливался в организме пропорционально сухому весу. Он был найден в органических и неорганических фракциях экстрагированного мицелия.

Интересно, что такое же влияние микроэлементов Mo, Zn, V и Mn наблюдалось в исследованиях последних лет микоризных грибов, которые более интенсивно росли в средах и развивались в древесных растениях при применении этих элементов, особенно марганца (Шемаханова, 1959; Мишустин и Пушкинская, 1961).

А к т и н о м и ц е т ы. После первых исследований влияния микроэлементов на рост грибов в литературе появляются работы, подтверждающие это действие на других объектах. Наблюдения производили на микроорганизмах, обитателях различных экологических зон, поскольку исследования проводились в различных странах мира, особенно Европы и Америки. Полученные разными методическими приемами, результаты носят иногда разноречивый характер, но большинство из них подтверждает благоприятное действие некоторых металлов на рост и развитие микроорганизмов. В большинстве исследований авторы не пользовались очищенной от металлов средой, а наблюдали их влияние по естественному для данных условий фону.

При изучении минерального питания актиномицетов, продуцентов антибиотиков, и оптимальных условий их культивирования было выяснено действие многих металлов на рост этих микроорганизмов.

Обычно положительное действие на рост сказывалось и на усилении продукции антибиотика, но в некоторых случаях различные металлы действовали только на рост, другие же — на образование антибиотических веществ. Большинство работ этого направления относится к продуценту стрептомицина — *Streptomyces griseus*. В ранних исследованиях Темпла (Temple, 1948) усиление роста мицелия этого гриба наблюдалось при воздействии магния и калия. Железо же действовало только на выход антибиотика. В дальнейшем такие же данные были получены в отношении цинка и меди (Chester a. Rolinson, 1951, 1951a). Исследования Чалюпки говорят о таком же действии K, Na, Mg, Ca, Fe, Zn, значительно увеличивающих вес мицелия (Chalupka, 1957).

Рост другого актиномицета — *Streptomyces fradii* — на синтетической среде с глютаминовой кислотой и глюкозой также усиливался под влиянием K, Mg, Fe, Zn (Dulmage, 1953). Некоторые сведения говорят о том, что при наличии в среде меди в

дозе 0,01%, а также кусочка медной пластины они производят задерживающее действие.

Как сообщают Хикей и др. (Hickey a. Tresner, 1952), кобальт оказывал положительное влияние на рост и споруляцию *Streptomyces fradii* и других актиномицетов.

Спилсбери (Spilsbury, 1948), употребляя мясоептонную среду, испытал действие многих микроэлементов, в том числе редких металлов и анионов. Он сообщает о повышении роста актиномицетов при добавлении молибдена.

Некоторые литературные данные говорят об увеличении роста актиномицетов при добавлении к среде почвенных экстрактов или их золы. Увеличение это было пропорционально внесению в среду золе и объясняется наличием в ней микроэлементов. Это толкование основывается на данных опытов с очищенными средами с последующим добавлением отдельных металлов, благоприятно влияющих на культуры актиномицетов. Лучшими дозами металлов оказались: Fe — 0,05 мг%, Mn — 0,0005, Zn, Cu, Mo — 0,005 мг%. Комбинации металлов в некоторых случаях были эффективнее, чем поодиночное внесение микроэлементов в среду. Лучшими сочетаниями были: Fe—Zn, Fe—Mn—Zn, Fe—Zn—Mo—Mn.

Изучение эффективных комбинаций микроэлементов проводилось на 8 видах *Streptomyces*. Металлы — Fe, Zn, Mn, Cu, Mo — вносили отдельно и в различных сочетаниях. Критерием эффективности служил рост, который усиливался от железа и цинка у всех культур. Марганец был эффективен только для *Streptomyces caelicolor*, медь не действовала на три вида и уменьшала рост *Streptomyces fradii* на 55% (Lechevalier, 1951; Heim, 1956).

Д р о ж ж и. О действии микроэлементов на рост и различные функции дрожжевых культур говорится в обзоре Нейберга (Neuberg, 1946). Более специальным сообщением, непосредственно рассматривающим минеральное питание дрожжей, является работа Йослина (Joslyn, 1941).

Следует отметить чрезвычайно обстоятельную, безукоризненно выполненную работу с дрожжами Кнюзеля (Knusel, 1957). Автор изучал влияние микроэлементов, в особенности цинка и железа, на рост и образование витаминов 10 видов *Candida Guilliermondii* и 9 близких к ним видов дрожжей. Рост всех этих микроорганизмов усиливался в сильной степени от железа и цинка, меньше действовали медь, марганец, молибден, ванадий. Хорошо влияли также комбинации железа и цинка.

В о д о р о с л и. Потребность в микроэлементах при росте водорослей подтверждена рядом работ. Так, Пирсон (Pirson, 1958) обнаружил необходимость марганца для роста *Ankistrodesmus*. Действие молибдена на сине-зеленую водоросль *Cylindrocapsa* наблюдал Венкатарамон (Venkataraman, 1959). Эта

водоросль, выделенная из почвы, в питательной среде без молибдена не развивалась. По мнению автора, причиной этого является молибден, который способствует усвоению нитратов. Тот же микроэлемент, по данным Арнона и др. (Arnon et al., 1955), усиливает рост *Scenedesmus*. Оба автора объясняют действие молибдена восстановлением нитратов, благодаря чему последние лучше используются водорослями.

При массовом выращивании *Chlorella* Уолкер (Walker, 1953, 1954) убедился в необходимости для роста этой водоросли не только кальция, но и железа, марганца, молибдена и цинка.

Доза бора в количестве 0,1 мг/л давала прирост биомассы *Nostoc muscorum* на 39% (Eyster, 1952).

В литературе также есть указания на возрастающие потребности в микроэлементах у микроорганизмов и простейших с повышением температуры (Hutner, 1958).

Б а к т е р и и. Зависимость роста бактерий от наличия в среде микроэлементов в большинстве случаев изучалась при использовании почвенных микроорганизмов. Большинство работ такого рода относилось к наблюдению действия молибдена, бора, ванадия и вольфрама на рост и азотфиксацию азотобактера и клубеньковых бактерий.

Многочисленные исследования в этом направлении принадлежат Бортельсу (Bortels, 1930, 1936, 1937, 1939), одному из первых показавшему, что при наличии молибдена усиливается размножение азотобактера. Работая с малогумусными почвами, Бортельс наблюдал резкое увеличение в них количества азотобактера при внесении молибдена и ванадия. Автор все же выражает сомнение относительно необходимости этих элементов для роста азотобактера, однако отсутствие этой бактерии в некоторых почвах он объясняет отсутствием в них молибдена. Того же мнения придерживается и Ван-Ниль (Van-Niel, 1935), который не мог выделить азотобактер из почв с низким содержанием Мо. Данные Бортельса о стимулирующем действии молибдена на азотобактер были подтверждены Клуйвером и Ван-Рененом (Kluiver a. Van-Reenen, 1933), а также Бэрком и Хернером (Burk a. Hogner, 1935). Зависимость между содержанием молибдена в почвах и распространением и активностью азотобактера подчеркивает Беляков (1950), констатировавший отсутствие азотобактера в целинных почвах, бедных молибденом, и нашедший его в засушливой зоне Северного Прибалхашья, почвы которого содержали молибден.

В условиях орошаемого земледелия Узбекистана внесение молибдена стимулировало рост азотобактера и других бактерий в почве и в ризосфере хлопчатника, где количество этой бактерии увеличилось в 4—4,5 раза (Кузнецов, 1952). Усиление развития азотобактера при действии молибдена наблюдалось также и в условиях ризосферы озимой пшеницы. Так, Савельева (1954)

отмечает увеличение числа клеток этой бактерии при применении суперфосфата с молибденом и бором.

Лабораторные и вегетационные опыты Матуашвили (1947) показали резкое ускорение развития азотобактера под действием молибдена, что привело автора к убеждению о необходимости этого элемента для данной бактерии.

Действие молибдена и вольфрама на два вида азотобактера подтверждено также позднейшими работами Килера и Варнера (1962), проведенными с радиоактивными элементами и тщательной очисткой сред от загрязнений. В этих условиях авторы наблюдали явную необходимость молибдена для роста обоих видов.

Меньше исследований проведено в отношении действия бора. По мнению Герретсена и Хупа (Gerretsen a. Hoop, 1954), бор является необходимым элементом для азотобактера, так же, как и молибден, ускоряющим его рост и размножение. С другой стороны, Андерсон и Джордан (Anderson a. Jordan, 1961) не нашли жизненно необходимым для азотобактера наличие в питательной среде бора. О необходимости цинка для роста этой бактерии говорят исследования Метца (Metz, 1930).

Мало сведений в литературе о действии на азотобактер марганца. Но, по данным Стейнберга (Steinberg, 1938), скорость размножения этой бактерии в среде без марганца замедляется.

Разноречивы данные литературы относительно действия меди. О ее необходимости говорит Шредер (Schröder, 1952), в то время как Гривс (Greaves, 1933) сообщает о ее токсичности для развития и усвоения азота азотобактером. В данном случае авторы использовали разные дозы меди, давшие им противоречивые результаты.

В почвенных условиях (Eisswein u. Schwartz, 1939) медь угнетала азотобактер в первые дни, в последующий же период наблюдалось восстановление первоначального количества клеток. Радлер (Radler, 1955) отмечает благоприятное влияние кобальта на размножение азотобактера.

Параллельно опытам с азотобактером Бортельс (Bortels, 1936, 1937a) проводил наблюдения над клубеньковыми бактериями клевера, сои, гороха и др., показавшие, что молибден и ванадий повышают приживаемость и развитие этих бактерий на корнях растения-хозяина. Это обычно выражалось в увеличении количества и величины клубеньков. Повышение азотфиксации и развитие клубеньков на вике под действием бора отмечали Бренчли и Торнтон и др. (Brenchley a. Thornton, 1925). Подобные же результаты получил Мульдер (Mulder, 1939, 1948a) на клевере и люцерне при испытании клубеньковых бактерий этих растений.

О положительном действии молибдена и бора на развитие клубеньковых бактерий в почве сообщают также Клиндаре и

Кресляня (1961). Комбинированное применение этих микроэлементов на дерново-среднеподзолистой почве Латвии увеличило количество клубеньковых бактерий клевера в 4, люцерны — в 6 раз.

Некоторые сведения о действии кобальта на данные бактерии сообщают Риче с сотрудниками, Лоу и др. (Richie et al., 1960; Lowe a. Evans, 1962). Первые установили резкое ускорение роста клубеньковых бактерий сои на среде с кобальтом и усиление приживаемости данных бактерий на корнях; вторые, проводя тщательно поставленные опыты с клубеньковыми бактериями, установили значительное усиление развития различных видов этих бактерий, особенно клубеньковых люцерны, от действия данного элемента.

Кроме того, изучали отзывчивость ряда других бактерий на микроэлементы. В исследованиях с целлюлозными бактериями Штапп и Бортельс (Stapp u. Bortels, 1934) убедились в том, что для развития и активности этих бактерий требуются, кроме кальция, также марганец и железо. Однако эти требования в большой мере зависят от типа почв и их pH. Бортельс (Bortels, 1956) также сообщает, что *Cellvibrio* и *Cytophaga* нуждаются в марганце и железе и частично в меди в слабокислых почвах, а в щелочных эти элементы нужны только для *Cellvibrio*.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о действии микроэлементов на почвенную микрофлору в полевых условиях при внесении их в качестве удобрений. Так, в многолетних и обширных полевых опытах с марганцевыми и другими микроудобрениями, проведенными в Институте физиологии растений АН УССР, изменялись состав и количество микрофлоры (Власюк, 1952, 1956; Гродзинская, 1959). В ризосфере сахарной свеклы, кукурузы, льна и др. растений наблюдалось увеличение нитрифицирующих, маслянокислых и других бактерий. Данные лаборатории микробиологии ВИУА, приводимые Кедровым-Зихманом (1952), говорят о значительном действии бора на количество почвенной микрофлоры. В подзолистых почвах изменяется количественное соотношение бактерий к грибам. Особенно это заметно при действии бора по фону извести. Без бора это соотношение равно 4,7, при внесении этого элемента — 13,4. При этом число бактерий увеличивается с 800 до 2010 тыс. на 1 г почвы, а число плесеней уменьшается с 170 тыс. до 150, при этом усиливается рост клубеньковых и нитрификаторов. Подобные данные получены Рубенчиком и Бершовой (1959). Применение микроэлементов значительно повышало биологическую активность микрофлоры почвы.

Усиление микробной деятельности с внесением микроэлементов в почвы Восточной Сибири отмечает Ламбин (1950). Благоприятное действие бора на микрофлору почв констатируют также Челябинова и Судакова (1952). По их мнению, этот

элемент стимулирует развитие бактерий даже в том случае, когда он применяется в дозах, токсичных для высших растений. Бор изменяет распределение микроорганизмов на корнях растений, увеличивая количество требующих органическое вещество. Размножение группы гнилостных бактерий при воздействии В в торфяно-болотных почвах Латвии отмечает также Озолиня (1958). В ризосфере кукурузы и трав количество микроорганизмов увеличивается в несколько раз при внесении этого элемента.

Увеличение численности ризосферной микрофлоры бобовых и злаковых культур при внесении микроэлементов отмечено и другими авторами (Креслинь, 1963, 1963а; Клиндаре, 1963). Данное явление в значительной мере зависит также от сопряженности происходящих в почве процессов. Усиление азотфиксации и связанное с этим повышение азотного баланса почвы влекут за собой повышенную активность аммонифицирующих и нитрифицирующих бактерий.

Такое же действие на микрофлору почвы оказывали бор, марганец, цинк, медь и в иных условиях. Внесенные с поливными водами и внекорневой подкормкой на тяжелосуглинистых черноземах Приазовского края, они стимулировали развитие микрофлоры ризосферы некоторых сельскохозяйственных растений. Усиливалось развитие *Bac. mycoides* и увеличивались показатели биологической активности почвы (Щепкина, 1961).

Широко поставленные опыты в Азербайджанской ССР также подтверждают эти данные. Микроудобрения, полученные на базе отходов нефтяной промышленности, значительно повышали развитие почвенных микроорганизмов, в том числе и азотобактера, в условиях суглинистых почв этой республики (Касимова, 1961). Там же в условиях Бардинского и Адамского районов наблюдалось активирующее действие марганца, бора и меди на азотобактер и азотфиксирующую микрофлору почвы (Абуталыбов, 1961); меньший эффект был получен от цинка, и кобальта (Абуталыбов, Газиева, 1961).

Действие бора и в меньшей мере других микроэлементов на почвенную микрофлору констатировали и в условиях суглинистых почв Западной Европы (Günther u. Meschkat, 1955).

Об усилении роста под влиянием марганца ряда распространенных в почве бактерий (*Bac. subtilis*, *Flavobact. lutescens*) сообщает Бауэрнфельд и др. (Bauernfeld et al., 1960). Автор считает, что эти микроорганизмы являются конкурентами высших растений в области использования этого элемента. Он также полагает, что болезни растений вследствие недостатка марганца происходят из-за развития особой манганофильной микрофлоры, активно накапливающей и переводящей его в трудно-растворимые формы.

Нельзя не остановиться на данных, касающихся других групп бактерий, распространенных в почве. Так, необходимость мар-

таблица для некоторых видов молочнокислых бактерий доказана работами Маклеода и Снеля (MacLeod a. Snell, 1947). Работая с *Lactobacillus delbrueckii*, Петерс и Снель (Peters a. Snell, 1954) убедились в необходимости для развития этой бактерии кроме некоторых аминокислот еще и магния, который может быть заменен марганцем. Тот же марганец в количестве 110 мг/л стимулировал размножение *Lactobacillus pentoaceticum*, влияя таким образом на выход продуктов брожения и меняя их соотношение в сторону увеличения выхода спирта (Гречушкин, 1961).

О полезности применения марганца в молочной промышленности свидетельствуют работы Мана и Гелеслуфа (Man a. Galeelooft, 1962). Добавление марганца к молоку стимулировало развитие R-кокков, входящих в состав микрофлоры закваски, что устраняет наблюдающееся весной ослабление активности заквасок. Усиливается лимоннокислое брожение, оказывающее влияние на показания креатиновой пробы. Размножение R-кокков увеличивает содержание диацетила в масле.

Действие микроэлементов на рост бактерий кишечной группы проверялось Бернасовской (1960). В очищенную от металлов синтетическую среду с добавлением различных концентраций Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co высевались брюшнотифозные, дизентерийные и другие бактерии. Все они в той или иной мере усиливали рост под действием этих элементов; больше стимулировало рост железо. Токсичность и антигенные свойства культур не менялись. Faget и Гудо (Faguet et Goudot, 1961) наблюдали положительное действие железа и марганца на развитие (ускорение лаг-фазы) и рост четырех штаммов *E. coli*; кобальт и никель в данном опыте не оказывали действия. Однако эти элементы проявили положительное влияние в опытах с *Clostridium sporogenes* в анаэробных условиях. Авторы связывают действие ионов с окислительно-восстановительным потенциалом среды, поскольку с разложением клеток увеличивается рН последней. По их мнению, ион металла катализировал реакцию окисления, вступающая в связь с группами OH и SH. В работе приводятся схемы возможных реакций.

Маклеод (McLeod, 1951) установил необходимость марганца и магния для роста *Streptococcus faecalis*. Его исследования показали, что эти элементы нельзя заменить другими. При недостаточном их количестве наблюдался автолиз культур, который мог быть прекращен внесением данных элементов.

Усиление роста *Clostridium perfringens* под действием молибдена в условиях роста на казеино-гидролизатной среде наблюдал Диневич (1961). Автор указывает на угнетающее действие меди (в дозе 5 мг/л) на рост этой бактерии. Однако добавление молибдена нейтрализовало действие меди, и кривая роста бактерий была равна контрольной (без металлов).

По данным Петерсон (Patterson, 1960), кобальт, цинк и

медь, примененные совместно, усиливали рост *Mycobacterium tuberculosis avies* на среде Дорсе примерно в три раза. Изучение же роста культур БЦЖ на средах с микроэлементами показало значительное влияние цинка. С внесением последнего происходило усиленное образование пленки, которая употреблялась для изготовления вакцины. Железо, свинец и медь не имели такого значения для роста этих культур (Williston et al., 1958 1962).

В опытах Горбаха и др. (Gorbach et al., 1955) добавление кобальта и бора усиливало рост *Bac. asteroides*, чего не получалось при применении цинка и меди. Авторы показали адсорбцию кобальта клетками этой культуры, причем она теряла способность образовывать газ.

Представляет интерес то, что галофильные бактерии, имеющие в своих клетках сравнительно большие количества минеральных элементов, также реагируют на некоторые микроэлементы. Так, Сегаль и Гиббонс (Sehgal a. Gibbons, 1960) установили стимулирующее влияние на развитие *Halobacterium salinarium*, *Halobacterium cutirubrum*, *Halobacterium halobium* железа в концентрации до 50 мг/л. В его отсутствие данные бактерии не росли, железо понижало потребность этих бактерий в NaCl. Серноокислый марганец в концентрации 0,05 г/л также увеличивал скорость роста и конечное количество клеток бактерий. Увеличение же доз марганца задерживало рост, удлиняло лаг-фазу, но не уменьшало общего выхода клеток.

В литературе имеются указания относительно морских бактерий, проявляющих сульфатредуцирующую способность (Hata, 1960) и нуждающихся для своего роста в железе. Другие микроэлементы — Ni, Zn, Cu и Cd — частично подавляли их рост. О биологической роли Mn, Cu, Zn сообщает также Беренштейн (1948, 1949, 1950).

Споры бактерий. Ряд литературных источников свидетельствует о действии микроэлементов на споры бактерий — их образование и прорастание. Усиление прорастания спор *Bac. megaterium* под действием марганца наблюдали Левинсон и Хитт (Levinson a. Nyatt, 1955, 1959). Они объясняют это действие активацией протеолитических ферментов. При расщеплении протеина одним из продуктов реакции образуется l-аланин, известный стимулятор прорастания спор. Таким образом, получается косвенное действие марганца на данный процесс. Но то, что увеличение дозы марганца усиливает процесс дыхания взятой бактерии и прорастание спор при наличии внесенного l-аланина, заставляет предположить особую, еще неясную и не связанную только с l-аланином роль марганца. С другой стороны, тот же марганец не ускорял спорулирования у *Bac. coagulans*, о чем свидетельствуют Амага и Ордал (Amaha a. Ordal, 1957). Усиление споруляции у ряда почвенных спорообразующих видов

бактерий под влиянием марганца и до некоторой степени железа наблюдали другие авторы (Cugran a. Evans, 1954), причем не все взятые виды и даже штаммы одного и того же вида реагировали на металл.

Глубокие изменения происходят в спорах бактерий под действием некоторых микроэлементов. Так, кальций и марганец усиливали резистентность спор *Bac. coagulans* к нагреванию. Такими свойствами не обладал магний (Amaha a. Ordal, 1957).

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о стимулирующем действии некоторых микроэлементов на рост самых разнообразных микроорганизмов. Это говорит об участии этих элементов в каких-то, возможно, общих для микроорганизмов процессах обмена веществ. В то же время один и тот же элемент может по-разному действовать на представителей разных родов микроорганизмов, что говорит о специфическом действии отдельных элементов. Имеется больше данных о положительном действии цинка, железа, меньше — марганца и бора. Действие молибдена относится главным образом к азотфиксаторам. Неоднородность полученных данных свидетельствует о специфике действия определенных элементов и зависит от особенностей обмена веществ отдельных организмов.

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Морфологические изменения грибов и бактерий под действием микроэлементов отмечены некоторыми авторами. У *Aspergillus oryzae* наблюдалось изменение формы клеток и ускорение конидиеобразования под влиянием высоких доз марганца и меди (Yoshimura, 1939). В свою очередь, недостаток марганца и цинка вызывал ветвление нитей, образование булавовидных утолщений клеток, появление ленточных форм *Noctardia opaca* (Webley, 1960; Webley et al., 1962). Авторы объясняют это явление уменьшением синтеза нуклеиновых кислот, ведущим к ненормальному росту и делению клеток.

Изменения морфологических признаков клеток в обогащенных микроэлементами культурах *Saccharomyces cerevisiae* наблюдал Басс-Шадхан (1962). От кобальта оболочка клетки делалась утолщенной, резко выраженной. Медь же уменьшала размеры клетки. Влияние марганца не отмечено.

Применение молибдена и бора изменяло морфологию клеток разных видов азотобактера (Матуашвили, 1947; Бершова, 1951; Рубенчик, Бершова и др., 1955). При больших дозах металла клетки уменьшались, при малых наблюдалась обратная зависимость. Изменялась зернистость клетки, протоплазма делалась более гомогенной.

Дефицит железа и цинка в среде, где росла *Mycobacterium*

megmatis, приводил к изменению клеток этой бактерии, которые непомерно удлинялись, приобретая несвойственные им формы. Данное явление объясняется, по-видимому, задержкой клеточного деления, аналогичной описанному для грибов (Winder a. O'Hara, 1962).

Культуральные особенности

Наряду с действием микроэлементов на рост и морфологию известны многочисленные случаи изменения культуральных особенностей микроорганизмов. Особое значение в этих процессах принадлежит цинку. Так, по данным Менцеля (Menzel et al., 1944), при применении этого элемента усиливалось образование красной пигментации у *Aspergillus fumigatus*. Действие цинка сказалось и в усилении желтого пигмента грибов рода *Fusarium graminearum*, выращиваемых на синтетической среде (Mull et al., 1944).

С другой стороны, Куртин и др. (Curtin et al., 1940) наблюдали уменьшение пигментации *Penicillium phoeniceum* при добавлении этого элемента к среде.

Применение меди, цинка и железа в очищенной от микроэлементов среде способствовало спорообразованию и пигментации спор *Aspergillus niger* (Упитис, 1961).

Усиление пигментации *Aspergillus wentii* достигалось также внесением марганца (Karow a. Waksman, 1947; Karow, 1947), который действовал на склеротии *Sclerotium delphinii* (Perlman, 1948).

Действие цинка изменяло характер опушения у актиномицетов. Он способствовал образованию воздушного мицелия *Streptomyces griseus* (Woodruff, 1947).

Добавление металла к среде изменяло пигментацию актиномицетов. Так, цинк усиливал окраску красно-желтых видов и не действовал на пигментацию *Streptomyces fraidise* (Snain et al., 1955).

Действие микроэлементов на пигментацию бактерий особенно видно на примере азотобактера. Все виды этой бактерии образуют пигмент, цвет и оттенки которого в значительной степени зависят от особенностей вида и условий его выращивания. Известно, что пигменты азотобактера относятся к группе меланинов и образуются ферментативным путем при действии тирозиназы на тирозин. В состав тирозиназы входит медь, наличие которой считают необходимым для образования пигмента (Mulder, 1939a). По Бортельсу (Bortels, 1939), пигменты *Asotobacter agile* зависят от соотношения железа и молибдена в среде. Сравнительно увеличенное количество железа ведет к коричнево-фиолетовым, а увеличение доз молибдена — к желтым оттенкам. В опытах Джонстона и Фишбейна (Johnstone a. Fish-

Wain, 1956) железо ослабляло, а молибден усиливал образование пигмента *Azotobacter vinelandii*. При значительном содержании в среде солей железа пигменты азотобактера приобретали коричневый оттенок. Резкую стимуляцию пигментирования у азотобактера наблюдал Андерсен и др. (Andersen et al., 1961).

При ферментативном синтезе бактериального фитоена (пигмента каротинового типа) у *Staphylococcus aureus* положительное действие оказывал марганец. При помощи меченого углерода (C^{14}) было показано, что в превращениях мевалоновой кислоты, используемой для синтеза этого пигмента, кофактором фермента, ведущего эту реакцию, являлись АТФ+Mn (Ginzaburo, 1960). Под влиянием того же марганца наблюдалось усиление окраски стафилококков, то есть образование пигментов каротинового типа (Sprampinato, 1961).

Добавление к среде Дорсе Co, Zn, Cu повышало накопление свободного порфирина у *Mycobacterium tuberculosis avium*. Применение этих элементов каждого в отдельности ослабляло результаты, и усиление пигментообразования наступало только от цинка и меди (Patterson, 1960). Считают также, что продукция продигиозина, красного пигмента, вырабатываемого *Bac. prodigiosus*, связана с образованием комплексных соединений солей цинка с дериватами пиррола.

Дефицит цинка и железа отражался на образовании пигмента (копропорфирина) у *Mycobacterium smegmatis*, количество которого варьировало в разные моменты роста и не соответствовало количеству в нормальных культурах (Winder a. O'Hara, 1962). У того же микроорганизма при недостатке цинка в среде не образовывались вещества, входящие в состав флюоресцирующего пигмента (Rathledge et al., 1962). Имеются указания на необходимость меди для образования красящего вещества *Cellulivibrio* и *Cytophaga*.

Известно участие микроэлементов в биогенезе растительных пигментов высших растений — антоциана, флавонов, порфиринов и др. Оно в большинстве случаев выражается в создании хелатных структур с белковыми веществами, необходимых при синтезе пигментов. Медь и молибден участвуют в этих процессах. Особое значение придается бору в синтезе флавонов. По-видимому, изменение пигментации микроорганизмов под действием микроэлементов наступало также в реакциях подобного типа.

Наши наблюдения над изменениями культуральных свойств под влиянием внесенных в среду микроэлементов производились в опытах с актиномицетами и азотобактером. Первым микроорганизмам, как известно, присуще легко изменять указанные признаки под влиянием различных факторов внешней среды. Изменения же культур азотобактера достигаются обычно не так легко.

Актиномицеты, выделенные из почвы хозяйства Института

микробиологии АН УССР «Феофания», идентифицировались, а затем выращивались с пересевами на среде № 1 Красильникова с добавлением различных микроэлементов (Mo, B, Mn, Cu, Zn).

Наблюдения проводились над изменениями пигментации, формы и характера опущения колоний, способностью отщеплять различные варианты, отличные от основного штамма. В отдельных схемах опыта соблюдались строго одинаковые условия (толщина агара, размер чашки Петри, количество среды и т. д.).

Таблица 6

Изменение культуральных свойств актиномицетов под действием микроэлементов

Действующие микро-элементы	Актиномицеты	Пигментация	Опущение	Форма колоний	Расщепление	Пигментирование среды
Контроль (без микро-элементов)	<i>Act. roseus</i>	Светло-розовая	Опушенный	Округлая средней величины	Нет	Нет
Mo		То же	Неполное	Фестоночатая	Сильное	»
B		Темно-красная	Сегментированное	Округлая	Нет	»
Mn		Темно-розовая	Опушенный	Выпуклая	»	»
Zn		Розовая	Сильное	Мелкие	Среднее	»
Cu		Светло-розовая	Слабо опущенный	Без изменения	Сильное	»
Co		То же	Сегментами	То же	»	»
Контроль	<i>Act. rectus</i>	Буряя	Слабое	Округлая	Нет	Слабо-бурое
Mo	<i>bruneus</i>	Темно-буряя	Сильное	»	Слабое	Сильное
B		Черная	Сильное	»	»	Очень сильное
Mn		Темно-буряя	»	»	»	То же
Zn		Буряя	Слабое	»	»	Среднее
Cu		Темно-буряя	Нет	»	Очень сильное	Сильное
Co		Светло-буряя	Слабое	»	Слабое	Нет
Контроль	<i>Act. violaceus</i>	Фиолетовая	Опушенный	Округлая	Нет	Слабое
Mo		Темно-фиолетовая	»	»	Слабое	Сильное
B		Буро-фиолетовая	»	»	Сильное	»
Mn		Темно-фиолетовая	»	»	Нет	»
Zn		Светло-фиолетовая	»	»	Сильное	Нет
Co		То же	»	»	»	»

Исследования разных видов актиномицетов производились с первых дней их роста и продолжались в течение 20-дневного периода. Примеры полученных изменений приведены в табл. 6.

Из многих испытанных видов большему действию были подвержены культуры с темной пигментацией мицелия, особенно розовые и красные. Под действием молибдена, марганца и особенно бора их пигментация усиливалась или принимала разные оттенки. Изменялось в разной степени опушение, некоторые виды совсем его теряли. Изменялись формы колоний. В некоторых случаях наблюдалось сильное расщепление признаков. На чашке Петри можно было видеть многие варианты — колонии с разной окраской и опушением, разной величиной, доходящей иногда до точечного размера. Менее чувствительны к микроэлементам виды с желтой пигментацией и еще меньше — с белой. Таким образом, актиномицеты в сильной степени способны изменять свои культуральные признаки под действием микроэлементов. Такого рода явление должно быть учтено при видовом определении этих микроорганизмов.

Что касается *Azotobacter chroococcum*, то изменения под влиянием микроэлементов в основном наблюдались в отношении его роста, пигментации, формы клеток и консистенции слизи (в данном случае мы не останавливаемся на изменениях биохимических свойств). Мо усиливал, а В ослаблял пигментацию азотобактера. Консистенция слизи при внесении молибдена была более жидкой. Оба микроэлемента вызывали диссоциацию культур. Все это проявлялось в различной мере в зависимости от штаммовых различий.

Подобные, менее или более выраженные изменения наблюдались также при культивировании разных видов бактерий. Изменялась консистенция слизи, клетки удлинялись. В некоторых случаях изменялось окрашивание по Граму. Культуры, заведомо грамположительные, после роста на среде с микроэлементами окрашивались гораздо светлее.

Из перечисленного видно, что наблюдения над изменением морфолого-культуральных особенностей микроорганизмов под влиянием микроэлементов шли главным образом по линии изменения формы клетки и пигментации. Можно отметить, что не только визуальные наблюдения, но и исследования биохимического характера с применением изотопов подтвердили участие металлов в биологическом образовании ряда пигментов бактерий. В данном случае мы говорим об участии металлов в биологических процессах образования пигментов, еще очень мало изученных. Однако известна важная роль металлов в создании красящих веществ, образующих большую отрасль химической промышленности в народном хозяйстве. Интересны возможные аналогии в этих двух направлениях использования металлов.

ЧАСТЬ III

ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Как известно, влияние микроэлементов на организмы главным образом обусловлено их участием в ферментных реакциях. Физиологическая роль их постепенно раскрывается при исследовании этих процессов. Поэтому, изучая действие микроэлементов, мы, естественно, обратились к исследованию их влияния на ферментативную активность микроорганизмов.

Г р и б ы. Заметные изменения физиологических особенностей *Rhizopus nigricans* под действием цинка и других микроэлементов наблюдали Фостер и Ваксман (Foster a. Waksman, 1939). В отсутствие цинка в среде ими отмечено неполное окисление глюкозы и превращение ее в фумаровую кислоту. При добавлении же этого элемента, вызывавшего обильный и быстрый рост, в фумаровую кислоту переходила только незначительная часть глюкозы. Действие железа и марганца было значительно менее выраженным. Авторы приходят к заключению, что цинк необходим для гриба и служит не только пластическим веществом, но и катализатором при расщеплении глюкозы и получении большего количества энергии.

Значительно позже Горбах с сотрудниками (Gorbach et al., 1956, 1957) пришли к тому же выводу, работая с *Aspergillus niger*. Образование сахарозы у этого гриба значительно повышалось при наличии цинка и зависело от состава среды. С другой стороны, отсутствие цинка в среде при выращивании *Nocardia opaca* вело к потере им способности использовать сахара (Webley et al., 1962).

Для образования протеиназы у *Aspergillus niger* при росте его на минеральной среде требовалось добавление цинка и железа, в то время как медь и марганец действовали только как стимуляторы (Gorbach a. Koch, 1955). Усиление синтеза амилазы у *Aspergillus oryzae* происходит также при действии малых доз цинка, меди и железа. У того же микроорганизма отмечена необходимость в железе и цинке для действия протеолитических ферментов (Steiner, 1961).

Действие цинка отмечено и при образовании других фермен-

тов. Установлено, что недостаток его содержания в среде приводит к резкому снижению роста *Aspergillus niger* и активности фосфофруктокиназы и дегидразы фосфоглицеринальдегида в его мицелии. Добавление этого элемента восстанавливает активность данных процессов (Bertrand a. Wolf, 1958). Вероятно, с наличием цинка связан синтез любых белков вообще, в том числе и ферментных у этого микроорганизма.

Интересны исследования индийских ученых с гексокиназой данного гриба. Прибавление к питательной среде, очищенной от микроэлементов, цинка повышало активность этого фермента. Еще больше усиливалась активность при одновременном прибавлении марганца и железа. Однако эти же ионы, прибавленные к экстракту из такого гриба, выращенного на среде, лишенной микроэлементов или с оптимальным содержанием магния, не активировали фермент.

В свою очередь потребление лимонной кислоты этим грибом стимулировалось марганцем. Бертран и Вольф (Bertrand a. Wolf, 1955) говорят о прямой связи между потреблением этой кислоты и концентрацией марганца в среде. Предполагают, что марганец является составной частью фермента аконитазы либо принимает непосредственное участие в его формировании. Действие марганца в данном случае специфично и не может быть заменено другим элементом.

По данным других авторов (Ratajak a. Owens, 1942), гидролиз арабогалактозы у этого гриба усиливался при добавлении Cu, Zn, Mn, Mo, Fe. Эти же микроэлементы повышали каталитическую активность *Aspergillus oryzae* (Yoshimura, 1939).

Недостаточное содержание цинка в среде вызывало значительные изменения в ферментативных реакциях *Neurospora crassa* (Nason et al., 1951). Исчезала активность дегидрогеназы спирта, прекращался синтез триптофана. В то же время увеличивалась активность других ферментов, в том числе дифосфопиридиннуклеотидазы. Инактивировалась фумараза, гексокиназа, альдолаза и другие ферменты. Таким образом, радикально перестраивался обмен веществ микроорганизмов.

О таких же изменениях ферментативных систем говорит Буромский (1912). При наличии цинка окисление углеводов идет до конечной стадии, а без цинка — до промежуточных.

Изучая химизм брожения и дыхания *Aspergillus niger*, Костычев (1956) привел доказательства того, что уксусный альдегид является промежуточным продуктом в этом процессе. Для его накопления автор применял ионы цинка и кадмия, которые способствовали этому. Механизм данного явления заключался в инактивации фермента редуктазы, что затрудняло нормальное протекание восстановительных реакций, лежащих в основе броуидельного процесса. Действие этих двух элементов в данном процессе весьма специфично, поскольку на другие ферменты,

находящиеся в бродильной среде, они не влияют. Проведенные специальные исследования показали также усиление расщепления белков под действием цинка.

Широкие и очень доказательные работы Николаса с *Neurospora crassa* указывают на роль молибдена в различных ферментативных процессах. Так, при недостатке молибдена в среде происходит уменьшение активности нитратредуктазы, что характеризует этот элемент как необходимый компонент данного фермента (Nicholas et al., 1954, 1954a). Дальнейшие наблюдения показали также, что от этого элемента зависит образование каталазы и пероксидазы (Nicholas, 1957). Так, при недостатке молибдена содержание указанных ферментов снижалось, при добавлении его к растущей культуре — восстанавливалось. На основании этого можно сделать вывод, что отсутствие или недостаток Mo сказывается на активности молибдозависимых flavопротеинов, реагирующих с O_2 с образованием H_2O_2 ; понижение количества этого соединения в отсутствие молибдена влияет на индуцированный синтез каталазы и пероксидазы.

Дальнейшие работы того же автора с сотрудниками (Nicholas a. Commissiong, 1957; Nicholas a. Goodman, 1958), проведенные на том же объекте, показали стимулирование активности других ферментов. Железо в оптимальной дозе повышало активность железосодержащих ферментов — диафораз (ДПН- H_2 и ТПН- H_2), а также нитратредуктазу. Медь стимулировала оксидазу цитохрома c, которую угнетал молибден. В свою очередь молибден стимулировал нитратредуктазу, которую угнетала медь; обе диафоразы угнетались медью и молибденом. Ванадий, вольфрам и молибден угнетали активность кислой фосфатазы, недостаточное содержание цинка снижало активность дегидразы глютаминовой кислоты.

Все это демонстрирует сложность взаимоотношений, в которых проявляются антагонизм металлов, а также их важность в отношении действия на ферменты клетки.

Работы последних лет с радиоактивным цинком подтвердили изменяемость активности ряда ферментов, в том числе цикла лимонной и глиоксиловых кислот. В данном процессе недостаток цинка (Zn^{65}) усиливает активность аконитазы и подавляет изоцитрикодегидрогеназу и фумаразу; затрудняется расщепление глюкозы по схеме Эмбден—Мейергофа благодаря подавлению альдолазы фруктозо-1,6-дифосфата.

Водоросли. Фотосинтез. Поскольку микроэлементы участвуют в различных реакциях обмена веществ у микроорганизмов, можно было ожидать, что они оказывают влияние и на фотосинтез соответственной микрофлоры. Это можно предполагать по аналогии с высшими растениями. Однако в этой области литературные данные относятся в основном к водорослям.

Так, Кесслер (Kessler et al., 1957) отметил влияние марганца на фотосинтез зеленой водоросли *Ankistrodesmus*. Отсутствие этого микроэлемента в среде действует на выделение O_2 культуры подобно таким ингибиторам, как гидроксилламин и др. Отсюда автор делает вывод о необходимости марганца для фотосинтеза водоросли. Некоторым подтверждением этих данных служат наблюдения Аллена (1962), получившего при исследовании *Chlorella pyrenoidosa* методом электронного парамагнитного резонанса в спектре 6 полос, обусловленных марганцем. По-видимому, этот ион связан с реакциями выделения O_2 при фотосинтезе.

Следует упомянуть также об особой роли некоторых микроэлементов, участвующих в реакциях фиксации углекислоты фотосинтезирующими и гетеротрофными бактериями. Бенг, Миода и др. (Bangh, Myoda et al., 1959; Myoda, Werkman, 1960) работали с радиоактивным углеродом при наличии фосфоэнолпирувиноградной кислоты. При этой реакции требуется Mn^{2+} с возможной заменой его Mg^{2+} . Реакция катализируется оксалацетаткарбоксылазой с участием марганца.

Бактерии. Указаний на изменение ферментативной активности бактерий под влиянием микроэлементов в литературе немало. Все они носят несколько разрозненный характер и относятся к изучению различных видов бактерий и различным сторонам их ферментативной деятельности.

Опыты с *Bac. subtilis* показали, что для нормального расщепления полисахаридов α -амилазой требовался цинк (Stein, Fischer, 1960).

С другой стороны, максимальная продукция общей амилазы той же бактерии получалась при наличии железа и марганца в среде (Lulla, 1951). Испытание действия микроэлементов (Mo, В, Cu, Mn, Zn) на протеолитическую, амилолитическую и дегидрогеназную активность ряда ризосферных бактерий и актиномицетов показало значительный эффект, выразившийся в повышении активности этих ферментных процессов. Большое влияние оказывали цинк, марганец и молибден. Угнетающее действие наблюдалось при применении меди (Бершова, 1960а, 1960б, 1961, 1961а).

Образование сахарозы усиливалось при росте *Aerobacter aerogenes* на среде с мелассой при добавлении небольших доз никеля и цинка; при этом увеличивался выход 2,3-бутанола. Внесение же меди или $Ni+Zn$ подавляло образование этого вещества (Ranganayake et al., 1958). Лецитиназа *Clostridium welchii* активировалась Ca, Mg, Co, Zn, Mn (Zamecnik et al., 1947).

Изменение характера брожения *Lactobacterium pentoaceticum* в полноценной питательной среде происходило под влиянием марганца (Гречушкин, 1961). В анаэробных условиях увеличи-

вился выход продуктов брожения и менялось их соотношение: усиливалось образование спирта. При аэрации марганец усиливал процессы окисления, что вело к уменьшению выхода спирта.

Особое место в литературе занимают работы, посвященные ферментам, имеющим прямое или косвенное значение в процессах окисления и восстановления в клетках. При изучении бесклеточных гомогенатов азотобактера Плаут и Лярди (Plaut a. Lardy, 1949) показали активирование дикарбоксилазы щавелевоуксусной кислоты марганцем, кобальтом и цинком. При добавлении яблочной кислоты это явление не проявляется. При наличии марганца орто- и пирофосфат и АТФ действовали как ингибиторы.

Выводы других исследователей говорят о возможном участии молибдена в ряде других ферментов этой бактерии. Так, подтверждено наличие молибдена в ксантиноксидазе (Richert et al., 1953); в альдегидоксидазе (Mahler et al., 1954) и гидрогеназе (Shug et al., 1954). Килер и Варнер (1962) на основании своих исследований связи молибдена с определенными фракциями протеинов пришли к заключению о возможном участии этого элемента в терминальной системе переноса электронов. Они также считают, что у азотобактера имеются ферменты, где молибден мог бы использоваться как кофактор молибденопротеинов ферментных систем.

Согласно данным Спенсера и др. (Spencer et al., 1957), марганец является специфическим активатором редуктазы гидроксиламина у *Azotobacter agile*. О других ферментах азотобактера сказано в разделе азотфиксации.

Для активности оксидазы пировиноградной кислоты *Clostridium butyricum* требовалось железо (О'Кане, 1954).

Минагава (Minagawa, 1958) сообщает о полученных путем адаптации дрожжах, устойчивых к действию меди и содержащих цитохромы *c* и *b* и корпопорфирин. Скорость окисления глюкозы у таких штаммов резко колебалась. О необходимости железа для восстановления цитохрома *c* в бесклеточных экстрактах азотобактера говорят Николас и Фишер (Nicholas a. Fischer et al., 1960).

Некоторое внимание уделялось изучению адаптированного фермента пенициллиназы. Железо и кобальт стимулировали его образование у стафилококка. Меньшее влияние оказывали марганец и никель (Leitner a. Cohen, 1962).

В литературе имеются данные об активирующем действии микроэлементов на ряд ферментативных процессов в почвах. Под действием Mo , B , Mn и других элементов увеличивалось количество общего азота, нитратов, растворимых форм органического вещества. Однако только в некоторых из работ учитывалось также состояние микрофлоры почвы.

Большое значение микроэлементов в активизации фосфатаз, продуцируемых почвенными микроорганизмами и корнями растений в почве, показано Котелевым с сотрудниками (1963, 1965). При внекорневой подкормке кукурузы особое влияние на активность этих ферментов оказали цинк и бор. В чистых культурах почвенных бактерий, разлагающих органофосфаты (*Bac. megaterium* и др.), микроэлементы также действовали. В этом случае активными стимуляторами оказались бор и марганец, менее активными — цинк и кобальт.

Об активизации фосфатаз, образующих *Bac. megaterium*, свидетельствуют данные, полученные Мальцевой (1961). При использовании в среде марганца и молибдена разложение органофосфатов усиливалось с 5 до 53% в зависимости от взятого субстрата. Более активно действовал марганец. Влияние этих элементов сказывалось больше при разложении фитина, чем РНК.

Особое место занимают исследования Заварзина (1957, 1958), посвященные участию молибдена, вольфрама и железа в процессе окисления нитритов нитрифицирующими бактериями. В ряде лабораторных опытов эти элементы испытывались совместно с рибофлавином и культурой нитрифицирующих бактерий. Предполагалось, что молибден действует в форме молибдофлавопротеинов, поэтому был взят рибофлавин. Взятые микроэлементы усиливали процесс нитрификации. Стимулирующее действие усиливалось при наличии железа и в значительной мере зависело от рН среды, оптимальная градация которого была разной для молибдена и вольфрама. Испытание других микроэлементов дало возможность автору разделить их по силе действия на группы: стимулирующих (Mo, W), не всегда стимулирующих (B, Si), не действующих (Al, Co, V), подавляющих (Cu, Mn, Zn).

Вместе с тем Деева (1955) наблюдала положительное действие бора и марганца на процессы нитрификации в полевых условиях. По-видимому, в определенных условиях почвы данные микроэлементы стимулируют этот процесс.

Разложение целлюлозы в почве видами *Cellovibrio* и *Cytophaga* также активировалось под влиянием марганца, железа и меди (Bortels, 1956).

Из сказанного видна многообразная роль микроэлементов в ферментативной деятельности клетки. Отрицательное действие при недостаточном содержании определенного микроэлемента можно объяснить необходимостью его в структуре фермента или в других побочных реакциях клетки. Кажущиеся разногласия в некоторых приведенных данных объясняются спецификой действия отдельных элементов и проявлением антагонизма ионов металла.

ДЫХАНИЕ

Изучению дыхания микроорганизмов в последнее время уделялось много внимания, поскольку данный процесс определяет в основном обмен веществ живой клетки. Этому также способствовало усовершенствование методики манометрических измерений газового обмена.

Многочисленные работы по дыханию патогенных микроорганизмов, *B. coli* и других проводились главным образом для определения их способности окислять различные органические вещества.

Большое количество исследований посвящено также дыханию азотобактера, показавших высокую его интенсивность, способность бактерий к использованию различных субстратов, приспособление к окислению различных органических веществ. Однако кроме азотобактера, почти все почвенные бактерии в этом отношении изучены недостаточно.

Некоторые литературные данные указывают на влияние микроэлементов (Zn, Co, Ni, Fe, Mn) на дыхание микроорганизмов. Металлы, включаясь в ферменты, активируют окислительно-восстановительные реакции организма, в том числе процессы цикла Кребса. Первые наблюдения в этом направлении свидетельствуют о стимуляции цинком дыхания плесневых грибов (*Aspergillus niger*, *Rhizopus* и др.) (Буромский, 1912; Foster, 1938). Обычно это выражалось в увеличении дыхательного коэффициента. В некоторых случаях это не было благоприятным для накопления молочной кислоты (Waksman a. Foster, 1938). По мнению Фостера (Foster, 1949), цинк, играя важную роль в метаболизме углеводов, влияет также и на цикл трикарбоновых кислот у грибов. Однако прямых доказательств этого в то время еще не было. Значительно позже опыты с гомогенатами клеток показали включение кобальта в цикл трикарбоновых кислот, результатом чего было изменение образования промежуточных продуктов цикла: в метаболизме малата происходила аккумуляция кетокислот и др. Действие кобальта было обусловлено образованием комплексов между ионами и некоторыми формами липоидов (Dingle et al., 1962).

Изучая метаболизм культуры *Nocardia opaca* при недостатке в среде железа, цинка, марганца, Веблей с сотрудниками (Webley et al., 1962) наблюдал значительные изменения в дыхании этого организма, особенно с некоторыми субстратами (пируватом, фенилацетатом и др.). Сравнительно с нормальными культурами Fe-дефицитные теряли образование каталазы и накапливали пировиноградную кислоту, что подтверждает необходимость железа для действия оксидазы этой кислоты.

Применение относительно высоких доз цинка, никеля и кобальта (122 мкг/мл) угнетало процессы метаболизма приве-

денных выше грибов. Добавление органических кислот снимало это угнетение, а в некоторых случаях усиливало обмен. На основании серии опытов с добавлением органических веществ Сиварама и др. (Sivarama et al., 1962) пришли к выводу, что токсичность металлов заключается в образовании органических комплексов, блокирующих процессы Кребса, и образовании промежуточных веществ, особенно пирувата и малата.

На особом материале—спорах гриба *Ustilago sphaerogenes*—Гримм и Аллен (Grimm a. Allen, 1954) также показали влияние микроэлементов на ферменты дыхания. Параллельно определению интенсивности дыхания бесклеточных препаратов этих спор производились спектрофотометрические исследования металлов в цитохромах. Усиление образования цитохрома *a*, *b* и особенно *c* обуславливалось действием цинка. Его не могли заменить железо, медь и марганец. Увеличивалась также активность цитохромоксидазы.

Наряду с этим авторы испытывали действие витаминов, из которых только B_1 увеличивал образование цитохрома *c* и притом только при наличии цинка и аммонийного источника азота в среде. Такая связь действия витамина и цинка очень интересна, но мало доказательна. Можно думать, что в данном случае действовал только цинк.

В литературе есть указания, что дрожжи, выросшие при наличии цинка, энергичнее потребляли O_2 , чем дрожжи, выросшие без его добавления. Влияние же меди на дыхательные ферменты дрожжей сказалось в изменении культуры и появлении вариантов, имеющих дыхательную недостаточность (Vanagishime, 1960).

Данные, полученные в отношении грибных организмов, в значительной мере можно отнести и к бактериям, однако наблюдения над дыханием последних сравнительно немногочисленны.

Левинсон и Хитт (Levinson a. Hyatt, 1955, 1956) изучали дыхание прорастающих спор *Bac. megaterium*. Наряду с ускорением прорастания при добавлении марганца повышалось и поглощение O_2 . Еще большее потребление O_2 наблюдалось при применении *l*-аланина и марганца. По мнению авторов, последний необходим при прорастании спор и играет особую роль, не связанную с *l*-аланином, в процессах дыхания.

По некоторым данным, Pb, Cu, Hg, Ag угнетали дыхание *Streptococcus faecalis*, что происходило от задержки окисления пировиноградной кислоты. Это ингибирование снималось при внесении α -липоевой кислоты (Grunert et al., 1960). По другим сведениям, Co, Ni, Zn подавляли потребление O_2 у дизентерийных культур, причем это действие было неодинаково у разных видов. Авторы считают, что данные металлы блокировали степень окисления пирувата, так как эти ионы могут конкурировать

вать с Fe, Mn и Mg, необходимыми для осуществления этой ферментативной реакции.

Изменение ферментных систем покоящихся клеток *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* под действием меди наблюдали Воратц и др. (Woratz et al., 1957). При выдерживании отмытых клеток этих культур в течение часа в растворе сернистой меди действие последней проявилось в изменении активности гликолитических и дыхательных ферментов бактерий. Изменился гликолиз, окислительное использование лактата, сукцината и других веществ. В сложных питательных средах бактерицидность меди уменьшается благодаря образованию комплексов с веществами среды. С другой стороны, связанное с дыханием окислительное фосфорилирование *Bact. alcaligenes* и *E. coli* может протекать очень активно, если культуры предварительно инкубировались при наличии марганца, кобальта или магния (Shibko a. Pinchot, 1961). В отношении азотобактера Гуше и Кохолати (Goucher a. Kocholaty, 1954) сообщают о необходимости магния или марганца для окисления некоторых органических соединений бесклеточными экстрактами этой бактерии. В этих же опытах наблюдалось положительное действие железа и молибдена на окисление сукцината.

Своеобразные реакции возникают между металлами и сложными органическими веществами типа антибиотиков в клетках бактерий. Известно, что дыхание азотобактера подавляется некоторыми антибиотиками. Магний и отчасти марганец снимают это действие. Такой факт подтверждает гипотезу о подавлении дыхания бактерий антибиотиками за счет их способности образовывать внутрикомплексные соединения с неорганическими ионами, в частности с названными выше (Johnson, Colmer, 1957).

Таким образом, в процессе дыхания микроорганизмов активно участвуют некоторые микроэлементы (Mn, Zn, Fe, Cu), активируя этот процесс и усиливая обменные реакции. Однако другие металлы — Pb, Hg, Ag, Ni, Co — угнетают дыхание. В отношении цинка и меди литературные данные разноречивы. Можно думать, что в данном случае решающую роль играют дозы этих элементов.

Задачей нашей работы (Бершова, 1960, 1962) являлось изучение дыхания почвенных ризосферных микроорганизмов, представителей распространенных в ризосфере групп. При этом изучалось влияние микроэлементов (Mo, B, Mn, Zn, Cu) на дыхание этих микроорганизмов.

Применяя различные методы исследования (описание которых приводится в соответствующих главах), мы учитывали специфику работы с микроэлементами и первые опыты с чистыми культурами проводили с очисткой сред от изучаемых элементов. Однако этот прием отпадал при работе с органическими

или почвенными средами, где микроэлементы связаны в комплексные органические соединения и их извлечение применением соответствующих реактивов вело к нарушению естественной структуры среды.

При проведении опытов с чистыми культурами бактерий, которые выращивались на синтетических средах, мы испытали несколько рекомендованных приемов удаления металлов. Наиболее приемлемым оказался метод очистки дитизоном, которым и пользовались в некоторых случаях. Очистка среды дитизоном (Dithenylthiocarbazon) производилась по методу, описанному Стоу и Арноном (Stout a. Arnon, 1939), основанному на принципе образования и выделения комплексных соединений дитизона с металлами, загрязняющими среду.

Однако на бактериологических средах, обработанных этим и другими способами, например 8-оксихинолином, рост микроорганизмов был угнетен настолько, что не могло получаться достаточного количества нужной для опытов биомассы клеток, не говоря уже о возможном угнетении ферментативной активности этих ослабленных культур.

Такое явление происходило, по-видимому, за счет изъятых из среды микроэлементов, полный состав которых мы не могли вернуть, а также, возможно, за счет оставшихся в среде примененных соединений. Торможение роста исследуемых культур в этом случае могло быть объяснено блокированием дитизоном обменных процессов клеток посевного материала (как и молодых, растущих клеток), в катализе которых участвуют ионы определенных металлов.

При проведении предварительных опытов был получен достаточный эффект от внесения микроэлементов в обычную употребляемую нами бактериальную среду. Это побудило нас в дальнейшем отказаться от детальной очистки сред от металлов, ограничившись лишь анализом применяемых сред на наличие и количество в них микроэлементов. Эти количества были приняты за «фон», по которому проводились исследования. Но наряду с этим всегда производились предупредительные меры от возможного добавочного загрязнения металлами опытных материалов. Так, посуда тщательно промывалась хромовой смесью. При изготовлении сред пользовались перекристаллизованными солями, длительно промытым агаром и бидистиллированной водой. Кроме того, была принята для выращивания микроорганизмов одна синтетическая минеральная среда — Красильникова № 1. Только в некоторых особых случаях, при отсутствии роста сапрофитов на этой среде, к ней добавляли пептон в количестве 0,1%.

Количество металлов, найденное в синтетической среде, то есть «фон» среды для выращивания микроорганизмов, приведено в табл. 7. Методика определения микроэлементов в среде бы-

ла та же, что и при определении их в почве (приводимая ниже).

Как видно из приведенных цифр, в среде почти отсутствовали молибден и марганец, бор также был в следовых количе-

Таблица 7

Валовое количество микроэлементов (в мкг на 1 л среды)

Металлы	В воде водопроводной	В солях	В сахарозе	Всего
Марганец	Нет	Нет	Следы	Следы
Бор	0,175	»	Нет	0,175
Цинк	71,0	70,0	350,0	491,0
Молибден	Следы	Нет	Следы	Следы
Медь	4,8	1,25	1,4	7,45

ствах. Во всех трех компонентах среды найдены медь и относительно много цинка. Однако эти количества были значительно меньше доз вносимых микроэлементов при изготовлении среды и, по-видимому, были недостаточны для удовлетворения потребностей микроорганизмов, поскольку у последних увеличивался рост при их добавлении.

Изучение дыхания микроорганизмов проводилось с испытанием Mo, B, Mn, Zn, Cu в дозах от 0,2 до 20 мг/л в зависимости от микроэлемента и способа его внесения. Действие микроэлементов изучалось при внесении их в среду, на которой росли микроорганизмы, и в суспензии отмытых покоящихся клеток. Большие дозы брали при внесении их в среду и меньшие — в опытах с суспензией клеток.

В опыты были взяты чистые культуры бактерий и актиномицетов, выделенные из ризосферы кукурузы, а также азотобактер и клубеньковые бактерии. Исследование проводилось в аппарате Варбурга с клетками односуточных культур (актиномицеты — 10-суточные), выращенных на синтетической среде с сахаром. В качестве субстрата была взята сахароза.

Все испытуемые бактерии выращивались на агаризованной среде № 1 Красильникова (актиномицеты — в жидкой среде). Клетки снимали шпателем или отцентрифугировали, трижды промывали в буферном растворе с последующим центрифугированием и помещали в основном отделении сосуда, присоединяемого к манометру. В боковые резервуары сосудов помещали растворы субстрата и микроэлементов. Количество клеток для опыта определяли соответствующим каждой культуре стандартом. Определялся также азот, входящий в состав взятого

количества клеток (название культур приведено в таблицах). Опыт с каждой культурой проводился не менее трех раз и больше.

Полученные данные относительно поглощения кислорода разными видами микроорганизмов выражены в *мкл* O₂ в 1 час на 1 *мг* азота клеток, а также на 10 млрд. клеток.

Результаты опытов приведены в нижеследующих таблицах. Как видно из табл. 8, интенсивность поглощения кислорода разными видами взятых микроорганизмов очень различна. Наиболее интенсивное дыхание обнаружено у азотобактера. Почти вдвое меньше кислорода, чем азотобактер, поглощает *Ps. aurantiaca* (в пересчете на азот клеток).

Таблица 8
Интенсивность дыхания различных видов

Микроорганизмы	Количество O ₂ , <i>мкл/час</i>		
	Дыхание с субстратом		Эндогенное дыхание
	На 1 <i>мг</i> азота клеток	На 10 млрд. клеток	На 1 <i>мг</i> азота клеток
<i>Azotobacter chroococcum</i>	1200	260	120
<i>Ps. aurantiaca</i>	650	110	120
<i>Rhizobium meliloti</i>	500	70	40
<i>Bac. megaterium</i>	450	175	50
<i>Bac. oligonitrophilus</i>	400	130	50
<i>Actinomyces griseus</i>	180	—	60
<i>Actinomyces chromogenes</i>	270	—	90

Следующими по активности идут *Rhizobium* и спороносные палочки, у которых величина QO₂ разнится мало. Меньше всех поглощают кислорода актиномицеты, однако интенсивность дыхания обоих взятых видов существенно различна: *Actinomyces chromogenes* поглощает в 1,5 раза больше кислорода, чем *Actinomyces griseus*.

Нас интересовало также поглощение кислорода определенным количеством клеток. Оказалось, что эти величины не соответствуют относительным количествам кислорода, приходящимся на 1 *мг* азота. Первое место по потреблению кислорода на 10 млрд. клеток также занимает азотобактер, за ним идут *Bac. megaterium* и *Bac. oligonitrophilus*, а лишь затем *Ps. aurantiaca*. Меньше всех O₂ на 10 млрд. клеток потребляет *Rhizobium meliloti*.

В проведенных опытах обращает на себя внимание повышенное эндогенное дыхание *Ps. aurantiaca* и актиномицетов, что может быть связано с имеющимися в клетках и мицелии за-

пасными веществами. Действие микроэлементов на дыхание взятых культур выразилось в следующих величинах Q_{O_2} , приведенных в табл. 9, 10, 11.

Потребление кислорода контрольной суспензией клеток азотобактера выразилось в 1150 *мкл/час*. Применение же микроэлементов в среду роста этой культуры повысило интенсивность дыхания азотобактера. Величина этого повышения различна для разных микроэлементов и колеблется от 100 до 400 *мкл/час*. Больше всего повышение дыхания наблюдалось при внесении цинка и марганца, затем — в порядке последовательности — меди, бора и молибдена.

Внесение микроэлементов в суспензию покоящихся клеток дает иную картину их действия. При наличии цинка и меди тут наблюдалось торможение дыхания. Действие остальных микроэлементов оставалось также стимулирующим, но в меньшей степени, чем в первых опытах. Большое значение имеет в этом случае применение соответствующих дозировок. Повышение дозы в два раза приводило к резкому торможению дыхания клеток при действии всех микроэлементов, кроме марганца. Эндогенное дыхание в данных опытах определялось величиной 100—130 *мкл/час* O_2 . Оно также несколько повышалось от применения микроэлементов.

Таблица 9

Действие микроэлементов на дыхание неспорных бактерий *

Внесенные микроэлементы	Азотобактер			<i>Rhizobium meliloti</i>			<i>Ps. aurantiaca</i>		
	Дыхание с субстратом		Эндогенное	Дыхание с субстратом		Эндогенное	Дыхание с субстратом		Эндогенное
	I	II		I	II		I	II	
Контроль	1150	1200	140	500	380	40	500	650	60
Молибден	1360	1340	130	700	450	60	625	880	70
Бор	1390	1300	110	560	320	80	530	795	75
Марганец	1480	1420	120	750	470	90	660	790	70
Цинк	1550	1040	140	500	360	60	680	710	75
Медь	1410	1120	110	700	380	50	550	740	80

* В этой и последующих таблицах I — микроэлементы внесены в питательную среду для роста культуры, II — микроэлементы внесены в суспензию клеток.

Rhizobium потребляет кислорода гораздо меньше, чем азотобактер. Микроэлементы, внесенные в среду, на которой росла эта бактерия, усиливали ее дыхание. Повышение количества поглощенного кислорода от внесения молибдена равно таково-

му у азотобактера. В такой же мере выразилось и действие меди. Внесение цинка не сказалось. Больше всего усиливалось дыхание при наличии марганца. Влияние микроэлементов значительно снижалось при внесении их в суспензию клеток. В этом случае дыхание незначительно активировалось от молибдена и марганца. Угнетающе действовали бор и цинк. Перестала действовать медь.

Ps. aurantiaca, один из активных потребителей кислорода, также реагирует на микроэлементы, которые увеличивают потребление его на 125—180 мкл/час. Такое же влияние наблюдалось почти в равной степени от добавления Mo, Mn и Zn. Менее значительно действие бора и меди. Эндогенное дыхание этой бактерии относительно высоко, оно достигает 60—80 мкл/час и также отражает действие микроэлементов.

На дыхание споровых бактерий (табл. 10) действуют В, Mn, Cu и Mo. Последний в значительной степени повышает дыхание *Vac. oligonitrophilus*. Повышение потребления кислорода при этом доходит до 220 мкл/час. Цинк почти не влияет на дыхание *Vac. megaterium* и в незначительной степени усиливает потребление кислорода *Vac. oligonitrophilus*.

Таблица 10
Действие микроэлементов на дыхание
Vac. megaterium и *Vac. oligonitrophilus*

Внесенные микроэлементы	<i>Vac. megaterium</i>			<i>Vac. oligonitrophilus</i>	
	Дыхание с субстратом		Эндогенное	Дыхание с субстратом	Эндогенное
	I	II			
Контроль	460	415	80	400	40
Молибден	540	450	100	620	60
Бор	590	530	90	510	60
Марганец	630	490	100	480	50
Цинк	480	480	80	460	50
Медь	670	590	100	530	70

При внесении микроэлементов в суспензию клеток *Vac. megaterium* заметное усиление дыхания наблюдалось только от бора и меди. Вместе с тем не отмечено торможения этого процесса некоторыми микроэлементами, наблюдаемого у других культур.

Микроэлементы, внесенные в среду, активируют также дыхание актиномицетов (табл. 11). В большей степени это влия-

Таблица 11

Действие микроэлементов на дыхание актиномицетов

Микроэлементы	<i>Actinomyces griseus</i>		<i>Actinomyces chromogenes</i>		Эндогенное дыхание
	Дыхание с субстратом				
	I		I		
		Усиление		Усиление	
Контроль	180	—	270	—	64
Молибден	470	+290	345	+75	45
Бор	415	+235	310	+40	30
Марганец	280	+100	340	+70	40
Цинк	160	—	240	—	50
Медь	—	—	—	—	—

ние проявилось на *Actinomyces griseus*, который вообще меньше потребляет O_2 , чем *Actinomyces chromogenes*. При внесении молибдена и бора наблюдалось усиление поглощения O_2 более чем в два раза. Несколько слабее действует марганец. Все эти микроэлементы действуют также на *Act. chromogenes*, но в меньшей мере. Цинк угнетает дыхание обоих актиномицетов. Что касается меди, то эти микроорганизмы не росли при наличии самых минимальных из взятых ее доз. Дыхание их значительно слабее, чем у бактерий.

Полученные данные показывают, что интенсивность дыхания различных почвенных микроорганизмов не одинакова. Обычно считают, что активность дыхания одноклеточных микроорганизмов зависит от отношения поверхности клетки к ее объему, то есть мелкоклеточные микроорганизмы потребляют кислорода больше, чем крупноклеточные. Однако это, по-видимому, не всегда является обязательным и зависит также от мощности и набора ферментных окислительных систем клетки.

Наличие в среде незначительных количеств микроэлементов (Mo, B, Mn, Zn, Cu) усиливает процессы дыхания в клетках микроорганизмов. Это действие очень различно и зависит от микроорганизма и вида микроэлемента. В большинстве случаев положительно действовали молибден, марганец, цинк, меньше — медь и бор. В некоторых случаях микроэлемент, действующий положительно на одни микроорганизмы, вызывает угнетение дыхания других. Кроме того, незначительные повышения доз микроэлементов могут угнетать дыхание клетки. Эта неоднородность действия наблюдается и в пределах одного рода у разных видов и обуславливается, очевидно, различием в наборе ферментных систем.

ДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

В процессах биологического окисления в живом организме дегидрирование является одной из основных реакций. Как известно, сущность его заключается в переносе атомов водорода от окисляемого органического субстрата на соответствующий акцептор, содержащийся в клетке. Дегидрогеназные ферменты катализируют эту реакцию, в результате которой освобождается определенное количество энергии, используемое организмом.

Наличие дегидрогеназных ферментных систем у бактерий показано работами многих авторов, изучавших эти ферменты с разных точек зрения и при разных условиях (различные субстраты, действие антибиотиков и др.). Больше других микроорганизмов изучены дегидрогеназы азотобактера.

Однако в литературе ограничено количество указаний относительно действия микроэлементов на процессы дегидрирования в бактериальной клетке. Дегидрогеназа альдегидов, выделенная из бесклеточных экстрактов *Acetobacter* sp. и инактивированная после диализа, полностью реактивировалась при добавлении Mg, Mn, Co (Nakayama, 1960). Дегидрогеназа маннит-I-фосфата, выделенная из экстрактов клеток молочнокислых бактерий, активировалась цинком, кобальтом, магнием и не реагировала на марганец (Hidio et al., 1960). Большинство авторов, изучая действие металлов, обычно оперировало со сравнительно высокими их дозами, что приводило к искажению данных. Нет в литературе также сведений о действии микроэлементов на дегидрогеназные системы ризосферных микроорганизмов.

Наши исследования (Бершова, 1960б, 1961а) проводились с чистыми культурами бактерий и актиномицетов, выделенных из ризосферы кукурузы и картофеля, а также с азотобактером (штамм К) и клубеньковыми бактериями.

Названия испытанных микроорганизмов и схемы опытов приведены в таблицах. Действие микроэлементов испытывалось при внесении их в среду, на которой росли испытуемые микроорганизмы, и во взвесь отмытых неразмножающихся клеток культуры. Первое обеспечивало их влияние на растущую клетку при формировании в ней ферментных систем, второе определяло их действие при непосредственном контакте с клеткой.

Микроэлементы брали в дозах от 0,4 мг (для меди) до 20 мг/л (для марганца), большие при действии на размножающиеся клетки, меньшие — в опытах с покоящимися клетками.

В работе применялся метод Тунберга, модифицированный в отделе анаэробных микроорганизмов Института микробиологии АН УССР. Влияние микроэлементов испытывалось на фоне

трех субстратов: глюкозы, сахарозы и маннита, которые употреблялись в концентрации М/10 по 0,5 мл на пробирку. В качестве акцептора водорода была взята метилсеновая синька в разведении 1 : 2000. Испытываемые культуры (кроме актиномицетов) выращивали на агаризованных средах, преимущественно синтетических. Клетки снимали шпателем, отмывали от среды в физиологическом растворе с последующим центрифугированием.

В опытах с разными культурами были использованы неодинаковые количества их клеток в связи с различной способностью к дегидрированию культур. Это давало возможность проводить опыты в определенные отрезки времени.

Результаты исследований активности дегидрирования разных микроорганизмов, приведенные в табл. 12, 13, 14, 15, 16, выражены в минутах.

Как показали опыты, азотобактер дегидрировал все три субстрата, но с разной интенсивностью. Наиболее быстро проходило дегидрирование глюкозы, затем сахарозы. Значительно медленнее шел процесс с маннитом. Внесение микроэлементов в среду, где росла культура, в большинстве случаев способствовало ускорению дегидрирования. Особенно это относится к Мо, затем к Мп и Zn. Все микроэлементы действовали по-разному. Усиление процесса наблюдалось при наличии всех субстратов, но в различной степени по сравнению с дегидрированием в контрольном варианте опыта. Так, внесение молибдена ускоряло обесцвечивание синьки при наличии глюкозного субстрата от 45 до 18 мин, с сахарозой — от 50 до 22, с маннитом — от 75 до 35 мин. При внесении во взвесь клеток микроэлементы действовали значительно слабее, а в некоторых вариантах опыта действие цинка и меди становилось тормозящим. Благоприятное влияние молибдена в этом случае заметно уменьшается; перестают действовать марганец и бор, сильно тормозит реакцию цинк и определенно угнетает медь.

Действие микроэлементов на *Rhizobium* (табл. 12) аналогично действию на азотобактер. Оно выражено сильнее при внесении их в среду и слабее — при добавлении во взвесь клеток. В первом случае наиболее активно действует молибден, который ускоряет дегидрирование почти в два раза на всех трех субстратах. Так, с глюкозой обесцвечивание синьки происходит за 14 мин при контроле в 25 мин, на сахарозе — за 18 мин при контроле 35 мин, на манните — за 24 мин при контроле в 32 мин. Следующими по силе воздействия были марганец, бор и цинк. Медь во всех вариантах задерживала реакцию. Как и в предыдущих опытах, дегидрирование скорее протекало при окислении глюкозы. Однако для данной бактерии субстраты сахароза и маннит оказались равноценными. Действие микроэлементов более выражено при наличии глюкозы и маннита. Сла-

Таблица 12

Активность дегидрирования *Azotobacter chroococcum* и *Rhizobium meliloti*

Вариант опыта	<i>Azotobacter</i> (количество клеток— 2 млрд.)			<i>Rhizobium</i> (количество клеток— 3,5 млрд.)		
	Сахароза	Глюкоза	Маннит	Глюкоза	Сахароза	Маннит
Контроль	50	45	75	25	35	32
Молибден	22	18	35	15	18	24
Бор	43	45	65	22	30	36
Марганец	40	40	60	20	35	30
Цинк	30	35	55	22	32	28
Медь	40	—	50	30	38	30

Примечание. В этой и последующих таблицах приведены данные опытов, где микроэлементы внесены в среду, на которой росла культура.

бее их влияние при внесении во взвесь клеток. В этом случае можно отметить положительное действие молибдена и марганца, тормозящее — меди и в некоторых случаях — бора.

Несколько иное действие микроэлементов наблюдается в отношении *Vac. megaterium* (табл. 13). Клетки этой бактерии дегидрируют в равной степени глюкозу и сахарозу. Значительно замедлена эта реакция с маннитом. Соответственно и действие микроэлементов почти равно по первым двум субстратам. Почти в одинаковой степени действуют молибден и марганец, в большинстве случаев не проявляют действия цинк и медь. При использовании маннита относительное действие микроэлементов увеличивается. Испытание культуры, выращенной без них, показало усиление дегидрогеназной активности, проявляемой в случае молибдена и марганца на глюкозе; на два другие субстрата, кроме упомянутых, действует также и бор. Но в этих

Таблица 13

Скорость дегидрирования *Vac. oligonitrophilus* и *Vac. megaterium*

Вариант опыта	<i>Vac. oligonitrophilus</i> (количество клеток—3,5 млрд.)			<i>Vac. megaterium</i> (количество кле- ток—4,5 млрд.)		
	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глюкоза	Сахароза	Маннит
Контроль	40	39	80	21	20	50
Молибден	20	23	60	13	15	34
Бор	45	53	75	18	18	42
Марганец	30	34	60	17	17	25
Цинк	35	36	75	20	22	50
Медь	42	45	80	20	20	30

опытах можно отметить резко тормозящее действие цинка и меди.

Обильные слизи при культивировании *Bac. oligonitrophilus* затрудняло дозировку клеток и осаждение их при центрифугировании. Как и у предыдущей культуры, активность дегидрирования глюкозы и сахарозы *Bac. oligonitrophilus* почти одинакова, но вдвое замедлено дегидрирование маннита. Действие микроэлементов сказывается в значительной мере при воздействии их на растущую культуру и в меньшей мере — при внесении в отмытые клетки. В первом случае выделяется действие молибдена, меньше влияет марганец, незначительно активизирует дегидрогеназы цинк. Медь тормозит реакцию при использовании сахарозы. Внесение молибдена, марганца и бора в отмытые клетки не дает заметных изменений. Цинк и медь действуют тормозяще.

Из широко распространенного в почве рода *Pseudomonas* были испытаны четыре вида: *Ps. sinuosa* заинтересовал нас как микроорганизм, положительно влияющий на рост сельскохозяйственных растений, *Ps. denitrificans* — как активный денитрификатор, *Ps. fluorescens* и *Ps. rubigenosa*, отличающиеся интенсивной пигментацией — зеленой и ярко-красной, — как пигментированные культуры, поскольку наличие пигментов могло в той или иной мере сказаться при действии микроэлементов.

Таблица 14
Скорость дегидрирования видов рода *Pseudomonas*

Вариант опыта	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глюкоза	Сахароза	Маннит
<i>Ps. sinuosa</i> —4,5 млрд. клеток			<i>Ps. fluorescens</i> —2,5 млрд. клеток			
Контроль	40	40	60	40	75	85
Молибден	20	28	43	21	45	50
Бор	32	31	48	37	55	70
Марганец	37	28	56	25	60	70
Цинк	31	38	30	55	80	80
Медь	35	50	53	38	85	87
<i>Ps. denitrificans</i> —2,5 млрд. клеток			<i>Ps. rubigenosa</i> —1 млрд. клеток			
Контроль	35	53	62	24	31	46
Молибден	28	50	45	26	25	48
Бор	36	55	60	25	30	48
Марганец	26	36	55	22	35	40
Цинк	30	48	65	26	35	52
Медь	33	53	50	18	33	37

Как видно из табл. 14, бактерии дегидрируют все три субстрата, однако дегидрогеназная активность у них неодинакова. В то время как у *Ps. denitrificans* этот процесс идет с разной

активностью на различных субстратах, у *Ps. sinuosa* глюкоза и сахароза дегидрируются почти с одинаковой скоростью, значительно медленнее дегидрируется маннит. Действие микроэлементов выражено отчетливо, обесцвечивание синьки *Ps. sinuosa*, выросшей на среде с молибденом, происходит почти в два раза быстрее на всех субстратах. Так же действует на нее и цинк в отношении маннита и глюкозы. Действие марганца выразилось только на сахарозе. Бор активировал дегидрогеназу, окисляющую маннит, и в меньшей мере дегидрогеназы, окисляющие два других субстрата. Внесение молибдена, марганца и бора в отмытую культуру активирует дегидрирование сахарозы и почти не сказывается при наличии других субстратов.

Клетки *Ps. denitrificans* реагируют на микроэлементы в отношении молибдена и марганца при дегидрировании глюкозы и одного молибдена — при дегидрировании маннита. Эта бактерия меньше всех ранее рассмотренных подвержена действию микроэлементов. Внесение их в отмытые клетки также мало эффективно.

Приведенные данные свидетельствуют о чрезвычайной активности дегидрогеназных систем *Ps. rubigenosa* принимая во внимание сравнительно малое количество (1 млрд.) клеток в опыте. У нее, как и у большинства взятых бактерий, легче дегидрировалась глюкоза и сахароза и труднее — маннит. Действие микроэлементов в данном случае незначительно. Можно только отметить некоторое ускорение дегидрирования сахарозы и маннита при внесении молибдена и маннита при внесении марганца и бора.

Активность *Ps. fluorescens* значительно слабее. Даже дегидрирование глюкозы проходит в течение 40 мин., почти вдвое медленнее дегидрируются сахароза и маннит. Микроэлементы активируют дегидрогеназы клеток данной культуры. Очень сильно действие молибдена, марганца и бора на растущую культуру, проявление которого наблюдается при наличии всех трех субстратов. Медь инактивировала окисление сахарозы и маннита. В отмытых клетках культуры микроэлементы действовали с меньшей силой, однако молибден и марганец ускоряли действие всех трех дегидрогеназ.

Оба вида микробактерий были взяты в равных количествах клеток (5 млрд.). Это количество почти в одно время дегидрирует глюкозу. Что же касается двух других субстратов, то *Mycob. convolutum* дегидрирует сахарозу и маннит гораздо активнее, чем *Mycob. globiformi*. Действие на нее микроэлементов выражено слабее. Влияние микроэлементов на *Mycob. globiformi* выразилось в ускорении дегидрирования сахарозы и маннита. При дегидрировании последнего не действовали только цинк и медь. Слабое действие микроэлементов наблюдалось при использовании глюкозного субстрата. Интересно отметить,

Таблица 15

Скорость дегидрирования *Mycobacterium* (количество клеток—5 млрд.)

Вариант опыта	<i>Mycobacterium globiformi</i>			<i>Mycobacterium convolutum</i>		
	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глюкоза	Сахароза	Маннит
Контроль	22	45	67	20	28	50
Молибден	18	34	48	16	21	45
Бор	19	41	61	18	29	48
Марганец	20	33	57	18	20	45
Цинк	20	40	70	18	22	52
Медь	24	40	73	18	30	51

что эта культура реагировала на них не только в процессе роста, но и при внесении их в отмытые клетки. Таким образом, влияние микроэлементов можно наблюдать и на видах данной филогенетической обособленной группы бактерий.

В опыте с актиномицетами было взято четыре штамма разных видов. В табл. 16 приведены данные относительно двух видов, поскольку в остальных двух культурах дегидрогеназная активность менялась в тех же направлениях. Испытывалось 25 мг растертого в ступке мицелия актиномицетов, выращенных в жидкой среде № 1 Красильникова. Предварительные опыты с целым мицелием показали более медленное дегидрирование по сравнению с растертым.

Таблица 16

Дегидрогеназная активность актиномицетов

Вариант опыта	<i>Actinomyces griseus</i>			<i>Actinomyces coelicolor</i>		
	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глюкоза	Сахароза	Маннит
Контроль	185	210	300	80	120	180
Молибден	110	200	230	65	110	170
Бор	195	220	400	82	180	175
Марганец	170	180	300	62	105	160
Цинк	250	220	300	85	130	185
Медь	—	—	—	—	—	—

Как видно из табл. 16, процесс дегидрирования у актиномицетов проходит значительно медленнее, чем у бактерий, если брать сравнительно равные по весу биомассы этих микроорганизмов. Проведенные опыты показали наличие у актиномицетов дегидрогеназных ферментов ко всем трем субстратам.

Так же, как и у бактерий, дегидрирование сахарозы и маннита было более затруднено. Действие микроэлементов выражено при внесении их в среду в процессе роста обоих актиноми-

летов, однако оно не так значительно и касается только молибдена и марганца. Бор и цинк в большинстве случаев задерживали дегидрирование. Медь задерживала рост актиномицетов, которые даже при минимальных ее дозах не росли. Результаты применения микроэлементов аналогичны у обоих актиномицетов, несмотря на то, что они отличались друг от друга не только в отношении морфолого-культуральных признаков, но и активностью дегидрирования.

Все испытанные культуры обладали различной скоростью дегидрирования и различной активностью в отношении разных субстратов. Если принять во внимание количество клеток, находящихся в опыте, и время реакции, то наиболее активно проходил этот процесс у *Ps. rubigenosa*, затем у азотобактера и *Rhizobium*. Действие микроэлементов на эту пигментную бактерию было незначительным, чего нельзя сказать о двух других микроорганизмах. Весьма возможно, что малая активность микроэлементов зависела от наличия пигментных веществ у данной бактерии.

Сравнительно малой дегидрогеназной активностью отличались актиномицеты. Молибден и марганец ускоряли дегидрирование субстратов этими организмами.

При внесении в среду, на которой росли микроорганизмы, микроэлементы оказывали более сильное влияние, чем при внесении в отмытые клетки. Весьма возможно, что в этом случае происходили изменения в дегидрогеназных системах с введением металлоиона в группу фермента, что было осложнено в случае покоящихся клеток.

Таким образом, установлено положительное влияние микроэлементов на дегидрогенажную активность микроорганизмов (бактерий и актиномицетов), выделенных из ризосферы сельскохозяйственных растений.

Микроэлементы молибден и марганец ускоряли процесс дегидрирования всех 14 видов микроорганизмов на трех разных органических субстратах. Цинк и бор не всегда активировали данную реакцию, медь в большинстве случаев тормозила дегидрирование.

Действие микроэлементов проявлялось в различной степени в зависимости от взятого микроэлемента и вида микроорганизмов. Сильнее оно было выражено при внесении микроэлементов в среду, на которой росли микроорганизмы, чем при внесении во взвеси отмытых неразмножающихся клеток.

Дегидрирование органического субстрата актиномицетами протекало значительно медленнее, чем бактериями. Микроэлементы молибден и марганец ускоряли дегидрирование субстрата у четырех видов взятых актиномицетов, однако их влияние на данные микроорганизмы проявлялось в меньшей мере, чем на бактерии.

КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

Определение каталазной активности микроорганизмов производилось на 10 культурах, выделенных из ризосферы пшеницы и кукурузы. Названия видов указаны в приведенных ниже таблицах.

Для определения каталазы пользовались методом Баха и Опарина с соответствующими изменениями применительно к работе с бактериальными культурами. В качестве микроэлементов были взяты Мо, Мп, В, Си в виде Na_2MoO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, MnSO_4 , CuSO_4 .

Количество клеток бактерий, кроме азотобактера, в вариантах опытов было равно 20—30 млрд., а азотобактера — 6 и 8 млрд. Контролем служили убитые прогревом культуры.

В табл. 17 приведены результаты, полученные при применении молибдена. Культуры 24-часовые. Приведенные в таблицах данные представляют количество (в мл) 0,1-н. раствора перманганата, ушедшего на титрование H_2O_2 , не разложенного каталазой бактерий.

Таблица 17

Влияние молибдена на каталазную активность бактерий

Номер штамма	Вид	Количество перманганата, мл				
		Прогретые культуры		Непрогретые культуры		
		Контроль	Мо	Контроль	Мо	Разница
34в	<i>Bac. danicus</i>	4,0	4,0	3,8	1,3	2,5
16	<i>Chromobact. chlorinum</i>	4,1	4,0	2,5	0,9	1,6
3	<i>Ps. longa</i>	4,0	4,0	2,6	1,1	1,5
6	<i>Bac. adhearans</i>	4,1	4,1	3,1	2,0	1,1
84в	<i>Bact. agile</i>	4,0	4,0	3,0	2,1	0,9
21	<i>Bac. glutinosum</i>	4,0	4,0	3,0	2,6	0,4
5	<i>Ps. eisenbergii</i>	4,0	4,0	1,0	0,7	0,3
7	<i>Ps. striata</i>	4,1	4,1	1,3	1,2	0,1
31	<i>Chromobact. flavescens</i>	4,1	4,1	3,9	4,1	-0,2
13	<i>Ps. fluorescens</i>	3,9	3,9	1,3	1,8	-0,5

Приведенные данные указывают на способность молибдена повышать каталазную активность бактериальных культур. Внешение молибдена повысило способность разлагать перекись водорода у семи из десяти взятых видов. Повышение это выразилось очень сильно у пяти видов (№ 34, 16, 6, 84, 3). На три вида (№ 7, 31, 13) влияние Мо не доказано, так как получен-

ние при титровании данные могут быть отнесены за счет отклонения в пределах ошибки.

Следующие опыты проводили с большим количеством микроэлементов (табл. 18). Контроль среды каждого варианта опыта при титровании не дал отклонений, и потому их не приводим. Молибден повысил действие каталазы всех девяти культур, взятых в опыт, бор — только у пяти, и не в такой степени, как молибден. В большей мере выразилось действие марганца, обнаруженное на семи культурах. Медь подавляла деятельность каталазы у всех девяти видов. Надо отметить, что примененная доза меди в большинстве случаев угнетала рост микроорганизмов, особенно азотобактера.

Таблица 18
Сравнительное действие микроэлементов на каталазную активность бактерий

Номер штамма	Вид	Количество перманганата, мл					
		Прогретье клетки	Контроль	Живые культуры, выросшие на среде с			
				Мо	В	Мп	Си
3	<i>Ps. longa</i>	4,2	2,3	1,8	2,7	1,0	4,0
5	<i>Ps. eisenbergii</i>	4,2	1,0	0,6	0,6	1,0	2,9
6	<i>Bac. adhaerens</i>	4,1	3,1	2,6	3,3	3,2	3,5
7	<i>Ps. striata</i>	4,2	1,8	1,3	1,5	1,2	3,2
16	<i>Chromobact. clorinum</i>	4,0	3,9	2,9	4,0	3,2	3,8
19	<i>Bac. mycoides</i>	4,9	4,4	3,9	3,5	3,5	4,3
21	<i>Bac. glutinosum</i>	5,0	2,6	2,0	2,0	1,9	4,5
34в	<i>Bac. danicus</i>	5,1	3,2	2,0	3,1	2,8	5,3
1в	<i>Ps. gracilis</i>	5,1	2,5	1,3	1,7	1,3	3,2

Отдельно проводили опыты с азотобактером. Отличие их от уже приведенных заключалось в том, что наряду с испытанием культуры, выросшей на среде с микроэлементами, определяли каталазу при добавлении микроэлементов непосредственно в суспензии культуры, выросшей без микроэлементов. В этих определениях контакт культуры с микроэлементами был только в течение получаса — времени проведения анализа. Результаты опытов приведены в табл. 19.

Азотобактер обладает сильно выраженной каталазной активностью. Усиление каталазной активности тканей высших растений под действием микроэлементов наблюдалось многими авторами. Особенно заметно в этом отношении влияние марганца и цинка (Пейве, Крауя, 1957; Власюк, 1962). Такое же действие микроэлементов показано и в наших исследова-

Влияние микроэлементов на каталазную активность азотобактера

Вариант опыта	Количество клеток, млрд.	Количество перманганата, мг					
		Прогретье клетки	Контроль	Mo	B	Mn	Cu
Внесение в среду, на которой росла культура	9	4,7	1,0	0,3	0,8	0,3	Нет роста
Внесение в среду, на которой росла культура	6	4,7	3,4	2,2	3,9	3,1	»
Внесение в суспензию клеток	9	4,7	2,2	2,2	3,3	2,1	3,1
Внесение в суспензию клеток	5	4,7	3,0	4,2	3,6	4,2	4,1

ниях с микроорганизмами, каталазная активность которых повышалась от действия разных микроэлементов в 2—5 раз.

Влияние микроэлементов на каталазную активность бактерий в большей степени сказывается на растущих культурах и менее выражено на выросших.

Молибден и марганец, примененные как микроэлементы, сильно активируют каталазу бактерий, в том числе и азотобактера. Влияние бора проявляется реже и слабее, чем молибдена и марганца. Медь, примененная в дозе 10—20 мг, инактивирует каталазу бактерий. В этом отношении большую роль играют дозы микроэлементов и относительная плотность суспензий культур.

Действие микроэлементов проявляется как на спороносные, так и на неспороносные виды бактерий. Молодые (14-часовые) культуры реагировали на микроэлементы так же, как и более старые (24-часовые).

Как литературные, так и полученные нами данные свидетельствуют об определенном физиологическом значении и участии некоторых микроэлементов в окислительно-восстановительных реакциях клетки и ее энергетическом обмене. Однако действие микроэлементов, по-видимому, не ограничивается этим, но заключается также в их влиянии на образование различных промежуточных органических соединений, возникающих в процессах дыхания. К таким, например, относятся некоторые органические кислоты и другие соединения, используемые клеткой для последующего синтеза различных веществ.

Известно, что участием в окислительно-восстановительных и других важнейших реакциях клетки микроэлементы влияют на белковый обмен высших растений. О непосредственном уча-

сти марганца, железа, цинка, молибдена в этом процессе свидетельствует их способность повышать активность ряда ферментов белкового обмена (аминопептидаз, ди- и полипептидаз, аргиназ и др.). Повышение содержания белкового азота у многих бобовых кормовых трав под действием упомянутых микроэлементов подтверждает на практике это положение (Жизневская, Пейве и др., 1946).

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Сведения о протеазах почвенных микроорганизмов немногочисленны. Изучение их шло в основном в направлении поисков активных штаммов грибов и бактерий для ферментной промышленности и в редких случаях для углубленного исследования и классификации бактериальных протеаз (Maschmann, 1943).

В данное время больше изучены как наиболее активные протеазы споровых бактерий. Вместе с тем известно, что многие почвенные бактерии, грибы и актиномицеты обладают активными протеазами.

Как уже было сказано, нас интересовало влияние микроэлементов на протеолитические ферменты почвенных микроорганизмов, а также протеолитическая активность отдельных видов широко распространенных в ризосфере микроорганизмов для выяснения, в какой мере эти виды могут принимать участие в процессах разложения белковых веществ в почве.

Некоторые литературные источники (Johnson, 1941; Гейл, 1954; Грин и Нейрат, 1959) указывают на активирующее действие Co , Mn , Zn на бактериальные пептидазы. Имеются сведения о действии марганца на протеазы спор (Levinson a. Nyatt, 1954).

В наших опытах (Бершова, 1960а) были взяты на испытания Mo , B , Mn , Zn , Cu в предварительно испытанных дозах от 20 до 0,2 мг на 1 л среды — в зависимости от микроэлемента. Исследовали культуры бактерий и актиномицетов — представителей наиболее распространенных в ризосфере родов, свежывделенных из ризосферы кукурузы и картофеля. Протеолитическую активность культур определяли по разжижению желатины и измеряли методом вискозиметрии Освальда.

Действие микроэлементов испытывали на культуральных жидкостях взятых в опыты микроорганизмов, а также на их клетках, так как интересно было учесть изменения под влиянием микроэлементов способности культур выделять данный фермент в среду. Полученные данные выражены в единицах относительной вязкости желатины в пересчете на 100% ее концентрации в среде. Для сравнения свойств культур, приобретенных при выращивании на различных средах, их предвари-

Таблица 20

Протеолитическая активность микрофлоры (выраженная в единицах относительной вязкости желатины)

Микроорганизмы	МПБ		Синтетическая среда № 1	
	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость
	I	II	III	IV
<i>Pseudomonas rubigenosa</i>	58	78	140	600
<i>Ps. caudatus</i>	61	94	155	880
<i>Ps. liquefaciens</i>	60	70	225	920
<i>Ps. fluorescens</i>	90	92	320	900
<i>Bacterium liquefaciens</i>	160	120	—	—
<i>Bact. nitrificans</i>	190	287	1010	1485
<i>Pseudobacterium groningensis</i>	265	160	940	1170
<i>Pseudobact. vulgatus</i>	505	130	730	980
<i>Mycobacterium hyalinum</i>	122	85	222	1057
<i>Mycobact. globiforme</i>	230	140	230	848
<i>Proactinomyces albus</i>	88	78	305	630
<i>Actinomyces griseus</i>	—	—	240	300
<i>Act. chromogenes</i>	—	—	190	200
<i>Bacillus cereus</i>	70	170	330	1600
<i>Bac. idosus</i>	74	150	220	730
<i>Bac. oligonitrophilus</i>	80	180	208	695
<i>Bac. mesentericus</i>	100	470	—	—
<i>Bac. mycoides</i>	170	121	—	—
<i>Bac. megaterium</i>	185	260	—	—
<i>Bac. glutinosus</i>	325	730	950	1075

Примечание. В графе III и IV отсутствие роста микроорганизма на среде № 1 обозначено (—).

тельно культивировали параллельно на МПА и синтетической среде с сахарозой.

Из данных табл. 20 видно, что представители различных видов почвенной микрофлоры обладают различной протеолитической активностью. Они различаются также и способностью выделять и накапливать в среде протеолитические ферменты. Наиболее протеолитически активными в данном случае были виды *Pseudomonas*. Они разжижали желатину до 58—90 единиц относительной вязкости, а их культуральные жидкости — до 70—94. Следующими по активности идут виды рода *Bacterium* с разжижением желатины, в 3—4 раза меньшим, чем у *Pseudomonas*. Однако их культуральные жидкости менее активны (только в 2—3 раза), чем у *Pseudomonas*. Почти равной активностью с видами *Bacterium* обладают *Mycobacterium*, но активность экзоферментов в среде у последних более значительна.

Одинаковой активностью с *Mycobacterium* обладают актиномицеты, при росте которых относительная вязкость равна 240—300. Накопление в среде ферментов у этих микроорганизмов значительно больше. В этом отношении актиномицеты превосходят большинство бактерий. Семь видов рода *Bacillus* показали заметные различия в действии протеаз. Некоторые из них достигают активности *Pseudomonas*. Что же касается *Bac. megaterium* и *Bac. glutinosus*, то их активность значительно ниже. Соответственно активности клеток получено и действие их культуральных жидкостей. У первых двух видов разжижение желатины при внесении центрифугатов достигает высокой степени (170—150 единиц относительной вязкости), у других же оно значительно ниже.

При выращивании же видов, растущих на синтетических средах, на синтетической среде Красильникова № 1 с минеральным азотом наблюдалось интересное явление частичной потери протеолитической активности. После трех пассажей на этой среде был применен такой же прием засева в желатину, как и культур, выращенных в МПА. Разжижение желатины такими культурами показано в III и IV графах табл. 20. Оно было гораздо слабее, чем у тех же культур, выращенных на МПБ. Протеолитическая активность клеток уменьшилась приблизительно в 3—4 раза. Разница между активными и менее активными видами в этом случае сглаживалась.

Ослабление протеолитической активности особенно заметно на действиях культуральных жидкостей, активность которых сильно уменьшилась, а в некоторых случаях совсем не проявлялась. Такое явление свидетельствует о замедлении выделений культурой ферментов в среду. Однако способность образовывать протеолитические ферменты сохраняется в клетке и проявляется в соответствующих условиях.

Действие микроэлементов испытывали при посеве культур в 2,5%-ную желатину. Все испытуемые виды предварительно пассировали на среде с микроэлементами. При последующих высевах таких микроорганизмов в желатину наблюдалось увеличение их протеолитической активности. В табл. 21 приведены показатели относительной вязкости желатины при высеве четырех видов *Pseudomonas*.

Действие микроэлементов наблюдалось на всех четырех культурах (табл. 21), но в разной степени. Более заметно влияние молибдена и марганца, менее — бора. Цинк — в одном, медь — в двух случаях тормозили действие протеаз.

Активация протеаз проявилась и при накоплении этих ферментов в среде, на которой росли культуры. Испытание культуральных жидкостей, полученных при росте бактерий на среде с микроэлементами, в большинстве случаев показало более сильное действие, чем у контрольных вариантов. Так, у *Ps. sau-*

Действие микроэлементов на протеолитическую активность видов *Pseudomonas*
(относительная вязкость желатины)

Микроэлементы	<i>Ps. rubigenosa</i>		<i>Ps. caudatus</i>		<i>Ps. liquefaciens</i>		<i>Ps. fluorescens</i>	
	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость
Контроль	80	335	122	885	91	102	225	920
Молибден	62	304	69	535	76	71	210	710
Бор	65	360	115	735	73	173	205	850
Марганец	67	280	90	690	85	113	180	860
Цинк	62	370	100	785	92	120	450	930
Медь	75	430	191	600	62	129	250	830

caudatus контрольные варианты разжижали желатину до 885 единиц относительной вязкости, опытные же культуры, выращиваемые на среде с молибденом, были значительно активнее и разжижали желатину до 535, соответственно на среде с марганцем — до 690, на среде с медью — до 600 единиц относительной вязкости. Наблюдалось также явление, когда клетки культуры проявляли заметное усиление активности, выделение же ферментов задерживалось. Такая картина обнаружена у *Ps. rubigenosa* и *Ps. liquefaciens*. В других случаях при действии меди культуральные жидкости были активнее контрольных, а клетки — нет (*Ps. caudatus*, *Ps. fluorescens*).

Действие микроэлементов на виды *Bacterium* и *Pseudobacterium* иллюстрирует табл. 22, из которой видно, что оно проявляется в тех же направлениях, что и действие их на *Pseudomonas*. Бактериальные клетки были протеолитически активнее под влиянием Mo, Mn, Zn. Эти микроэлементы также стимулировали выделение протеаз в среду, что видно из повышенной активности культуральных жидкостей микроорганизмов.

Бор в трех случаях действовал инактивирующе, в двух же других получено незначительное стимулирование. По-видимому, сыграла роль дозировка бора, одинаковое количество которого было оптимально для одних микроорганизмов и незначительно угнетало другие. Однако у всех культур, приведенных в табл. 22, бор тормозил выделение ферментов в среду, а у *Bact. liquefaciens* — в значительной степени. Только *Bact. liquefaciens* положительно реагировала на внесение меди.

В табл. 23 приведены данные относительно действия микроэлементов на взятые микобактерии, проактиномицеты и актиномицеты, показывающие, что наиболее четко влияние микроэлементов сказалось на *Actynomyces griseus*, у которого усиление активности протеаз доходило до двух и более раз. Активно действовал и марганец, следующим по силе действия был мо-

Таблица 22

Действие микроэлементов на протеолитическую активность видов *Bacterium* и *Pseudobacterium* (относительная вязкость желатинны)

Микроэлементы	<i>Bact. liquefaciens</i>		<i>Bact. nitrificans</i>		<i>Pseudobact. groeningensis</i>		<i>Pseudobact. vulgatus</i>	
	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость
Контроль	250	197	300	280	740	870	750	785
Молибден	197	181	280	213	660	805	640	615
Бор	229	416	290	390	765	900	800	745
Марганец	202	160	190	186	700	890	650	579
Цинк	200	109	230	216	600	820	600	720
Медь	198	130	295	240	865	880	790	685

Таблица 23

Действие микроэлементов на активность протеаз различных видов из класса лучистых грибов (относительная вязкость желатинны)

Микроэлементы	<i>Mycobacterium hyalinum</i>		<i>Mycobacterium globiforme</i>		<i>Proactinomyces albus</i>		<i>Actinomyces griseus</i>	
	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость
Контроль	220	185	290	145	140	98	245	515
Молибден	205	141	271	125	125	86	136	211
Бор	225	195	294	134	148	98	185	465
Марганец	230	190	225	130	95	84	88	92
Цинк	150	120	210	130	76	90	66	70
Медь	240	220	300	162	125	90	—	—

либден. Даже бор усиливал протеолитическую активность, однако не в такой степени, как первые три микроэлемента. Медь в дозе 0,2 мг/л среды угнетала рост актиномицетов.

В остальных трех культурах сказало действие марганца и цинка как на клетки, так и на культуральные жидкости. Медь не оказывала стимулирующего действия. Вообще же микобактерии оказались мало отзывчивыми на действие микроэлементов, сравнительно с другими организмами.

В табл. 24 приведено изменение протеолитической активности спорных бактерий. Повышение протеолитической активности у *Vac. cereus* наблюдалось только под влиянием цинка. Однако усиление действия культуральной жидкости этого микроорганизма отмечается во всех вариантах опыта. На *Vac. ty-coides* заметное влияние оказали молибден и цинк. Тормозила протеолиз медь. Что же касается выделения ферментов в куль-

туральную жидкость, то в этом случае оказывали действие молибден, марганец и цинк. *Bac. glutinosus*, отличающийся медленным действием протеаз, реагировал только на марганец и цинк. Медь же в значительной степени тормозила его протеолитическую активность. В опытах же с фильтраатами культур обнаружено влияние также молибдена и бора.

Таблица 24

Действие микроэлементов на протеолитическую активность споровых бактерий (относительная вязкость желатины)

Микроэлементы	<i>Bac. cereus</i>		<i>Bac. obligonitrophilus</i>		<i>Bac. mycoides</i>		<i>Bac. glutinosus</i>	
	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость	Клетки	Культуральная жидкость
Контроль	300	215	200	690	270	101	425	975
Молибден	290	185	212	606	200	68	423	800
Бор	300	210	222	740	275	98	415	785
Марганец	280	190	245	833	265	77	306	760
Цинк	155	190	227	485	245	88	310	880
Медь	250	210	231	810	360	92	695	1125

Полное отсутствие активирующего влияния микроэлементов в опытах с клетками наблюдалось у *Bac. oligonitrophilus*, но культуральные жидкости его при действии молибдена и цинка обладали большей активностью. Таким образом, каждая из споровых культур по-разному реагирует на микроэлементы.

Проведенные в одинаковых условиях опыты с 20 видами почвенных микроорганизмов имели целью сравнение их протеолитической активности. Испытания показали, что не только роды, но и разные виды одного рода обладают различной способностью разжижать желатину. По этому признаку данные микроорганизмы можно условно отнести к более или менее протеолитически активным группам. Большая активность протеаз проявилась у видов *Pseudomonas*. Менее активны виды *Mycobacterium* и *Pseudobacterium*. Некоторые виды споровых бактерий (*Bac. cereus*, *Bac. idosus*) обладают очень активными протеолитическими ферментами. У таких же видов, как *Bac. glutinosus* и *Bac. mycoides*, протеолиз проходит гораздо медленнее.

Данные, полученные на одном белке, относительны. Не подлежит сомнению, что протеолитическая активность к другим белковым соединениям может измениться. Она изменяется также в зависимости от условий опыта. При выращивании культур на синтетической среде с минеральным источником азота у микроорганизмов значительно снижалась протеолитическая

активность, что было отмечено при последующих посевах на желатину.

Влияние микроэлементов на протеолитическую активность проявлялось в разной степени в зависимости от микроэлемента, его дозы и вида микроорганизма. В большинстве случаев можно было отметить стимулирующее действие молибдена, цинка, марганца на активность клеток и усиление протеолитического действия культуральных жидкостей. Что касается последних, то это влияние могло происходить благодаря усилению выделений ферментов клетками, а также, возможно, за счет активирования самих ферментов в среде.

АМИЛОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Процессы биологического превращения углерода в почве ризосферы растений очень сложны и многочисленны. О них в известной мере можно судить по амилолитической активности микрофлоры.

Расщепление крахмала в почве осуществляется различными микроорганизмами. Как указывают Пошон и де Баржак (1960), микроорганизмы, осуществляющие этот процесс, можно разделить на две группы: мало специализированную бактериальную и грибную микрофлору, расщепляющую крахмал до декстринов, и меньшую количественно, но более специализированную, расщепляющую этот углевод до органических кислот и других конечных продуктов.

Несмотря на многочисленные исследования этого процесса, состав микрофлоры, разлагающей крахмал, степень участия в этом отдельных видов микроорганизмов и факторы, активирующие это разложение, полностью еще не известны.

Обычно изучение данного вопроса шло в двух направлениях: а) исследование амилолитической активности различных групп и отдельных видов почвенных микроорганизмов; б) поиски активных штаммов почвенных бактерий и грибов для получения ферментных препаратов и выяснения оптимальных условий культивирования этих штаммов.

Что касается действия микроэлементов на амилолитическую активность почвенных микроорганизмов, то литература по этому вопросу весьма ограничена. Кроме упомянутых на страницах литературного обзора работ (Lulla, 1951; Stein, Fischer, 1960), об активирующем влиянии металлов, сравнительно незначительном, на амилолитическую активность термофильных бактерий сообщают Имшенецкий и Солнцева (1944). О влиянии цинка и других микроэлементов на амилазу *Bac. subtilis* говорят работы Велли, Стейна и др. (Velles, Stein et al., 1959; Yamamoto, Fukimoto, 1959).

Наши исследования (Бершова, 1961) были направлены на

изучение амилолитической способности представителей различных видов ризосферных микроорганизмов и влияния на этот процесс микроэлементов. Амилолитическая активность испытываемых культур определялась по их способности расщеплять крахмал в определенный промежуток времени до полного исчезновения окрашивания йодом. α - и β -амилазы определяли суммарно. Кроме актиномицетов, которых выращивали в жидких средах, испытываемые бактерии культивировали на агаризованных средах, снимали шпателем с чашек, промывали в буферном ацетатном растворе с последующим центрифугированием. Суспензии таких клеток доводили до определенной концентрации с помощью соответствующих стандартов. Поскольку нас интересовала также амилаза, выделяемая культурой в процессе роста в среду, из агара делали вытяжки из расчета: агар + буферный раствор 1 : 1. Такие вытяжки, или культуральные жидкости (в случае жидких культур), испытывали в количестве 1 мл. Культуры испытывали в 2- и 10-дневном возрасте. Данные, приведенные в таблицах, выражены в условных единицах амилолитической активности, полученных на 25 мл среды (суммарно из клеток и среды, на которой росла культура). За единицу амилолитической активности было принято количество крахмала (в мг), разложенного в течение одного часа 1 млрд. клеток.

Влияние микроэлементов испытывалось путем добавления в среду, на которой росли микроорганизмы, что обеспечивало их действие на растущую клетку, и добавлением в пробирки с суспензией клеток, выросших без микроэлементов. В последнем случае достигалось действие на неразмножающуюся культуру. Применяли такие дозы микроэлементов, предварительно изученные: Mo — 10, B — 8, Mn — 15, Zn — 3, Cu — 0,6 мг/л.

На амилолитическую способность были испытаны 123 штамма ризосферных бактерий, принадлежащих к 62 видам, и 246 штаммов, относящихся к 34 видам актиномицетов. Эти культуры были выделены из ризосферы пшеницы и кукурузы. Кроме того, испытывали музейные штаммы азотобактера и клубеньковых бактерий. Результаты представлены в табл. 25. Они указывают на наиболее широко выраженную способность разлагать крахмал у видов рода *Bacillus*. Из 25 видов только два не проявили амилолитической способности. Все взятые виды актиномицетов и проактиномицетов также очень интенсивно разлагали крахмал. Однако тут наблюдались штаммовые различия. Из 246 штаммов 20, относящихся к разным видам, были не активны. У остальных только 57% видов показали способность расщеплять этот углевод. Все же у некоторых видов *Pseudomonas* и *Bacterium* она проявлялась очень интенсивно.

Влияние микроэлементов на данный процесс изучалось на нескольких видах микроорганизмов, относящихся к различным наиболее распространенным в ризосфере группам почвенной

Таблица 25

Амилолитическая активность ризосферных микроорганизмов

Состав микрофлоры	Количество видов		
	взято в опыт	амилолитически	
		активных	неактивных
Споровые бактерии из рода <i>Bacillus</i>	25	23	2
Неспоровые бактерии из родов <i>Bacterium</i> и <i>Pseudomonas</i>	18	8	10
Азотобактер	3	3	—
Клубеньковые бактерии	2	1	1
<i>Muco-</i> и <i>Pseudobacterium</i>	14	9	5
Актиномицеты и проактиномицеты	34	34	—

микрофлоры. Их названия и результаты исследований в единицах амилолитической активности, полученных на 25 мл среды, приведены в табл. 26, 27, 28.

Амилолитическая активность азотобактера, приведенная в табл. 26, в двух суточных культурах равнялась 195 единицам, активность *Rhizobium meliloti* — 70—76 единицам. Значительно больше накоплено амилазы в 10-суточных культурах, у клубеньковых она увеличивалась до трех раз, у азотобактера — в гораздо большей мере, доходя до 2074—3000 единиц. Это уве-

Таблица 26

Действие микроэлементов на амилолитическую активность неспоровых бактерий

Вариант опыта	<i>Azotobacter chroococcum</i>		<i>Rhizobium meliloti</i>		<i>Ps. rubigenosa</i>		<i>Ps. caudatus</i>	
	I				I			
	Возраст культур (в сутках)							
	2	10	2	10	2	10	2	10
Контроль	195	2074	76	220	129	142	65	80
Молибден	930	3502	126	283	176	450	94	120
Бор	168	863	78	300	156	152	50	90
Марганец	292	2572	181	343	231	114	120	140
Цинк	160	1440	110	342	406	233	93	109
Медь	190	1020	—	240	177	190	50	—

личение в большой мере обусловлено накоплением амилолитического фермента в среде.

При внесении молибдена и марганца в среду и суспензию клеток амилолитическая активность молодых культур азотобактера усиливается. Это усиление более заметно при внесении в культуру, выросшую с микроэлементами, чем при внесении в суспензию клеток. Некоторое замедление амилолитического расщепления наблюдалось в случае внесения бора и меди. На старые 10-суточные культуры положительно влияет, кроме двух упомянутых микроэлементов, еще и цинк.

Эти же три элемента также активируют расщепление крахмала *Rhizobium meliloti*. При внесении их в среду, на которой росла эта бактерия, в молодых культурах более эффективен марганец, затем молибден. При внесении же их в суспензию неразмножающихся клеток первое место по эффективности занимает молибден. Что касается цинка, то он оказывает влияние на амилолитическую активность только при внесении в среду, где росла культура. При продолжении роста до 10 суток сказывается действие бора, влияние которого на молодые культуры не отмечено.

Амилолитическая активность у *Rhizobium* от внесения микроэлементов больше усиливается в молодых культурах, чем в старых. Однако на последние действовали все взятые микроэлементы, чего не наблюдалось у молодых культур.

Из неспорозных бактерий в испытание были взяты два вида *Pseudomonas*. Амилолитическая активность этих видов значительно меньше, чем азотобактера. Действие микроэлементов выражено более отчетливо у *Ps. rubigenosa*. Расщепление крахмала контрольными вариантами этой бактерии выражается 129 единицами, вариантом, выросшим на среде с молибденом, — 176, на среде с марганцем — 231; с цинком — 406 единицами. Как видно из этих данных, наиболее сильное воздействие на эту культуру оказали цинк и марганец.

Влияние микроэлементов проявилось и в 10-суточной культуре, но в этом случае больше действовал молибден. При внесении микроэлементов в суспензию клеток дали эффект только у 10-суточных культур молибден и цинк.

Такая же картина влияния микроэлементов наблюдалась и у *Ps. caudatus*, однако с относительно меньшим результатом. Тут также были эффективны марганец, цинк и молибден.

Обе споровые культуры (табл. 27) обладали высокой амилолитической активностью, особенно *Bac. glutinosus*. Некоторые различия в их ферментных системах выразились в способе накопления амилазы в среде: у *Bac. megaterium*, как и у всех предыдущих культур, с удлинением срока культивирования наблюдалось накопление амилазы; у *Bac. glutinosus* это накопление было только в первые дни. При продолжении культивиро-

Таблица 27

Действие микроэлементов на амилитическую активность споровых бактерий

Вариант опыта	<i>Bac. megaterium</i>		<i>Bac. glutinosus</i>			
	I	II	I		II	
	Возраст культур (в сутках)					
	2	2	12	2	12	
Контроль	290	355	470	335	904	515
Молибден	780	788	750	366	1224	620
Бор	258	461	590	441	838	1025
Марганец	550	662	600	810	1114	1042
Цинк	350	467	707	384	880	1018
Медь	—	—	—	351	610	—

вания до 12 суток количество амилазы у большинства вариантов опыта уменьшалось.

Действие микроэлементов на *Bac. megaterium* проявилось при внесении как в среду, так и в суспензию культуры. Первое место по эффективности действия занимает молибден, затем марганец и цинк. Расщепление крахмала усиливалось в 1,5—2 раза. При внесении микроэлементов в суспензию клеток действует и бор. *Bac. glutinosus* также реагирует на микроэлементы. Амилитическая активность этой бактерии значительно (в некоторых случаях в два и больше раза) усиливается. В относительных количествах это усиление одинаково в вариантах как с молодыми, так и со старыми культурами. Первое место по силе действия на данную культуру занимают цинк и молибден. Отмечено некоторое действие бора. Медь угнетала активность амилазы.

Таблица 28

Действие микроэлементов на амилитическую активность актиномицетов

Вариант опыта	<i>Act. griseus</i>				<i>Act. globisporus</i>	
	I		II		I	II
	Возраст (в сутках)					
	10	20	10	20	10	20
Контроль	492	340	432	359	320	375
Молибден	965	553	525	409	650	610
Бор	341	216	261	315	300	320
Марганец	696	475	515	464	610	415
Цинк	817	455	517	432	410	480
Медь	—	—	250	369	—	350

Данные о амилолитической активности актиномицетов приведены в табл. 28. Амилолитическая активность актиномицетов выше, чем испытанных культур бактерий, если брать сравнительно одинаковые биомассы этих микроорганизмов. Действие микроэлементов на расщепление крахмала обоими видами актиномицетов очень значительно. Активность *Act. griseus* равна 432—492 единицам, *Act. globisporus* — 320—375. Интересно отметить особенность стареющей культуры (20-суточной) *Act. griseus* снижать расщепление крахмала, что при испытании бактериальных культур констатировано только в одном случае. Кроме того, из суммарного количества единиц, представленных в табл. 28, большее количество относится к действию мицелия. Культуральные жидкости актиномицетов мало активны, чего также не наблюдалось у бактерий. Соотношение единиц амилолитической активности действия культуральных жидкостей и клеток у испытанных бактерий колебалось в пределах 1 : 2—1 : 3, в то время как у актиномицетов оно равнялось 1 : 5—1 : 10.

Действие микроэлементов особенно сильно при внесении их в среду, где росли актиномицеты. Больше всего при этом сказалось влияние молибдена, который активировал процесс в два раза. Почти в равной степени сказалось влияние марганца и цинка. Тормозил процесс бор.

Многочисленные исследования физиологов растений показали участие микроэлементов (Mn, Zn, Mo, Cu) в синтезе и превращениях углеводов высших растений. Входя в состав соответствующих ферментов (карбоксилазы, энолазы, альдегидоксидазы и многих других), эти микроэлементы активируют процессы углеводного обмена. Так, Mn и Zn повышают количество сахаров в сахарной свекле и винограде. Марганец способствует гидролизу крахмала при прорастании семян. Бор, создавая комплексные соединения с сахарами и другими углеводами, улучшает их передвижение в растениях. Той же способностью обладают и другие соединения.

Действие микроэлементов на некоторые особенности углеводного обмена проявилось и в наших опытах с амилазой почвенных микроорганизмов.

Примененные в опытах микроэлементы большей частью повышали амилолитическую активность большинства взятых микроорганизмов. Особенно это касается марганца, цинка, молибдена. Такое действие, по-видимому, осуществляется благодаря связи данных металлов с ферментной системой клеток. Это представляет интерес, если принять во внимание, что в отношении бактериальных амилаз такие сведения в литературе до сих пор были единичными.

Также интересно проявившееся действие бора на некоторые культуры. Считают, что этот микроэлемент, обычно имеющийся в клетках растений, не нужен для действия ферментов. Воз-

можно, что в данном случае влияние его на амилолитические функции клеток было косвенным. Действие меди было в большинстве случаев инактивирующим.

Влияние микроэлементов проявлялось главным образом на клетки и на выделение ими амилазы в среду. При действии же микроэлементов на культуральные жидкости или фильтраты вытяжек среды, на которой росли культуры, мы не получали заметного эффекта. Это говорит также о непосредственной связи микроэлементов с жизнедеятельностью клетки бактерий и актиномицетов. Микроэлементы действовали главным образом при внесении в среду, на которой росли микроорганизмы, меньше — при внесении в суспензию клеток.

Таким образом, изучение действия микроэлементов на некоторые ферментативные системы микроорганизмов показало определенное активирующее влияние их на процессы окислительно-восстановительные, протеолитические и амилолитические. Можно полагать, что при внесении микроэлементов в почву осуществляется подобное влияние, являясь определенным фактором в повышении биологической активности процессов почвы и действия их на развитие и продуктивность сельскохозяйственных растений.

ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА

Большинство исследований азотфиксации азотобактера, клубеньковых и других микроорганизмов в той или иной мере связано с изучением действия на этот процесс микроэлементов. Усиление развития бактерий и активности азотфиксации при применении последних отмечалось многими авторами. Первое место по силе действия на азотфиксирующую способность микроорганизмов занимал Mo , затем шли V , W и Fe . Эти микроэлементы увеличивали биологическое связывание азота в два и больше раз.

Первые наблюдения в этой области относились к эффективному действию почвенных вытяжек (Greaves, 1916; Bortels, 1927, 1930), изучение которых привело к выводу, что стимулирующим началом их были соли Mo и некоторых других металлов. Дальнейшие опыты с применением этих солей показали неодинаковое отношение к ним различных видов и даже штаммов азотобактера (Kluver a. van Reenen, 1933; Burk, 1934; Horner et al., 1942), а также значение определенных дозировок микроэлементов (Esposito, 1954; Esposito a. Wilson, 1956).

По данному вопросу опубликовано много работ, однако до сих пор предметом споров служит вопрос, является ли микроэлемент для азотфиксации необходимым или только стимулирующим фактором.

Углубленные исследования в этом направлении произведе-

ны Бортельсом, отметившим усиление азотфиксации не только в лабораторных, но и в полевых опытах. Автор считает, что наличие молибдена и ванадия в почве необходимо для развития в ней азотобактера и клубеньковых бактерий и является показателем плодородия почвы. Стимулирование азотфиксации и размножения азотфиксаторов в почве отмечено также Ван-Нилем (Van-Niel, 1935), Мульдером и др. (Mulder, 1939; Mulder et al., 1959), Абуталыбовым (1961) и др. Последний нашел, что повышение азотфиксирующей способности почвы при внесении молибдена и бора зависит от активации этими элементами не только азотобактера, но и других микроорганизмов почвы, фиксирующих азот (Абуталыбов, Газиева, 1961). Данные Бортельса были подтверждены Клуйвером и Ван-Рененом (Kluiver a. Van-Reenen, 1933), а также Берком и Хернером (Burk a. Herper, 1940). Последние наблюдали стимуляцию азотфиксации молибденом даже на средах со связанным азотом в нитратной или аммонийной форме. Согласно Мульдеру (Mulder, 1948), в последнем случае стимулирующая доза молибдена значительно меньше, чем при усвоении азотобактером молекулярного азота.

Огромное усиление азотфиксации азотобактера от применения Mo (на 600%) отмечает Матуашвили (1947). Использование фосфорно-молибденовой кислоты в опытах Федорова (1952) повысило азотфиксацию на 95%.

На дерново-среднеподзолистой почве Латвии применение молибдена и бора перед посевом повышало азотфиксацию местного штамма (№ 48) азотобактера в полевых условиях на 22—35% (Клинцаре, Креслиня, 1961).

Как видно из приведенных данных, степень стимулирующего действия молибдена на азотфиксацию у разных авторов получалась разной, однако это действие было несомненным.

Несмотря на большое количество исследований азотфиксации, этого важнейшего процесса в земледелии, химизм его до сих пор недостаточно изучен. Имеются только гипотетические высказывания относительно этапов и ферментов азотфиксации.

По мнению Виноградского (1928, 1952), азотфиксация происходит с участием фермента нитрогеназы, активирующей молекулярный азот. Берк (Burk, 1934) назвал ферментный комплекс, участвующий в азотфиксации, азотазой, а его главный компонент, активирующий молекулярный азот, — нитрогеназой.

По мнению Кастля (Castle, 1958), активной группой нитрогеназы может быть хелатное соединение с металлическим ионом сменной валентности. Такими могут быть Fe, Mo, Mn.

По данным Гапона (1947) и Блома (Blom, 1928), молекулярный азот активируется геминным ферментом, в составе которого имеется железо, однако пути этого процесса в представлении этих авторов разные.

Было высказано предположение, оспариваемое в дальней-

нем некоторыми исследователями, что найденная у азотобактера гидрогеназа активно участвует в процессе азотфиксации и что все бактерии, имеющие такую гидрогеназу, могут фиксировать атмосферный азот. Согласно Эспозито и Вильсону (Esposito a. Wilson, 1956), повышенное содержание железа стимулирует гидрогеназную активность азотобактера.

Действие молибдена на азотфиксацию связывают с наличием его в клетках азотобактера. Однако данные отдельных авторов в этом отношении расходятся. Тер Мулен (Ter Meulen, 1931), Кониш и Тцуге (Konishi a. Tzuge, 1934) нашли относительно большие количества этого элемента в клетках азотобактера, тогда как по данным Берка (Burk, 1934), его содержание незначительно. Такие расхождения можно объяснить разным поглощением молибдена при различных условиях выращивания культур, что, по-видимому, не принято во внимание упомянутыми исследователями.

Использование метода изотопов позволило изучить поступление молибдена в клетки азотобактера. Пользуясь Mo^{99} , мы (1956, 1958) показали поступление его, а также отдачу клетками этой бактерии, большее использование молодой культурой и различия в поглощении разными штаммами азотобактера. Форма связи его с другими соединениями в клетке изменилась, так как новые, выделенные в среду соединения Mo , были более доступны растениям.

Работая с тем же Mo^{99} и W^{85} , другие исследователи определили, что эти микроэлементы сосредоточены в плазме клетки и входят в состав фракции металлофлавопротеинов (Keeler a. Clark, 1958; Киллер и Варнер, 1962).

Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не решен вопрос, является ли участие молибдена в азотфиксации специфичным. Ряд опытов показал, что Mo и отчасти V необходимы для роста микроорганизмов, причем это наблюдалось и на средах со связанными формами азота в виде нитратов и аммиака. Желая исключить возможность ошибки, Берк (Burk, 1934) культивировал азотобактер на средах со связанным азотом в смеси газов (водорода и кислорода) и на средах без азота — в обычных условиях. В первом случае стимуляция была незначительной, в то время как во втором случае азотфиксация повышалась на 100—500%. Более убедительно подтверждена специфичность действия Mo и Fe в реакции азотфиксации опытами Пенгры и Вильсона (Pengra a. Wilson, 1959), которые показали стимулирующее действие этих элементов при выращивании *Aerobacter aerogenes* в атмосфере азота и отсутствие этого действия при росте на средах со связанным азотом.

Казалось бы, такие данные решают вопрос в сторону специфичности Mo . Однако другие исследования того же Берка, а также Федорова (1949) и других показали возможность фик-

саци азота без внесения молибдена в среду. В последнем случае все же надо учесть возможное наличие в среде молибдена за счет загрязнений и принять во внимание, что все указанные авторы работали без специальной очистки среды. Кроме того, современные методы очистки все же не дают полной гарантии отсутствия этого элемента (Хьюитт, 1960).

Испытание действия молибдена на азотфиксирующую способность азотобактера и других почвенных бактерий проводилось нами параллельно с наблюдением за их ростом (Бершова, 1951). Кроме азотобактера было взято несколько видов олигонитрофилов. Наличие в среде молибдена значительно усиливало азотфиксирующую способность бактерий (табл. 29). Заметное усиление роста в некоторых случаях было относительно меньшим, чем азотфиксации.

Таблица 29

Влияние молибдена на рост и азотфиксацию азотфиксирующих бактерий

Вид	Количество клеток (в млн. на 1 мл среды)		Количество фиксированного азота на 1 г сахара (в мг)	
	Без Мо	С Мо	Без Мо	С Мо
<i>Pseudomonas rubigenosa</i>	45	52	2,2	3,3
<i>Bact. liquefaciens</i>	60	67	3,3	3,7
<i>Bact. radiobacter</i>	50	75	5,7	6,4
<i>Bact. agile</i>	69	63	6,3	7,5
<i>Bact. herbicola</i>	120	151	7,1	7,6
<i>Azotobacter chroococcum</i>	—	—	7,5	15,1
<i>Mycobact. vadosum</i>	30	41	3,7	4,5
<i>Mycobact. mibicum</i>	52	75	4,1	6,1
<i>Bac. brevis</i>	—	—	3,8	5,2
<i>Bac. polymyxa</i>	90	115	4,8	6,7
<i>Bac. glutinosus</i>	16	14	5,8	5,9

Следует отметить, что физиологическая роль молибдена выходит за рамки азотфиксации, так как он участвует в восстановлении нитратного азота, питании микроорганизмов и высших растений. При наличии в среде источников азота в форме NH_3 необходимость в Мо отпадает (Esposito a. Wilson, 1956).

Было также отмечено действие на азотфиксацию ванадия и вольфрама (Burk, 1934; Bortels, 1936; Davies a. Stockdill, 1956). Однако их стимулирующее влияние было значительно меньше, чем молибдена (Burk a. Hogner, 1935; Kovats, 1938; Hogner a. al., 1942), и в определенной мере зависело от их валентности (Nicholas, 1958). Так, ванадий не влиял на процесс азотфиксации.

Некоторые работы показали антагонизм W и Mo. Наличие первого конкретно подавляло функции Mo (Takahasi a. Nason, 1957). В опытах Ишваран и Роу (Iswaran a. Rao, 1960) наряду с влиянием молибдена наблюдалось стимулирующее действие и железа, кобальта, никеля. При совместном внесении Mo, Ni, Co действие Mo ослабевало, что дало право авторам считать Ni и Co антагонистами Mo в данных процессах.

Наряду с молибденом значительную роль в азотфиксации играет также железо. В одних случаях отмечено действие одного этого элемента, в других — стимуляцию им молибдена. Некоторые авторы считают, что железо необходимо для нормального развития и фиксации азотобактера (Bassalik u. Neubauer, 1934), объясняя это действие его коллоидной структурой, благоприятствующей поглощению азота из воздуха (Moskeridge, 1917; Rippel, 1936; Steinberg, 1938).

Положительное влияние марганца на азотфиксацию отмечено многими исследователями (Olagu, 1920; Миротворский и Григорян, 1945; Грибанов, 1954). По данным Грибанова, различные штаммы азотобактера по-разному реагировали на марганец, но наличие последнего непременно усиливало азотфиксацию на 32, 48, 56%.

Изучение действия бора шло почти во всех случаях наряду с молибденом. Влияние этого микроэлемента изучалось в лабораторных опытах с чистыми культурами аэробных азотфиксаторов, а также в полевых условиях при внесении их под растение. Усиление азотфиксации азотобактером наблюдали многие авторы (Greaves, 1933; Herzinger, 1940; Миротворский и Григорян, 1945; Jordan a. Anderson, 1950; Mulder, 1957a). Большую стимуляцию данного процесса под влиянием бора получили Геретсен и Хуп (Gerretsen a. Ноор, 1954). В почве на делянках с бором азотфиксация увеличивалась в 10—15 раз сравнительно с контрольной делянкой. Об усилении развития азотобактера и азотфиксации в почве ризосферы озимой пшеницы при применении суперфосфата совместно с бором и молибденом сообщает Савельева (1954). В других опытах бор, не влияя на развитие, резко стимулировал азотфиксацию азотобактера (Anderson et al., 1961). В то же время исследования Матуашвили (1947) не подтвердили благоприятного действия этого элемента.

Много есть также литературных данных о действии микроэлементов на клубеньковые бактерии. Бортельсом впервые было показано, что рост разных бобовых и связывание азота повышались от внесения молибдена и меньше — ванадия. Доказательством действия считалось высокое содержание Mo в клубеньках на корнях бобовых, обнаруженное многими авторами (Ter Meulen, 1931; Jensen a. Betty, 1943; Jensen, 1946), что, по их мнению, является подтверждением важной роли молибдена

в азотфиксации. Как доказательства этого приводятся наблюдения о лучшем развитии клубеньков, увеличении содержания азота в них и во всем растении (Образцова, 1937; Mulder, 1954, 1957; Неклюдов, 1959). То же подтверждено исследованиями Федорова (1952). Автор считает, что роль молибдена в клубеньках аналогична таковой в клетках азотобактера. Особое мнение на этот счет высказывает Турчин (1958, 1960, 1963), работавший с меченым азотом (N^{15}). Последний обнаружен в клеточном соке клубенька. По мнению автора, фиксация азота осуществляется не клубеньковыми бактериями, а тканями клубенька, то есть, по сути, тканями высшего растения. В этом процессе участвуют как ткани растения, так и бактерии, связанные цепью переноса электронов. Роль же клубеньковых бактерий заключается в индуцировании образования специфической клубеньковой ткани. Этот же автор также сообщил о наличии фермента азотфиксации в неактивном состоянии в тканях небобовых растений (1963).

Действие бора на клубеньковые бактерии в основном оценивалось по развитию клубеньков на корнях растений. Так, Образцова (1937) отмечает в два раза большее образование их на вике при его внесении. О том же сообщает Калантырь (1937) в отношении сои, наблюдавший не только увеличение количества клубеньков, но и активности клубеньковых бактерий. Исаин (1958) сообщает о гистологических изменениях клубеньков в среде без бора, об изменении соотношения углеводов в тканях и развитии бактерий за счет клеточного вещества клубеньков. Усиление азотфиксации и хороший рост бобовых при применении бора получил также Федоров (1952).

Действие бора, внесенного в почву, в условиях Англии отмечали Бренчли и Торнтон (Brenchley a. Thornton, 1925). Оно проявлялось в усилении азотфиксации и накоплении азота в почве под викой. В три раза увеличивалось количество азота под клевером и люцерной при внесении бора в почву в вегетативных опытах Мульдера (Mulder, 1948).

Одиночными работами представлены в литературе исследования о действии кобальта. Опытами Риче и др. (Richie et al., 1960) установлена способность этого элемента резко усиливать азотфиксацию клубеньковых бактерий сои.

Усиление азотфиксации *Azotobacter indicum* под действием цинка и меди наблюдал Бекинг (Becking, 1961).

Влияние молибдена сказывалось на азотфиксации и других микроорганизмов. Способность связывать атмосферный азот у *Clostridium pasteurianum* и *Clostridium butyricum* усиливалась в шесть и больше раз под воздействием молибдена (Jensen a. Spenser, 1946, 1947). Как и азотобактер, различные штаммы этих бактерий не одинаково реагировали на Mo и V. Действие последнего было слабее. Другие металлы не дали эффекта.

По данным Федорова (1952), тот же микроорганизм при добавлении малых концентраций фосфорномолибденовой кислоты усиливал азотфиксацию на 163%, при добавлении 0,001% борной кислоты — на 139%. Благоприятное влияние железа на этот процесс у *Clostridium pasteurianum* отметили Карнаган и Кестл (Carnahan a. Castle, 1958). По сведениям других авторов, молибден и ванадий стимулировали азотфиксацию бактерий из рода *Beijerincka* (Becking, 1961) и нескольких штаммов *Achromobacter* sp. (Proctor et al., 1959). Молибден был необходим для азотфиксации *Aerobacter aerogenes* (Pengra a. Wilson, 1959) и *Mycobacterium flavum* (Крылова, 1963, 1964). В наших опытах (1958) 12 видов олигонитрофильных бактерий повышали азотфиксацию от внесенного Mo^{99} до 20%.

Используя меченый азот (N^{15}), Грев и Вильсон (Grev a. Wilson, 1962) изучали процесс азотфиксации *Vac. polymyxa* и других спорообразующих бактерий. Авторы убедились в том, что без железа и молибдена в среде азотфиксация снижалась до 50%. При выращивании же культур на аммонийных солях действие молибдена не сказывалось.

Отмечено также действие микроэлементов на фиксацию азота сине-зелеными водорослями *Anabaena* и *Nostoc* (Bortels, 1940). Действие молибдена сказывалось значительно сильнее, чем ванадия. По данным Истера (Eyster, 1952), на *Nostoc* также влиял бор в концентрации 0,1 мг/мл. Тага и Эльрефаль (Taga a. Elrefal, 1962) сообщают, что для оптимальной фиксации азота этими водорослями необходим Mo и Co . Прибавка фиксированного азота в этом случае была равна 51 и 58%.

Все эти работы показывают стимулирующее действие определенных микроэлементов на биологическую фиксацию азота. Механизм действия металла понятен из хода этого процесса. Предложено несколько априорных схем фиксации азота с участием металлов. Авторы некоторых из них — Федоров (1949) и Винфильд (Winfield, 1955). В схеме, предложенной Бахом (Bach, 1957), указано место металла в реакции азотфиксации. Обзор современных данных о возможных путях фиксации азота, а также некоторый критический анализ этих схем подробно представлены в работах Рубенчика (1960), Крыловой (1962).

Участие микроэлементов в азотфиксации заключается в том, что металл, взаимодействуя с ферментом, обуславливающим этот процесс, влияет на физико-химическое состояние последнего, делая его более активным в восстановлении атмосферного азота. Спорным является такой вопрос: по мнению Федорова и др., молибден, бор и другие стимулирующие вещества действуют на фермент, не являясь его составной частью. Другие же исследователи считают, что молибден и железо входят непосредственно в состав фермента, обуславливающего процесс фиксации. Действие его связывают с ферментом гид-

рогеназой, которая восстанавливает азот, адсорбированный ферментом азотфиксации (Shug a. Wilson, 1954). Поводом к таким представлениям послужило то, что гидрогеназа является металлофлавопротеином с протетической группой, содержащей Mo. Содержание Mo в гидрогеназе подтверждено рядом исследований (Keeler, 1957; Bergel, Bray, 1958). Последние, обнаруживая молибден в определенной фракции белковых веществ независимо от условий культивирования, полагают, что найденный элемент находится в молибдопротеине. Шаг и др. (Shug et al., 1954) получили очищенный препарат гидрогеназы из разрушенных ультразвуком клеток клостридиума. Этот препарат восстанавливал свою активность только при добавлении молибдена и неорганического фосфата. Другие микроэлементы не оказывали такого действия.

Однако против этого предположения говорит то, что при получении бесклеточных препаратов из бактерий гидрогеназа всегда находится в разных фракциях центрифугатов с активным началом азотфиксации; последнее содержится в центрифугате, а гидрогеназа — в осадке. С другой стороны, некоторые исследования говорят в пользу участия железа в азотфиксации. Виртанен (Virtanen, 1954) пришел к выводу, что фермент, катализирующий этот процесс, содержит молибден и железо. Это положение подтвердили также другие авторы (Esposito a. Wilson, 1956). Роль железа заключается в том, что оно входит в активную группу нитрогеназы и хемосорбция N_2 происходит на нем (Carnahan a. Castle, 1958).

На основании углубленных исследований Николас (Nicholas, 1958) также придает значение этим двум элементам. Его наблюдения показали, что как железо, так и молибден тесно связаны с белками и трудно удалимы диализом. Автор полагает, что существует два вида гидрогеназы: один — с включением железа, другой, более специфический, — с молибденом. С этой точки зрения он допускает возможность взаимозависимости процессов азотфиксации с гидрогеназной активностью.

Таким образом, наряду с доказанным действием молибдена не исключено также действие железа. В некоторых случаях действие молибдена обусловлено наличием в среде железа. Несколько слабее влияние ванадия и вольфрама, которые только частично могут заменить молибден. При совместном использовании молибдена с ванадием и вольфрамом первый может быть конкурентно подавлен ими. Некоторые данные говорят о положительном действии на азотфиксацию марганца и бора.

Дозы молибдена, необходимые для роста микроорганизмов, значительно меньше, чем для азотфиксации.

Отзывчивость различных микроорганизмов на микроэлементы при азотфиксации не одинакова. Это относится не только к видам, но и к штаммам бактерий.

ЧАСТЬ IV

ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ И ДРУГИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

ВИТАМИНЫ ГРУППЫ В

Исследования последних лет показали, что действие микроэлементов на живые организмы очень сходно с действием витаминов. Параллельно с утверждением о необходимости для аукогетеротрофов (бактерий и грибов) витаминов, влияющих на их обмен веществ, показана такая же необходимость и в определенных микроэлементах, участвующих в сходных реакциях клетки.

С усовершенствованием методик исследования и развития знаний о витаминах и микроэлементах невольно поражает сходство их функций в живой клетке. Большинство витаминов участвует в системе ферментов как коферменты; то же можно сказать и о микроэлементах, являющихся составной частью ферментных систем или органических соединений, так или иначе участвующих в ферментативных процессах (Мо — в флавопротеинах, Fe — в цитохромах, Co — в V_{12} и др.).

Но наряду с этим имеется ряд данных, указывающих на определенное влияние микроэлементов на синтез витаминов в клетке, причем определенные металлы связывают с синтезом определенных витаминов (Zn — с V_1 и рибофлавином, Co — с V_{12}). Много данных такого рода находим в отношении высших растений, гораздо меньше имеется сведений о влиянии микроэлементов на образование витаминов у микроорганизмов.

Витамин V_{12} имеет в своем составе кобальт. Это обстоятельство может, как будто, определять действие последнего в синтезе V_{12} . Однако это не всегда так. V_{12} синтезируется многими бактериями и актиномицетами и необходим также для многих других микроорганизмов — аукогетеротрофов. Изучению его свойств и получению уделяется много внимания в связи с важностью его функций в животном и растительном организмах. Образование данного витамина почвенными микроорганизмами (грибами, азотобактером, *Vac. megaterium* и др.)

установлено многими исследованиями (Lochhead, 1952; Lochhead a. Burton, 1955; Красильников, 1958; Ушакова, 1958; Смайл, 1963), показавшими влияние среды и других экологических факторов на синтез этого витамина микроорганизмами.

Изучение влияния металлов в большинстве ограничивалось кобальтом и в редких случаях другими элементами. Витамин В₁₂ получают обычно при культивировании актиномицетов, выращиваемых для получения антибиотиков. Параллельно с этим велись исследования в отношении действия металла.

Мейтра и Рои (Maitra a. Roy, 1960) установили необходимость цинка и частично железа для биосинтеза В₁₂ *Streptomyces olivaceus*, выращиваемого на синтетической среде, по возможности освобожденной от микроэлементов. Другие металлы (Мо, Сг, Мп) усиливали рост актиномицета, но не образование витамина. Отмечено также интересное действие бора, задерживающее рост, но не синтез В₁₂. О такой же диспропорции между выходом витамина и ростом клеток сообщают и другие авторы (Kurz a. Nielsen, 1957).

Действие кобальта на синтез упомянутого витамина у различных микроорганизмов освещено в статье-обзоре Даркена (Darken, 1953). Мы же остановимся только на некоторых работах, вышедших позже или не упомянутых в этом обзоре.

Хендлин и Рюгер (Hendlin a. Ruger, 1950) нашли, что кобальт необходим для *Streptomyces griseus*. Добавление его в комплексную среду увеличивало образование В₁₂ в три раза. То же было показано и для *Streptomyces olivaceus* и других актиномицетов (Hall et al., 1953). Определенное стимулирующее влияние СоСl₂ на биосинтез хлортетрациклина и витамина В₁₂ *Actinomyces aureofaciens* показали Круссер с сотрудниками (1960).

Использование кобальта актиномицетами было подтверждено применением радиоактивного Со⁶⁰, который вошел в молекулу образованного актиномицетом витамина В₁₂ (Chariet et al., 1950).

Интересно, что актиномицеты могут использовать не только неорганические формы кобальта, но и кобальт, входящий в состав клеток других организмов. Так, показано, что источником этого элемента в среде для *Streptomyces griseus* при биосинтезе В₁₂ служили клетки дрожжей (Perlman a. O'Brien, 1954).

Интересны данные Миамото (1957), отметившего прямую связь между синтезом В₁₂ у *Streptomyces griseus* и нуклеиновыми кислотами. При добавлении к питательной среде кобальта усиливается рост актиномицета, увеличивалось значительно количество РНК и ДНК, а также усилилось образование витамина В₁₂ в 30 раз.

Выращивание пропионовокислых бактерий — продуцентов витамина В₁₂ — на синтетической среде с некоторыми микроэле-

ментами показало различия в их действии на эти бактерии. Так, марганец не влиял на рост бактерий, но уменьшал выход истинного витамина В₁₂. Магний и железо усиливали образование витамина на 40—60%. Особые результаты получены при внесении кобальта в дозе 0,25 мг на 100 мл — выход витамина усилился на 3200%. Цинк же, примененный по фону других микроэлементов, угнетал рост и продукцию витамина. Подщелачивание среды усиливало это действие, а добавление гипосульфита снимало угнетение (Воробьева, 1961, 1962). В данных опытах нам кажется чрезмерным усиление выхода витамина под влиянием кобальта, а также неправильным использование цинка в относительно высоких дозах (10—60 мг/л).

Положительное влияние кобальта на образование витамина В₁₂ различными почвенными микроорганизмами наблюдала Летунова (1959, 1959а). Она изучала действие кобальта на различные экотипы бактерий, применив для этого концентрации Со, приближающиеся к таковым в естественной среде обитания изучаемых микроорганизмов. Оказалось, что оптимальные концентрации этого элемента для усиления синтеза В₁₂ соответствуют таковым в природных условиях. Штаммы, выделенные из обогащенных кобальтом илов, требовали больших его концентраций по сравнению со штаммами, выделенными из обедненных илов. Добавление кобальта в среду для выращивания *Aspergillus niger* усилило образование витамина этим грибом в 10 раз (Nicholas, 1952).

Изучение обмена кобальта у микроорганизмов с применением Со⁶⁰ помогло установить интересные данные, относящиеся к синтезу В₁₂. Опыты с *Aspergillus oryzae* и *Bac. natto* показали накопление Со⁶⁰ в максимальном количестве в начале логарифмической фазы роста, причем количество этого элемента в клетках было пропорционально скорости их размножения и не соответствовало синтезу В₁₂. Авторы полагают, что действие Со было направлено на усиление азотного обмена активированием некоторых ферментов (полипептидаз, аргиназы и др.). Таким образом, действие кобальта на биосинтез В₁₂ было косвенным (Савада и др., 1955).

Интересно взаимодействие между В₁₂ и медью. Наличие 0,001% меди задерживало рост мутанта *Bact. coli*. Добавление в среду В₁₂ снимало это торможение полностью (Hine et al., 1957). По-видимому, токсичность меди являлась результатом ее определенных соединений в клетке, образование которых измерялось присоединением В₁₂.

Такое же явление отметили другие исследователи, работавшие с 9 штаммами дрожжей *Candida* sp. (Басс-Шадхан и др., 1962). Усиление синтеза витамина В₁₂ при внесении кобальта в среду наблюдалось только при оптимальном содержании в ней азотных и питательных веществ.

Рибофлавин. Действие кобальта отмечено и в образовании другого витамина из группы В — рибофлавина. Так, Энри (Enri, 1955, 1958), изучая действие микроэлементов на образование упомянутого витамина у *Candida Guilliermondii*, установил стимуляцию этого процесса кобальтом, в меньшей мере — цинком и угнетение — железом. Автор считает, что кобальт задерживает поступление железа во внутреннюю область клетки, где локализуются процессы образования рибофлавина; он также отмечает способность железа катализировать процесс разложения рибофлавина при помощи H_2O_2 , что не свойственно кобальту. Возможно, что все указанное служит объяснением положительного влияния кобальта. Однако малые дозы железа не угнетали, а стимулировали образование витамина B_2 . Угнетающее действие относительно высоких доз железа известно из других работ, авторы которых объясняют это явление задерживающим влиянием его на деятельность ферментов, участвующих в синтезе рибофлавина.

Несколько иной точки зрения придерживается Шавловский (1959). Работая с комплексообразователями, связывающими железо и другие металлы среды при выращивании *Candida Guilliermondii*, автор наблюдал стимулирующее действие малых доз кобальта и железа на синтез данного витамина. Он считает, что недостаточное содержание металла нарушает обмен веществ клеток, в результате чего в среде накапливается рибофлавин. Действие стимулирующих веществ проявляется при размножении клеток в условиях формирования новой протоплазмы.

Дальнейшее изучение действия железа на синтез рибофлавина (Шавловский, 1959) установило зависимость между этим элементом и содержанием нуклеотидных форм витамина в клетках дрожжей, а именно флавиномононуклеотидов (ФМН). Это указывает также на увеличение роли флавиновых ферментов в дыхательных системах дрожжей при нарушении обмена железом.

Углубленные исследования биосинтеза рибофлавина у *Candida Guilliermondii* и близких к ним видов, а также действия на этот процесс цинка и железа принадлежат Кнюзелю (Knüsel, 1957). Упомянутые культуры синтезировали витамин B_{12} , который выделялся в свободном виде в культуральную жидкость. Синтез его был стимулирован цинком. Железо не действовало на образование этого витамина, но, внесенное совместно с цинком, усиливало рост клеток, использование глюкозы и синтез витамина B_{12} . Витамин, по мнению автора, был конечным продуктом в обмене веществ при участии цинка и выделялся как запасное вещество.

В исследованиях Басс-Шадхана (1960) с культурой *Saccharomyces cerevisiae* применение кобальта, меди и марганца вело

к увеличению в их клетках рибофлавина на 46% и снижению витамина В₁ на 19%.

Взаимодействие данного витамина и бора наблюдалось на культурах *Lactobacillus arabinosus* и *Lactobacillus casei*. Добавление борной кислоты в количестве 22 мг на 10 мл среды, на которой выращивались эти бактерии, полностью подавляло их рост. При дополнительном внесении рибофлавина в количестве 0,05—3 мг на 100 мл среды наблюдалось все усиливающееся развитие бактерий, достигавшее нормальной величины. Другие витамины — тиамин, биотин, р-аминобензойная кислота — не оказывали такого действия (Adrian, 1956). Недостаток цинка в среде уменьшал образование витамина В₂ и у плесневых грибов (Nicholas, 1952). В свою очередь отмечено, что оранжево-желтые варианты гриба *Ashbya gossypii* повышали образование рибофлавина в среде с железом.

Другие витамины группы В. Сведений относительно действия микроэлементов на другие витамины группы В очень мало. Некоторые данные относительно их влияния на физиологические функции грибов и о действии на синтез биотина *Phycomyces blakesleeana* находим в работах Шопфера (Schopfer, 1943). Продукция этого витамина увеличивалась при добавлении смеси солей Cu, Fe, Mn, Zn, Ga, Mo. В опытах же Николаса (Nicholas, 1952) недостаток цинка уменьшал образование биотина, никотиновой и пантотеновой кислот *Aspergillus niger*.

Широкое изучение действия недостатка металла на различные ферменты привело к интересным выводам относительно их функций в питании растительных организмов. Так, изучая влияние недостатка цинка в питании *Neurospora crassa*, Незон (Nason et al., 1951) приходит к выводу о сходности действия этого элемента и биотина. Отсутствие как одного, так и другого вело к уменьшению роста гриба и к изменению процессов его метаболизма. Исчезала активность некоторых ферментов, таких, как алкогольдегидрогеназа, участвующих в образовании триптофана, но усиливалась активность других ферментов, например, усилилось в 10—20 раз действие ДФП нуклеотидазы (фермент, расщепляющий связи ДФН и никотинамида рибозида). С другой стороны, не функционировали фумараза, гексокиназа, альдолаза, трифосфат-дегидрогеназа и другие ферменты.

В сообщении Вулли (Woolley, 1941) говорится о положительном действии марганца на культуру *Lactobacillus casei*, употребляемую для получения пантотеновой кислоты. Что же касается тиамина, то образование его связывают с действием цинка.

По данным опытов с *Neurospora* и высшими растениями (Nason, 1950; Nason et al., 1951), возможное действие цинка на

синтез никотиновой кислоты объясняется тем, что она является дериватом триптофана. Синтез же последнего отсутствует при дефиците цинка.

Рамакришнан (Ramakrishnan, 1956) сообщает о повышении биосинтеза витамина С у гриба *Aspergillus tumarii* Kifa от внесения марганца и кобальта.

Из всех приведенных литературных данных можно отметить положительное влияние микроэлементов (Zn, Fe, Mn, Mo, B, Co) на биосинтез витаминов у различных микроорганизмов. Более доказанным специфическим действием можно считать действие цинка в образовании В₁ и рибофлавина и кобальта в синтезе В₁₂. По-видимому, различные группы микроорганизмов в разной степени отзывчивы при образовании витаминов на действие микроэлементов. Можно думать, что эти микроэлементы участвуют в сходных процессах обмена веществ клетки и прямо или косвенно влияют на них. Большое значение в данных исследованиях имеют условия проведения опытов.

В последние годы рядом исследований установлено наличие в почве различных витаминов и ауксинов. Продуцентами их являются в основном почвенные микроорганизмы, а также высшие растения — их корневые выделения (Иерусалимский, 1949; Смалий, 1962). Количество указанных биологически активных веществ, главным образом витаминов группы В и гетероауксина, обычно соответствует численности микроорганизмов в почве. В ризосфере растений этих веществ обнаружено больше, чем в почве без растений. Уже упомянутыми авторами и другими показано участие микрофлоры почвы в снабжении растений не только основными элементами питания, но и физиологически активными веществами типа ауксинов и витаминов. В этом отношении деятельность микроорганизмов чрезвычайно многообразна и в большей мере зависит от влияния внешних факторов. Можно предположить, что в условиях почвы в ризосфере растений одним из таких факторов является применение удобрений, в том числе и микроэлементов.

В наших исследованиях (Бершова, Козлова, 1961, 1962, 1962а, 1962б; Бершова, 1963) изучалось действие микроэлементов на образование ризосферными микроорганизмами витаминов группы В и гетероауксина.

Образование витаминов группы В почвенными микроорганизмами

Изучалось действие микроэлементов Mo, B, Mn, Zn, Cu, Co на витаминообразование у микроорганизмов, выделенных из ризосферы кукурузы и картофеля. Работали с 12 видами бактерий и актиномицетов.

Определения велись при помощи биологических методов со

специфическими штаммами микроорганизмов, нуждающимися в соответствующем витамине. Микроэлементы вносили в среды, на которых выращивали исследуемые организмы.

На рис. 1, 2, 3, 4 и 5 представлены количества витаминов, образуемых отдельными видами некоторых бактерий и актино-

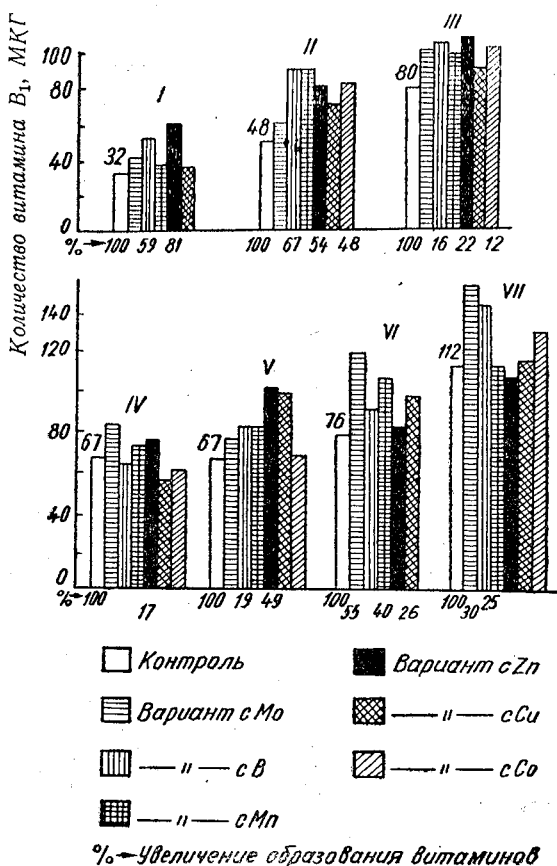


Рис. 1. Влияние микроэлементов на образование витамина B₁ микроорганизмами (в мкг): I — *Mycobacterium tumescens*, II — *Pseudomonas radiobacter*, III — *Bacillus oligonitrophilus*, IV — *Actinomyces griseus*, V — *Mycobacterium micosum*, VI — *Bacterium agile*, VII — *Rhizobium meliloti*.

мицетов, взятых нами из общего количества испытанных микроорганизмов. Количество найденных витаминов (B₁, B₁₂, пантотеновой и никотиновой кислот) приведено в мкг на 1 г сухих клеток бактерий, биотина — на 100 г. Величина столбиков на рисунках указывает на количество образованного витамина и

изменение этого количества под влиянием разных микроэлементов. Каждый столбик соответствует количеству витамина у отдельных вариантов культуры, подвергшихся действию микроэлементов.

Витамин В₁. На рис. 1 показаны количества этого витамина. Взятые микроорганизмы образуют различные количе-

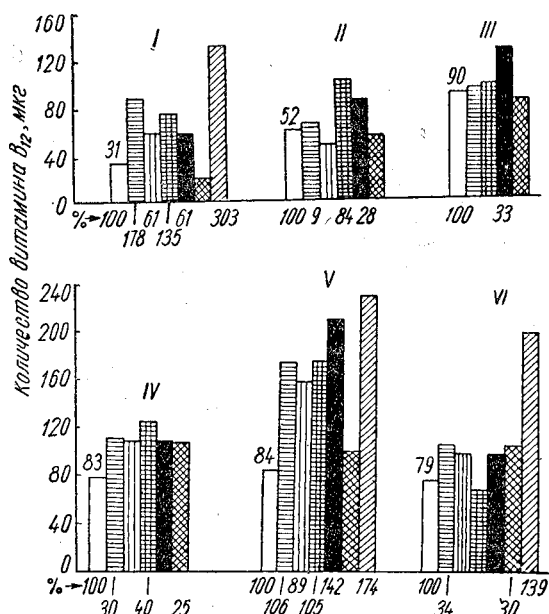


Рис. 2. Влияние микроэлементов на образование витамина В₁₂ (в мкг):

I — *Mycobacterium tumescens*, II — *Bacillus megaterium*, III — *Mycobacterium mucosum*, IV — *Bacterium agile*, V — *Bacillus oligonitrophilus*, VI — *Pseudomonas aurantiaca*.

Условные обозначения те же, что на рис. 1.

ства витамина В₁ — от 32 до 112 мкг на 1 г сухих клеток. Больше всего образовывали этот витамин азотобактер и клубеньковые бактерии, меньше его было найдено в культурах актиномицетов. Из всех микроэлементов молибден, цинк и марганец проявили большее действие, активируя образование витамина В₁ почти у всех взятых видов бактерий. Действие бора не всегда проявлялось. Так, азотобактер и *Vac. megaterium* не реагировали на добавление его к среде. Действие кобальта проявилось в четырех случаях, а меди — в трех и было незначительным.

Усиление образования витамина В₁ под действием микроэлементов в большинстве случаев было очень заметным и доходи-

до до 60—70%. Актиномицеты также усиливали образование витамина при внесении молибдена, марганца и цинка и отрицательно реагировали на добавление кобальта и меди.

Интересные данные получены при испытании *Ps. aurantiaca*. Этот вид, свежевыделенный, образовывал В₁. После первых же пересевов обнаружить у него В₁ уже не удавалось даже при применении микроэлементов.

В и т а м и н В₁₂. Данные по витамину В₁₂ приведены на рис. 2. Наиболее продуктивными в отношении синтеза витамина В₁₂ оказались культуры *Rhizobium meliloti*, *Ps. aurantiaca*, *Bact. agile*, *Bac. oligonitrophilus*.

Все эти микроорганизмы относятся к различным группам бактерий, что не дает возможности сделать заключение о продуцировании В₁₂ преимущественно какой-либо одной группой.

Микроэлементы оказывали в той или иной степени влияние почти на все взятые микроорганизмы. Усиление витаминообразования у некоторых бактерий доходило до 100%.

Под действием микроэлементов большая часть видов более интенсивно образовывала В₁₂: при применении цинка из 12 культур 9 усиливали синтез В₁₂, в том числе азотобактер, клубеньковые и *Bac. megaterium*, при применении молибдена — 7, марганца — 8, бора — 5 культур. Медь у 5 видов усилила и у 5 тормозила синтез В₁₂. В данном опыте был применен кобальт, поскольку он входит в состав В₁₂. Наличие его в среде увеличило образование В₁₂ у всех 5 культур, где он был применен. Увеличение образования В₁₂ при внесении кобальта доходило до 1,5—2—3 раз для различных видов.

Взятые актиномицеты образовывали витамин В₁₂ в гораздо меньшем количестве, чем бактерии. В их контрольных вариантах он не был найден. Однако применение микроэлементов усилило образование В₁₂ и дало возможность обнаружить его у всех трех видов. Так, у *Actinomyces griseus* В₁₂ обнаружен в вариантах с марганцем, цинком и медью, у *Act. globosus* — с марганцем, молибденом и бором. Таким образом, влияние марганца сказалось на всех трех видах актиномицетов.

Никотиновая кислота. Данные об образовании этого витамина приведены на рис. 3. Синтез никотиновой кислоты осуществляется микроорганизмами значительно интенсивнее, чем всех других испытанных витаминов. Взятые микроорганизмы образовывали это соединение в количестве от 86 до 432 мкг на 1 г сухих клеток. Наиболее активными в этом отношении оказались азотобактер, радиобактер, *Mycobact. micosum* и *Bac. megaterium*. Сравнительно большие количества никотиновой кислоты, достигающие до 99—178 мкг, образовывали также взятые актиномицеты.

Действие микроэлементов проявилось следующим образом: внесение молибдена усиливало образование данного витамина

у всех видов микроорганизмов и особенно у азотобактера, клубеньковых и *Vac. megaterium*. Марганец, цинк и бор действовали также положительно на образование никотиновой кислоты большинством взятых микроорганизмов. Однако это стимулирующее действие проявлялось по-разному, в различной степени

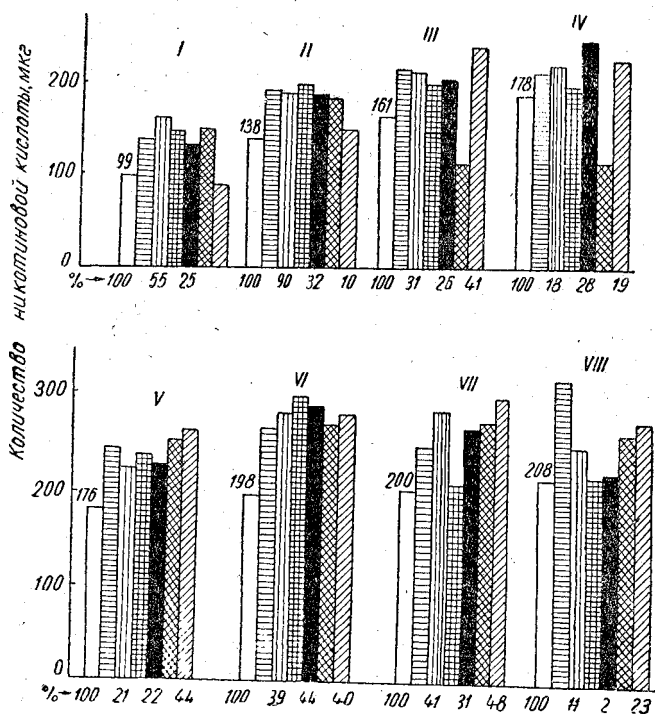


Рис. 3. Действие микроэлементов на образование никотиновой кислоты (в мг):

I — *Actinomyces globosus*, II — *Rhizobium meliloti*, III — *Actinomyces griseus*, IV — *Actinomyces albus*, V — *Bacterium agile*, VI — *Pseudomonas aurantiaca*, VII — *Bacillus oligonitrophilus*, VIII — *Azotobacter chroococcum*.

Условные обозначения те же, что на рис. 1.

усиливая витаминобразование. У одних микроорганизмов оно было очень значительно, у других только немного превышало контрольные цифры. Активно действовали молибден, цинк и бор.

Биотин. Данные опытов по определению биотина приведены на рис. 4. Взятые микроорганизмы образуют различные количества биотина: от 26 до 93 мг на 100 г сухих клеток испытуемых культур. Более активными продуцентами этого вита-

мина из всех испытанных микроорганизмов являются *Bac. oligotrophilus*, *Bac. megaterium*, *Az. chroococcum*. У них найдено 78—93 мкг биотина. Значительно меньше витамина образуют *Bact. agile* и *Ps. radiobacter*, в клетках которых его обнаружено 26—30 мкг.

Микроэлементы Mo, B, Mn, Zn, Cu активировали образование биотина у большинства испытанных микроорганизмов. Это

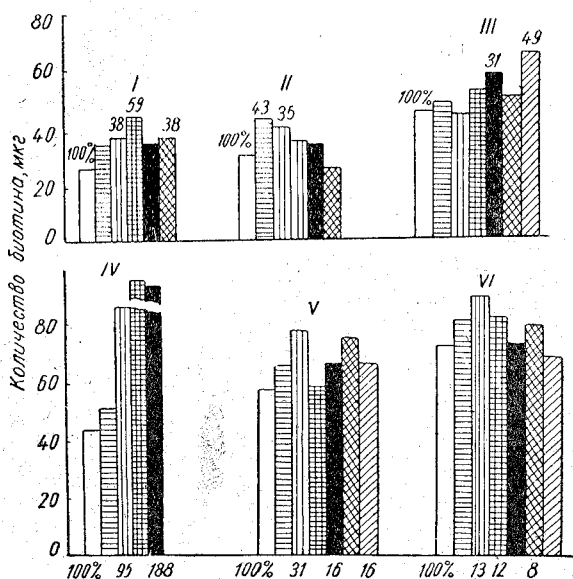


Рис. 4. Действие микроэлементов на образование биотина (в мкг):

I — *Bacterium agile*, II — *Pseudomonas radiobacter*, III — *Rhizobium meliloti*, IV — *Actinomyces griseus*, V — *Mycobacterium mucosum*, VI — *Mycobacterium tumescens*.

Условные обозначения те же, что на рис. 1.

усиление в отдельных случаях было очень значительным и доходило до 43—59% прибавки количества биотина.

Отдельные микроэлементы по-разному действовали на микроорганизмы. Больше случаев положительного влияния наблюдалось при внесении цинка, марганца и бора. Микроэлементы усиливали витаминобразование у 7—8 видов из 10, взятых в опыт. Это усиление было порядка 18—59%.

На меньшее количество видов и менее эффективно действовал молибден, внесение которого усилило образование витамина только в пяти случаях, из которых только в двух увеличение было значительным (32—43%).

Что касается меди, то ее положительное действие было от-

мечено в двух случаях, когда последовало увеличение количества биотина на 32—38%.

Только одна культура — *Rhizobium* — усилила образование биотина на 49% при действии кобальта, эта же культура реагировала и на цинк.

Отзывчивость отдельных видов микроорганизмов на внесение микроэлементов весьма различна. Так, некоторые из них усиливали образование биотина при действии каждого из взятых микроэлементов. Усиление достигало значительных размеров. Другие же реагировали только на один или два элемента. У некоторых усиление образования биотина достигало 50% и больше, у других — только 6—15%.

Представляет интерес тот факт, что очень отзывчивые на микроэлементы культуры относятся к организмам, меньше всего продуцирующим биотин. В противоположность этому на группу бактерий, активно образующих этот витамин, микроэлементы действовали слабее. *Vac. oligonitrophilus* усилил образование витамина на 10—11% под действием марганца и цинка. *Vac. megaterium* реагировал только на марганец.

Особенно сильно влияли микроэлементы на культуру актиномицета. Под влиянием марганца количество биотина у него увеличилось на 149%, цинка — на 138, бора — 95, молибдена — на 13%.

Пантотеновая кислота. На рис. 5 приведены изменения количества образования пантотеновой кислоты. Найденные количества пантотеновой кислоты колебались у разных видов от 36 до 150 мкг на 1 г сухих клеток. Все микроорганизмы различались по способности образовывать этот витамин. Микобактерии и актиномицеты синтезировали пантотеновой кислоты мало. Большие количества витамина обнаружено у азотобактера, споровых и клубеньковых бактерий. Больше всего пантотеновой кислоты было найдено у *Rhizobium meliloti* и *Ps. aurantiaca* (до 150 мкг).

Влияние микроэлементов выразилось в усилении в той или иной степени образования пантотеновой кислоты. Так, из 10 взятых микроорганизмов 7 видов повышали в значительной мере синтез витамина при действии бора, марганца и меди. То же наблюдалось у пяти видов при действии молибдена и цинка. Меньше положительных случаев получено при внесении кобальта. Повышение количества витамина было порядка 20—80%. В большинстве остальных вариантов опыта также наблюдалось стимулирующее действие микроэлементов, выраженное в увеличении количества витамина на 5—15%.

Таким образом, на образование пантотеновой кислоты больше действовали марганец, бор, медь, затем молибден, цинк, меньше — кобальт.

Интересно отметить в этих опытах стимулирующее действие

меди, которое обычно в опытах с другими витаминами не наблюдалось. В этом опыте почти все взятые виды положительно реагировали на большинство примененных микроэлементов. Так, у *Vac. megaterium* образование пантотеновой кислоты от применения молибдена усилилось на 35%, бора — на 20, марганца — на 35, цинка — на 25, меди — на 48, кобальта — на

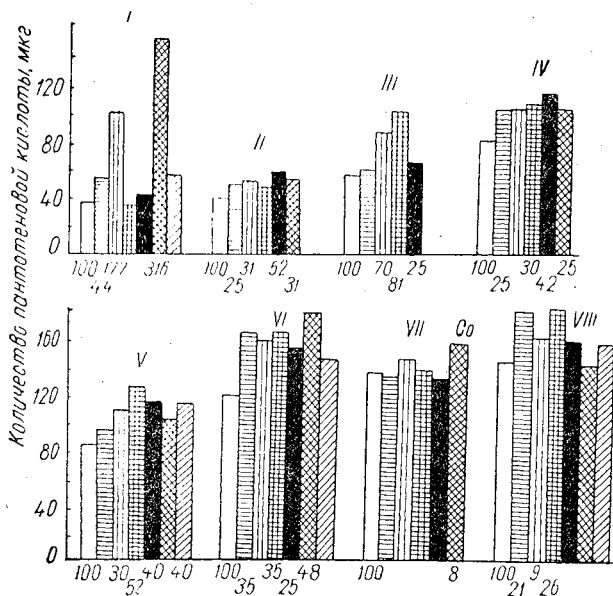


Рис. 5. Действие микроэлементов на образование пантотеновой кислоты:
 I — *Mycobacterium mucosum*, II — *Pseudomonas radiobacter*, III — *Actinomyces griseus*, IV — *Bacterium agile*, V — *Mycobacterium tumescens*, VI — *Bacillus megaterium*, VII — *Rhizobium meliloti*, VIII — *Pseudomonas aurantiaca*.

Условные обозначения те же, что на рис. 1.

11%. Подобная картина наблюдалась и у большинства других видов. Исключение составляли только азотобактер, клубеньковые и *Vac. oligonitrophilus*. Весьма возможно, что такое сходное отношение данных культур к микроэлементам вытекает из их общих физиологических особенностей фиксации свободного азота.

Что касается актиномицета, то этот микроорганизм в значительной степени усиливал образование данного витамина от внесения микроэлементов. На нем больше всего сказались действие марганца, давшее прибавку витамина на 81%, и бора — на 70%.

Представляло интерес сравнить действия микроэлементов

на биосинтез разных витаминов в пределах одной культуры микроорганизмов. Для этого были взяты случаи относительно высокого действия микроэлементов, где их стимуляция выразилась в прибавке выхода витаминов больше чем на 20%.

При анализе данных оказалось, что влияние микроэлементов в сильной степени различается в отношении образования различных витаминов. Их стимулирующее действие относилось в большинстве случаев к синтезу никотиновой и пантотеновой кислот. В опытах получено больше всего положительных данных, показывающих усиление образования этих двух витаминов. Особой разницы в действии отдельных микроэлементов (кроме Cu и Co) на синтез этих двух витаминов не наблюдалось. Чаще всего микроорганизмы реагировали на большинство примененных микроэлементов. Такое явление свидетельствует о малой специфичности отдельных микроэлементов в данных реакциях образования пантотеновой и никотиновой кислот.

Иначе обстояло дело с витамином B_{12} . Почти во всех случаях при его образовании стимулирующее действие (кроме Co , входящего в состав молекулы витамина) оказывал и цинк. Возможно, что цинк является специфическим элементом, участвующим, может быть, косвенно, в биосинтезе B_{12} у микроорганизмов. Многочисленны случаи положительного влияния микроэлементов на образование B_1 .

Из всех определяемых витаминов меньше случаев положительного действия было получено в отношении биотина. Образование этого витамина усиливалось главным образом под действием марганца и бора.

Таким образом, все микроорганизмы по их способности реагировать на микроэлементы можно разделить на три группы:

1) слабо реагирующие (меньшинство бактерий; примером может быть азотобактер);

2) реагирующие в одной или двух реакциях образования витаминов на большинство микроэлементов (большинство бактерий);

3) реагирующие на большинство микроэлементов при образовании различных витаминов (исследованные микобактерии, актиномицеты и некоторые бактерии).

В табл. 30 приведены данные о трех бактериях, представителях этих трех групп. Знаком (+) обозначено усиление образования указанных витаминов при действии определенных микроэлементов.

Трудно связать отзывчивость отдельных видов на микроэлементы с их генетическим положением, поскольку микроорганизмы, принадлежащие к близким филогенетическим группам (*Pseudomonas* и др.), по-разному реагировали на микроэлементы. Исключение представляют микобактерии и актиномице-

Таблица 30

Действие микроэлементов на образование витаминов некоторыми микроорганизмами:

Микроорганизмы	B ₁	B ₆	B ₁₂	Никотиновая кислота	Пантотеновая кислота	Биотин	Микроэлементы
<i>Azotobacter chroococcum</i> I группа			+	+			Mo B Mn Zn Cu Co
<i>Bac. oligonitrophilus</i> II группа	+	+	+	+			Mo B Mn Zn Cu Co
<i>Bact. agile</i> III группа	+	+	+	+	+	+	Mo B Mn Zn Cu Co

ты, в сильной степени активируемые при образовании витаминов.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии микроэлементов на образование витаминов у почвенных бактерий и актиномицетов. Однако механизм участия микроэлементов в этих реакциях остается неясным. Усиливая витаминообразование, они, по-видимому, участвуют в тонких процессах обмена веществ клетки. Действие микроэлементов на биосинтез витаминов может не являться непосредственным. Так, есть указания на их влияние на гидролиз фосфатов в реакциях с АТФ, а отсюда — и на дыхательный цикл и белковый обмен клетки, сказывающийся в образовании биологически активных веществ; Известна тесная связь витаминов с ферментами, где они во многих случаях выполняют коферментные функции.

Возможно, что такая взаимосвязь металла с витаминами через ферментные системы осуществляется и в данном случае. Не исключается также косвенное влияние микроэлементов, усиливающих некоторые обменные процессы клетки, предшествующие образованию витаминов.

Способность большинства микроорганизмов образовывать биологически активные вещества, в том числе гетероауксин, изучалась многими исследователями. Биосинтез гетероауксина бактериями известен из работ Бойсен-Йенсена (1938), Холодного (1939) и др. В работах последних лет при обосновании действия бактериальных удобрений, а также при изучении взаимоотношений между почвенными микроорганизмами и высшим растением этому свойству микроорганизмов придается большое значение.

Однако не все микроорганизмы могут синтезировать это вещество. Робертс и др. (Roberts J. et al., 1939), Красильников (1944, 1958), Смалий (1958), Бершова (1959) приходят к заключению, что только 40—60% из исследуемых микроорганизмов образуют гетероауксин. Работы в этом направлении велись главным образом в отношении азотобактера и клубеньковых бактерий (Thiman, 1936; Chen, 1938; Березова с сотр. 1938; Разницына, 1938; Kandler, 1951; Bukatsch u. Heitzer, 1952). Несмотря на большую литературу по этому вопросу, есть еще мало данных о действии металлов на этот биосинтез.

Смалий и Бершова (1948, 1948а, 1957) показали положительное действие молибдена, бора и марганца на образование гетероауксина у трех штаммов азотобактера. Большой эффект наблюдался в молодых культурах, когда количество этого вещества увеличилось в 2—4 раза при действии бора и в 3—4 — молибдена. В 5- и 10-суточных культурах это действие сглаживалось. Не все штаммы одинаково реагировали на микроэлементы. Положительное влияние молибдена и железа на ту же бактерию отмечали Бергер и Букач (Burger u. Bukatsch, 1958). Кроме азотобактера, ряд ризосферных споровых и бесспорных бактерий увеличивал количество гетероауксина при добавлении Mo, B, Mn, Zn (Бершова, 1959). Действие их было неодинаково и зависело как от микроэлемента, так и от вида бактерий.

Представляет также интерес зависимость биосинтеза гетероауксина от триптофана и действие на этот процесс микроэлементов. Положительное влияние триптофана на активность образования гетероауксина у микроорганизмов уже доказана. Известно, что триптофан и его производные (серин, антралиловая кислота) являются веществами, при ферментативном расщеплении которых образуется гетероауксин.

В свою очередь, на образование триптофана действуют некоторые микроэлементы. По данным Бертрана и Вольфа (Bertrand et Wolf, 1959, 1961), наличие в среде цинка (250 мкг) резко увеличивает содержание этого вещества в белках мицелия *Aspergillus niger*. В этом случае цинк может быть заменен

кадмием. Сведения о синтезе триптофана представлены в обзорной статье Доя (Doi, 1960).

На косвенное действие цинка в образовании триптофана указывал Незон (Nason, 1950), который нашел, что нехватка цинка у *Neurospora* задерживала превращение серина и индола в триптофан, что может вести, в свою очередь, к задержке образования гетероауксина.

В наших работах (Бернова, 1959) представлены данные, свидетельствующие о большом влиянии микроэлементов на образование гетероауксина у микроорганизмов при наличии триптофана. В данном случае металлы могут усиливать синтез триптофана и гетероауксина. Нашей задачей было выяснить способность микроорганизмов, широко распространенных в ризосфере растений, образовывать гетероауксин, и действие микроэлементов на этот процесс. Для определения ростовой реакции была использована методика Холодного (1939) с изолированными колесооттилями овса.

Представляло также интерес изучить влияние микроэлементов на культуры в случае наличия в среде триптофана. Положительное влияние триптофана на активность образования гетероауксина у микроорганизмов отмечено в работах Тимана (Thimann, 1936), Стове (Stove, 1955), Смалия (1958) и др. Эти авторы указывают на то, что триптофан и его производные являются веществами, при ферментативном расщеплении которых образуется гетероауксин. В наших опытах триптофан применяли в дозе 0,005%.

В опытах испытывали 98 штаммов, относящихся к 83 видам ризосферных бактерий, и их способность образовывать гетероауксин. Для дальнейшей работы из них отбирали виды, обладающие этой способностью и хорошо растущие на синтетической среде, так как все культуры в дальнейших опытах (кроме *Rhizobium*) выращивали на упомянутой агаризованной среде.

Таблица 31

Образование гетероауксина различными группами ризосферных бактерий (в %)

Группы	Количество штаммов				
	всего	образовавших гетероауксин		образовавших гетероауксин в относительно больших количествах	
Споровые	28	10	35	4	15
Неспоровые	45	18	40	9	20
Олигонитрофилы	25	11	44	5	20

Результаты испытаний приведены в табл. 31, из данных которой видно, что 35—44% всех штаммов образуют гетероауксин. Можно отметить некоторую тенденцию к большему синтезу этого вещества у неспоровых бактерий и олигонитрофилов.

В табл. 32 представлены данные образования гетероауксина в культурах *Rhizobium* под влиянием микроэлементов. Из семи предварительно испытанных видов только три образовывали гетероауксин. При добавлении в среду триптофана все семь видов проявили способность образовывать это соединение.

Таблица 32

Образование гетероауксина культурами клубеньковых бактерий

Микроэлементы	<i>Rh. trifolii</i>		<i>Rh. phaseoli</i>		<i>Rh. meliloti</i>	
	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном
Контроль	42	85	22	70	50	126
Молибден	140	151	45	195	82	248
Бор	70	146	60	180	66	192
Марганец	56	138	69	86	63	176
Цинк	42	96	39	96	54	175
Медь	58	82	45	120	42	96

Во всех последующих таблицах количество гетероауксина выражено суммарно (в слизи и агаре) в мкг на 25 мл среды. Все пять внесенных микроэлементов положительно влияют на синтез гетероауксина взятыми бактериями. В опытах без триптофана выделяется действие молибдена, увеличившее количество гетероауксина культуры *Rh. trifolii* почти в четыре, *Rh. phaseoli* — в два раза и *Rh. meliloti* — больше, чем все остальные микроэлементы. Вторым микроэлементом по эффективности действия является бор, особенно для культур *Rh. phaseoli*.

Внесение в среду триптофана значительно усилило образование гетероауксина у всех трех видов *Rhizobium*. По фону триптофана увеличивается относительное влияние микроэлементов. Это относится к молибдену, бору, марганцу и в некоторых случаях — к цинку. Под влиянием меди наблюдалось увеличение количества гетероауксина только в культуре *Rh. phaseoli*. Действие микроэлементов различно для всех трех видов. Все же можно отметить наиболее сильное их влияние на культуру *Rh. meliloti*, которая выделяется перед остальными по способности образовывать гетероауксин. На рис. 6 видны особенности действия каждого микроэлемента на колеоптили.

Образование этого соединения и влияние на этот процесс микроэлементов в значительной мере зависит от применяемой среды. *Rh. phaseoli* выращивали параллельно на двух средах—

Мазе и Эшби с триптофаном. Количество обнаруженного гетероауксина резко увеличивается на среде Эшби, хотя культура и росла хуже на этой среде (табл. 33).

Как видно из табл. 33, на среде Эшби гетероауксина образовалось почти в четыре раза больше, чем на среде Мазе. Пер-

Таблица 33

Образование гетероауксина *Ph. phaseoli* на двух разных средах с триптофаном

Микроэлементы	Среда Мазе	Среда Эшби
Контроль	70	261
Молибден	195	567
Бор	180	420
Марганец	86	278
Цинк	96	336
Медь	120	303

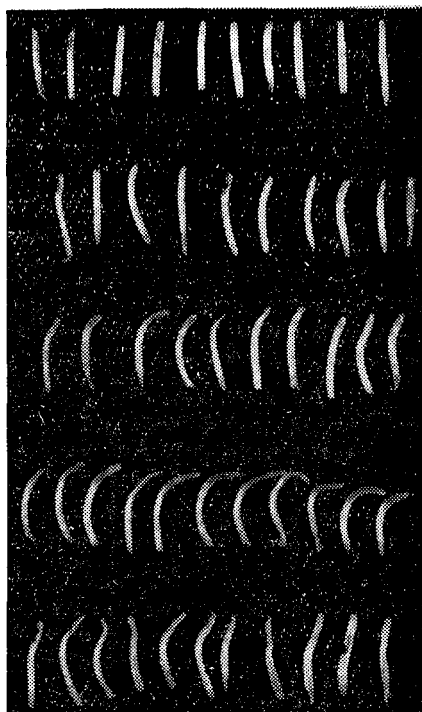


Рис. 6. Изгибы колеоптилей (сверху вниз) при нанесении бактериальных культур:

первый ряд — контроль (без триптофана), второй ряд — контроль + триптофан, третий ряд — действие бора с триптофаном, четвертый ряд — действие молибдена с триптофаном, пятый ряд — действие цинка с триптофаном.

вое место по положительному влиянию в этих опытах, как и в предыдущих, занимает молибден, затем — бор. Повысилась чувствительность культуры к цинку. Можно отметить большее количество образуемого гетероауксина на среде Эшби, в контроле превышающее количество этого вещества в вариантах с молибденом на среде Мазе. Можно предположить, что образование гетероауксина в данном случае увеличивается как результат неблагоприятных условий роста испытанной культуры, так как среда Эшби значительно уступает по пригодности культивирования *Rhizobium* среде Мазе.

В опытах с азотобактером были взяты три его штамма — К, Бг, 53. Результаты опытов приведены в табл. 34¹. Примененные микроэлементы различно действуют на интенсивность об-

¹ Опыты с азотобактером проводились совместно с В. Т. Смалием.

Таблица 34

Образование гетероауксина азотобактером

Возраст культуры (в сутках)	Штамм К				Штамм Бг				Штамм 53			
	Контроль	В	Мо	Мп	Контроль	В	Мо	Мп	Контроль	В	Мо	Мп
2	5	22	17	6	5	12	26	28	4	3	6	2
5	150	171	250	160	142	185	233	161	129	139	140	100
10	173	209	165	158	168	178	231	140	155	127	176	125

разования гетероауксина азотобактером. Наиболее выразительные данные получены при применении молибдена. Под его влиянием штаммы К и Бг увеличивали количество образованного гетероауксина почти вдвое. Кроме того, у этих штаммов молибден как бы ускорял образование гетероауксина, накопление которого в максимальном количестве наблюдалось на пятые сутки, в то время как в других вариантах опыта максимальное количество этого вещества было обнаружено на десятые сутки.

Влияние молибдена на штамм 53 сказалось в меньшей мере, чем на двух других; отличался этот штамм и тем, что большее количество гетероауксина у него обнаружено в 10-суточной культуре. Бор дал значительное усиление образования гетероауксина у штамма К, меньшее — у штамма Бг и незначительное — у штамма 53. Марганец действовал гораздо слабее. Его положительное влияние сказалось только на одном штамме Бг в 5-суточном возрасте.

Таким образом, не все штаммы азотобактера в одинаковой степени реагируют на действие микроэлементов. Штаммовые различия сказываются и в отношении времени максимального накопления гетероауксина. Из взятых микроэлементов наиболее эффективно действовал молибден.

Примером особого действия микроэлементов могут служить опыты с культурами *Pseudomonas rosea* и *Bact. rugosum*, результаты которых приведены в табл. 35. Обе эти культуры продуцируют гетероауксин примерно в равных количествах — 48—64 мкг и мало нуждаются в триптофане для его образования.

Однако на культуру *Bact. rugosum* без триптофана микроэлементы не действуют (кроме повышения количества гетероауксина при внесении меди). При совместном действии с триптофаном все взятые микроэлементы в значительной степени увеличивают выход гетероауксина. Наибольшее влияние в этом случае оказывали цинк и бор, которые обычно действуют слабо. Что же касается культуры *Pseudomonas rosea*, то все микроэлементы, кроме меди, без триптофана увеличивали образование гетероауксина в 2—4 раза. Внесение в среду триптофана

Т а б л и ц а 35
Образование гетероауксина культурами
Bact. rugosum и *Pseudomonas rosea*

Микроэлементы	<i>Bact. rugosum</i>		<i>Pseudomonas rosea</i>	
	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном
Контроль	48	51	64	68
Молибден	52	84	203	237
Бор	45	138	309	142
Марганец	46	106	217	156
Цинк	24	260	145	305
Медь	96	86	60	171

сказалось только на влиянии цинка и меди, которые увеличили образование гетероауксина в 2—3 раза. В вариантах с бором и марганцем наблюдалось некоторое уменьшение количества этого соединения.

Несколько иное влияние микроэлементов наблюдалось в спорообразующих культурах *Bac. granulatus*, *Bac. virgatus* и *Bac. megaterium* (табл. 36). Без триптофана микроэлементы не оказывают на них заметного влияния. Первые две культуры образуют гетероауксин в почти одинаковом количестве — 41—48 мг. Можно отметить токсическое действие меди на первую культуру, не давшую роста при внесении меди. Внесение в среду триптофана резко изменило картину: культуры начали продуцировать 125—139 мг гетероауксина. На образование последнего в этом случае большое влияние оказывают микроэлементы и в первую очередь молибден. При внесении последнего количество гетероауксина повысилось до 190—316 мг. Следующими по силе действия были бор, цинк и марганец. В первой культуре внесение триптофана снимало токсическое действие меди, культура росла и образовывала гетероауксин, правда, в значительно меньшем количестве, чем в контроле.

Т а б л и ц а 36
Образование гетероауксина культурами споровых бактерий

Микроэлементы	<i>Bac. granulatus</i>		<i>Bac. virgatus</i>		<i>Bac. megaterium</i>	
	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном
Контроль	43	125	48	139	41	60
Молибден	42	316	46	190	60	79
Бор	58	156	25	187	49	68
Марганец	52	161	49	144	55	63
Цинк	48	142	41	168	42	80
Медь	—	70	37	155	33	58

Сравнительно мало гетероауксина образует *Vac. megaterium* — 41 мкг. Добавление триптофана увеличивает это количество до 60 мкг. На эту культуру влияли только молибден, цинк и марганец, но в меньшей степени, чем на другие микроорганизмы.

В число испытанных культур были включены две, обладающие резко выраженными свойствами олигонитрофилов: обе хорошо росли на среде Эшби. Данные по образованию гетероауксина этими бактериями (*Pseudomonas caudatus*, *Pseudomonas radiobacter*) приведены в табл. 37. В среде роста и в слизи первой культуры гетероауксин не был обнаружен, вторая образовывала его в малых количествах. На первую культуру микроэлементы не оказывали влияния, на вторую влияли в сравнительно малой степени. Только молибден и цинк удвоили количество гетероауксина. При внесении триптофана в первую культуру найдено 44 мкг, во второй—105 мкг гетероауксина. По фону триптофана образование гетероауксина первой культурой увеличилось почти в три раза от внесения молибдена и бора и несколько меньше — от марганца и цинка. Даже медь действовала в этом случае. На вторую культуру микроэлементы влияли относительно слабее, однако абсолютные цифры количества гетероауксина в вариантах опыта с молибденом, бором и цинком больше, чем в первой культуре. В этом случае не оказывали влияния марганец и медь.

Таблица 37

Образование гетероауксина культурами *Pseudomonas caudatus*,
Pseudomonas radiobacter, *Pseudobacterium subluteum*

Микроэлементы	<i>Ps. caudatus</i>		<i>Ps. radiobacter</i>		<i>Pseudobacterium subluteum</i>	
	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном	Без триптофана	С триптофаном
Контроль	0	44	35	105	40	58
Молибден	0	147	85	180	64	105
Бор	0	130	39	133	98	122
Марганец	0	111	58	71	63	76
Цинк	0	107	63	145	86	94
Медь	0	59	24	77	62	61

Испытание культуры *Pseudobacterium subluteum* дало следующие результаты. Культура образовывала гетероауксин в количестве 40 мкг. Добавление одних микроэлементов увеличило это количество в 1,5—2 раза, причем все микроэлементы действовали положительно. Выделялось действие бора и цинка. Триптофан увеличил образование гетероауксина до 58 мкг. По его фону также отмечено положительное действие всех микроэлементов, особенно бора. Цинк же уступал место молибдену. Влияние микроэлементов на эту культуру было сильнее без

триптофана. На культуру *Bac. tenuissimus* влияние микроэлементов было незначительным.

Было также испытано 12 резко различающихся видов актиномицетов. Однако заметных количеств гетероауксина у большинства из них не было получено, несмотря на то, что применялось выращивание культур на жидких и агаризованных средах, испытывались как растертый мицелий, так и фильтраты культуральной жидкости разного возраста. Поддающиеся учету количества гетероауксина образовывали только четыре вида в старых культурах (табл. 38). Несколько иные результаты получены при добавлении триптофана. Так, *Actinomyces griseus* начал образовывать на синтетической среде № 1 гетероауксин в количестве 85 мкг. Действие микроэлементов на данную культуру было значительным. Так, молибден, бор и цинк способствовали образованию гетероауксина в три и больше раза, чем в контроле. Заметное увеличение наблюдалось и в случае внесения меди. Таким образом, можно отметить усиление в образовании гетероауксина *Act. griseus* при внесении в среду триптофана и микроэлементов.

Таблица 38

Образование гетероауксина актиномицетами

Актиномицеты	Без триптофана	С триптофаном					
		Контроль	Mo	B	Mn	Zn	Cu
<i>Act. griseus</i>	40	85	187	157	95	208	113
<i>Act. coelicolor</i>	39	—	—	—	—	—	—
<i>Act. chromogenes</i>	41	—	—	—	—	—	—
<i>Act. violaceus</i>	24	—	—	—	—	—	—

Было обращено внимание на необычные изгибы колеоптилей, наблюдавшиеся в некоторых культурах (*Pseudobact. subluteum*), а также при внесении цинка в среду роста *Rhizobium*. Колеоптиль имели двойной изгиб (рис. 7), что указывало на возможность действия двух факторов. Трудно сказать, было ли это действие какого-либо одного вещества, кроме гетероауксина, или образование добавочных точек роста с другой стороны колеоптиля происходило благодаря особой диффузии гетероауксина в тканях растения.

В результате проведенных опытов можно сказать, что влияние микроэлементов на образование микроорганизмами гетероауксина неоднородно и варьирует в зависимости от вида бактерий и актиномицетов, а также от взятых микроэлементов. Из 12 видов бактерий положительно реагировали на внесение микроэлементов 10, увеличивая в большей или меньшей степени

выход гетероауксина. При добавлении к среде триптофана положительно реагировали все микроорганизмы. Прибавки количества гетероауксина колебались в зависимости от вида микроэлемента в большинстве случаев от 100 до 200%.

Положительное влияние триптофана на образование гетероауксина объясняется его химической близостью к последне-

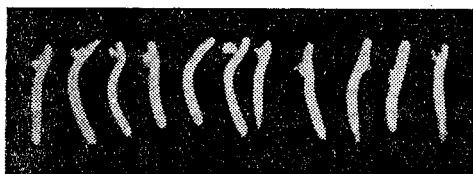


Рис. 7. Двойные изгибы coleoptилей.

му, благодаря чему он в процессе метаболизма клетки является непосредственным предшественником гетероауксина. Возникает вопрос, почему действие микроэлементов выражено в большей степени при наличии триптофана. Известно,

что микроэлементы, образуя металлопротеиновые комплексы, входят в ферментативные системы клетки. Образование гетероауксина связано с ферментативным расщеплением аминокислот, в частности триптофана и его производных. Микроэлементы, усиливая превращение этой аминокислоты, усиливают образование гетероауксина. Отсюда вытекает непосредственное влияние микроэлементов на активность данных реакций. То, что процесс образования гетероауксина является, по-видимому, общим для многих микроорганизмов, говорит о его значении в их обмене веществ.

Из всех взятых микроэлементов более активными оказались молибден, бор и цинк, но действие их своеобразно: на некоторые виды бактерий они влияли почти одинаково, на другие — по-разному. Марганец действовал слабее. Медь в редких случаях оказывала слабо положительное, и в большинстве — отрицательное влияние. Разное влияние отдельных микроэлементов зависит, по-видимому, от характера их связи с ферментами клетки.

Рассматривая полученные данные в связи с физиологическими отличиями различных групп микроорганизмов, можно отметить, что интенсивность образования гетероауксина мало отличалась у всех использованных групп. Без триптофана актиномицеты образуют гетероауксин в меньших количествах, чем бактерии. Так же мало отличались различные группы микроорганизмов степенью использования внесенного триптофана. Возможно, что испытание всех 98 штаммов бактерий и актиномицетов, в том числе и не образующих этого ростового вещества, на среде с триптофаном выявило бы у всех способность образовывать гетероауксин.

Образование гетероауксина почвенной микрофлорой играет важную роль в ее взаимоотношениях с высшими растениями,

являясь одним из факторов, влияющих на их рост. Усиление образования гетероауксина под влиянием триптофана дает право предположить, что подобного рода явление может происходить в относительно заметных размерах при внесении в почву органических удобрений (навоза, компостов, зеленых удобрений и др.), в результате разложения которых образуются различные аминокислоты, в том числе и триптофан.

Значение микроэлементов в образовании ауксинов высшими растениями отмечено многими авторами. Особая роль в этих работах отводилась цинку. Растения, выращенные в условиях цинковой недостаточности, не образовывали ауксинов. Показана также прямая связь наличия этого элемента и биосинтеза ауксинов. Выдвинутое положение впоследствии было подтверждено исследованиями, объясняющими это действием цинка на синтез триптофана. Последний является предшественником в образовании гетероауксина. Имеются указания, что такое действие цинка связано с уменьшением триптофансинтетазы — фермента, необходимого для синтеза этой аминокислоты.

Определенную роль бора в синтезе ауксинов и ауксиноксидазы у растений отмечает Школьник с сотрудниками (1963). Органические соединения бора — арилборные кислоты, имеющие структуру, сходную со структурами бензойных кислот, оказывают подобное ауксином влияние на рост клеток растений. Возможно, что такого рода влияние наблюдалось в опытах с этим элементом.

Интересна возможная взаимосвязь с действием микроэлементов и витаминов. Витамины В₁ и В₆ участвуют в синтезе и превращениях триптофана и других аминокислот. Недостаток цинка отражается на их содержании. Этот недостаток можно восполнить, внося в среду витамины В₁ и В₆ при выращивании выших растений (Школьник, Давыдова, 1962). С другой стороны, недостаток цинка в среде приводит к значительному уменьшению указанных витаминов в тканях растений.

Таким образом, определенное значение микроэлементов в синтезе витаминов и гетероауксина микроорганизмами не подлежит сомнению.

Стимулирующее влияние микроудобрений на образование биологически активных веществ (витаминов и гетероауксина) у почвенных микроорганизмов, возможно, является одним из факторов их действия на сельскохозяйственные растения. Кроме того, применение в сельском хозяйстве совместно с микроэлементами бактериальных препаратов (азотобактерин, нитрагин, фосфоробактерин), действие которых связывают с образованием микроорганизмами биотических веществ, может быть более эффективным благодаря отмеченной их стимулирующей способности.

АНТИБИОТИКИ

Участие микроэлементов в разнообразных реакциях клетки микроорганизмов отразилось и на образовании ими антибиотических веществ. Вполне понятно большое число исследований, посвященных пенициллам как продуцентам пенициллина. Изучение образования этого антибиотика включало также и изучение роли металлоионов при биосинтезе. (Данные, относящиеся к *Penicillium notatum*, можно отнести также и к *Penicillium chrysogenum*).

В своих ранних работах еще оксфордская группа ученых заметила действие некоторых микроэлементов на эти грибы. Изучение их поверхностных культур показало увеличение образования антибиотика под влиянием меди (Clayton et al., 1944). Положительное действие цинка, стимулирующее выход продукции, не зависело от наличия в среде других микроэлементов (Foster et al., 1943; Moyer a. Coghill, 1946). Авторы объясняют это действие способностью цинка задерживать образование глюконовой кислоты в фазе образования пенициллина.

При глубинном культивировании гриба обнаружилось различия в отзывчивости его различных штаммов к микроэлементам в зависимости от состава сред. Опыты Фостера и др. (Foster et al., 1946) с большим количеством металлов также показали значительное увеличение выхода антибиотика под действием цинка. Однако это наблюдалось только на синтетических средах.

Необходимость микроэлементов при культивировании *Penicillium chrysogenum* подтвердили Жервис и Джонсон (Jarvis a. Jonson, 1946, 1947). Но при работе с неочищенными солями добавление их было необязательным.

В исследованиях Пратта и др. (Pratt a. Dufrenoy, 1947) стимулятором образования пенициллина являлся хром; попытка заменить его кобальтом или молибденом не увенчалась успехом. Найт, Коффлер и др. (Knight, 1946; Koffler et al., 1947) пришли к заключению, что действующим началом стимулирующего влияния различных органических веществ и золы являются микроэлементы, содержащиеся в них (Co, Cu, Fe, Mn, Zn, W и др.).

В опытах Наместниковой (1960) при усовершенствовании технологии получения антибиотиков выход пенициллина значительно повышался под влиянием $MnSO_4$, внесенного в среду в дозе 0,004 %.

Особого внимания заслуживают данные в отношении усиления образования антибиотических веществ актиномицетами под влиянием микроэлементов.

По наблюдениям Аинсворса (Ainsworth, 1947), при поверх-

постном культивировании *Streptomyces griseus* необходим марганец, который может быть заменен железом без нарушения синтеза стрептомицина. Максимальная продукция этого антибиотика данным актиномицетом была получена при применении некоторых солей металлов. Торнберри и Андерсон (Thornberry a. Andersen, 1948) пришли к заключению о необходимости К, Zn и Fe для оптимальной продукции стрептомицина. Стимуляция выхода последнего наблюдалась также и при внесении марганца. То же нашли Саундерс и Сильвестер (Saunders a. Sylvester, 1947) относительно погруженных культур. Эти же данные были подтверждены другими авторами, упоминающими кроме названных металлов еще и кобальт (Woodruff, 1947; Templ, 1948; Principe a. Thornberry, 1952). Однако при внесении кобальта большое значение имело определение оптимальных дозировок последнего.

Положительное действие металлов наблюдалось не только в минеральных, но и в комплексных средах. Усиление выхода стрептомицина получено при добавлении сернокислого цинка к мясопептонной среде с глюкозой (Johnston a. Waksman, 1948). Во всех положительных опытах играли роль концентрации взятых металлов.

Кроме стрептомицина, при наличии металлоионов отмечено также увеличение продукции других антибиотиков.

Добавление цинка в очень малых концентрациях усиливало выход неомицина у *Streptomyces fradiae* (Lechevalier, 1951). Образование этого же антибиотика усиливалось в синтетической среде под влиянием Zn, K, Mg, Fe (Dulmage, 1953).

На усиление продукции кандицина у *Streptomyces griseus* при добавлении к синтетической среде K, Mg, Fe и Zn указывает Акер и Лешевалье (Acker a. Lechevalier, 1954). Наряду с этим ими не отмечено действие марганца.

Рейнольд и Ваксман (Reynolds a. Waksman, 1948) сообщают об усилении синтеза этим актиномицетом гризеина при добавлении железа. Увеличение доз элемента усиливало образование антибиотика в логарифмической пропорции. Это привело к уверенности, что железо входит в состав молекулы этого антибиотика. В данном случае цинк не имел успеха.

О таком же усилении выхода актинорубина под влиянием железа сообщает Кельнер и Мортон (Kelner a. Morton, 1947). Однако излишек этого элемента вредно отражался на образовании антибиотика.

При изучении влияния ряда различных микроэлементов на образование антибиотика *Streptomyces venezuelae* (Gallicchio a. Gottlieb, 1958) изъятие цинка и железа из среды подавляло его продукцию, а добавление действовало благоприятно. Марганец был полезен для продукции антибиотика, но не для роста актиномицета.

Приведенные данные говорят в пользу специфичности действия цинка и железа при синтезе антибиотиков. Кроме необходимых микроэлементов, для большинства, если не для всех фаз метаболизма грибов и актиномицетов, требуются еще цинк и железо. Усиление образования некоторых антибиотиков отмечалось при воздействии марганца. Однако металлы полезны в определенных дозах; повышение содержания последних может задерживать рост и синтез антибиотиков. Это особенно относится к кобальту и цинку.

Металлы могут играть роль как структурные элементы (например, железо в молекуле гризеина). С другой стороны, действие железа, молибдена и меди связывают с системой переноса электронов в молекулах. Эти металлы функционируют в электронных связях от протеинных к другим системам клетки.

Функции марганца относятся к групповым реакциям, включающим фосфаты. Цинк и магний, а также марганец участвуют преимущественно в общем ферментативном декарбоксилировании и реакциях гидролиза.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ И АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Металлы способны вступать путем хелатных связей в соединения со сложными органическими веществами, меняя их структуру в сторону усложнения или упрощения. В результате изменяются функциональные особенности этих соединений. Такие соединения могут возникать между металлами и антибиотиками, усиливая или ослабляя действие последних.

В изучении данного вопроса определенных успехов добился Вайнберг (Weinberg, 1955, 1959, 1960), установивший ряд интересных явлений при взаимодействии металлов и антибиотических веществ. Он испытывал влияние 21 микроэлемента на действие бацитрацина на различные бактерии кишечной группы, споровые и другие. Цинк и кобальт усиливали действие антибиотика. На действие кобальта указывает также Юнг (Young, 1956). В его обзорной статье наряду со сведениями о содержании кобальта в почвах разных стран, растениях и влиянии его на рост различных микроорганизмов приведены интересные данные о действии этого элемента на повышение антибактериальной активности некоторых антибиотиков.

Об усилении бактерицидности бацитрацина марганцем, кадмием и цинком сообщают Адлер и Сноке (Adler a. Snoke, 1962). В данных опытах обнаружено действие иных элементов, чем в опытах Вайберга, что говорит об иных условиях проведения опытов или отличающихся свойствах антибиотика.

По данным Виндера (Winder, 1962), кобальт и железо уси-

ливали бактериостатическое действие изониазида на *Mycobacterium tuberculosis*, или БЦЖ. Совместное же применение других металлов (Cu, Mn, Cr) снимало это действие.

Кобальт в различных сочетаниях усиливал действие пенициллина против чувствительных и устойчивых к нему стрептококков (Naganjo, Munoz, 1957).

Однако образование внутрикомплексных связей между металлом и антибиотиком не всегда ведет к усилению действия последнего. В работах того же Вайнберга с разными типами антибиотиков установлено, что окси-, хлор- и тетрациклин задерживают споруляцию *Bac. subtilis*. Применение марганца снимало действие этих антибиотиков. В другом случае марганец снимал торможение определенной группы ферментов, производимое ауреомицином (Saz a. Slie, 1954). Это, по-видимому, обусловливалось образованием хелатных структур антибиотика и марганца.

Того же порядка данные о действии микроэлемента на активность противотуберкулезных средств. Исследовалось образование комплексов металлов с ПАСК, стрептомицином, ТВ-1 и другими антитуберкулезными веществами. Установлено, что действие металлов зависит от образования комплексов с этими веществами. При этом сила их влияния зависит от сродства металла с этим веществом. Если сродство металла больше с ферментом клетки бактерии, чем с антитуберкулезным веществом, образуется комплекс металл—фермент, в результате чего наблюдается синергизм действия металла и этого вещества. Если же металл, соединяясь с противотуберкулезным веществом, образует комплекс металл—антитуберкулезный агент, то наблюдается антагонизм, то есть задерживающее действие соединения на туберкулезную палочку (Уено, 1956).

Применение металлсвязывающих веществ, таких, как ЕДА и другие (этилендиаминтетраацетат, циклогександиаминтетраацетат), до некоторой степени расшифровывает действие металлов в вышеприведенных случаях. ЕДА ингибировал действие бацитрацина в опытах Вайнберга. Это ингибирование снималось применением цинка.

Аналогичные данные получены в исследованиях Адлера и Сноке (Adler a. Snoke, 1962). Цинк, кадмий и марганец снимали ингибирующее влияние хелат в отношении бацитрацина и его действия на стафилококк. При этом последние два металла усиливали бактерицидность. По-видимому, для активности данного и некоторых других антибиотиков требуется металл, входящий в их соединение. Поэтому добавление металла усиливает их активность. Применение металлсвязывающих веществ, отнимающих металл от антибиотика, ингибирует его действие, которое снимается при внесении добавочного металла. Последний входит непосредственно в соединение антибиотика.

Усиление бактерицидности достигается также замещением одних ионов другими, более специфическими.

С другой стороны, наличие антибиотиков в среде может лишать бактерии необходимых для их роста элементов при возникновении хелатных связей и тем тормозить рост культуры. Тонкими опытами Польман (Pohlman, 1962) экспериментально доказал такие связи стрептомицина и полимиксина с микроэлементами, препятствующие росту стафилококка и ряда других микроорганизмов.

Отмечено также действие металлов на развитие устойчивости бактерий к антибиотикам. Так, Черномордик (1959), изучая влияние микроэлементов на синегнойную палочку, установил, что Со тормозил скорость приобретения устойчивости этой бактерии к стрептомицину, Mg — ускорял, а В, Zn, Cu, Fe не оказывали влияния. Это соответствовало также наблюдениям с дизентерийными бактериями.

Микроэлементы, вступая в соединение с органически сложными веществами, могут изменять их структуру и функции, тормозя или стимулируя их действие. Так, Mo снимал торможение роста *Clostridium*, возникающее под влиянием некоторых органических соединений (1,2-диацетилэтилен и др., Сагнан et al., 1960). Ингибирующее действие α -пиколиновой кислоты на спорующую *Bac. cereus* снимало действие примененных Zn, Co, Ni и некоторых фосфорных соединений (Krishnamurty et al., 1960). В свою очередь, торможение α -амилазы, вызванное рибофлавином в условиях светового облучения, снижается при добавлении Са (Сонэ Коехидо, 1962).

К явлениям того же рода относится действие органических соединений, нивелирующее влияние микроэлементов.

В опытах Тага и др. (Тага et al., 1959) метанол нивелировал стимулирующее действие Mn на образование лимонной кислоты *Aspergillus niger*, а также устранял тормозящее влияние на этот процесс больших доз Fe, Mn.

Другие сведения относятся к токсинам, образуемым *Clostridium perfringens* и дифтерийной палочкой. Fe и Co подавляли действие этих токсинов. Обработка инактивированного при помощи Fe токсина цитратом восстанавливала его активность. Так же действовал препарат ЭДТУ (Janoff et al., 1960).

Различное действие отдельных элементов на один и тот же препарат (диметилхлортетрациклин) наблюдал Хамер (Haмер, 1961). Цинк усиливал, а медь, никель, железо снижали действие этого препарата на стафилококк.

Интересно взаимодействие аминокислот и микроэлементов. Бактериостатическое действие l-цистеина в отношении стрептококка и *E. coli* усиливалось медью, а l- и d-серина — кобальтом. Добавление l-гистидина и l-цистеина к системе серин+Со уменьшало влияние последнего. Возможным объяснением та-

кого явления служит конкуренция аминокислот за связывание металла, особенно при наличии гистидина и цистеина (Weinberg, 1960).

При изучении способности тетрациклиновых антибиотиков вступать в комплексные соединения с металлами было обнаружено торможение незначительными дозами железа антибиотического действия тетрациклина и некоторых других препаратов на бруцеллы. В то же время марганец и барий усиливали действие антибиотиков на эти бактерии (Krémégy, Ferencik, 1961).

Аналогичное влияние на грамположительные и грамотрицательные бактерии оказывал оксин. Единственный из примененных различных катионов — Со — резко задерживал его действие. В отношении же грамотрицательных палочек такую же роль играли железо, цинк и медь. Применение этого вещества против грамположительных бактерий в среде, очищенной от микроэлементов, дает слабо токсичное действие. Антибактериальная активность восстанавливается железом, медью, кадмием. Таким образом, оксин антибактериально действует на грамположительные бактерии только при наличии некоторых металлов, с которыми он образует хелатные соединения, обладающие токсическим действием. Эта токсичность возникает благодаря каталитическому действию хелат, нарушающих окислительно-восстановительные процессы клетки (Rubbo et al., 1950).

ОБРАЗОВАНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ И ДРУГИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Особый интерес представляет способность плесневых грибов повышать под действием микроэлементов образование некоторых веществ, используемых обычно в практике. Так, образование лимонной кислоты *Aspergillus niger* повышалось от применения железа (Perlman et al., 1946). То же констатировал Васильев (Wassiljew, 1935) в отношении цинка, применяя разные питательные среды. Другие микроэлементы повышали выход этой кислоты у *Aspergillus fonsacaens* (Ciegler a. Raper, 1960).

О положительном действии этих двух элементов, использованных в малых концентрациях, на образование кислоты *Aspergillus wentii* и *Aspergillus glaucus* сообщает ряд других исследователей (Timmonin a. Rouatt, 1944; Wyllie, 1945; Karow, 1947; Karow a. Waksman, 1947).

В работах Локвуда и др. (Lockwood et al., 1945) благоприятное действие цинка и железа на продукцию *Aspergillus terreus* итаконовой кислоты зависело в синтетической среде от источника углевода.

Бейли и Кавалито (Bailey a. Cavallito, 1943) отмечали 30-разовое увеличение количества образуемого цитринина при добав-

лении железа в минеральную среду с глюкозой. Этот элемент мог быть с одинаковой эффективностью замещен марганцем, но не цинком и медью.

Некоторые органические вещества, введенные в среду, на которой выращивались микроорганизмы, изменяли процессы метаболизма и влияния микроэлементов. Так, выход лимонной кислоты у *Aspergillus niger* при использовании метанола в большой степени зависел от добавления в среду марганца, цинка и железа. При наличии метанола для образования лимонной кислоты было необходимо добавление марганца или цинка (Bertgang, de Wolf, 1961a). Метанол, по-видимому, действовал на обычные процессы метаболизма углеводов, изменяя их. Микроэлементы ингибировали это действие.

С другой стороны, стимулирующее действие на выход этой кислоты цинка при добавлении в среду метанола не проявлялось (Taha, El-Zainy et al., 1958, 1959).

Широкие исследования в отношении изучения факторов, влияющих на образование органических кислот плесневыми грибами, были проведены Буткевичем (1957). Стимулирующее действие цинка на образование лимонной кислоты было настолько убедительным, что автор рекомендовал использование этого элемента в промышленном производстве. Введение цинка в среду имеет существенное значение в двух направлениях: ускоряет развитие мицелия и, таким образом, сокращает время его выращивания и повышает активность мицелия в отношении его способности к превращению сахара в лимонную кислоту. Мицелий, выращенный без цинка, не активировался при последующем введении его в среду.

Изучение влияния микроэлементов на *Aspergillus niger* и его способность образовывать лимонную кислоту ведется в лаборатории химии микробов в Каире (Имшенецкий, 1961), где также установлено, что цинк необходим для биосинтеза этой кислоты.

Такое же влияние микроэлементов наблюдалось и в отношении иных веществ, образуемых плесневыми грибами.

Работая с *Penicillium patulum*, Брек (Brack, 1947) наблюдал увеличение продукции гентизилового спирта и уменьшение образования патулина при высоких дозах железа в среде. Добавление меди в таких случаях уменьшало продукцию обоих веществ. Комбинация цинка и железа усиливала образование только гентизилового спирта, а железа и марганца — повышала выход патулина и исключала образование спирта.

Синтез жира плесневым грибом из рода *Penicillium* стимулировался рядом микроэлементов — Cu, Zn, W, Br, Ni, Mn и др. (Singh et al., 1962).

Басс-Шадхан (1962a) сообщает, что марганец, медь и кобальт значительно повышали образование биологически активного полисахарида — зимозана, концентрированного в оболочке

Candida sp. Препараты зимозана, выделенные из дрожжей, обогащенных микроэлементами, отличались высокой биологической активностью и большим содержанием углеводов.

Мало известны функции металлов в отношении защиты организма от радиационного воздействия. Однако первые работы в этом направлении указывают на возможность создания комплексов металлоферментов, обеспечивающих защиту последних от облучения. Таким комплексом может быть цистеин-*n*-фосфатаза (Albert et al., 1962).

АНТАГОНИЗМ ИОНОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Антагонизм ионов, установленный в области физиологии высших растений, играет большую роль в снабжении последних минеральными элементами. Это явление существует также и в физиологии микроорганизмов. Однако тут оно изучено мало. С открытием металлоферментов и металлоорганических сложных комплексов ему даны новые объяснения. Полагают, что в основе антагонизма ионов лежит конкуренция за связи в органических комплексах клетки. В процессе соревнования за связи при различных комбинациях металла и органических веществ возникают антагонистические и синергические влияния на тот или иной процесс в организме. Так, при избытке марганца, кадмия или цинка может возникать недостаток необходимого железа, вызванный прямой конкуренцией этих элементов.

Некоторое объяснение антагонизма ионов дает Эпштейн (Epstein, 1961). По его мнению, прохождение ионов через клеточные мембраны происходит с помощью переносчика. Конкуренция между ионами наступает тогда, когда переносчик химически родственен нескольким находящимся в растворе ионам. Так, конкурируют Ca—Sr, Cl—Br и др. Физиологи растений считают, что такой ионный обмен сыграл большую роль в эволюции органических структур в связи с возможностью образования множества схожих соединений.

В области микробиологии накоплен, но не обобщен материал относительного ионного обмена. Переносить же сюда данные, полученные на растениях, вряд ли можно, учитывая особенности обмена микроорганизмов. Возможности комбинаций ионов очень разнообразны, и это вызывает затруднение в установлении общих закономерностей.

Антагонистические взаимоотношения некоторых металлов отмечены при росте многих видов микроскопических грибов (Lohrmann, 1940). Они проявились в торможении действия одного элемента другим. Так, торможение роста ртутью или бором

устранялось внесением магния, а торможение высокой дозой последнего устраняли, в свою очередь ртуть и бор.

Избежать токсического действия относительно больших количеств кобальта, никеля и цинка на рост *Aspergillus niger* удавалось применением относительно высоких доз железа и магния (250—25 000 мг/л). Постепенное повышение дозы последних соответственно уменьшало поглощение клеткой токсических количеств цинка и никеля. Меньшее ингибирующее действие проявилось в отношении кобальта (Adiga et al., 1962).

Угнетающее действие повышенных доз меди на рост *Aspergillus niger* снижали железо, молибден, цинк и марганец. Последние три действовали слабее, чем железо. Такое же действие оказывала глюкоза, входящая в состав среды (Упитис, 1962).

Добавление молибдена снимало угнетение роста *Neurospora crassa* вольфрамом при выращивании гриба на средах с NO_3 или NH_3 . Можно предположить, что вольфрам создает недостаточность Мо и (что уже отмечалось) ингибирует определенные биотические процессы, протекающие с участием Мо (Ramaiah et al., 1961).

Действие металлов на рост бактерий наблюдалось в опытах Хата (Hata, 1960), который сообщает об антагонизме ионов Mn, Cd к Fe при выращивании морских сульфатредуцирующих бактерий.

Сегаль и Гиббонс (Sehgal a. Gibbons, 1960) сообщают о взаимодействии железа и марганца при выращивании галофильных бактерий. Наличие железа снимало отрицательное влияние больших концентраций марганца, задерживающее рост бактерий.

Действие сочетаний различных микроэлементов на рост девяти штаммов *Streptomyces* наблюдали Хейм и Лешевалье (Heim a. Lechevalier, 1956). Большинство штаммов увеличивало рост при воздействии суммы взятых элементов, однако два из них лучше развивались только при сочетании железа и цинка.

Рост пропионовокислых бактерий угнетался сравнительно высокими дозами цинка на фоне В, Си, Со, Fe. Это действие цинка изменялось при применении других микроэлементов. Марганец усиливал токсичность при двухкомпонентном внесении. Наличие же других микроэлементов устраняло синергизм цинка и марганца (Воробьева, 1962).

Антагонизму цинка и марганца при развитии молочнокислых бактерий посвящены работы Маклеода и Снела (MacLeod a. Snell, 1950). Ими была обнаружена токсичность цинка для *Lactobacillus arabinosus*. Эта токсичность снималась добавлением марганца. Магний, кальций, стронций также снимали токсичность цинка к двум видам, но не могли заменить марганца, необходимого для роста молочнокислых бактерий. В то же вре-

мя эти ионы не действовали на токсичность цинка к третьему виду — *Leuconostoc mesenteroides*.

В этих опытах вызывает интерес различное действие одних и тех же ионов на три вида бактерий и, с другой стороны, различное действие нескольких ионов на один какой-либо вид.

Такой эффект разных ионов может быть объяснен их каталитической ролью в обменных реакциях клетки. Токсичность цинка можно рассматривать как результат образования с ним каталитически неактивных протеинов, а снятие угнетения — как вытеснение цинка другими ионами с образованием нормально активных протеинов. Такое объяснение механизма антагонистического действия даст возможность широко трактовать данные явления.

Ионный антагонизм у бактерий обычно изучается в связи с требованиями питания неорганическими ионами. Функция марганца заключается, по-видимому, как в питании, так и в образовании активных комплексов, активирующих необходимые ферменты. Возможно, что такой фермент может активироваться и другими ионами, которые, однако, не могут замещать марганец в питании организма.

Действуя на рост, микроэлементы влияют также и на ферментативные процессы микроорганизмов. Исследования Перлмана и др. (Perlman et al., 1946), наблюдавшего стимуляцию выхода лимонной кислоты у *Aspergillus niger* при действии Fe, Mn, Sr, Al, показали, что эти микроэлементы в смеси влияли гораздо слабее, чем при поодиочном внесении. Оптимальные дозы их были различны для различных штаммов гриба.

Цинк задерживал поглощение кислорода грибом *Epidermophyton*. Добавление кальция или молибдена снимало это действие (Nickerson, Chadwick, 1946).

В работах японских авторов (Fukumoto et al., 1960) образование амилазы *Bac. amyloliquefaciens* подавлялось солями цинка и кобальта. Это угнетение снималось добавлением кальция и стронция в дозах, увеличенных в 6 раз.

Тормозящее действие цинка и меди на фосфоглюкомутазу объясняется вытеснением этими элементами необходимого для фермента магния (Milstein, 1961). Схожие по действию на азотобактер Mo, W и V в то же время являются антагонистами в некоторых реакциях клетки.

В опытах с *Neurospora crassa* вольфрам является конкурентным антагонистом молибдена, полностью устраняющим его активирующее действие на нитратредуктазу гриба (Augich, 1959). Подобное же явление наблюдали Килер и Вернер (Keeler a. Varner, 1957, 1962); установившие, что вольфрам ингибирует функцию молибдена в клетках азотобактера. При внесении вольфрама поглощение Mo⁹⁹ снижалось на 95%, но размножение клеток не замедлялось. По-видимому, вольфрам влияет

на процесс образования «избыточных» молибдопротеинов в более сильной степени, чем на синтез молибдопротеинов, необходимых для размножения клеток. Ванадий не устранял угнетающего действия вольфрама, что показывает невозможность замены им молибдена.

При изучении действия микроэлементов на азотфиксацию азотобактера наблюдалось ослабление влияния молибдена при совместном его применении с никелем и кобальтом. Последние проявили антагонизм к молибдену в данном процессе (Lswagan, Rao, 1960).

Антагонизм ионов можно наблюдать не только в живых клетках, но и во внутриклеточном материале. Работая с клеточными экстрактами *Lactobacillus arabinosus*, Кларк и Маклеод (Clark a. Mcleod, 1954) нашли, что при гликолизе необходим марганец (кроме АТФ и NH_4). Другие ионы (Mg, Co, Ni, Zn) не могли заместить его или уменьшить необходимость в нем. Задерживали гликолиз Na, Cs. Однако добавление Mg, Co, Ni нивелировало торможение данного процесса.

Важным вопросом при использовании микроэлементов является выявление их эффективных комбинаций — двойных, тройных и т. д. В этих соотношениях может играть роль антагонизм ионов. Априорные решения этого вопроса на основании химических характеристик элементов невозможны. Кроме того, как уже было сказано, организмы, находящиеся под влиянием микроэлементов, не всегда одинаково реагируют на них.

При некоторых сочетаниях микроэлементов могут возникать определенные торможения ферментативных процессов вследствие конкуренции ионов в соединениях, необходимых для ферментов. Горбах с сотрудниками (Gorbach u. al., 1957) занимался исследованиями влияния Zn, Fe, Cu, Mn, взятых в отдельности и совместно, на рост и образование сахарозы *Aspergillus niger*. Цинк и медь оказывали стимулирующее действие на эти процессы. При применении двойных комбинаций железо тормозило влияние цинка, в свою очередь это торможение снималось при внесении марганца и меди. Добавление цинка в среду, содержащую Mn, Fe, Cu, сильно повышало образование сахарозы. Это повышение в элюатах культур доходило до 288% и в культуральных жидкостях — до 640%. Тормозящее действие железа исключалось в этом случае благодаря марганцу и меди. Авторы приходят к выводу, что при действии различных элементов проявляются их сложные взаимоотношения, выражающиеся в активации, синергизме и антагонизме ионов.

Антагонизм микроэлементов при испытании различных двух-, трех- и четырехкомпонентных смесей Cu, Mn, Fe, Ca при их действии на целлюлозные бактерии наблюдал Бортельс (Bortels, 1956). Антагонизм проявлялся в реакциях гидролитического расщепления целлюлозы.

Интересное объяснение антагонистическому действию металлов на ферменты дают Де Терк и Бернгейм (De Terk et Bernheim, 1960). Они сообщают о своеобразном антагонизме Co и Fe в клетках *Pseudomonas aeruginosa*. Кобальт может вытеснять железо из клетки и задерживать усвоение аммиачного иона и ряда ферментных окислительных процессов. Это торможение может в большинстве случаев сниматься солями неорганического железа, взятого в определенных дозах. По мнению авторов, подобные реакции обусловлены соединениями этих металлов с некоторыми рецепторами клетки, причем роль железа заключается в переносе соединений в сферу ферментного влияния. Таким образом, впервые действие микроэлементов пытались связать с рецепторным строением клетки бактерии.

Различные сочетания микроэлементов своеобразно действовали на образование витамина В₁₂ пропионовокислыми бактериями (Воробьева, 1962). Высокие дозы цинка угнетали витаминобразование. Это угнетение снималось другими ионами, причем действие последних было разным в отношении роста и витаминобразования. Марганец и хром усиливали действие цинка.

ЧАСТЬ V

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

АМИНО- И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Изменение состава аминокислот под действием цинка в культурах *Aspergillus niger* наблюдали Бертран и Вольф (Bertrand a. Wolf, 1959). Цинк был необходим для синтеза триптофана. Действие этого элемента на синтез аминокислот не ограничивалось триптофаном, оно проявилось и в отношении тирозина, фенилаланина, треонина, лейцина, изолейцина, серина, валина. В этом случае кадмий лишь частично мог заменить цинк и притом со значительно меньшей эффективностью. Авторы полагают, что некоторые аминокислоты образуются из общего предшественника, что обуславливает сходное влияние на них цинка и кадмия.

Сведения о действии микроэлементов на нуклеиновые кислоты микроорганизмов в основном относятся к цинку и марганцу. В опытах с *Nocardia opaca* (Webley et al., 1962) исключение из среды этих двух элементов вело к уменьшению синтеза ДНК и РНК. Некоторые данные говорят также о действии молибдена. Применение его в условиях выращивания *Clostridium perfringens* на казеиново-гидролизатной среде повышало содержание общего азота и РНК этой культуры (Диневич, 1961).

О действии металлов на нуклеиновые кислоты можно судить также по активности ферментов, их расщепляющих.

Влияние различных катионов на активность ДНК-азы изучалось в лабораторных условиях с выдерживанием постоянной ионной силы. Лучшими активаторами в этих условиях оказались марганец, магний и железо в концентрации 0,01 М и кобальт — 0,0005 М. Понижение рН изменяло эффективность действия элементов. ДНК-аза была также выделена из заводского штамма *Bac. subtilis*, употребляемого для производства амилазы. Фермент активировался марганцем и магнием. Эти же металлы нужны для ферментативного процесса, производимого нуклеозидазой, выделенной из *Xanthomonas pruni* (Van Eys, 1960).

Виндер и о'Хара (Winder a. o'Hara, 1962), работавшие с *Mycobacterium smegmatis*, получили данные, говорящие об из-

менениях в метаболизме клетки под влиянием микроэлементов. Бактерия плохо растет в среде с недостатком железа и цинка. Авторы сравнивали культуры, растущие в нормальной среде и в среде без этих элементов. В последнем случае наблюдалось угнетение роста, изменение морфологических и культуральных особенностей культуры, а также количественные изменения нуклеиновых кислот (исчисляемых в % нерастворимого азота). Относительные количества РНК уменьшались, изменения в ДНК были несущественны. Все эти изменения, зависящие, по-видимому, от замедления синтеза РНК, вели к задержке образования белка, то есть роста культуры. Авторы убедились, что недостаток указанных микроэлементов оказывает специфическое тормозящее действие на синтез РНК. Нарушение соотношений в образовании ядерных кислот вело к другим нарушениям в метаболизме клетки. Так, при недостатке цинка наблюдалось относительно увеличение нерастворимых неорганических полифосфатов, показывающее задержку хода энергетических реакций. Количество аденозинтрифосфата (АТФ), обычно уменьшающееся к концу роста культуры, в Zn-дефицитных культурах оставалось достаточно высоким. Количество пиридиннуклеотидов рано падало в Zn- и Fe-дефицитных культурах из-за недостатка указанных металлов для синтеза этого соединения. Весьма возможно, что это исходило из задержки образования никотиновой кислоты или ее составной части. Дефицит цинка отражался на общем числе липидов, количество которых повышалось, особенно фосфолипидов. Вместе с тем падало количество нерастворимых форм азотных веществ и особенно кислоторастворимого азота. Подобные явления наблюдались и у высших растений (Possingham, 1957).

Приведенные данные указывают на определенное действие микроэлементов на важнейшие соединения клетки и ее метаболизм. Опыты с металлдефицитными культурами убедительно показали эти изменения. Действие некоторых микроэлементов (Zn, Fe, Mn) можно считать специфическим. Однако было бы ошибочным приписывать специфичность соединениям некоторых ферментов с определенными металлами только потому, что без наличия последних уменьшается концентрация фермента. В данном случае может иметь место косвенное влияние на синтез апофермента, как это происходит при влиянии дефицита цинка на синтез триптофана.

В некоторых случаях при дефиците нескольких металлов наблюдается отрицательное влияние отсутствия только одного из них, в других же необходимый металл может быть заменен другим, сходным по физическим свойствам.

Как правило, действие микроэлементов зависит в значительной мере от условий их применения и особенностей микроорганизмов.

ИЗМЕНЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АКТИНОМИЦЕТОВ

Учитывая литературные данные о действии микроэлементов на изменения активности ферментов, а также на нуклеиновые кислоты, нами были проведены опыты с испытанием действия микроэлементов на антагонистические свойства актиномицетов (Бершова, 1963).

Из большого количества выделенных из почв хозяйства Института микробиологии АН УССР «Феофания» актиномицетов было отобрано 32 штамма разных видов, обладающих антагонистическими свойствами к стафилококку штамм 209. Эти виды выращивались на агаризованной среде № 1 Красильникова с добавлением отдельных микроэлементов. Через 5—7 суток из проросшего актиномицетом агара вырезывались блоки с культурой и накладывались на газон чашки, засеянной стафилококком. Контроль — среда с микроэлементами. Через 24 ч измерялся размер зон отсутствия роста стафилококка вокруг блока с актиномицетом. Полученные результаты опытов приведены в табл. 39.

Таблица 39

Влияние микроэлементов на антагонистические свойства актиномицетов к стафилококку (зоны отсутствия роста — в мм)

Номер культуры	Вид актиномицета	Среда с микроэлементами						
		Контроль	Mo	B	Mn	Zn	Cu	Co
1	<i>Actinomyces griseus</i>	15	20	17	25	20	15	20
2	<i>Act. griseus zonatus</i>	18	20	20	24	24	20	22
3	<i>Act. griseus zonatus</i> , штамм № 2	20	25	22	22	20	25	22
4	<i>Act. globisporus griseus</i>	22	20	25	22	22	22	24
5	<i>Act. globisporus</i>	15	17	20	16	18	12	20
6	<i>Act. flavus</i>	15	18	18	19	12	10	12
7	<i>Act. viridiflavus</i>	17	19	18	15	12	12	17
8	<i>Act. violaceus</i>	16	12	12	15	11	12	11
9	<i>Act. globisporus</i>	18	16	18	20	13	20	25
10	<i>Act. albus</i>	14	17	18	20	24	20	23

Оказалось, что микроэлементы изменяют степень антагонистического действия актиномицетов на стафилококк. В большинстве случаев получены увеличенные зоны подавления роста сравнительно с контрольными культурами. Эти увеличения в некоторых случаях были значительными. Примером такого действия служит большинство культур. Усиление антагонизма проявилось под влиянием почти всех взятых элементов. Особенно

активно действие марганца, цинка, кобальта. У некоторых видов наблюдалось действие только одного—трех элементов. Наряду с этим отмечены случаи уменьшения антагонистического действия. Один актиномицет (№ 8) снижал образование бактерицидных веществ под действием взятых микроэлементов. При повторении опытов указанное явление воспроизводилось

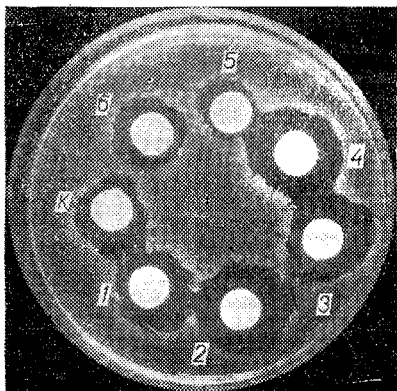


Рис. 8. Антагонистическое действие разных вариантов *Actinomyces griseus* на стафилококк:

К — контроль, 1 — вариант, выращенный на среде с бором, 2 — с молибденом, 3 — с марганцем, 4 — с цинком, 5 — с медью, 6 — с кобальтом.

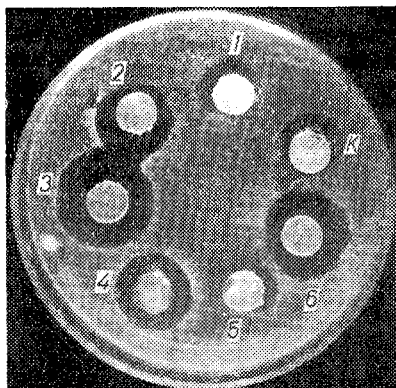


Рис. 9. Антагонистическое действие разных вариантов *Actinomyces globosus* на стафилококк.

Обозначения те же, что на рис. 8.

не всегда точно, наблюдались отклонения в сторону уменьшения или усиления его первоначального действия.

При испытании влияния микроэлементов на накопление актиномицетами разного возраста бактерицидных веществ оптимальным сроком оказались пятый—восьмой дни роста. Наиболее старые культуры показывали уменьшение действия микроэлементов. На рис. 8 и 9 видно это действие на двух видах актиномицетов. Представленные на рис. 8 блоки разных вариантов *Actinomyces griseus*, выращенного на средах с Мо, В, Мп, Zn, показывают большее бактерицидное действие, чем блок контрольного варианта (выращенного на среде без микроэлементов). Вариант, выращенный на среде с медью, был менее активен, чем контрольный. На рис. 9 представлены варианты другого вида актиномицета, выращенного на средах с Мо, В, Со. Они также оказались более активными.

Таким образом, можно говорить о действии определенных микроэлементов, усиливающих антагонистические свойства актиномицетов. Однако не все актиномицеты подвержены такому

влиянию. Некоторые из них реагируют в этом отношении слабее. Существуют видовые отличия в отзывчивости актиномицетов. На одни виды действуют больше молибден и бор, на другие — марганец, цинк и кобальт. Это действие различно по силе у разных штаммов.

Такое усиление и ослабление антагонистических свойств микроорганизмов при помощи микроэлементов может быть использовано при получении антибиотических веществ из актиномицетов.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЗОТОБАКТЕРА

Исследования изменений свойств микроорганизмов под действием микроэлементов были продолжены в опытах с азотобактером.

Некоторые литературные данные указывают на изменчивость азотобактера под влиянием его культивирования в разных условиях. Также подчеркивается трудность получения стойких новых форм этой бактерии. Почти всегда у полученных вариантов через некоторое время возвращались признаки исходных штаммов.

Предпосылкой для нашей работы было влияние микроэлементов на обмен веществ клетки. Возникло предположение, что с их помощью путем изменчивости можно получить новые наследственные признаки или усилить уже существующие у этой бактерии.

Работа проводилась в направлении получения вариантов азотобактера, более активных по азотфиксации и влиянию на растения, чем основные штаммы. Была также сделана попытка закрепить полученные новые свойства азотобактера.

Предварительные опыты по выяснению отзывчивости разных штаммов азотобактера проводились с 20 штаммами, свежевыделенными из различных почв УССР. Все штаммы относятся к *Azotobacter chromococcum*. Микроэлементы — бор в виде буры ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) и молибден в виде Na_2MoO_4 .

Из 20 штаммов увеличили рост и азотфиксацию в первых же опытах 14 (табл. 40). Увеличение азотфиксации от внесения бора составило 1—3 мг на 1 г внесенного в среду сахара, молибден увеличивал азотфиксацию значительно больше — в 2—3 раза по сравнению с азотфиксацией основного штамма.

Для дальнейшей работы были отобраны десять штаммов азотобактера, особенно отзывчивых на влияние микроэлементов. С целью выявления действия и закрепления положительных новых свойств азотобактера проводилось длительное (3—4 месяца) пассирование штаммов при последовательных посевах на агаровой среде Эшби с добавлением бора или молиб-

Действие микроэлементов на рост и азотфиксацию разных штаммов азотобактера

Номер штамма	Контроль		Бор		Молибден		Фосфорномолибденовая кислота	
	Общая масса бактерий	Азотфиксация	Общая масса бактерий	Азотфиксация	Общая масса бактерий	Азотфиксация	Общая масса бактерий	Азотфиксация
1	3,8	9,2	4,1	—	4,9	—	4,5	14,5
2	5,7	6,6	6,1	9,5	6,4	16,8	5,0	—
3	5,0	12,5	5,6	12,3	4,4	—	4,4	—
4	5,6	9,1	5,7	—	4,6	—	5,6	—
5	3,7	9,0	4,1	11,4	4,5	14,5	4,2	—
6	0,6	5,2	0,7	—	0,5	—	0,5	—
7	2,6	6,9	3,3	9,9	2,8	—	2,6	—
8	2,7	7,7	3,3	—	4,5	19,1	4,2	—
9	3,9	6,2	3,1	—	4,3	10,2	4,8	13,6
10	2,1	6,1	3,0	6,5	2,8	7,9	2,9	7,5
11	1,0	—	1,5	—	1,5	—	—	—
12	0,5	—	0,7	—	0,6	—	—	—
13	0,8	—	1,3	—	—	—	—	—
14	1,0	—	0,9	—	1,4	—	—	—
15	2,4	—	3,0	—	—	—	—	—
16	1,1	—	0,6	—	0,8	—	—	—
17	1,0	—	0,9	—	1,8	—	—	—
18	2,2	—	3,0	—	2,8	—	—	—
19	1,9	—	2,7	—	1,8	—	—	—
К	5,0	7,1	5,0	—	5,3	—	5,2	—

Примечание. Общая масса бактерий определялась в г на чашку Петри. Азотфиксация — в мг N на 1 г сахара, внесенного в среду.

дена, а также отбор колоний. Для испытания новых свойств и их наследственного закрепления варианты штаммов культивировались на среде Эшби уже без микроэлементов. Изменение свойств культуры определялось изменением роста, азотфиксации и наблюдаемых внешних признаков.

Азотфиксация определялась на десятый день роста азотобактера в промытом речном стерильном песке со средой Виноградского и соответствующими микроэлементами. Засев производился одинаковым количеством клеток. Через десять дней инкубации при 25°С культуры сжигали по методике Кьельдаля, в растворе определяли азот колориметрическим способом.

В результате длительных пассажей и отбора были получены варианты основных штаммов азотобактера, отличающиеся от исходных штаммов культуральными и морфологическими свойствами и величиной азотфиксации. Последующее культивиро-

вание этих вариантов на среде без микроэлементов в течение нескольких месяцев не изменяло приобретенных признаков. Увеличению роста варианта культур почти всегда сопутствует увеличение азотфиксации. Варианты, полученные пассированием на среде с молибденом, значительно увеличили азотфиксирующую способность; некоторые из них (7 и 9) увеличили ее более чем вдвое. Увеличение азотфиксирующей способности подтверждается также сопоставлением увеличения роста и азотфиксации. Последняя у штаммов 7, 8, 9, К возросла в большей степени, чем увеличение в росте.

Для закрепления полученных изменений у вариантов азотобактера проводилось дальнейшее пассирование их на средах с микроэлементами. Периодические испытания показали, что способность к высокой азотфиксации сохранялась у вариантов на протяжении долгого времени.

В условиях лаборатории были проведены микровегетационные опыты с испытанием эффективности действия полученных вариантов азотобактера на рост проростков некоторых растений. В этих опытах можно отметить положительное влияние вариантов азотобактера, гораздо большее, чем влияние основных штаммов, на рост проростков. Кроме того, в опыте отмечены большие различия в развитии корневой системы проростков, значительно большей у растений с бактеризацией семян вариантами азотобактера.

Полученные варианты были испытаны в вегетационных опытах с яровой пшеницей и овсом, а затем, на второй год, и в полевых опытах. Схему и результаты опытов приводим в табл. 41, 42. Как видно из таблиц, урожай обоих растений при внесении вариантов был повышенный в сравнении с урожаем по контрольным штаммам азотобактера. Из четырех вариантов, культивированных на среде с бором, два повысили урожай пшеницы на 4—15% выше контрольного штамма. Все четыре варианта, культивированные на молибдене, дали прибавки урожая зерна на 15—25% выше основных штаммов. Прибавки урожая по вариантам, выращенным на средах с молибденом, значительно выше, чем по вариантам, выращенным на среде с бором.

Аналогичные результаты получены и в опытах с овсом (табл. 42). Несмотря на то, что в опытах с овсом были взяты варианты иных штаммов, кроме штамма № 7, который был внесен с овсом и пшеницей, прибавка урожая была также при внесении вариантов, культивированных на молибдене, и при двух вариантах, культивированных на боре. Прибавки зерна овса от тех и других вариантов в данном опыте были почти одинаковыми — 16—22%.

Производили также наблюдения над приживаемостью азотобактера в ризосфере и на корнях растений. При высевах земли с корней растений, бактеризованных вариантами, азото-

Таблица 41

Урожай яровой пшеницы в опытах с азотобактером, культивированным на средах с микроэлементами

Вариант опыта	Урожай в % к контролю		Урожай в % к основному штамму азотобактера	
	Общая масса	Зерно	Общая масса	Зерно
Контроль (без азотобактера)	100	100	—	—
Азотобактер, основной штамм № 2	105	100	100	100
Вариант штамма № 2, выращиваемого на среде с Мо	110	124	105	124
То же на среде с В	105	100	100	100
Азотобактер, основной штамм № 5	119	115	100	100
Вариант штамма № 5, выращиваемого на среде с Мо	148	130	129	115
То же на среде с В	98	110	82	95
Азотобактер, основной штамм № 7	123	120	100	100
Вариант штамма № 7, выращиваемого на среде с Мо	140	145	117	125
То же на среде с В	120	124	97	104
Азотобактер, основной штамм № 18	95	105	100	100
Вариант штамма № 18, выращиваемого на среде с Мо	126	120	131	115
То же на среде с В	91	120	96	115

Таблица 42

Урожай овса в опытах с азотобактером, культивированным на средах с микроэлементами

Вариант опыта	Урожай в % к контролю		Урожай в % к неизменному штамму азотобактера	
	Общая масса	Зерно	Общая масса	Зерно
Контроль (без азотобактера)	100	100	—	—
Азотобактер, основной штамм № 15	102	100	100	100
Вариант штамма № 15, выращиваемого на средах с Мо	113	122	111	122
То же на средах с В	120	122	118	122
Азотобактер, основной штамм К	137	125	100	100
Вариант штамма К, выращиваемого на средах с Мо	139	137	102	112
Азотобактер, основной штамм № 8	118	117	100	100
Вариант штамма № 8, выращиваемого на средах с Мо	133	132	115	116
То же на средах с В	111	111	94	96
Азотобактер, основной штамм № 7	115	122	100	100
Вариант штамма № 6, выращиваемого на средах с Мо	140	144	125	122
То же на средах с В	134	138	119	116

бактер всегда проявлял интенсивный рост, больший, чем рост основных штаммов, и приживаемость вариантов была всегда большей.

Испытание вариантов штаммов азотобактера было повторено в полевых условиях на культуре овса. В опыт были взяты только варианты, полученные на средах с молибденом, как более эффективные, устойчивые и перспективные для дальнейшей работы.

Опыт проводили на суглинистой дерново-подзолистой почве опытного поля Института микробиологии АН УССР «Феофания». Семена овса обрабатывали суспензией культур основных штаммов азотобактера и их вариантов. Всего было взято четыре штамма и четыре их варианта. Результаты опыта и схему приводим в табл. 43.

Т а б л и ц а 43

Полевые опыты с применением вариантов штаммов азотобактера

Вариант опыта	Вес общей массы		Вес зерна		Прибавка урожая зерна в % к основному штамму
	ц/га	%	ц/га	%	
Контроль (без азотобактера)	49	100	9,4	100	—
Азотобактер					
штамм № 8	62	126,5	10,2	108,9	—
штамм № 15	59	120,4	10,1	107,4	—
штамм К	55	112,2	10,5	111,7	—
штамм № 2	42	85,4	10,0	106,4	—
Варианты					
штамма № 8	62	126,5	11,3	111,2	2,1
штамма № 15	61	124,5	11,5	122,5	15,1
штамма К	63	128,6	12,1	128,9	17,2
штамма № 2	60	122,2	11,7	125,1	18,9

Как видно из приведенных данных, урожай зерна овса повысился от применения всех четырех вариантов азотобактера. На делянках с внесением основных штаммов азотобактера урожай также был выше, чем в контроле, но действие вариантов азотобактера было значительно сильнее, чем основных штаммов азотобактера во всех четырех случаях.

Таким образом, при воздействии микроэлементов были получены измененные свойства у азотобактера, которые затем передавались по наследству. Микроэлементы В и Мо усиливали рост и азотфиксацию азотобактера в определенных условиях его культивирования на средах с этими элементами. При длительном пассировании штаммов азотобактера при наличии молибдена и бора рост, азотфиксирующая способность и морфо-

логические признаки азотобактера значительно изменяются. Однако не все штаммы азотобактера отзывчивы на влияние указанных факторов. Более пластичны штаммы, свежeweыделенные из почв. Наиболее стойкими в удержании приобретенных признаков являются варианты, полученные при помощи молибдена.

Объяснение таких наследственных изменений в физиологических свойствах микроорганизмов следует, как нам кажется, искать во влиянии микроэлементов на нуклеиновые кислоты клеток. Как известно, эти кислоты играют определенную роль в передаче наследственных черт организмов. Металлы, вступая с ними и их компонентами (фосфорными и другими группами) в комплексные соединения, как полагают, играют роль в стабилизации структур кислот и скорости белкового обмена. Кроме того, есть указания на их определенное значение при ферментативных реакциях распада и синтеза нуклеиновых кислот. Некоторые микроэлементы активируют нуклеотилазы, ДНК — полимеразы, рибонуклеазы, фосфородиэстеразы и многие другие ферменты. В опытах Школьника и его сотрудников (1962) показано влияние бора на синтез РНК и ДНК у растений. Отсутствие этого элемента вело к снижению количества нуклеиновых кислот, особенно РНК, во всех частях растений.

Полученные нами изменения азотфиксирующей способности азотобактера под влиянием бора и молибдена относятся, по видимому, к процессам подобного рода и подтверждают предположение Виндера и о'Хара (Winder a. o'Haга, 1962) об участии микроэлементов в передаче наследственных признаков.

ЧАСТЬ VI

УСВОЕНИЕ МОЛИБДЕНА БАКТЕРИЯМИ (опыты с радиоактивным изотопом Mo^{99})

До сих пор остается неясным вопрос, в какой мере микроэлементы, находящиеся в среде, используются микроорганизмами. Определенные результаты в этом отношении могли дать исследования с применением радиоактивных изотопов микроэлементов.

Задачей наших исследований было изучение путей и степени использования Mo^{99} почвенными бактериями. С другой стороны, работа с Mo была интересна с точки зрения азотфиксирующей способности азотобактера и других бактерий, усваивающих атмосферный азот.

Известно, что наличие Mo в среде значительно усиливает азотфиксирующую способность азотобактера (Bortels, 1930; Матушвили, 1947; Бершова, 1951, 1956, 1958; Федоров, 1952; Крылова, 1964).

Это усиление, по данным разных авторов, может достигать 80—600%.

Кроме того, обогащение почвы азотом идет и за счет азотоусвоения ряда почвенных микроорганизмов, в том числе олигонитрофилов. Действие на них молибдена совсем не изучено. Вместе с тем можно было по аналогии полагать, что оно также будет положительным.

С помощью изотопа молибдена мы старались разрешить следующие вопросы: о поступлении молибдена в клетки бактерий; скорости поступления Mo в зависимости от их роста; адсорбции Mo размножающимися клетками азотобактера; поглощении Mo неразмножающимися клетками; об отношении разных штаммов азотобактера к Mo ; отдаче Mo клетками бактерий в среду; конкуренции за Mo между азотобактером и растением; поступлении Mo из клеток бактерий в растение; поглощении Mo азотобактером из почвы; влиянии Mo^{99} на размножение азотобактера и некоторых олигонитрофилов и их азотфиксирующую способность.

Опыты проводили в лабораторных условиях. Каждый опыт повторяли несколько раз. В качестве объекта исследований бы-

ли взяты культуры *Azotobacter chroococcum* — штамм К и другие штаммы, а также ряд культур, выделенных из почвы и растущих на среде Эшби (табл. 55). Изотоп молибдена — Mo^{99} — обладал следующими свойствами: формула соединения MoO_3 , полураспад 67 ч, излучение — β , γ , e^- . Раствор изотопа вносили в соответствующие среды в определенных, указанных ниже дозах. Большим неудобством был короткий срок полураспада Mo , а также необходимость работы с малыми количествами этого соединения, так как Mo усваивается растениями и бактериями в относительно малых дозах; большие же дозы были токсичны для объектов исследования.

Активность источников излучения измеряли на счетчике Гейгера — Мюллера. Количество импульсов в минуту в анализируемом объекте указывало на количество поступившего в него молибдена. Для получения культуры бактерий, обладающих радиоактивностью, их выращивали на агаризованных средах Эшби и других с добавлением Mo^{99} . При испытании этих культур сначала производили отмыв их от частиц среды, затем отбирали навески, распределяли на определенной площади фильтровальной бумаги, подсушивали и помещали в счетчик. При испытании фильтров культур или жидкой среды, в которой они росли, определенное количество таковых наносили на фильтровальную бумагу и подсушивали перед определением. Зеленые проростки растений разрезали на кусочки 1—2 см длины. Из агара вырезывали блоки в 200 мм^3 , которые помещали в счетчик. Поправка на полураспад при измерениях в разные сроки производилась ко времени первого измерения. Более подробное описание методики приведено при изложении каждого опыта. Культивирование азотобактера проводили на обычной агаризованной и жидкой среде Эшби с дозой MoO_3 20—30—50 мг/л. Большие дозы угнетали азотобактер.

ПОГЛОЩЕНИЕ Mo^{99} КЛЕТКАМИ АЗОТОБАКТЕРА

Исследование поглощения клетками азотобактера Mo из среды проводилось в следующем опыте. Двухсуточную культуру азотобактера, выращенную на среде с Mo^{99} , испытывали на радиоактивность. Кроме того, испытывали активность излучения агара, на котором она росла. Культуру брали в количестве 3 млрд. клеток, агар — 200 мм^3 .

Как видно из табл. 44, клетки азотобактера поглотили Mo в количестве, дающем 110—220 импульсов, в зависимости от взятой дозы Mo . При оптимальной дозе в 25 мг/л Mo поглощалось больше, чем при угнетающих культуру дозах. Поглощение Mo подтверждается и анализом агара, на котором рос азотобактер. Больше импульсов давали блоки агара, вырезанные из контрольной среды, меньше — блоки из среды, на которой рос

Таблица 44

Поступление Мо в клетки азотобактера (в имп/мин)

Вариант опыта	Культура	Агар
Контроль. Среда с 25 мг Мо	—	140
Среда с 25 мг Мо+азотобактер	220	80
с 50 мг Мо. Контроль	—	260
с 50 мг Мо+азотобактер	110	140
с 100 мг Мо. Контроль	—	420
с 100 мг Мо+азотобактер	175	210

азотобактер и из которой он поглотил Мо. Это повторялось при всех взятых дозах Мо, изменялось только количественное соотношение импульсов в зависимости от вариантов опыта.

ВРЕМЯ ПОСТУПЛЕНИЯ Мо⁹⁹ В КЛЕТКИ

Следующие исследования показали время поступления Мо в клетки азотобактера в процессе роста культуры. Азотобактер высевали на чашки Петри с агаризованной средой Эшби с молибденом. Анализ культуры проводили через определенные отрезки времени. Результаты двух опытов, проведенных с препаратами МоО₃ разной удельной активности, приведены в табл. 45. Они показывают, что в процессе роста азотобактер активно поглощает Мо из среды. Уже в 16-часовой культуре имеется определенное количество Мо, нарастающее в течение двух суток роста. Дальнейшие определения показывают некоторое увеличение поглощения Мо, но не в такой мере, как это было в первый период размножения культуры. По-

Таблица 45

Поступление Мо в клетки в процессе роста азотобактера (в имп/мин)

Номер опыта	Возраст культуры (в часах)				
	16	24	48	72	96
1	28	32	67	70	—
2	40	50	90	—	100

видимо, азотобактер нуждается в Мо в большей мере в начальном периоде роста молодых клеток. Некоторую аналогию данного явления можно провести с высшими растениями, которые больше употребляют микроэлемента также в первые фазы роста (Власюк, 1964).

АДСОРБЦИЯ Mo^{99}

Для решения этого вопроса был поставлен опыт с внесением в жидкую среду Энби с Mo молодых (2-суточных), старых (10-суточных) и убитых (нагревом) клеток азотобактера. Количество клеток было одинаковым. Через 24 ч культуру азотобактера отцентрифугировали, промывали до исчезновения Mo в промывных водах и анализировали на радиоактивность (табл. 46).

Полученные данные подтверждают результаты первых опытов в том отношении, что Mo поглощается больше молодой, развивающейся культурой. Гораздо меньше импульсов дала старая культура. Незначительное количество импульсов получено и при анализе убитой культуры. Следовательно, не исключено и явление адсорбции Mo клетками азотобактера, но оно незначительно по сравнению с поглощением Mo живыми клетками с обменом веществ.

Таблица 46

Mo в клетках разного возраста
(в имп/мин)

Азотобактер	Культура	Среда, 1 мл
Клетки		
молодые	87	690
старые	18	750
убитые	6	900

ПОГЛОЩЕНИЕ Mo^{99} НЕРАЗМНОЖАЮЩИМИСЯ КЛЕТКАМИ

Во втором опыте, проведенном для выяснения того же вопроса, получены гораздо более показательные данные, вероятно потому, что здесь был взят препарат Mo с большей удельной активностью.

Молодую (двухсуточную) культуру азотобактера в количестве 3 млрд. клеток вносили в колбочки с физиологическим раствором с добавлением Mo . Культура находилась в условиях, исключающих размножение. Через 3 и 5 суток культуру отцентрифугировали, промывали и испытывали на радиоактивность (табл. 47).

Полученные данные показывают очень сильное поглощение Mo культурой азотобактера. Увеличение дозы молибдена в среде благоприятствовало увеличению поглощения. Однако количество Mo в клетках, обнаруженное на пятые сутки, осталось относительно таким же, как и на третьи сутки. В неразмножающейся культуре количество Mo на пятые сутки не увеличилось. Очевидно, и в данных условиях также происходит обмен веществ в клетке, определяющий поглощение Mo .

Таблица 47

Поглощение Mo^{99} неразмножающимися клетками азотобактера (в *имп/мин*)

Вариант опыта	Сроки испытания (в сутках)	
	3	5
Азотобактер в физиологическом растворе с 15 <i>мг/л</i> Mo	15000	1250
Азотобактер с 30 <i>мг/л</i> Mo	3370	3200

ПОГЛОЩЕНИЕ Mo^{99} РАЗНЫМИ ШТАММАМИ АЗОТОБАКТЕРА

Было также изучено поглощение Mo разными штаммами азотобактера. Были взяты штаммы К и 53 *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter agile*. Культуры высевали в равных условиях на чашки Петри с агаризованной средой Эшби с Mo^{99} . Через 3, 5, 10 суток испытывали их радиоактивность. Поглощение Mo разными штаммами характеризуется данными, приведенными в табл. 48.

Таблица 48

Поглощение Mo разными штаммами азотобактера (в *имп/мин*)

Дозы Mo , добавленные в среду (<i>мг/л</i>)	Сроки исследования (в сутках)							
	3			5			10	
	53	К	<i>Az. agile</i>	53	К	<i>Az. agile</i>	53	К
15	90	120	84	181	195	144	144	204
30	190	166	98	240	270	132	264	288

Оказалось, что различные штаммы азотобактера поглощают Mo в неодинаковых количествах. В молодой, 3-суточной культуре поглощение Mo больше у штамма К при дозе 15 *мг* Mo . При увеличении дозы до 30 *мг* больше Mo поглощает штамм 53. Однако во все последующие сроки при обеих дозах Mo больше у штамма К. Значительно меньше поглощает Mo *Azotobacter agile*.

Приняв во внимание азотфиксирующую способность этих трех штаммов, можно предположить, что более энергичные азотфиксаторы поглощают больше Mo .

ОТДАЧА Mo^{99} В СРЕДУ

Наряду с опытами, показывающими поглощение Mo , были проведены наблюдения над способностью культуры отдавать Mo в среду. Радиоактивную культуру азотобактера в количестве 1 г вносили в колбочку с 20 мл физиологического раствора. После 24 ч пребывания в растворе в условиях, исключающих размножение, культуру отцентрифугировали. При определении Mo в культуре и в центрифужной жидкости получены данные (табл. 49), показывающие, что клетки азотобактера могут отдавать поглощенный молибден в среду, где он, по всей вероятности, может быть использован последующими генерациями бактерий или растениями.

Данный процесс подобен динамике радиоактивного фосфора, поглощаемого и выделяемого в среду бактериями (Котелев, Гаркавенко, 1954; Ахромейко, Шестакова, 1958).

Таблица 49
Отдача Mo клетками азотобактера

Объект исследования	Количество имп/мин
Первоначальная культура азотобактера	1290
Культура отцентрифугированная	930
Физиологический раствор после центрифугирования	200

РЕУТИЛИЗАЦИЯ Mo^{99} РАСТЕНИЯМИ

Взаимоотношения между растениями и бактериями в отношении обмена микроэлементов совершенно не изучены и представляют определенный интерес. Поэтому были проведены следующие исследования. Проростки яровой пшеницы на бумажных поплавках помещали на дно большой пробирки с 15 мл воды. Туда же вносили в разных дозах (табл. 50) культуру азотобактера, поглотившую Mo^{99} . Корни проростков находились вместе с азотобактером в воде. Поверхность зерен пшеницы перед проращиванием предварительно стерилизовали. Вся система пробирка — среда также была стерильной. Вода в качестве среды была взята для более активного автолиза клеток бактерий. Анализ на радиоактивность подвергали зеленую часть проростков. Результаты опыта представлены в табл. 50.

Данные опыта 1 подтвердили предположение о переходе Mo из клеток азотобактера в ткани высшего растения. Однако отдача этого элемента происходила очень медленно. Через 4 суток в растение поступает незначительное количество Mo , пропорциональное внесенному количеству клеток азотобактера. Такое соотношение показывает, что Mo в растениях получен после автолиза или выделения его из клеток азотобактера. Через 7 суток в растениях Mo гораздо больше, причем и количество его

Т а б л и ц а 50

Поступление Мо из клеток азотобактера в растение (в имп/мин)

Вариант опыта	Схема опыта	Количество клеток азотобактера, внесенное в среду (млрд.)	Опыт 1 (без Мо)		Опыт 2 (внесен Мо)	
			Сроки анализа (в сутках)			
			4	7	2	5
1	Растение (контроль)	—	—	—	18е	46
2	Растение + азотобактер	6	16	30	32	76
3	То же	3	12	30	29	56
4	» »	1,5	8	16	25	56
5	» »	0,75	4	16	—	40
Импульсы в 3 млрд. клеток первоначальной культуры азотобактера		112				

тоже относительно пропорционально количеству внесенных в разных вариантах опыта клеток бактерии.

Опыт 2 был поставлен несколько иначе. При той же схеме, что и в опыте 1, в каждую пробирку был внесен также и раствор Мо. Можно было предположить, что растение могло бы ограничиться использованием неорганического соединения Мо. Однако из полученных данных видно (варианты 2, 3, 4 опыта 2), что растение поглощает также Мо, бывший в клетках азотобактера. Особо отчетливо это обнаружено во второй срок исследования — на 5-е сутки. При этом данное явление наблюдается только при больших количествах культуры азотобактера (варианты опыта 2, 3, 4). Весьма возможно, что Мо, высвобожденный из клеток бактерий, был в другой, более благоприятной для растений форме соединения.

Отдача Мо клеткой азотобактера и поглощение его растением отмечены и в следующих опытах (табл. 51). Работу проводили на двух средах — голодном агаре и агаре Эшби — с целью поставить культуру азотобактера в нормальные и неблагоприятные условия существования, исключаящие размножение клеток и способствующие более интенсивному протеканию их автолиза. Опыт ставили в стерильных условиях с упомянутой агаровой средой в количестве 10 мг на большую пробирку. На агар вариантов опыта 3 и 6 высевали азотобактер, содержащий Мо, и проростки пшеницы, поверхность зерна которых была предварительно простерилизована. Анализировали зеленые части

Таблица 51

Поступление Мо в растения (в имп/мин)

Номер варианта	Схема опыта	Сроки испытания (в сутках)		
		2	5	7
<i>Агар Эшби</i>				
1	Растение (контроль)	2	3	8
2	Растение-Мо	13	40	88
3	Растение-азотобактер	16	20	50
<i>Голодный агар</i>				
4	Растение (контроль)	0	0	0
5	Растение-Мо	25	40	76
6	Растение-азотобактер	13	34	76

проростков растений. В варианты 2 и 5 вносили, кроме того, раствор Mo^{99} .

При проведении опыта было видно, как корни растений проникают в агар и на них располагается азотобактер. Исследования радиоактивности молодых проростков показало (табл. 51), что Mo попадает в растения уже через двое суток. Не исключена возможность попадания его и гораздо раньше, но мы проводили исследования начиная только со вторых суток, когда проростки достигали определенной величины. Mo поступал в растения как из внесенного раствора, так и из клеток азотобактера. Усвоение Mo из внесенного раствора в первый период (на вторые сутки) протекает более активно на голодной среде. Степень поглощения его из клеток азотобактера в этот период почти равна на обеих средах (13—16 имп). На 5-е и 7-е сутки начинается, вероятно, сказываться автолиз клеток и Mo оказывается больше в растениях на голодной среде (вариант опыта 6), чем в среде Эшби (вариант 3).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Mo^{99} АЗОТОБАКТЕРОМ И РАСТЕНИЕМ

Как известно, Mo благоприятно влияет на продуктивность некоторых растений. Можно было предположить, что в естественных условиях, при недостаточном его содержании в почве, может происходить конкуренция за него между бактериями и растениями. Для выяснения этого вопроса был поставлен опыт по той же методике, которая приведена в предыдущем исследовании. Азотобактер был выращен на обычной (без Mo) среде. Раствор Mo^{99} и культуру азотобактера вносили в пробирку с водой на дне. Корни проростков находились также в этой воде. Схему и результаты двух опытов, проведенных с

препаратами Мо разной удельной активности, приводим в табл. 52.

Полученные данные двух опытов (табл. 52) свидетельствуют о поглощении растением определенного количества Мо из среды. Наличие в ней большого количества клеток азотобактера (варианты опыта 2 и 3) явно задерживают поглощение Мо растениями. Количество клеток в 1,5 и 0,75 млрд. уже мало влияет на данный процесс.

Таблица 52
Конкуренция за Мо между азотобактером и растением

Номер варианта	Схема опыта	Количество внесенных клеток азотобактера (млрд.)	Опыт 1		Опыт 2	
			Количество импульсов в растениях			
			Сроки анализа (в сутках)			
			2	5	2	7
1	Растение + Мо ⁹⁹ (контроль)	—	44	190	27	144
2	Растение + Мо ⁹⁹ + азотобактер	6	34	66	7	81
3	То же	3	34	62	24	76
4	» »	1,5	36	158	29	120
5	» »	0,75	40	168	26	114

При проверке полученных данных в условиях естественной почвенной среды проводили следующие исследования. В почву двух типов (подзол и чернозем), помещенную в сосудики, вносили раствор соединения Мо⁹⁹ в двух дозах: 12 и 20 мг на 100 г почвы. Туда же вносили культуру азотобактера. Через 24 ч почву высевали крупными комочками на чашку Петри с агаром Эшби. Спустя двое суток вокруг комочков можно было видеть пышно разившиеся колонии азотобактера. Осторожно, чтобы не затронуть почву, слизь культуры (3 млрд. клеток) была снята и подвергнута анализу на радиоактивность. Схема опыта и результаты измерений представлены в табл. 53.

Культура азотобактера поглощала Мо из почвы, причем выявить влияние типа почвы на этот процесс не удалось. По-видимому, адсорбционные свойства почвы в данном случае не влияли на поглощение Мо бактерией. Увеличение дозы Мо в данном случае также не сыграло роли.

Испытывали также сравнительное действие стабильного и радиоактивного молибдена на азотобактер и группу олигонитрофилов в отношении влияния этого микроэлемента на размножение и азотфиксацию бактерий. Можно было предположить, что общность физиологических функций (фиксация азота) таких

Таблица 53

Поглощение Мо азотобактером на почвы
(в имп/мин)

Вариант опыта	Подзол	Чернозем
Азотобактер из почвы с дозой 12 мг Мо	32	35
Азотобактер из почвы с дозой 20 мг Мо	31	34

бактерий, относящихся к различным родам, скажется в определенном влиянии на них Мо¹. Полученные данные, приведенные в табл. 54, подтвердили это предположение.

Таблица 54

Влияние Мо на азотфиксацию и размножение азотфиксирующих бактерий

Вид	Количество фиксированного азота на 1 г сахара (в мг)			Количество клеток (в млн. на 1 мл среды)	
	Без Мо	Мо стабильный	Мо радиоактивный	Мо стабильный	Мо радиоактивный
<i>Pseudomonas rubigenosa</i>	2,2	3,3	4,0	52	61
<i>Bact. liquefaciens</i>	3,3	3,7	4,5	67	70
<i>Mycobacterium vadosum</i>	3,7	4,5	4,9	41	49
<i>Bac. brevis</i>	3,8	5,2	5,9	—	—
<i>Micrococcus cinabareus</i>	4,0	5,1	5,4	43	47
<i>Mycobacterium mibicum</i>	4,1	6,1	7,0	75	87
<i>Bac. polymyxa</i>	4,8	6,7	7,3	115	120
<i>Mycobacterium lacticum</i>	5,0	5,8	6,2	42	50
<i>Bact. radiobacter</i>	5,7	6,4	7,2	75	92
<i>Bac. glutinosum</i>	5,8	5,9	6,1	14	12
<i>Bact. agile</i>	6,3	7,5	7,8	63	67
<i>Bact. herbicola</i>	7,1	1,6	8,0	151	165
<i>Azotobacter croococcum</i>	7,5	15,1	15,9	—	—
» » штамм К	7,8	13,5	14,4	200	280

Стабильный Мо усиливал азотфиксацию почти всех видов взятых в опыт бактерий. Однако азотфиксация у азотобактера под влиянием Мо повышалась значительно больше, чем у других бактерий. У олигонитрофилов азотфиксация повышалась в большинстве случаев (при действии стабильного Мо) с 12 до 40%, у азотобактера же — почти вдвое.

¹ Названия испытанных видов приводили в таблицах.

Интересно отметить положительное влияние радиоактивного Мо на азотфиксацию тех же бактерий. Внесение такого Мо повысило интенсивность азотфиксации у всех 12 взятых в опыты видов олигонитрофилов. Это увеличение различно у разных бактерий и колеблется в пределах 10—20% величины азотфиксации под действием стабильного Мо. Что же касается азотобактера (в опыт были взяты два штамма этой бактерии), то радиоактивный Мо также повысил его азотфиксацию, однако не в такой мере. Нужно отметить, что положительное влияние Мо оказывает при применении его в микродозе. Повышение же дозы свыше 50 мг/л начинает угнетать азотобактер. Олигонитрофилы менее отзывчивы на повышение дозы Мо.

Наряду с азотфиксирующей способностью определялось также влияние радиоактивного Мо на размножение культур. Оказалось, что все бактерии, показавшие повышение азотфиксации, лучше развивались в среде с радиоактивным Мо. Увеличение количества клеток бактерий было относительно пропорционально большей азотфиксации культур. Наши данные были подтверждены исследованием Крыловой (1964), показавшей положительное влияние молибдена и ванадия на азотфиксацию некоторых видов азотобактера.

Таким образом, было показано, что:

- 1) клетки азотобактера поглощают из среды молибден;
- 2) молибден поглощается в значительно большей степени молодыми, растущими, чем старыми клетками азотобактера;
- 3) покоящиеся молодые клетки азотобактера также активно поглощают молибден;
- 4) молибден проникает в клетки различных штаммов и видов азотобактера в неодинаковом количестве;
- 5) часть поглощенного клетками азотобактера молибдена выделяется в окружающую среду;
- 6) молибден, находившийся в клетках азотобактера, может затем проникать в высшие растения;
- 7) развиваясь в почве, содержащей Мо, азотобактер использует его;
- 8) радиоактивный изотоп молибдена, применяемый в микродозе, оказывает положительное влияние на азотобактер и различные виды олигонитрофилов, повышая активность их размножения и азотфиксации.

ЧАСТЬ VII

ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ РИЗОСФЕРЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Действие микроэлементов на почвенную микрофлору изучалось в естественных условиях ее обитания в ризосфере растений. Исследования микрофлоры ризосферы с применением микроэлементов заключались в изучении качественных и количественных ее изменений и корреляции этих изменений с урожаем сельскохозяйственных культур. Указанные наблюдения проводились в полевых опытах с различными сельскохозяйственными растениями.

Полевые опыты ставили на опытном поле экспериментальной базы Института микробиологии АН УССР «Феофания» в течение 6 лет в пятипольном севообороте по общепринятой методике (Константинов, 1950). Почва — дерново-подзолистая. Были использованы следующие культуры, в двухгодичных опытах каждая, по таким агрофонам:

Растение	Сорт	Предшественник	Удобрительный фон
Озимая пшеница	Лютесценс 17	Овес на сено	10 т перегноя под пахоту
Яровая пшеница	Лютесценс 62	Эспарцет	6 ц/га суперфосфата и 3 ц/га калийной соли
Сахарная свекла	Рамонская 0,6	Клевер	8 ц/га суперфосфата и 4 ц калийной соли, 5 кг азота селитры в рядки
Кукуруза	Грушевская	Яровые	4 ц/га суперфосфата и 4 ц/га калийной соли
Картофель	Сеянец 36	Озимь	То же

В схемы полевых опытов было включено изучение бора в виде буры, молибдена — Na_2MoO_4 , марганца — MnSO_4 . Имелось

в виду выяснить сравнительное действие микроэлементов (Мо, В, Мп) на почвенную микрофлору и урожай сельскохозяйственных растений, эффективность совместного применения микроэлементов и бактериальных препаратов (азотобактерина и фосфоробактерина) и действие микроэлементов, примененных совместно с минеральными и органическими удобрениями. Микроэлементы брали в дозах: В — 3 кг/га, Мо — 3, Мп — 5 кг/га. Дозы определяли по действующему началу микроудобрений.

Бактериальные удобрения вносили по общепринятой инструкции. Фосфоробактерин (Киевского завода бактериальных удобрений) жидкий применяли в дозе 100 мл/га, или 40 млрд. клеток на 1 га. Азотобактерин, изготовленный на штамме азотобактера К, торфяной препарат, вносили из расчета 3 кг/га (около 100 млрд. клеток на 1 га) путем бактеризации семян. Дозы солей В и Мо при совместном внесении с бактериальными удобрениями уменьшались до 2 кг/га.

В опытах с кукурузой и картофелем применяли гранулированный суперфосфат в дозе 40 кг/га действующего начала и перегной сыпец в количестве 5 т/га. Как тот, так и другой вносили в лунки под упомянутые растения.

Средние пробы почвы для исследования микрофлоры брали по диагонали делянок из ризосферы растений на глубине 10—15 см с соблюдением стерильности. Пробы брали в такие фазы роста растений: озимая пшеница — весеннее кущение, колошение, молочная зрелость; яровая пшеница — всходы, колошение, молочная зрелость; кукуруза — период 4 листочков, выбрасывание метелок, начало налива зерна; сахарная свекла — период 3—4 листочков, образование розетки, смыкание рядов; картофель — всходы, цветение, начало образования клубней. Полученные урожайные данные различных растений статистически обрабатывали.

Проводя исследования такого типа, необходимо было знать количество микроэлементов в почве. Соответствующие анализы изучаемых микроэлементов показали их наличие в таких количествах (определяли подвижные формы микроэлементов, количество которых отнесено к абсолютно сухой почве (в мг/кг):

Марганец — 203—359 (по методу Власюка и Горной, извлечением 0,5 н. H_2SO_4 с нагреванием)

Молибден — 0,13—0,17 (роданитовым методом, по Григу)

Бор — 0,56—0,54 (по методу Починка, извлечением водой при нагревании с хинализарином)

Цинк — 1,54—1,99 (по Пейве и Ринькису извлечением 1 н. KCl)

Медь — 6,92—8,13 (по методу Секдела, модифицированному в Институте физиологии растений АН УССР)

Данные определения свидетельствуют о сравнительно больших количествах в почве цинка и малых — молибдена. Количество бора и марганца соответствует таковому в большинстве дерново-подзолистых почв.

Микробиологическая часть исследований охватывала вопросы:

- 1) общее количество бактерий (растущих в средах);
- 2) количество актиномицетов и микроскопических грибов;
- 3) динамика бактерий различных физиологических групп: аммонификаторов, нитрификаторов, денитрификаторов, азотфиксаторов, бактерий аэробного и анаэробного разложения клетчатки, маслянокислого брожения;
- 4) определение потенциальной биологической активности микрофлоры почвы: аммонифицирующей, нитрифицирующей и азотфиксирующей;
- 5) динамика нитратов и фосфорной кислоты в почвах, являющаяся в основном результатом происходящих биопроцессов.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ БОРА, МОЛИБДЕНА, МАРГАНЦА НА МИКРОФЛОРУ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ

Количественные изменения микрофлоры после применения микроудобрений

В результате проведенных наблюдений удалось обнаружить разницу, иногда значительную, в количестве микроорганизмов, обитающих в ризосфере. В табл. 55 представлены данные по общему количеству бактерий, актиномицетов и грибов в 1 г почвы ризосферы разных растений.

Общее количество бактерий в ризосфере не одинаково. Так, в ризосфере озимой пшеницы на контрольной делянке их обнаружено 2,5 млн., яровой пшеницы — 4,3, кукурузы — 3,9, сахарной свеклы — 4, картофеля — 2,4 млн. на 1 г.

Изменение этого количества по фазам роста растений шло в одном направлении почти для всех растений: больше микроорганизмов обнаружено при втором взятии образцов, то есть при цветении зерновых, перед цветением картофеля и образовании розетки листьев у сахарной свеклы. Почти на всех делянках, где были внесены микроудобрения, численность микрофлоры увеличивалась в 1,5—2 раза. Особенно отмечены эти изменения при втором взятии образцов почвы. Больше действие оказывал молибден, затем марганец. Но в некоторых случаях эта последовательность нарушалась, и на первое место становился бор или марганец.

Подобную картину наблюдали и в отношении актиномицетов. Однако в динамике этих микроорганизмов отмечены существенные различия в сравнении с бактериями. При всходах яро-

Действие микроэлементов на общее количество бактерий, актиномицетов и грибов почвы (на 1 г почвы ризосферы)

Растение	Вариант опыта	Бактерии (в млн.)			Актиномицеты (в тыс.)			Грибы (в тыс.)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
Озимая пшеница	Контроль	2,5	3,5	1,8	1000	1100	900	300	600	150
	Бор	3,5	4,5	3,5	1600	1800	1000	800	900	100
	Молибден	4,5	7,0	3,8	1050	1600	1300	450	1200	190
	Марганец	2,9	3,0	2,3	1600	1800	1600	200	300	130
Яровая пшеница	Контроль	4,3	4,7	2,7	Не	500	900	Не исследовали		
	Бор	5,6	6,0	11,0	обна-	650	1500			
	Молибден	6,5	12,0	9,1	ру-	850	1200			
	Марганец	6,0	5,1	—	жено	800	1600			
Кукуруза	Контроль	3,9	4,5	2,9	55	450	1050	100	200	190
	Бор	6,2	6,9	2,8	105	600	1200	200	990	300
	Молибден	6,6	7,5	3,7	80	550	1000	200	410	520
	Марганец	4,9	4,9	2,9	100	500	1350	400	440	400
Сахарная свекла	Контроль	4,0	4,5	2,6	200	400	800	300	800	—
	Бор	4,6	5,0	2,8	300	900	800	600	1200	—
	Молибден	6,0	6,9	4,9	300	1100	1050	500	800	—
	Марганец	5,6	3,7	2,0	400	600	900	400	600	—
Картофель	Контроль	2,4	3,7	2,0	200	1500	1600	180	600	300
	Бор	2,3	4,8	2,2	400	1800	1600	280	600	800
	Молибден	3,8	4,8	2,6	400	2300	400	300	800	1100
	Марганец	2,9	3,4	2,9	400	1630	1700	1400	100	400

Примечание. В этой и последующих таблицах I, II, III обозначают: I — первую исследуемую фазу роста, II — вторую, III — третью.

вой пшеницы эта группа микроорганизмов не была обнаружена, а в ризосфере сахарной свеклы и кукурузы в этот же период она была в малых количествах (55—200 тыс. на 1 г почвы). Больше всего актиномицетов найдено в ризосфере озими (1000 тыс. особей в 1 г). В последующих фазах роста растений количество их увеличивается. Если в весенний период их было значительно меньше, чем бактерий, то осенью численность этих микроорганизмов почти одинакова. Актиномицеты меньше подвержены влиянию микроудобрений, чем бактерии, но все же и на этой группе сказались внесение микроэлементов. Численность их увеличивается под влиянием всех трех элементов, но первое место по силе действия занимают бор и марганец.

Положительное действие микроэлементов сказывается и на плесневых грибах. Последние найдены в ризосфере озимой пше-

ницы в больших количествах, чем у других растений, в меньших — у картофеля и кукурузы (300 тыс. на 1 г — у пшеницы, 180 — у картофеля, 100 тыс. на 1 г — у кукурузы). Как и у бактерий, численность грибов увеличивается в период цветения. Во все три периода роста грибов было больше на делянках с молибденом и бором и в некоторых случаях — с марганцем.

Данные третьего взятия проб, отобранных при созревании растений, мало отражали изменения в численности бактерий, которые сглаживались к концу вегетационного периода. Активирующее микрофлору действие микроэлементов сказалось и на бактериях различных физиологических групп.

Все микроорганизмы, осуществляющие основные процессы круговорота азота, разлагающие и минерализующие органическое вещество, а также фиксирующие азот атмосферы, в той или иной мере реагировали на внесение удобрений. В ризосфере взятых растений на контрольной делянке количество аммонифицирующих бактерий в 1 г почвы было равно 1 млн. и только у озимой пшеницы — 10 млн. Внесение микроудобрений повышало их численность в 10 и 100 раз. Такое повышение количества бактерий этой группы в весенний период наблюдалось в ризосфере у озимой пшеницы и кукурузы под влиянием бора и молибдена, у сахарной свеклы и картофеля — всех трех элементов. Это влияние продолжалось и в дальнейших фазах роста, несколько варьируя в зависимости от растения.

Нитрифицирующие бактерии, найденные в количестве 10—1—0,1 тыс. на 1 г в ризосфере растений на контрольной делянке, также увеличивались в численности в 10 раз у всех растений при внесении молибдена и в большинстве случаев при внесении других элементов.

Такое же действие микроэлементов обнаружено и в отношении денитрификаторов. Исключением являлась яровая пшеница, в ризосфере которой наблюдалось уменьшение количества этих бактерий при внесении бора и молибдена.

В почве данного участка («Феофания») на контрольной делянке азотобактер, находившийся, очевидно, в неактивном состоянии, не был обнаружен. Внесение молибдена активировало его, и при первом взятии проб он был найден в ризосфере всех растений, кроме яровой пшеницы. Кроме молибдена, такое же действие оказал и бор в ризосфере озимой пшеницы и марганец — в ризосфере свеклы. На последующих этапах исследования эта бактерия в большинстве случаев не была выявлена.

Бактерии маслянокислого брожения больше реагировали на микроэлементы в период цветения растений. Особенно это было заметно в опытах с пшеницей, свеклой и картофелем. Что касается кукурузы, то повышение численности этих бактерий в ее ризосфере относилось больше к периоду отрастания первых листочков розетки.

Бактерии аэробного и анаэробного разложения клетчатки реагировали на микроэлементы в ризосфере озимой пшеницы и сахарной свеклы. В условиях ризосферы яровой пшеницы на них действовали только бор и молибден. Что же касается кукурузы и картофеля, то особых изменений в количестве этих бактерий в их ризосфере не наблюдалось.

Биологическая активность почвы

Параллельно с приведенными исследованиями определялась потенциальная активность почвенной микрофлоры в отношении разложения органических веществ с образованием аммиака, процесса нитрификации и азотфиксации. Опыты проводили с почвой ризосферы упомянутых выше растений. Данные приведены в табл. 56.

Таблица 56

Изменения биологической активности микрофлоры почв под влиянием микроэлементов (NH_3 и NO_3 — в мг на 1 кг почвы, N — в мг на 1 г внесенного сахара)

Растение	Вариант опыта	Способность почвы					
		аммонифицирующая		нитрифицирующая		азотфиксирующая	
		NH_3		NO_3		N	
		I	II	I	II	I	II
Озимая пшеница	Контроль	125	119	8,3	5,8	6,2	9,4
	Бор	147	119	13,0	7,5	8,0	13,5
	Молибден	138	138	14,0	12,5	8,8	12,2
	Марганец	126	108	10,0	6,5	7,9	10,6
Яровая пшеница	Контроль	42	20	9,1	10,0	7,8	6,1
	Бор	90	65	14,0	27,0	8,7	8,6
	Молибден	105	45	13,0	29,0	9,0	8,1
	Марганец	81	52	12,0	18,0	9,0	7,9
Сахарная свекла	Контроль	85	33	20,0	—	13,2	—
	Бор	125	44	26,0	—	14,8	—
	Молибден	95	69	28,0	—	18,7	—
	Марганец	80	68	25,0	—	14,2	—
Сахарная свекла	Контроль	127	109	16,0	23,0	9,1	8,4
	Бор	159	109	20,0	20,0	11,7	9,2
	Молибден	173	109	16,0	31,0	14,0	11,2
	Марганец	152	92	20,9	24,0	10,9	9,6

Аммонификация. Процесс аммонификации проходил наиболее активно в ризосфере сахарной свеклы и озими. Все три взятые микроэлемента усиливали его. Особенно это отме-

чено в первой фазе роста яровой пшеницы. При пересчете на 1 кг почвы контрольной делянки получено 42 мг NH_3 , на делянках же с микроудобрениями — 81, 90, 105. Что касается остальных культур, то величина аммонифицирующей способности доходила до 159—173 мг NH_3 при контроле 85—127 мг. На первом месте по силе действия на микрофлору ризосферы яровой пшеницы и сахарной свеклы стоит молибден, влияние двух других элементов почти одинаково. В ризосфере же озими и кукурузы больше действовали бор, затем молибден. При втором взятии проб действие микроэлементов остается четко заметным только у яровой пшеницы и кукурузы.

Н и т р и ф и к а ц и я. То же можно сказать и о сопряженном с аммонификацией процессе нитрификации. Более активно этот процесс проходил в ризосфере кукурузы и свеклы. Действие микроэлементов было большим в почве под пшеницей. Все три элемента влияли на процесс с почти одинаковой силой. Во второй фазе роста усиление нитрификации от микроудобрений происходило в основном только в ризосфере пшеницы.

А з о т ф и к с а ц и я. Азотфиксирующая способность почв повышалась при внесении микроэлементов в меньшей степени, чем предыдущие два процесса. Однако усиление азотфиксации под влиянием удобрений достаточно показательно, особенно при внесении молибдена. Так, в ризосфере озимой пшеницы количество азота увеличивалось при пересчете на 1 г внесенного сахара до 7,9—8,8 мг при 6,2 мг в контроле, у сахарной свеклы — до 10,9—14,0 мг при 9,1 мг в контроле, у кукурузы соответственно до 14,2—18,7 мг при контроле в 13,2 мг. Действие бора и марганца в этом случае было почти равным.

Показатели потенциальной биологической активности свидетельствуют о возможности значительного влияния микроэлементов на почвенную микрофлору при разных культурах севооборота.

Динамика нитратов и фосфорной кислоты в почвах

Наряду с микробиологическими проводились агрохимические исследования в отношении динамики количеств нитратов и подвижной фосфорной кислоты в почве опытных делянок (табл. 57). Как известно, нитраты в ризосфере в период вегетации растений обычно отсутствуют благодаря быстрому использованию их растениями. Это также подтвердилось данными опытами: нитратов при втором и третьем взятии образцов не обнаружено. Однако весной, в первый период роста, они найдены под сахарной свеклой, кукурузой и картофелем. Количество их повышено на делянках с внесением микроудобрений. Так, под свеклой при внесении бора и марганца обнаружено

Таблица 57

Динамика нитратов и фосфорной кислоты в почве под влиянием микроэлементов (в мг на 1 кг почвы)

Растение	Вариант опыта	Нитраты	P ₂ O ₅		
		I	I	II	III
Озимая пшеница	Контроль	Нет	20	26	23
	Бор	Следы	88	36	35
	Молибден	7,5	39	28	32
	Марганец	Следы	26	26	35
Яровая пшеница	Контроль	Следы	60	83	59
	Бор	8,5	101	100	120
	Молибден	Следы	115	184	100
	Марганец	Следы	97	106	—
Кукуруза	Контроль	10,0	18,7	24	—
	Бор	11,1	28,8	34	—
	Молибден	18,1	27	—	—
	Марганец	13,1	21	—	—
Сахарная свекла	Контроль	35	86	65	59
	Бор	40	80	59	55
	Молибден	48	120	66	80
	Марганец	41	109	62	52
Картофель	Контроль	6,0	31	30	50
	Бор	Следы	40	42	—
	Молибден	Следы	82	63	—

40—41 мг NO₃ на 1 кг почвы, при внесении молибдена — 48 мг при контроле в 35 мг. В ризосфере кукурузы найдено NO₃ соответственно 11, 13, 18 мг при контроле в 10 мг/кг.

Такой же эффект получен и в отношении фосфорной кислоты. Ее подвижные формы обнаружены в различных количествах в зависимости от культур севооборота. Больше P₂O₅ найдено под яровыми и пропашными и меньше — у озими и кукурузы. У всех культур, кроме свеклы, количество P₂O₅ увеличивалось на делянках с бором; подобное действие оказывал и молибден. В период цветения растений разница сглаживается, но в культуре яровой пшеницы она достаточно показательна и в это время.

Увеличение количеств растворимых форм фосфорной кислоты и накопление нитратов происходит, по-видимому, за счет повышения активности микробиологических процессов, в частности нитрификации и бактерий, разлагающих органические и неорганические соединения, содержащие фосфор.

Полученные урожаи сельскохозяйственных культур в боль-

шинстве случаев коррелируют с наблюдаемыми изменениями в биологических процессах. Данные об урожае опытных культур приводим в табл. 58.

Таблица 58

Повышение урожая растений в условиях базы «Феофания» под влиянием микроэлементов (в ц/га)

Растение	Вариант опыта	Зерно	Солома	Прибавка на 1 га				Точность опыта ±Р% за 2 года
				ц		%		
				Зерно	Солома	Зерно	Солома	
Яровая пшеница	Контроль	10,0	16,5	—	—	—	—	±3,7% ±3,2%
	Бор	10,6	17,7	0,6	1,2	6,0	7,2	
	Молибден	11,1	18,6	1,1	2,2	11,0	13,3	
	Марганец	11,0	18,3	1,0	1,8	10,0	10,0	
Озимая пшеница	Контроль	27,5	66,2	—	—	—	—	±3,2% ±3,3%
	Бор	29,3	69,9	1,8	3,7	6,5	5,5	
	Молибден	29,0	68,1	1,5	2,0	5,4	3,0	
	Марганец	27,8	67,0	1,3	1,2	1,8	1,8	
Кукуруза		Початки	Стебли	Початки	Стебли	Початки	Стебли	±2,8% ±3,9%
	Контроль	47,1	104,1	—	—	—	—	
	Бор	51,2	111,2	4,2	7,1	8,9	6,8	
	Молибден	52,9	122,4	5,9	18,3	12,5	17,6	
Сахарная свекла		Корни	—	Корни	—	Корни	—	±2,5% ±3,3%
	Контроль	233	—	—	—	—	—	
	Бор	241	—	8	—	3,4	—	
	Молибден	248	—	15	—	6,7	—	
Картофель		Клубни	—	Клубни	—	Клубни	—	±2,4% ±3,1
	Контроль	175	—	—	—	—	—	
	Бор	180	—	5	—	2,6	—	
	Молибден	182	—	7	—	4,0	—	
	Марганец	184	—	9	—	5,1	—	

Как видно из приведенных данных, в условиях подзолистых почв базы «Феофания» микроэлементы давали определенный эффект. Их влияние больше сказалось на кукурузе и сахарной свекле, чем на других культурах. Все три взятых микроудобрения давали прибавку урожая. В зависимости от культуры эти прибавки были различной величины. Так, прибавки зерна яровой пшеницы получены в пределах 1 ц/га, озимой — до 1,8, кукурузы — 2—5,9 ц/га. Все полученные прибавки, даже относительно малые (яровая пшеница), представляют интерес для сельского хозяйства страны, принимая во внимание простоту и дешевизну применяемых микроудобрений.

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ УДОБРИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Участвуя в ферментативных процессах микроорганизмов, микроэлементы не могут не влиять на бактерии, используемые для изготовления бактериальных удобрительных препаратов. Результатом этого влияния является повышение действия препарата и получение больших урожаев сельскохозяйственных растений. О повышении действия нитрагина при совместном применении его с молибденом сообщают Образцова (1937), Афанасьева (1960).

Ратнер и Буркин (1959) указывают на высокую эффективность применения молибдена в посевах бобовых трав. Одни препараты нитрагина и азотобактерина давали прибавки урожая в пределах 4—6%. На фоне же молибдена с гранулированным суперфосфатом прибавки от препаратов повысились на 13—16% (без учета фона). При совместном же действии обогащенного молибденом гранулированного суперфосфата и бактериальных препаратов урожай удвоился. Применение такого сочетания привело к улучшению кормового качества сена — повысило содержание белка, каротинов и хлорофилла.

На торфяно-болотных и дерново-подзолистых почвах БССР в опытах Института мелиорации АН БССР (Вавуло, 1958) применение молибдена с азотобактерином значительно повысило урожай кукурузы; от азотобактерина повышение было равно 33%, при совместном внесении — 68%. Автор относит такое действие за счет повышения азотфиксирующей способности микрофлоры почв.

Повышение эффективности нитрагина в полевых и вегетационных опытах с люцерной, эспарцетом и викой в условиях Армянской ССР наблюдали Асланян и Бабаджанян (1956). К нитрагину добавляли бор, молибден и марганец в разных количествах. Наиболее постоянным и эффективным было действие бора, повышающее урожай сена на 15—20%. Положительное же действие марганца и молибдена было не постоянным.

Многочисленные исследования действия микроэлементов на микрофлору почвы и бактериальные удобрения проведены в условиях Эстонии Рахно (1950, 1953а, 1954, 1960). Им показано, что микроэлементы Мо, В, Мп повышали эффективность азотобактерина и урожай зерновых культур. Автор пришел к заключению, что препараты азотобактера эффективны только на почвах, где содержится спонтанная культура этой бактерии, то есть где имеются соответствующие условия для ее развития. Наряду с благоприятным действием минеральных и органических удобрений на развитие азотобактера в почве оказывают также влияние и микроудобрения. Автор предлагает в качестве удобрительных препаратов смеси органических веществ и микроэлементов,

которыми обрабатывают семена растений при посевах с целью создания благоприятных условий для развития почвенной полезной микрофлоры. Испытание таких смесей показало увеличение количества азота в почве, нитрифицирующей и азотфиксирующей микрофлоры (Рахно, 1961).

Широкие исследования с применением совместного действия микроэлементов и бактериальных удобрений проведены в Институте физиологии растений АН УССР (Власюк, Лисовал, 1960). Внесение марганца повышало действие азотобактерина и фосфоробактерина в отношении сахарной свеклы, кукурузы и озимой пшеницы.

Совместное действие бактериальных удобрений азотобактерина и фосфоробактерина с микроэлементами наблюдалось нами на нескольких растениях. Схема микробиологических исследований та же, что и в предыдущем разделе. Найденные изменения в общем количестве бактерий и актиномицетов приведены в табл. 59.

Под влиянием азотобактерина и фосфоробактерина общее количество бактерий и актиномицетов в ризосфере всех растений несколько увеличивается. Это увеличение колебалось в пределах 50% в зависимости от растения. Совместное внесение азотобактерина и молибдена увеличивало численность микроорганизмов в два раза. Несколько слабее было положительное действие бора.

Подобное действие на почвенную микрофлору наблюдалось и при внесении фосфоробактерина под кукурузу. В 1 г почвы контрольной делянки в ризосфере обнаружено 3,9 млн. бактерий и 600 тыс. актиномицетов. Внесение фосфоробактерина усилило рост микроорганизмов, и их численность повысилась до 4,6 млн. бактерий и 800 тыс. актиномицетов. При добавлении молибдена и бора найдено соответственно 6,8—5,9 млн. и 900 тыс.

Под влиянием этих удобрений повысилось также в почве ризосферы число олигонитрофилов. Особенно заметно на этой группе бактерий влияние молибдена и азотобактерина.

Численность бактерий различных физиологических групп также повышалась при совместном внесении удобрений, причем это увеличение количества микроорганизмов наблюдалось в течение всего вегетационного периода. Так, у большинства испытанных растений в их ризосфере повышалась численность аммонифицирующих и нитрифицирующих бактерий до 10 раз. Особенно это наблюдалось в ризосфере кукурузы и картофеля.

Несколько меньше проявилось действие совместного внесения на группу денитрифицирующих бактерий. В ризосфере яровой пшеницы и картофеля количество этих бактерий изменялось мало. В ризосфере же свеклы, озими и кукурузы (на делянке с фосфоробактерином) численность денитрификаторов также увеличилась в 10 раз.

Таблица 59

Общее количество бактерий и актиномицетов в почве ризосферы при совместном внесении бактериальных удобрений и микроэлементов (на 1 г почвы ризосферы)

Растение	Вариант опыта	Бактерии (в млн.)		Актиномицеты (в тыс.)	
		I	II	I	II
Озимая пшеница	Контроль	2,5	3,5	1000	1100
	Азотобактерин	3,2	4,3	1200	1600
	Азотобактерин+молибден	4,1	6,5	1800	3000
	Азотобактерин+бор	3,2	4,9	1100	2000
Яровая пшеница	Контроль	4,3	4,7	Не	500
	Азотобактерин	6,2	6,7	обна-	800
	Азотобактерин+молибден	8,5	8,3	руже-	1200
	Азотобактерин+бор	5,6	5,6	но	800
Кукуруза	Контроль	3,9	4,5	600	900
	Азотобактерин	3,4	6,1	700	1500
	Азотобактерин+молибде	6,8	7,2	900	1200
	Азотобактерин+бор	3,9	7,6	900	1300
	Фосфобактерин	4,6	5,3	800	1500
	Фосфобактерин+молибден	6,8	7,0	900	1400
	Фосфобактерин+бор	5,9	6,9	900	1400
Сахарная свекла	Контроль	4,0	6,0	400	700
	Азотобактерин	7,0	6,8	700	1400
	Азотобактерин+молибден	9,0	7,7	800	1500
	Азотобактерин+бор	6,5	7,3	1100	1200
Картофель	Контроль	4,8	6,5	500	3500
	Азотобактерин	5,7	7,2	600	3600
	Азотобактерин+молибден	6,7	9,0	1000	6000

Действие бактериальных удобрений в отношении азотобактера было положительным. Отсутствие последнего отмечено на контрольных делянках; при внесении азотобактерина комочки почвы из ризосферы растений этих делянок, высеянные на среду Эшби, начали обрастать азотобактером. При внесении одного азотобактерина получено 20—25% комочков обрастаний, при совместном внесении азотобактерина с бором и молибденом число комочков, обросших азотобактером, увеличилось соответственно до 48—75%. Более активно по фону азотобактерина действовал молибден. Наличие азотобактера обнаружено также и при втором взятии проб.

Влияние микроэлементов и бактериальных удобрений на маслянокислые бактерии сказалось главным образом весной. Везде, где были внесены эти удобрения, количество бактерий маслянокислого брожения увеличивалось.

Численность бактерий аэробного и анаэробного разложения клетчатки, обнаруженных в данном опыте, незначительна и характеризуется спадом их количества от первого взятия проб до третьего. Внесение микроэлементов, как и бактериальных удобрений, мало влияло на эту группу бактерий.

Потенциальная биологическая активность почвы при внесении бактериальных удобрений с микроэлементами усиливалась (табл. 60). Относительно больше сказывалось такое удобрение на процессах нитрификации и азотфиксации, чем на аммонификации. Микрофлора ризосферы яровой пшеницы более активно реагировала на совместное внесение, чем микрофлора ризосферы свеклы. Так, при внесении одного азотобактерина получено 51 мг NH_3 на 1 кг почв, при добавлении же бора — 63, молибдена — 83 мг аммиака, то есть аммонифицирующая способность усиливалась в 1,5—2 раза. В ризосфере свеклы это увеличение было только в 1,5 раза. Такие же изменения наблюдались и в процессах нитрификации.

Таблица 60

Биологическая активность микрофлоры почвы при совместном внесении бактериальных удобрений и микроэлементов (NH_3 и NO_3 — в мг на 1 кг почвы, N — в мг на 1 г внесенного сахара)

Растение	Вариант опыта	Способность почвы					
		аммонифицирующая		нитрифицирующая		азотфиксирующая	
		NH_3		NO_3		N	
		I	II	I	II	I	II
Яровая пшеница	Контроль	42	20	9,0	10,0	8,8	6,4
	Азотобактерин	51	26	12,0	14,0	11,7	8,6
	Азотобактерин+молибден	83	42	18,0	28,0	19,0	8,6
	Азотобактерин+бор	63	37	15,0	26,0	12,8	7,1
Сахарная свекла	Контроль	127	109	16,0	23,0	9,1	8,4
	Азотобактерин	150	100	24,0	20,0	18,7	9,2
	Азотобактерин+молибден	180	120	27,0	35,0	19,0	9,8
	Азотобактерин+бор	163	110	28,0	26,0	19,5	8,7

Азотфиксирующая способность микрофлоры ризосферы обоих взятых растений усиливалась в большей степени, чем вышеприведенные процессы. Так, у свеклы азотфиксация усиливалась в два раза на всех делянках, где был внесен азотобактерин. У пшеницы такое высокое действие наблюдалось только на делянках, где был внесен азотобактерин с молибденом.

Агрохимические показатели определений нитратов и подвижных соединений фосфорной кислоты (табл. 61) также подтверждают благоприятное действие совместного внесения удобрений

на микрофлору. Количество нитратов в почве ризосферы обоих растений увеличивалось. Особенно это заметно на делянках с внесением азотобактерина и молибдена. То же наблюдалось и с P_2O_5 в ризосфере пшеницы. Однако в ризосфере свеклы количество P_2O_5 несколько уменьшено. Возможно, что в данном случае происходит большее поглощение фосфора внесенной и местной, активированной микрофлорой.

Таблица 61

Динамика нитратов и фосфорной кислоты в почве ризосферы при совместном внесении бактериальных удобрений и микроэлементов (в мг/кг почвы)

Растение	Вариант опыта	Нитраты	P_2O_5	
		I	I	II
Яровая пшеница	Контроль	Следы	60	83
	Азотобактерин	6,2	75	110
	Азотобактерин+молибден	13,5	115	150
	Азотобактерин+бор	6,6	103	214
Сахарная свекла	Контроль	16,0	86	65
	Азотобактерин	17,0	87	48
	Азотобактерин+молибден	21,0	85	56
	Азотобактерин+бор	7,0	89	56

Полученный урожай опытных растений подтвердил благоприятное действие совместного внесения бактериальных удобрений с микроэлементами. Данные урожайности приводим в табл. 62.

Действие бактериальных удобрений на урожай озимой и яровой пшеницы и кукурузы было более эффективно при совместном внесении с микроэлементами. Подобные результаты были получены и другими исследователями в иных условиях применения бактериальных препаратов (Рахно, 1961; Ройзин и Эзрух, 1956).

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ С СУПЕРФОСФАТОМ И ОРГАНИЧЕСКИМИ УДОБРЕНИЯМИ

В данном опыте, как и в предыдущих, результаты микробиологических исследований показали положительное влияние микроэлементов на ризосферную микрофлору. Количественные изменения последней в значительной степени зависели от того, с каким компонентом (суперфосфат или перегной) они были внесены (табл. 63).

На делянках с внесением удобрений (суперфосфата и перегноя) количество бактерий и актиномицетов увеличивалось в

Таблица 62

Урожай растений под влиянием совместного внесения бактериальных удобрений и микроэлементов (в ц/га)

Растение	Вариант опыта	Зерно	Солома	Прибавка урожая				Точность опыта ± P% за 2 года
				ц/га		%		
				Зерно	Солома	Зерно	Солома	
Озимая пшеница	Контроль	27,5	66,2	—	—	—	—	±3,4 % ±2,1 %
	Азотобактерин	28,8	68,2	1,3	2,0	4,7	3,0	
	Азотобактерин+ молибден	30,2	70,2	2,7	4,0	9,9	6,0	
	Азотобактерин+ бор	29,3	68,7	1,8	2,5	6,5	3,8	
Яровая пшеница	Контроль	10,0	16,5	—	—	—	—	±2,6 %
	Азотобактерин	11,2	18,0	1,2	1,5	12,5	7,5	
	Азотобактерин+ молибден	12,2	19,2	2,2	2,7	22	16	
	Азотобактерин+ бор	11,7	18,2	1,7	1,7	17	10	
Кукуруза		Почат- ки	Стеб- ли	Почат- ки	Стеб- ли	Почат- ки	Стеб- ли	±2,2 % ±2,6 %
	Контроль	47,0	104,1	—	—	—	—	
	Азотобактерин	50,3	109,3	3,3	4,3	7,0	4,1	
	Азотобактерин+ молибден	52,1	114,1	5,1	10,0	10,8	9,6	
	Азотобактерин+ бор	51,0	—	4,0	—	8,5	—	
	Фосфоробактерин Фосфоробактерин+ молибден	52,7 54,5	114,0 121,0	5,7 7,5	10,0 12,0	12,1 16,0	9,6 11,4	

период отрастания листьев кукурузы и при ее цветении. То же наблюдалось и в ризосфере картофеля. При добавлении к этим удобрениям микроэлементов численность микрофлоры возрастала еще больше. Однако это увеличение не одинаково для этих двух растений. В то время как в ризосфере кукурузы оно было почти равным по обоим фонам, у картофеля по фону перегноя численность бактерий оказалась гораздо меньшей, чем по фону суперфосфата.

Количество бактерий разных физиологических групп увеличивалось на делянках с внесением суперфосфата и перегноя. При добавлении микроэлементов численность аммонификаторов, нитрификаторов и маслянокислых бактерий в ризосфере кукурузы и картофеля увеличивалась до 10—100 раз. Таким образом, действие микроэлементов было заметно и по фону внесенных удобрений.

Таблица 63

Влияние совместного внесения микроэлементов с суперфосфатом и органическими удобрениями на количество бактерий и актиномицетов в почве ризосферы (на 1 г почвы)

Вариант опыта	Общее количество			
	бактерий (в млн.)		актиномицетов (в тыс.)	
	I	II	I	II
<i>Ризосфера кукурузы</i>				
Контроль	3,9	4,5	360	600
Суперфосфат	4,8	5,6	600	400
Суперфосфат+молибден+бор	5,4	6,5	800	500
Перегной	5,6	6,3	1000	400
Перегной+молибден+бор	6,5	6,9	1200	600
<i>Ризосфера картофеля</i>				
Контроль	4,8	6,5	500	—
Суперфосфат	5,5	5,8	500	800
Суперфосфат+молибден+бор	9,0	10,0	600	800
Перегной	9,5	12,0	1200	1600
Перегной+молибден+бор	9,8	14,0	1600	1800

Несколько меньшее влияние наблюдалось в отношении денитрификаторов. Количество бактерий этой группы увеличивалось в 10 раз только при внесении микроэлементов с суперфосфатом. На фоне же перегноя количественных изменений денитрификаторов от внесения микроэлементов не происходило.

Азотфиксирующая микрофлора ризосферы также активировалась при совместном внесении указанных удобрений, особенно при внесении перегноя с микроэлементами; в этом случае интенсивность обрастания комочков почвы азотобактером возрастала.

Изменения в количестве бактерий наблюдались также и в группе олигонитрофилов. Учет их численности в ризосфере разных растений показал увеличение в зависимости от внесенного микроэлемента, а также фона, по которому последний был внесен. Данные исследования приведены в табл. 64.

При внесении Mo увеличение количества олигонитрофилов в ризосфере кукурузы было большим, чем при внесении В и Mn. В ризосфере озимой пшеницы больше действовал марганец. Микроэлементы усиливали развитие данной группы бактерий при внесении их по фону суперфосфата и перегноя. По-видимому, существует зависимость между действием микроэлементов и фосфорным питанием микроорганизмов, при усилении которого увеличивается и влияние микроэлементов. Данные по биоло-

Таблица 64

Количество олигонитрофилов в ризосфере
сельскохозяйственных растений (в тыс. на 1 г почвы)

Вариант опыта	Кукуруза		Картофель	
			I	II
Контроль	1020	1010	790	960
Суперфосфат	1150	1740	980	1160
Суперфосфат+молибден+бор	1250	2780	1310	1660
Перегной	1540	1100	1150	1000
Перегной+молибден+бор	2520	1620	1650	1000
Молибден+бор	1320	2250	900	1100
	Озимая пшеница		Кукуруза	
	I		I	
Контроль	500		320	
Бор	800		800	
Молибден	1000		1500	

гической активности почвы ризосферы взятых растений приведены в табл. 65.

В ризосфере кукурузы и картофеля добавление в почву микроэлементов активировало процессы превращения азотных соединений. Особенно это можно было отметить при совместном внесении микроэлементов с суперфосфатом. В этих вариантах опыта аммонифицирующая и азотфиксирующая способность почв повышалась почти в равной, а в некоторых случаях — в большей мере, как и при внесении микроэлементов с перегноем. Также наблюдалось повышение активности нитрифицирующей микрофлоры.

Благоприятное влияние на процессы нитрификации выразилось в накоплении нитратов в почве, которые были обнаружены в первой фазе роста на делянках со смесями суперфосфат+микроэлементы и перегной+микроэлементы.

Кроме нитратов на этих же делянках в первый период роста растений обнаружено значительное количество легкорастворимой фосфорной кислоты, доходящее до 154—334 мг на 1 кг почвы. Наличие таких форм фосфатов в меньших количествах было обнаружено и в последующие этапы исследований.

В результате проведенных опытов получены следующие данные урожая взятых культур (табл. 66). Применение микроэлементов дало прибавку урожая початков с 3,2 до 6,5 ц/га — в зависимости от компонентов, с которыми их вносили. При сов-

Таблица 65

Биологическая активность почв при внесении микроэлементов с суперфосфатом и перегноем (NH_3 и NO_3 — в мг на 1 кг почвы, N — в мг на 1 г внесенного сахара)

Растение	Вариант опыта	Способность почвы		
		аммонифицирующая	нитрифицирующая	азотфиксирующая
		NH_3	NO_3	N
		I	I	I
Кукуруза	Контроль	105	167	9,0
	Суперфосфат	169	180	10,8
	Суперфосфат + бор + молибден	260	200	17,8
	Перегной	350	274	12,8
	Перегной + бор + молибден	470	353	15,6
Картофель	Контроль	156	130	8,1
	Суперфосфат	209	138	7,0
	Суперфосфат + бор + молибден	378	147	18,1
	Перегной	292	260	14,1
	Перегной + бор + молибден	392	349	18,1

местном внесении с суперфосфатом эффективность микроэлементов увеличивалась на 5 ц/га, с органическими удобрениями — на 6,5 ц/га. Подобный эффект наблюдался и на картофеле. Прибавка с 6 ц/га повышалась до 10 и 15,1 ц/га.

Таким образом, совместное внесение суперфосфата и микроэлементов является эффективным приемом для развития микрофлоры и повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

Аналогичная картина получена и при применении микроэлементов с органическими удобрениями. Как известно, навоз и перегной имеют значительное количество различных микроэлементов (Демолон, 1961). Казалось бы, что при внесении такого рода удобрений растения и микроорганизмы не будут реагировать на микроэлементы. Однако применение бора и молибдена по фону упомянутого перегноя было эффективным.

Подобные данные получены при использовании бора при компостировании местных удобрений и применении этих удобрений под растения. Бор способствовал уменьшению потерь органического вещества и азота, а также повышал эффективность компоста (Вышинский, 1959).

Проведенные исследования почвенной микрофлоры показали определенное влияние на нее в условиях дерново-подзолистой почвы микроэлементов, внесенных под разные растения. В большинстве случаев численность исследуемых микроорганизмов

Таблица 66

Урожай кукурузы и картофеля при совместном внесении микроэлементов с суперфосфатом и перегноем (в ц/га)

Вариант опыта	Прибавка урожая			
	початков кукурузы		картофеля	
	общая	от микро-элементов по фону	общая	от микро-элементов по фону
Контроль. Урожай на 1 га	54	—	192	—
Суперфосфат	5	—	5,2	—
Суперфосфат+бор+молибден	10,0	5,0	15,3	10,1
Перегной	11,0	—	14,0	—
Перегной+бор+молибден	17,5	6,5	29,1	15,1
Бор+молибден	3,2	3,2	6	6

Примечание. Точность опыта с кукурузой за 2 года $P = \pm 2,6\%$, $\pm 2,1\%$; точность опыта с картофелем $P = \pm 3,7\%$, $\pm 3,7\%$.

увеличивалась. Это наблюдалось как у бактериального, так и у грибного и актиномицетного населения почвы. Количество микроорганизмов возрастало в 1,5—2 раза, а в некоторых случаях и больше. Бактерии были более отзывчивы на влияние микроэлементов, чем актиномицеты. Число последних, а также грибов было подвержено меньшим изменениям, но и на них сказалось упомянутое влияние.

Примененные микроэлементы действовали в различной степени в зависимости от микроэлемента и растения, в ризосфере которого находилась исследуемая микрофлора. Большее влияние оказывали молибден и марганец в сравнении с бором. Сильнее реагировали на микроэлементы микроорганизмы ризосферы сахарной свеклы и кукурузы. По-видимому, ризосфера растений в данном случае является определенным фактором, отражающимся на действии микроэлементов. Возможно, что в данном случае играют роль состав корневых выделений растений, изменения влажности и структурности почв или какие-либо другие факторы, относящиеся к условиям их произрастания.

Как известно, состав корневых выделений неодинаков у разных растений. Микроэлементы способны образовывать различные комплексы с органическими соединениями. Можно предположить, что в данном случае возникают такие комплексы, состав которых зависит от разнообразия корневых выделений. Эти образующиеся соединения могут играть определенную роль — как положительную, так и отрицательную — при использовании их почвенными микроорганизмами. Кроме того, по данным некоторых исследований (Березова с сотр., 1965), в ризосфере и на

корнях отдельных видов растений развиваются особые комплексы микрофлоры, обладающие различными физиологическими особенностями. Так, на корнях свеклы в определенные периоды преобладают денитрификаторы и флюоресценты, на корнях кукурузы — фосфорные бактерии. По-видимому, эти различные группы бактерий нуждаются в определенных микроэлементах. Отсюда может возникать наблюдаемое в опытах явление — влияние определенных микроэлементов в ризосфере отдельных растений.

Изменения в численности микрофлоры отмечены и на различных физиологических группах бактерий, обнаруженных в ризосфере растений. Больше реагировали на микроэлементы бактерии, принимающие участие в круговороте азота, меньше — разлагающие клетчатку и бактерии маслянокислого брожения. Данное явление в значительной степени зависит от сопряженности проходящих в почве процессов. Так, повышение количества нитрификаторов может зависеть как от непосредственного влияния микроэлементов, так и от увеличения от того же действия продуктов процесса аммонификации.

Различия в действии отдельных микроэлементов на различные группы микроорганизмов, по-видимому, также обусловлены функциональными особенностями последних. Их различные функции основаны на соответствующей ферментативной деятельности. И, естественно, она в отдельных ферментных процессах проявляется влиянием различных микроэлементов. Так, например, молибден влияет на размножение и усвоение азота азотфиксирующими бактериями, в частности азотобактера, и слабо действует на не усваивающих или мало усваивающих азот актиномицетов.

Интересно действие молибдена, а в некоторых случаях марганца и бора, на размножение азотобактера, которого без этих микроэлементов нельзя было выявить в данной почве. Такая активация этой бактерии свидетельствует об усилении процессов азотфиксации атмосферного азота. Это подтверждается также опытами с действием микроэлементов на биологическую активность микроорганизмов почвы в отношении аммонификации, нитрификации и азотфиксации. Потенциальная активность данной микрофлоры почти во всех случаях повышалась под действием микроэлементов.

При внесении микроэлементов увеличивалось количество олигонитрофилов, что также свидетельствует об усилении процессов связывания атмосферного азота.

Оптимальные условия для развития микроорганизмов создавало совместное внесение микроэлементов с бактериальными удобрениями. Под влиянием микроэлементов улучшалась приживаемость внесенного с азотобактерином азотобактера, азотфиксирующая способность почв значительно повышалась, дей-

ствии бактериальных удобрений сказывалось более эффективным.

Обнаруженная эффективность применения микроэлементов совместно с суперфосфатом особенно сказывалась на усилении биологических процессов превращения азотистых веществ почвы.

Действие микроэлементов в значительной степени зависело также от фона применяемых удобрений. Несмотря на то, что обычно в органических удобрениях (перегное) имеется определенное количество микроэлементов, применение в опытах молибдена и бора по фону этих удобрений также сказалось положительно на развитии микрофлоры ризосферы растений. Параллельно с активностью микрофлоры обнаружено увеличение в почве усвояемых форм азотных соединений (нитратов) и фосфорной кислоты.

Учет урожая опытных растений показал определенную корреляцию между повышением урожая зерна, соломы, корне- и клубнеплодов, початков кукурузы и повышением биологической активности почвы под действием микроэлементов. Прибавки урожая колебались в определенных границах, достигая 16% и больше, и зависели от применяемого микроэлемента, удобрительного фона и других факторов. Такое повышение урожайности различных растений на дерново-подзолистой почве имеет несомненное практическое значение и ценность для сельского хозяйства.

К числу факторов, влияющих на действие микроэлементов, относятся также метеорологические условия. Так, в наших опытах с яровой пшеницей в засушливую весну и лето наблюдалось меньшее их действие как на микрофлору, так и на урожай растения. В большой мере эффективность микроудобрений зависит от содержания микроэлементов в почве (Власюк, 1965).

В формировании урожая по всем вышепредставленным данным большое участие принимает микрофлора почв в связи с положительным действием на нее микроэлементов. Последнее не исключает их непосредственного действия на растения. По-видимому, эти оба процесса закономерны в естественных условиях при росте растений и имеют место при применении микроудобрений. В какой мере преобладает тот или иной путь воздействия микроэлементов, могут показать только дальнейшие исследования.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПОЧВАХ

Отзывчивость некоторых грибов и бактерий на микроэлементы послужила основой для разработки методов определения микроэлементов Mn и Cu в почве. Критерием этого метода было отсутствие роста тест-организма в среде без мик-

роэлемента, наличие которого возмещалось навеской почвы. Степень роста организма зависела от величины навески. Мульдер (Mulder, 1939, 1948) определял содержание меди в почве с помощью *Aspergillus niger*. Этот же гриб использовали Веттер (Wetter, 1954), Шеффер с сотрудниками (Scheffer, Kloks, Hüperhoff, 1957) и другие для определения меди в почве, а Николас (Nicholas, 1952) — в биологическом материале. Результаты таких лабораторных определений согласовывались с результатами полевых и вегетационных определений.

Однако несколько позже Мульдер и Герретсен (Mulder a. Gerretsen, 1952) нашли *Aspergillus niger* неудовлетворительным тестом для данного метода, поскольку образование грибом кислоты увеличивало количество усвояемых Cu и Mn .

Бентли с сотрудниками (Bentley, Snell, Phillips, 1947) использовали для определения марганца бактериальный тест — *Lactobacillus arabinosus*.

Для установления наличия ванадия в питательных веществах Хатнер (Hutner, 1958) предложил использовать *Ochromonas malhamensis*.

ЧАСТЬ VIII

СВЯЗЬ МЕЖДУ ДЕЙСТВИЕМ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ И РОСТОМ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Полученные результаты действия микроэлементов на биологические свойства микроорганизмов (изменения наследственных свойств, ферментативной активности, образования биологически активных веществ) и другие важные функции клетки свидетельствуют о возможности коррелятивной связи этих изменений с действием микроорганизмов на сельскохозяйственные растения. Последнее подтверждено полевыми опытами, в которых прибавки урожая растений в определенной мере соответствовали изменениям в активности и количестве микрофлоры.

Однако интересно было получить непосредственное доказательство такой взаимосвязи в ряду микроэлементы → микроорганизмы → растения. Данные, подтверждающие такие взаимоотношения, получены нами в лабораторных опытах со стерильными культурами, а также в вегетационных опытах.

Прежде всего надо было показать поступление микроэлементов, предварительно использованных микроорганизмами, в растение, то есть их реутилизацию.

Роль микроорганизмов в минеральном питании растений, в том числе и в использовании ими микроэлементов, показана многими исследованиями. Она чрезвычайно важна, поскольку микроорганизмы подготавливают в почве усвояемые формы различных соединений микроэлементов для растений. С другой стороны, микроэлементы могут поступать в растения после контакта с микробной клеткой. Пути такого использования растениями микроэлементов в качественном и количественном отношении не ограничены, принимая во внимание огромное количество микроорганизмов, населяющих ризосферу, и разнообразие их функций.

Применение радиоактивных изотопов в исследованиях позволило проследить динамику фосфора, серы, передающихся растению из клеток бактерий. Эти элементы в виде удобрений, аминокислот или витаминов, внесенные в почву или среду для бактерий, поступали в клетки последних, из которых, постепен-

но высвобождаясь в процессах метаболизма, затем усваивались растениями (Шавловский, 1953, 1954; Котелев и Гаркавенко, 1954; Смалый, 1956; Ахромейко и Шестакова, 1958).

Такого рода динамика молибдена была показана в наших опытах с азотобактером. Поглощенный этой бактерией, Mo^{99} поступал затем в среду и в проростки растений в процессе их роста.

Последовательный переход Mo^{99} от бактерий к растению был также подтвержден рядом приведенных ниже опытов с другими микроорганизмами. Так, были выделены из ризосферы пшеницы и кукурузы многочисленные виды бактерий, из которых отобраны общие для взятых растений, растущие на соответствующей среде. Эти виды (табл. 67) выращивали на синтетической среде № 1 Красильникова с добавлением Mo^{99} . При дальнейших исследованиях в клетках всех этих видов был обнаружен Mo^{99} . Количество его, судя по импульсам, было неодинаково у разных видов и колебалось в относительно нешироких пределах — 1 : 2.

Таблица 67

Поступление Mo^{99} из клеток бактерий в проростки растений (количество имп/мин на навеску 50 мг ткани проростков)

Номер культуры	Вид	Растение			
		Озимая пшеница	Кукуруза	Яровая пшеница	Овес
1	<i>Bac. megaterium</i>	30	39	28	36
2	<i>Bac. glutinosus</i>	32	39	28	25
3	<i>Bac. oligonitrophilus</i>	39	33	47	47
4	<i>Mycobact. vadosum</i>	14	45	36	34
5	<i>Ps. fluorescens</i>	22	36	24	23
6	<i>Bact. herbicola</i>	28	29	17	22
7	<i>Bact. agile</i>	35	40	26	35
8	<i>Ps. radiobacter</i>	28	36	33	30
9	<i>Ps. sinuosa</i>	35	37	39	44
	Контроль (без бактерий)	2	4	4	5

Эти микроорганизмы суточного возраста были внесены в стерильные культуры проростков различных растений, выращиваемых в больших пробирках с 15 мл среды Прянишникова. Поверхность семян растений была простерилизована обработкой H_2O_2 и вся система пробирка — растение — среда выдерживалась стерильно. Бактерии вносили в количестве 20 млрд. клеток каждого вида на пробирку под проростки пятидневного возраста.

Через три дня после внесения бактерий производились анализы на радиоактивность растений, то есть на поступление Mo^{99} в ткани проростков.

Оказалось, что все растения через 3 дня после внесения бак-

терий в той или иной мере содержали Mo^{99} . Из четырех растений несколько больше его поглотила кукуруза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что все взятые виды бактерий поглощали Mo^{99} , что показывает общность данного явления для почвенных бактерий; в процессе их метаболизма этот элемент выделялся в среду. Возможно также предположить, что в среду выделялась только часть поглощенного молибдена, параллельно же клетки усваивали из среды новые количества этого элемента, необходимые им для некоторых биологических процессов. Выделенный из клеток молибден поглощался растениями, в данном случае проростками озимой и яровой пшеницы, кукурузы, овса.

На примере Mo^{99} можно думать об аналогичном процессе с другими видами микроэлементов, обнаруженных в составе тканей растений. Приведенные же данные указывают на определенную связь между растением и микроорганизмами при использовании ими микроэлементов.

Другие опыты также подтверждают взаимосвязь между растением и бактериями в использовании микроэлементов. Так, были взяты в чистых культурах девять видов бактерий (см. табл. 67) с добавлением азотобактера. Все эти бактерии выращивали с соблюдением одинаковых условий параллельно на среде с микроэлементами (Mo , B , Mn) и без них. Через двое суток роста культуры снимали шпателем с агаризованной среды и из них делали суспензии, которые использовали в опытах. Как те, так и другие культуры вносили в пробирку под растения. В каждую пробирку вносили смесь десяти видов бактерий.

В первом опыте с проростками озимой пшеницы методика была тождественна с приведенной выше, то есть выращивали растения в стерильных условиях, в больших пробирках со средой Прянишникова. Культуры бактерий вносили в количестве 1 млн. клеток каждого вида на пробирку с растением.

Опыт второй был заложен по той же схеме, но в условиях микровегетационных опытов со стерильной почвой. Зерна засеивали с предварительно простерилизованной поверхностью (озимая пшеница, кукуруза, овес). С семян овса предварительно снимали чешую. На пятый день роста проростков в чашки вносили в разные варианты опыта суспензии бактерий, выращенных без микроэлементов и с ними, а также одни растворы микроэлементов, взятых в количестве: Mo — 20, B — 5, Mn — 50 мг на чашку. Результаты обоих опытов приведены в табл. 68.

Данные, полученные в этих опытах, интересны, так как они в известной мере указывают на взаимоотношения в определенных условиях бактерий с высшими растениями. В опыте № 1 одни микроэлементы без бактерий увеличили вес проростков только на 3%. Следовательно, растения, развиваясь на среде Прянишникова, которая, по-видимому, вполне удовлетворяла их

Действие бактерий и микроэлементов на рост проростков в стерильных условиях (вес — в г и %)

Вариант опыта	Опыт 1 (в жидкой среде)		Опыт 2 (в почвенных условиях)								
	Озимая пшеница		Озимая пшеница			Кукуруза			Овес		
	г	%	г	%		г	%		г	%	
				1	2		1	2		1	2
Контроль (нестерильный)	—	—	10,0	100	—	11,0	100	—	8,0	100	—
Контроль (стерильный)	6,1	100	4	40	100	6	54	100	3,2	40	100
Бактерии, выросшие без микроэлементов	5,3	87	8,8	88	220	11,6	105	193	7,8	99	244
Бактерии, выросшие на среде с микроэлементами	6,8	112	10,5	105	262	12,4	113	208	8,7	108	272
Микроэлементы (без бактерий)	6,3	103	4,3	43	107	6,9	63	115	2,2	27	69

Примечание. 1 — процент к контролю нестерильному, 2 — процент к контролю стерильному.

требования, не реагируют на микроэлементы. Не исключена также возможность, что эта среда содержит достаточное для растений количество микроэлементов в качестве примесей к солям.

Внесение бактерий (без микроэлементов) угнетает растения. Возможно, что бактерии в этом случае, при тесном контакте в жидкой среде с корнями растений, конкурируют с ними за питательные вещества.

Внесение бактерий, выращенных на средах с микроэлементами, дало другие результаты. В первые дни в этом варианте опыта растения были также как бы угнетены, затем эта депрессия исчезла, растения приобрели ярко-зеленый цвет и хорошо росли. В результате в этом варианте опыта получена прибавка веса проростков на 12%. Объяснить это явление можно действием нескольких факторов, проявившихся под влиянием микроэлементов: а) большим снабжением азотом среды при активной деятельности азотобактера и некоторых олигонитрофилов; б) ускорением процессов жизнедеятельности бактерий, при которых происходит освобождение из клеток, а может быть, и синтез усвояемых растениями питательных веществ; в) освобождением из клеток микроэлементов в формах, более приемлемых для растений, что ведет к изменению состава среды в более благо-

приятном направлении; г) большим выделением этими бактериями активирующих рост веществ и многим другим.

В стерильном опыте № 2 в условиях почвы наблюдалась иная картина, почти аналогичная для всех трех растений. В стерильной почве проростки этих растений развивались плохо, вес их был равен соответственно 40, 54, 40% веса нестерильного контрольного варианта. (Мы не останавливаемся на этом явлении угнетения растений в стерильной почве, поскольку оно известно из литературы).

Внесение в определенный вариант опыта микроэлементов незначительно повысило вес проростков на стерильной почве (на 3—9%) у первых двух растений и проявило еще большее угнетение в отношении овса.

Добавление бактерий, выросших на обычных (без микроэлементов) средах, резко усилило рост проростков, вес которых увеличился почти в два раза, достигнув 88, 99, 105% к контрольному весу на нестерильной почве, и 193, 220, 244% — к контролю на стерильной.

Еще больше усилился рост всех трех растений при добавлении бактерий, выросших на средах с микроэлементами. Вес проростков в этих вариантах опыта больше веса проростков на нестерильной почве на 5—8%, а в случае кукурузы — на 13%.

Таким образом, внесение комплекса бактерий, выделенных из ризосферы, нивелировало токсическое действие на проростки простерилизованной почвы, причем действие бактерий, выросших на средах с микроэлементами, проявлялось более активно. Объяснением последнего могли служить уже высказанные соображения.

Полученные данные в определенной мере были подтверждены материалами вегетационных опытов, заложенных по той же схеме, но без стерилизации почвы. Растения — яровая пшеница

Таблица 69

Урожай зерна пшеницы и овса при раздельном внесении микроэлементов и бактерий (на сосуд)

Вариант опыта	Яровая пшеница		Овес	
	г	%	г	%
Контроль	10,1	100	11	100
Микроэлементы	10,8	108	11,8	107
Бактерии, выросшие без микроэлементов	10,9	109	12,2	111
Бактерии, выросшие на средах с микроэлементами	11,6	115	12,9	118

сорта Лютесценс 62 и овес Верхнячский. Бактерии — тех же видов, что и в микровегетационных опытах, в комплексе вносили в количестве 1 млрд. клеток каждого вида на сосуд. Семена бактеризовали суспензией клеток. Остатки суспензии после обработки зерна вносили в почву сосуда. Результаты опытов приведены в табл. 69. Как видно из ее данных, вес зерен пшеницы и овса в варианте опыта с микроэлементами повысился на 7—8%. Несколько выше было действие внесенных бактерий, давшее прибавку урожая 9—11%. При внесении же бактерий, выращенных на средах с микроэлементами, урожай зерна повысился на 15—18%.

Действие внесенных бактерий больше сказалось на овсе, чем на пшенице. По-видимому, повышение активности культур под действием микроэлементов благоприятно отражается на росте растений и, в конечном результате, на их продуктивности.

Проведенные опыты в определенной мере подтверждают действие микроэлементов, включившихся в жизненные процессы микроорганизмов, на рост и продуктивность сельскохозяйственных растений.

ЧАСТЬ IX

РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ

(грибным и бактериальным)

Определенную роль играют микроэлементы в снижении грибных, бактериальных и вирусных заболеваний растений. В этом случае можно говорить о непосредственном действии (бактерио- или фунгицидном) на возбудителя заболевания и об их косвенном действии, в той или иной мере отражающемся на устойчивости растений против возбудителей заболеваний.

Данный вопрос начал изучаться только в последние годы в связи с изучением физиологических особенностей растений при действии на них микроэлементов. По мнению Страхова (1959) и других исследователей, применением микроэлементов можно повысить устойчивость сортов сельскохозяйственных культур, приближая их свойства к естественно иммунным сортам. У растений с приобретенным иммунитетом возникают процессы, в основном сходные с таковыми у естественно иммунных сортов, угнетающие или убивающие проникшего в них возбудителя. Микроэлементы, использованные растением, влияя на эти биохимические процессы, могут влиять и на его иммунные свойства. Этот интересный вопрос вызвал многочисленные исследования устойчивости зерновых и других культур к головневому, ржавчинным и мучнисторосяным грибным заболеваниям, вызывающим массовое поражение сельскохозяйственных культур, а также к бактериозам растений. Микроэлементы использовались при корневом, внекорневом и других приемах внесения. Значительное уменьшение поражаемости растений упомянутыми грибами дали Mn, Ni, Zn, Fe, Cu, B. В опытах Страхова и Ярошенко (1952) железо снижало поражаемость овса пыльной головней в 4—8, цинк — в 3 раза. Марганец снижал поражение головней ячменя в 33 раза, никель — в 13, цинк — в 3 раза.

Подобные результаты получены в различных республиках СССР, а также за рубежом. Применение бора увеличивало стойкость пшеницы к ржавчинным и мучнисторосяным грибам.

В отношении технических культур Березовой и Судакевич (1960) установлено благоприятное действие бора при бактериозах и фузариозах льна. Тот же микроэлемент и другие снижали в несколько раз поражение бобовых трав бактериозами (Бельтюкова и др., 1964). То же можно сказать относительно сахарной свеклы, подсолнечника, кенафа. Микроэлементы повышали устойчивость картофеля к фитофторе и другим заболеваниям. В опытах Гедзь (1958) наблюдалось снижение на 17—34% поражаемости этой культуры раком. Защитное действие микроэлементов наблюдалось в культурах овощных, плодовых и ягодных.

Особого внимания заслуживает действие микроэлементов на вирусные заболевания растений. Правда, таких исследований немного, но имеются сообщения о действии цинка на X-вирус персика, марганца — на заболевание нитевидностью картофеля, марганца и бора — на штриховатость и мозаичность томатов, на Y-вирус картофеля и некоторые другие. По данным Рыжкова и Марченко (1957), наиболее сильное влияние на размножение вируса мозаики табака оказали Cu, Co, As.

Устойчивость растений против бактериальных заболеваний повышается даже при кратковременном воздействии микроэлементов, например при инъекции их в сосудистую систему растения или обработке семян. Это обычно проявляется в большой густоте всходов, возникающей благодаря снижению зараженности молодых растений.

Убедительны опыты с заражением отдельных частей растения грибной инфекцией. Предварительная обработка этих частей микроэлементами, особенно цинком и никелем, исключала развитие инфекции. При длительном воздействии микроэлементов (например, при внесении в почву) положительные случаи их действия наблюдаются чаще.

Устойчивость растений зависит также от количества поступивших в него микроэлементов. Их действие проявляется не только в год применения, но и в последующие годы — как последствие. Повышение устойчивости к заболеваниям зависит от сорта растений, а в некоторых случаях передается в потомство. Так, например, реагируют некоторые сорта картофеля и помидоров.

Действие микроэлементов особо положительно по фону удобрений. Так, в опытах Пересыпкина и Мусатовой (1960) марганец и медь были наиболее эффективны по фону удобрений в повышении устойчивости клевера к бактериозам и в повышении стойкости озимого рапса к бактериозам корней (Пересыпкин, 1956). Смеси микроэлементов в ряде случаев влияют на устойчивость растений сильнее, чем отдельные элементы. По данным Гедзя (1958), уменьшение заболевания картофеля раком при использовании смеси микроэлементов было равно 34%, тогда

как отдельные элементы понижали заболеваемость только на 17%.

Имеются сведения о возможности оздоровления заболевших растений при применении цинка и бора (кила капусты, поражение мучнисторосяными грибами). Такое действие микроэлементов может получиться в результате подавления некоторыми элементами (особенно медью) ферментов, необходимых для жизни фитопатогенных грибов и бактерий.

В других случаях под действием микроэлементов увеличивается механическая прочность покровных тканей к воздействию возбудителя. Это относится главным образом к мучнисторосяным грибам. Утолщение покровных тканей, вызываемое бором и марганцем, вступающими в соединение с пектиновыми веществами оболочки у картофеля, затрудняет проникновение в клубень фитогфторы. По данным Власюка (1952), марганец способствовал утолщению клеточных стенок механической ткани стебля пшеницы.

У льна борные удобрения улучшают углеводный режим, что повышало его устойчивость к заболеваниям, вызываемым *Vas. taserans*. По мнению Каталымова (1957), Березовой и Судаковой (1960), применение борных удобрений может полностью устранить бактериозы льна.

Устойчивость растений может быть также связана с возможным влиянием микроэлементов на повышение содержания антибиотических веществ в корневых выделениях. В подтверждение этого показано, что устойчивые сорта растений выделяют в почву вещества, тормозящие рост микроорганизмов ризосферы. Такое наблюдалось в ризосфере табаков, льна и других растений.

Интересны исследования Страхова и Ярошенко (1959), установивших, что Fe, Mn, Zn, B, Ni, Cu повышают интенсивность прорастания хламидоспор головневых грибов, которые затем дегенеративно изменяются и погибают в почве.

Данные Страхова (1959) по выяснению характера защитных реакций у растений говорят о ряде регрессивных изменений грибов (ржавчинных, головневых, мучнисторосяных) в клетках растений, выросших с применением микроэлементов. Перерождение содержимого мицелия нередко заканчивалось полным разтворением последнего.

Микроэлементы усиливают развитие микоризы, которая также способствует устойчивости растений. Примененные совместно с антибиотиками (стрептомицином, агримицином и др.), они усиливали действие последних на возбудителя (Чжан Хедзин, 1960; Gambogi et al., 1959). Возможно, что в этом случае усиление фунгицидного смесей объясняется ослаблением проницаемости клеток растений, облегчавшее проникновение антибиотиков.

Микроэлементы способны замедлять физиологическое старение ботвы и тем самым усиливать устойчивость картофеля против фитофторы. К таким же положительным факторам относится усиление микроэлементами фотосинтеза растений и связанного с ним образования пластических веществ, усиление энергии дыхания и ферментативных процессов, что дает клеткам растений возможность быстрее активизировать защитные реакции против внедрения и для борьбы с инфекцией.

К непосредственному защитному действию микроэлементов (Mn, Zn, B, Cu) относится инактивация токсинов и ферментов, выделяемых болезнетворными возбудителями (особенно грибами) в клетках и почве (Маленев, 1961). Так, пиколиновая кислота, входящая в состав фузариевой кислоты, относящейся к токсинам, связывается тяжелыми металлами хелатным путем. Токсины инактивируются не только отдельными микроэлементами, но и соединениями, в которые они входят. Такими являются соединения некоторых ферментов с металлами. Однако иногда использование микроэлементов при инактивации токсинов вызывает недостаток их в растениях, что отрицательно отзывается на росте и развитии последних.

Влияние цинка на токсин грибов рода фузарий, вызывающих увядание растений, может также объясняться его действием на соединения, содержащие сульфгидрильные группы. Этот элемент связывает и инактивирует данные токсины. С другой стороны, цинк и другие микроэлементы рекомендуются против той же болезни хлопка как уменьшающие содержание продуктов гидролиза пектина у растения и понижающие активность соответствующих ферментов у грибов, возбудителей болезни.

Некоторые наблюдения говорят также об усилении под влиянием микроэлементов образования фитонцидов в растениях, действующих угнетающе на болезнетворных возбудителей.

Таким образом, литературные данные и проведенные экспериментальные исследования указывают на определенное действие микроэлементов (Mo, B, Mn, Zn) на почвенную микрофлору.

Эти микроэлементы активировали важнейшие ферментативные системы микроорганизмов: дыхание, дегидрирование, каталазную, протеолитическую и амилазную активность.

Под влиянием микроэлементов у микроорганизмов усиливается образование биологически активных веществ — витаминов группы В и гетероауксина, — изменяются морфолого-культуральные и некоторые функциональные особенности с последующим закреплением и передачей их по наследству. Применение радиоактивного Mo^{99} показало поглощение его микроорганизмами, выделение в среду и передачу растениям. В условиях полевых опытов под влиянием микроэлементов наблюдалось повышенное размножение бактерий, актиномицетов и грибов в

ризосфере разных растений. Это сопровождалось повышением биологической активности почвенной микрофлоры, особенно бактерий азотного обмена. Эти изменения сказывались на динамике питательных веществ для растений в почве — нитратов и растворимых форм P_2O_5 . Как результат повышения активности микрофлоры отмечено увеличение урожайности сельскохозяйственных культур, достигающее в некоторых случаях значительных размеров.

Исходя из всего сказанного, можно считать, что положительное действие микроэлементов на сельскохозяйственные растения является сложным процессом, в котором определенную активную роль играют почвенные микроорганизмы.

ЛИТЕРАТУРА

- Абуталыбов М. Г.—В кн.: Тр. Ин-та земледелия Азерб. акад. с.-х. наук, 6, 3—13, 1961.
- Абуталыбов М. Г., Газиева Н. П.—Уч. зап. Азерб. ун-та. Сер. биол., 1, 45—59, 1961.
- Аллен М. Б.—В кн.: Тр. V Междунар. биохим. конгр. VI симпозиум, М., 1962.
- Асланян Г. Ш., Бабаджанян И. К.—В кн.: Влияние микроэлементов на повышение эффективности нитрагина. Изд-во АН АрмССР, 9, 1, 1956.
- Афанасьева А. Л.—В кн.: Аннотации трудов конференции «Микроэлементы в с. х., биол. и мед.», Новосибирск, 1960.
- Ахромейко А. И. и Шестакова В. А.—В кн.: Микробиология, 27, 1, 67—73, 1958.
- Баррон Е.—В кн.: Физиология бактерий, ИЛ, М., 1954.
- Бартон Д. Стереохимия.—В кн.: Перспективы развития органической химии. Под ред. А. Годде, ИЛ, М., 1959.
- Басс-Шадхан Х. Ф.—В кн.: Тр. Ин-та экспер. мед. АН ЛатвССР, 22, 145—146, 1960.
- Басс-Шадхан Х. Ф.—Бюлл. уч. совета по пробл. «Биол. роль микроэлементов», 2, 23—24, 1962.
- Басс-Шадхан Х., Цирите А., Копилева Л.—Изв. АН ЛатвССР, 3, 89—92, 1962.
- Беляков Е. Б. Распространение и активность азотобактера и молибдена в почвах.—В кн.: Рефер. докл. на конф. по микроэлем. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1950.
- Бельтюкова К. И., Матишевська М. С.—Микробиол. журн., 26, 4, 1964.
- Березова Е. Ф.—Агробиология, 5, 45—55, 1953.
- Березова Е. Ф.—В кн.: Роль микроорганизмов в питании растений, М., 1953а.
- Березова Е. Ф. и Судакова Л. В.—В кн.: Бактериальные болезни растений, М., 1960.
- Березова Е. Ф., Сорокина Г. А., Кочунова В. В., Михалева В. В., Новогрудская Е. О., Судакова Л. В.—В кн.: Роль микроорганизмов в питании растений, 1965.
- Бернштейн Ф. Я.—Успехи совр. биологии, 25, 2, 1948.
- Бернштейн Ф. Я.—Успехи совр. биологии, 27, 3, 1949.
- Бернштейн Ф. Я.—Успехи совр. биологии, 29, 2, 1950.
- Бернасовская Е. П.—В кн.: Мат. научн. конф. Киевск. ин-та эпидемиолог., 2, 64—66, 1960.
- Бершова О. И.—Микробиол. журн., 13, 1, 32—53, 1951.
- Бершова О. И. Повідомлення I.—Микробиол. журн., 18, 1, 5—12, 1956.
- Бершова О. И.—В кн.: Вопросы почвенной микробиологии, Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 115—121, 1958.
- Бершова О. И.—Микробиол. журн., 21, 4, 3—10, 1959.
- Бершова О. И.—Микробиол. журн., 22, 5, 14—19, 1960.
- Бершова О. И.—Микробиол. журн., 22, 6, 1—7, 1960а.

- Бершова О. И.—Микробиол. журн., 22, 3, 3—9, 1960б.
- Бершова О. И.—Микробиол. журн., 23, 3, 13—18, 1961.
- Бершова О. И.—В кн.: Микроорганизмы и эффективное плодородие почвы, Изд-во АН СССР, М., 301—307, 1961а.
- Бершова О. И.—В кн.: Применение микроэлементов, полимеров и радиоактивных изотопов в сельском хозяйстве, 1, Изд-во УАСХН, 149—153, 1962.
- Бершова О. И.—В кн.: Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине. Тр. IV Всесоюзн. совещ. по микроэлементам, 187—190, К., 1963.
- Бершова О. И., Козлова И. А.—Тезисы докл. 3-го Межвузовского совещания, Изд-во Ростовского ун-та, 88—89, 1962.
- Бершова О. И., Козлова И. А. Повідомлення I.—Мікробіол. журн., 24, 2, 34, 1962.
- Бершова О. И., Козлова И. А. Повідомлення II.—Мікробіол. журн., 24, 5, 15—20, 1962а.
- Бершова О. И., Козлова И. А.—В кн.: Применение микроэлементов, полимеров и радиоактивных изотопов в сельском хозяйстве, 2, Госсельхозиздат УССР, К., 102—106, 1962б.
- Бойсен-Иенсен П. Ростовые гормоны растений. Биомедгиз, М., 1938.
- Бойченко Е. А.—В кн.: Микроэлементы в сельском хозяйстве, 44—50, К., 1963.
- Бойченко Е. А., Саенко Г. Н., Удельнов Г. М.—Тезисы докладов I Всесоюзн. биохим. съезда, 1, 1964.
- Брей Д., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. ИЛ, М., 1958.
- Буромский И.—Изв. Моск. с.-х. ин-та, 4, М., 1912.
- Буткевич В. С. Избранные труды. Т. I, М., 1957.
- Буткевич В. С., Баринова Н. И.—В кн.: Тр. Ин-та пищевой промышленности, 2, 5, 165—186, 1932.
- Вавуло Ф. П.—В кн.: Получение и применение бактериальных удобрений. Изд-во АН УССР, К., 1958.
- Велли Б. Л.—V Междунар. биохим. конгр. IV симпозиум, М., 1961.
- Васильев Г.—Журнал эксперим. биол. и мед. Сер. 4, 14, 37, 17—21, 1930.
- Вернадский В. И. Биогеохимические очерки. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1940.
- Вильямс Р. Д. Доклад на V Междунар. биохим. конгр. IV симпозиум, М., 1961.
- Виноградов А. П.—В кн.: Микроэлементы в жизни растений и животных, М., 1952.
- Виноградский С. Н.—Успехи биол. хим., 6, 1928.
- Виноградский С. Н. Микробиология почвы. Изд-во АН СССР, М., 1952.
- Власюк П. А. Применение марганцевых удобрений в СССР. Изд-во АН УССР, К., 1952.
- Власюк П. А.—В кн.: Микроэлементы в с. х. и мед., 111—123, М., 1956.
- Власюк П. А. Марганцеве живлення і удобрення фослін. Вид-во УАСГН, К., 1962.
- Власюк П. А. Докл. на II Укр. республ. конфер. по физиол. раст. К., 1964.
- Власюк П. А.—Тезисы докл. на IX Менделеевском съезде, 1965.
- Власюк П. А., Лісовал П. З.—В кн.: Фізіологічні особливості живлення с.-г. рослин мікроелементами, 21, Вид-во УАСГН, 18—29, 1960.
- Власюк П. А., Климовицкая З. М.—Изв. АН СССР, Сер. биол., 5, М., 1961.
- Власюк П. А., Климовицкая З. М., Визирь К. Л.—Изв. АН СССР. Сер. биол., 6, 865—873, 1960.
- Власюк П. А., Климовицкая З. М., Лейденская Л. Д., Рудакова Э. В.—Первый Всесоюзн. биохим. съезд. Тезисы докладов, 2, 1964.

- Воробьева А. И.—ДАН СССР, 138, 2, 450—453, 1961.
 Воробьева А. И.—ДАН СССР, 145, 6, 1381—1384, 1962.
 Вышинский А. М.—Земледелие, 1, 1959.
 Гапон Е. И.—Микробиология, 16, 3, 1947.
 Гедзь С. М.—Агробиология, 2, 1958.
 Гейл Э.—В кн.: Физиология бактерий, ИЛ, М., 1954.
 Гречушкин И. И.—Микробиология, 30, 1, 35—41, 1961.
 Грибанов В. М.—Микробиол. журн. АН УРСР, 16, 3, 1954.
 Грин Д. Е.—V Междунар. биохим. конгресс. Пленарный доклад, М., 1961.
 Грин Н. и Нейрат Г.—В кн.: Белки, 3, 2, 7—151, ИЛ, М., 1959.
 Грин Д. Е., Гриффикс Д. Е., Дуг К. А., Уортон Д. С.—V Междунар. биохим. конгресс. IV симпозиум, М., 1961.
 Гродзинская К. П.—Микробиология, 28, 4, 1959.
 Деева В. П.—В кн.: Микроэлементы в с. х. и мед., М., 1955.
 Демолон А. Рост и развитие культурных растений. Сельхозгиз, М., 1961.
 Диксон М. и Уэбб Э. Ферменты. ИЛ, М., 1961.
 Диневич А. С.—В кн.: Тр. Молд. ин-та эпидем., микроб. и гит., 5, 79—88, 1961.
 Доросинский А. М.—В кн.: Сб. тр. плен. секц. удобр. ВАСХНИЛ, 19—25, 1953.
 Жизневская Г. Я., Пейве Я. В., Тенисоне И. В.—Первый Всесоюз. биохим. съезд. Тезисы докладов, 3, Л., 1964.
 Заварзин Г. А.—ДАН СССР, 113, 6, 1361—1362, 1957.
 Заварзин Г. А.—Микробиология, 27, 5, 542—546, 1958.
 Иерусалимский Н. Д. Азотное и витаминное питание микробов. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1949.
 Имшенецкий А. А.—Микробиология, 3, 545—548, 1961.
 Имшенецкий А. А. и Солнцева Л. И.—Микробиология, 13, 1, 1944.
 Исаин В. Н.—В кн.: Сб. работ кафедры ботаники ТСХА, М., 1958.
 Калантырь М. С.—Докл. ВАСХНИЛ, 2, 1937.
 Касимова Г. С.—В кн.: Уч. зап. Азербайдж. ун-та. Сер. биол., 2, 9—13, 1961.
 Катыльмов М. В. Микроэлементы и их роль в повышении урожайности. М., 1957.
 Кедров-Зихман О. Қ.—В кн.: Микроэлементы в жизни растений и животных. М., 1952.
 Килер Р. и Варнер Д.—В кн.: Микроэлементы, ИЛ, М., 386—403, 1962.
 Клиндаре А. Я.—В кн.: Микроорганизмы и растения. Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 17—31, 1963.
 Клиндаре А. Я., Креслинь Д.—В кн.: Наука—сельскому хозяйству, Изд-во АН ЛатвССР, 5, 31—34, 1961.
 Клотц М.—В кн.: Белки, ИЛ, М., 520—601, 1956.
 Ковальский В. В.—В кн.: Микроэлементы и естественная радиоактивность почв, Ростов-на-Дону, 1959.
 Ковальский В. В.—В кн.: Микроэлементы в с. х. и мед., ГИСХЛ, К., 1963.
 Константинов П. Н. Основы сельскохозяйственного опытного дела. Сельхозгиз, М., 1950.
 Костычев С. П. Избранные труды. Т. I. М., 1956.
 Котелев В. В., Гаркавенко А. И.—Известия Молдавского филиала АН СССР, 1 (15), 1954.
 Котелев В. В., Мехтиева Е. А., Смирнова В. И.—Тезисы докл. на Всесоюз. конф. по с. х. микробиол. Л., 1963.
 Котелев В. В. Автореф. дисс., 1965.
 Красильников Н. А.—ДАН СССР, 14, 2, 87, 1944.
 Красильников Н. А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. Изд-во АН СССР, М., 1958.

- Креслинь Д. Я.—В кн.: Микроорганизмы и растения, Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 61—69, 1963.
- Креслинь Д. Я.—В кн.: Микроорганизмы и растения, Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 41—61, 1963а.
- Круссер О. В., Якимов П. А., Ждепичкая Т. А., Кудряшева Г. Ф.—В кн.: Тр. Ленингр. хим.-фарм. ин-та, 9, 66—70, 1960.
- Крылова Н. Б.—Изв. АН СССР, 5. Сер. биол., 1962.
- Крылова Н. Б.—Тезисы докл. на Всесоюзн. конфер. с. х. микробиол., 1963.
- Крылова Н. Б. Автореф. дисс., М., 1964.
- Кузнецов В. П.—В кн.: Микроэлементы в жизни растений и животных, 561—568, 1952.
- Ламбин А. З.—Рефераты докладов на конфер. по микроэлементам, М.—Л., 1950.
- Летунова С. В.—В кн.: Применение микроэлементов в с. х. и мед., Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 525—530, 1959.
- Летунова С. В.—Микробиология, 28, 4, 1959а.
- Лилли В. и Бернетт Г. Физиология грибов. ИЛ, М., 1953.
- Маленев Ф. Е. Микроэлементы в фитопатологии. М.—Л., 1961.
- Малер Г.—В кн.: Соврем. пробл. биохимии, ИЛ, 319—335, 1957.
- Мальмстром Б. Г., Розенберг А. и Линдског С.—Доклад на V Междунар. конгр. биохимиков. IV симпозиум, М., 1961.
- Мальцева Н. М.—Микробиол. журн. АН УРСР, 23, 6, 11—17, 1961.
- Матушвили С. И.—Микробиология, 16, 1, 1947.
- Миротворский К. А. и Григорян Г. М.—Изв. Туркм. филиала АН СССР, 5—6, 1945.
- Михлин Д. М. Биологическое окисление. Изд-во АН СССР, М., 1956.
- Мишустин Е. Н.—В кн.: Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 3, 1954.
- Мишустин Е. Н. Микроорганизмы и плодородные почвы. Изд-во АН СССР, М., 1956.
- Мишустин Е. Н.—Изв. АН СССР, 2, 283—308, 1962.
- Мишустин Е. Н. и Пушкинская О. М.—Изв. АН СССР. Сер. биол., 5, 764—776, 1961.
- Наместникова В. И.—В кн.: Химия и технология антибиотиков. Тр. Ленингр. хим.-фарм. ин-та, 9, 78—88, 1960.
- Нейландс Д. Ж. и Штумпф П. Очерки по химии ферментов. ИЛ, М., 1958.
- Нейрат Г.—V Междунар. биохим. конгр. IV симпозиум, М., 1961.
- Неклюдов Б. М.—В кн.: Тр. Горьковской оп. станции, 1959.
- Николаев Л.—В кн.: Возникновение жизни на земле. Тр. Междунар. симпозиума. Изд-во АН СССР, 1959.
- Образцова А. А.—Микробиология, 6, 1937.
- Озолия В.—В кн.: Вопросы почвенной микробиологии, 2, 1958.
- Пересыпкин В. Ф. Автореф. докт. дисс., 1956.
- Пересыпкин В. Ф. и Мусатова Л. П.—Тезисы докл. III совещ. по иммунитету растений, Кишинев, 1960.
- Пейве Я. В. Микроэлементы и ферменты. Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 1960.
- Пейве Я. В. Биохимия почвы. Сельхозгиз, М., 1961.
- Пейве Я. В. Микроэлементы и их значение в сельском хозяйстве. Сельхозгиз, М., 1961а.
- Пейве Я. В.—«Правда», № 317, 1963.
- Пейве Я. В.—В кн.: Микроэлементы в с. х. и мед., 133—137, 1963а.
- Пейве Я. В. Доклад на IX Менделеевском съезде, 1965.
- Пейве Я. В. и Краул А. Е.—ДАН СССР, 117, 906—909, 1957.
- Пошон Ж. и де Баржак Г. Почвенная микробиология. ИЛ, М., 1960.
- Ратнер Е. И., Буркин И. А.—В кн.: Применение микроэлементов в с. х. и мед. Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 1959.
- Рахно П. Х. Рефер. докл. на Конф. по микроэлементам, М., 1950.

- Рахно П. Х.— Земледелие, 1, 1953.
- Рахно П. Х. Автореф. дисс., Таллин, 1953а.
- Рахно П. Х.— Изв. АН Эстонской ССР, 3, 2, 1954.
- Рахно П. Х.— Микробиология, 28, 2, 229—234, 1960.
- Рахно П. Х.— В кн.: Тр. Ин-та микробиол., 11, М., 1961.
- Разницына Е. И.— ДАН СССР, 18, 6, 1938.
- Ройзин М. Б. и Езрух Э. Н.— В кн.: Получение и применение бактериальных удобрений. Изд-во АН УССР, К., 1956.
- Рубенчик Л. И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве, К., 1960.
- Рубенчик Л. И., Бершова О. И.— В кн.: Применение микроэлементов в с. х. и мед. Изд-во АН ЛатвССР, Рига, 417—421, 1959.
- Рубенчик Л. И., Зиновьева Х. Г., Бершова О. И.— В кн.: Изменчивость микроорганизмов, Изд-во АН УССР, 111—123, 1955.
- Рыжков В. Л., Марченко Н. К.— Микробиология, 3, 1957.
- Савельева Л. В. Автореф. дисс., М., 1954.
- Смалій В. Т.— Микробиол. журн., 18, 3, 1956.
- Смалій В. Т.— Микробиол. журн., 20, 4, 1958.
- Смалій В. Т.— Микробиол. журн., 25, 2, 6—8, 1963.
- Смалій В. Т., Бершова О. И. Повідомлення I та II.— Микробиол. журн., 9, 4, 17—24, 1948.
- Смалій В. Т. и Бершова О. И.— Микробиол., 26, 5, 526—532, 1957.
- Стайлс В. Микроэлементы в жизни растений и животных. ИЛ, М., 1949.
- Страхов Т. Д. О механизме физиологического иммунитета растений к инфекционным заболеваниям. Харьков, 1959.
- Страхов Т. Д., Ярошенко Т. В.— В кн.: Микроэлементы в жизни растений и животных, М., 1952.
- Страхов Т. Д. и Ярошенко Т. В.— В кн.: Применение микроэлементов в с. х., Рига, 1959.
- Торчинский Ю. Я.— Успехи совр. биологии, 51, 3, 261—284, 1961.
- Троицкий Е. П.— Вестник Московского ун-та, 5, 48—56, 1960.
- Турчин Ф. В.— В кн.: Тр. Всесоюзн. конф. по применению изотопов в народном хоз. и науке. Изд-во АН СССР, М., 1958.
- Турчин Ф. В.— Почвоведение, 10, 1960.
- Турчин Ф. В., Берсенева З. И., Жидких Г. Г.— ДАН СССР, 19, 3, 731—735, 1963.
- Упитис В. В.— В кн.: Тр. I биохим. конф. Прибалт. респ. и Белоруссии, Tartu, 188—194, 1961.
- Упитис В. В.— В кн.: Тр. Ин-та биологии АН ЛатвССР, Рига, 1962.
- Ушакова В. И.— ДАН СССР, 122, 3, 520, 1958.
- Федоров М. В.— Микробиол., 18, 4, 1949.
- Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы. Сельхозгиз, М., 1952.
- Холодный Н. Г. Фитогормоны. Изд-во АН СССР, М., 1939.
- Хьюитт Э. Песчаные и водные культуры в изучении питания растений. ИЛ, М., 1960.
- Чайковская С. М. и Дружинина Е. И.— Микробиол., 26, 5, 609—614, 1957.
- Челядинова А. Н. и Судакова А. В.— Агробиология, 4, 1952.
- Черномордик А. Б. Автореф. дисс., 1959.
- Шавловский Г. М.— ДАН СССР, 91, 5, 1213—1217, 1953.
- Шавловский Г. И.— ДАН СССР, 95, 6, 1954.
- Шавловский Г. М.— В кн.: Физиология и биохимия микроорганизмов. Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 6, 157—167, М., 1959.
- Шемаханова Н. М. Автореф. докт. дисс., М., 1959.
- Школьник М. Я.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 5, 686—706, 1960.
- Школьник М. Я.— Тимирязевские чтения, 23, Изд-во АН СССР, М., 1963.
- Школьник М. Я.— Первый Всесоюзн. биохим. съезд. Тезисы докл., 1964.
- Школьник М. Я. и Маевская А. Н.— ДАН СССР, 145, 1, 1962.

- Школьник М. Я. и Давыдова В. Н.—ДАН СССР, 144, 3, 1962.
 Школьник М. Я., Крупникова Т. А., Дмитрова Н. И.—В кн., Микрорэлементы в с. х. и мед., 76—79, 1963.
 Щепкина О. И.—В кн.: Роль микроэлементов в с. х., Изд-во Московского ун-та, 229—238, 1961.
 Acker R. F. a. Lechevalier H.—Appl. Microb., 2, 152—157, 1954.
 Adiga P. R., Sastry K. S., Sarma P. S.—Biochem. a. Biophys. Acta, 64, 3, 546—548, 1962.
 Adler R. H., Snoke J. E.—J. Bact., 83, 1313—1317, 1962.
 Adrian J.—C. r. Acad. Sci., 233, 25, 2183—2185, 1956.
 Ainsworth G. C.—Journ. Gen. Microbiol., 1, 335—343, 1947.
 Albert A. a. Gledhill W. S.—Biochem. Journ., 41, 529—533, 1947.
 Albert A.—Biochim. J., 54, 4, 646, 1953.
 Amaha M. a. Ordal J.—J. Bact., 74, 5, 596—604, 1957.
 Anderson G. R., Jordan J. V.—Soil. Sci. 92, 2, 113—116, 1961.
 Arnon D. J.—Univ. of Wisconsin Press., 313—314, 1952.
 Arnon D. J., Ichioka P. S., Wessel G., Fujrwarra A., Woobley J. T.—Physiol. Plantarum, 8, 538—551, 1955.
 Aurich H.—Arch. Microb., 133, 1, 46—48, 1959.
 Bach M. K.—Bioch. et Biophys. Acta, 26, 1, 104—113, 1957.
 Bailey J. a. Cavallito C. J.—J. Bact., 45, 30—31, 1943.
 Bangh C. L., Myoda T., Bates D. S., Werkman C. H.—Jowa State J. Sci., 34, 1, 113—118, 1959.
 Bassalik K., Neubauer I.—J. Soc. Bot. Polon. Acta, 481—493, 1934.
 Bauernfeld A., Poschenrieder H.—Bauer Landwirtsch., Jahrb., 37, 610—618, 1960.
 Becking J. H.—Plant a. Soil., 14, 1, 1961.
 Bentley O. G., Snell E. E. a. Phillips P. H.—J. Biol. Chem., 170, 343—350, 1947.
 Bergel F., Bray R. C.—Biochem. Soc. Sympos., 15, 1958.
 Bertrand G. a. Javillier M.—Acad. Sci., Paris, 152, 225—228, 1911.
 Bertrand G. a. Javillier M.—Ann. Inst. Pasteur, 26, 241—246, 1912.
 Bertrand G.—Bull. Soc. Chim. France, 4, 11, 400—406, 1912.
 Bertrand G.—Zbl. Bakt., 2, 39, 488—496, 1913.
 Bertrand D.—Compt. rend. Acad. Sci., 213, 254—257, 1941.
 Bertrand D.—Ann. Inst. Pasteur, 68, 226—246, 1942.
 Bertrand D., De Wolf A.—Compt. rend. Acad. Sci., 24, 1877—1880, 1955.
 Bertrand D., Wolf A.—Compt. rend. Acad. Sci., 246, 17, 2537—2539, 1958.
 Bertrand D., Wolf A.—Compt. rend. Acad. Sci., 249, 21, 2237—2239, 1959.
 Bertrand D., Wolf A.—Compt. rend. Acad. Sci., 252, 5, 799—801, 1961.
 Bertrand D., Wolf A.—Compt. rend. Acad. Sci., 253, 13, 1342—1344, 1961a.
 Blank L. M.—J. Agr. Res., 62, 129—160, 1941.
 Blom I.—Biochem. Z., 184, 385, 1928.
 Bortels H.—Biochem. Z., 182, 301—358, 1927.
 Bortels H.—Arch. Mikrob., 1, 190, 333—342, 1930.
 Bortels H.—Zentr. f. Bakt., 2, 95, 193—213, 1936.
 Bortels H.—Arch. Mikrob., 1, 8, 1937.
 Bortels H.—Arch. Mikrob., 8, 13—26, 1937a.
 Bortels H.—Zentr. f. Bakt., 2, 100, 373, 1939.
 Bortels H.—Arch. Mikrobiol., 11, 155—186, 1940.
 Bortels H.—Arch. Microb., 25, 3, 226—245, 1956.
 Brack A.—Helv. Chim. acta, 30, 1—8, 1947.
 Brenchley W. E. a. Thornton H. G.—Proc. Roy. Soc., London, B, 98, 373—393, 1925.
 Bukatsch F. u. Heitzer H.—Arch. Mikrob., 17, 79—96, 1952.
 Burger K. u. Bukatsch F.—Zentralblatt f. Bakt., 2, 111, 1958.

- Burk D.—Erg. d. Enzym., 1934.
- Burk D. a. Horner C.—Trans. of 3rd Intern. Congr. of Soil Sci., 1, 152—155, 1935.
- Burk D. a. Horner C.—Proc. 3rd Intern. Congr. Microb., 1940.
- Burris R. H. a. Wilson—Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956.
- Buromsky I.—Zentralblatt Bakt., 2, 36, 54, 1913.
- Calvin M.—A symposium on the mechanism of enzyme action, Baltimore, 1954.
- Carnahan J. E., Castle J. E.—J. Bakt., 75, 2, 1958.
- Carnahan J. E., Mortenson L. E., Castle J. E.—J. Bact., 80, 3, 3111—3115, 1960.
- Cartwright W. J. a. Cain R. B.—Biochem. J., 73, 2, 305—314, 1958.
- Castle J. B.—J. Bact., 75, 121, 1958.
- Chain E. B., Tonolo A. a. Carilli A.—Nature, 176, 645, 1955.
- Chaloupka J.—Folia Biol., 3, 24—30, 1957.
- Chariet L., Rosenblum C. a. Woodbury D.—Science, 111, 601—602, 1950.
- Chen H. K.—Nature, 22, 142, 753, 1938.
- Chester C. G. a. Rolinson G. N.—Biol. Rev., 26, 239—252, 1951.
- Chester C. G. a. Rolinson G. N.—J. Gen., Microbiol., 5, 559—565, 1951a.
- Ciegler A. a. Raper K.—Arch. f. Mikrob., 37, 188—192, 1960.
- Clark J. a. Macleod R.—J. Biol. Chem., 211, 2, 531, 1954.
- Clayton G. E., Hems B. A.—Biochem. J., 38, 452—458, 1944.
- Cohn M.—A symposium on the mechanism of enzyme action, Baltimore, 1954.
- Coleman J. E. a. Vallee L.—J. Biol. Chem., 235, 2, 390—395, 1960.
- Courtney R., Gustafson R., Westerback S., Hygtiainen H., Chaberek S., Martell A.—J. Am. Chem. Soc., 79, 3030, 1957.
- Curran U., Evans F.—J. Bact., 67, 4, 489—497, 1954.
- Curtin T., Fitzgerald G.—Biochem. J., 34, 1605—1610, 1940.
- Darken M. A.—The Botanical Rev., 19, 2, 99—130, 1953.
- Davies E. B. a. Stockdill S. M.—Nature, 178, 866, 1956.
- De Renzo E. C., Kaleita E., Heytler P., Oleson J., Hutlings B., Williams J.—Arch. Bioch. Biophys., 45, 247, 1954.
- Desreux V., Hacha R., Frederic E.—J. Gen. Physiol., 45, 2, 93—102, 1962.
- De Terk W. E., Bernheim F.—Arch. Biochem., Biophys., 90, 2, 1960.
- Dingle J. T., Heath J. C., Webl M., Daniel M.—Bioch. et Biophys. Acta, 65, 1, 34—46, 1962.
- Doy C. H.—Rev. Pure and Appl. Chem., 10, 3, 185—205, 1960.
- DuImage H.—Appl. Microb., 1, 103—106, 1953.
- Eisswein A. u. Schwartz W.—Zentr. f. Bakt., 2, 100, 99, 1939.
- Enari T.—Acta Chem. Scand., 9, 17—26, 1955.
- Enari T.—PЖBX, 19, 25409, 1958.
- Epstein E.—Plant. Phys., 36, 4, 437—444, 1961.
- Esposito R. G. Master's thesis Universit. of Wisconsin, Madison, 1954.
- Esposito R. G. a. Wilson P. W.—Bioch. et Bioph. Acta, 22, 186, 1956.
- Evans H.—Soil Sci., 81, 3, 199—208, 1956.
- Eyster C.—Nature, 170, 755, 1952.
- Ezekiel W. N.—Phytopath., 35, 159—161, 1945.
- Faguet M. et Goudot A.—Ann. Inst. Pasteur, 101, 6, 860—868, 1961.
- Fischer J.—Planta, 32, 395—413, 1942.
- Folk J. E. a. Gladner J. A.—J. Biol. Chem., 235, 60, 1960.
- Foster J. W.—Bot. Rev., 5, 207—239, 1939.
- Foster J. W.—Academ. Press., New York, 1949.
- Foster J. W. a. Waksman S. A.—Journ. Am. Chem. Soc., 16, 127—135, 1939.

- Foster W. a. Waksman S. A.—*J. Bact.*, 37, 599—617, 1939a.
 Foster J. W., Woodruff H. B., McDaniel L. E.—*J. Bact.*, 46, 421—433, 1943.
 Foster J. W., Woodruff H. B., McDaniel L. E.—*J. Bact.*, 51, 465—478, 1946.
 Frieden C.—*Bioch. Biophys. Acta*, 27, 431, 1958.
 Fukumoto Y., Jamamoto T., Tsuru D., Kakumae M.—*Bull. Agric. Chem. Soc. Japan.*, 24, 5, A, 48, 1960.
 Gallicchio V. a. Gottlieb D.—*Mycologia*, 50, 490—496, 1958.
 Gerretsen F. a. Hoop H.—*Plants a. Soil*, 4, 349—367, 1954.
 Geser G.—*Arch. Mikrobiol.*, 41, 4, 408—440, 1962.
 Ginzaburo S.—*Biochem. et Biophys. Acta*, 45, 3, 616—617, 1960.
 Gollmick F.—*Zentr. Bakt.*, 93, 421—442, 1936.
 Gorbach G. u. Koch O.—*Arch. Mikrob.*, 23, 284—296, 1955.
 Gorbach G., Dedic G., Koch O.—*Arch. Mikrob.*, 22, 1, 78—86, 1955.
 Gorbach G., Koch O., Brovmander A.—*Zbl. Bak.*, 11, 109, 1—4, 1—12, 1956.
 Gorbach G., Terranova T., Terranova J.—*Arch. Mikrob.*, 26, 1, 1—10, 1957.
 Gorbach G., Terranova T., Terranova J.—*Arch. Mikr.*, 26, 1, 11—19, 1957a.
 Goucher C. a. Kocholaty W.—*J. Biol. Chem.*, 211, 613—629, 1954.
 Grav F. H. a. Wilson P. W.—*J. Bact.*, 3, 490—496, 1962.
 Greaves J. E.—*J. Agric. Res.*, 6, 389—416, 1916.
 Greaves J. E.—*Soil Sci.*, 36, 267—280, 1933.
 Grimm P. a. Allen P. J.—*Plant. Phys.*, 29, 4, 1954.
 Grunert R. R., Rohdenburg E. L.—*Arch. Bioch., Biophys.*, 86, 2, 185—189, 1960.
 Gunsalus D. In: Discussion on the symposium above the mechanism of enzyme action, Baltimore, 1954.
 Günther E., Meschkat H.—*Deutsch. Landwirtschaft.*, 6, 10, 498—501, 1955.
 Gurd F. a. Wilcox P.—*Acad. Press. N.—Y. Advanc. in Proteins Chem.*, 11, 311—427, 1956.
 Hagen V.—*Bioch. J.*, 76, 3, 56, 1960.
 Hall H. H., Benedict R. G., Wiesen C. F., Smith C. E. a. Jackson R. W.—*Appl. Microb.*, 1, 124—129, 1953.
 Hamer—*Chemotherapy*, 11, 8, 498—505, 1961.
 Hata J.—*PЖBX*, 6/C412, 1961.
 Heim A.—Thesis. Rutgers Univ., New Brunswick, 1956.
 Heim A. a. Lechevalier H.—*Micologia*, 48, 5, 628—636, 1956.
 Hellerman L. a. Stok C.—*J. Biol. Chem.*, 125, 771—793, 1938.
 Hendlin D., Ruger M.—*Science*, 111, 541—542, 1950.
 Herzinger H.—*Bodenk. Pflanz.*, 31, 1, 1940.
 Hewitt E. J.—*Ann. Rev. Plant. Phys.*, 2, 25—52, 1951.
 Hewitt E. J.—*Ruhland's Handb. d. Pflanzenphysiol.*, 4, 427—481, 1958.
 Hickey B. J., Tresner M. D.—*J. Bact.*, 64, 891—892, 1952.
 Hine D., Dowbarn M., Smith J.—*Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 35, 3, 267—272, 1957.
 Horner C. K., Burk B., Allison T. E., Sherman M. S.—*J. Agric. Res.*, 65, 173—193, 1942.
 Hutner S.—*Proc. Ohio Agr. Ex. Station*, N. Y., 1958.
 Iswaran V., Rao W.—*Proc. Indian Acad. Sci.*, 51, 3, 103—115, 1960.
 Janoff A., Zweifach B.—*J. Exp. Med.*, 112, 1, 23—24, 1960.
 Jarvis F., Johnson M.—*Am. Chem. Soc. Chicago Meeting*, 12, 1313, 1946.
 Jarvis F., Johnson M.—*J. Am. Chem. Soc.*, 69, 3010—3011, 1947.
 Jensen H. L., Betty R.—*Proc. Lin. Soc.*, 3, 68, 1—8, 1943.
 Jensen H. L.—*Proc. Lin. Soc.*, 3, 70, 203—211, 1946.
 Jensen H. L.—*Proc. Lin. Soc.*, 72, 299—310, 1948.
 Jensen H. L., Spenser D.—*Austr. J. Sci.*, 9, 28, 1946.

- Jensen H. L. a. Spenser D.—*Proc. Lin. Soc.*, 72, 73—86, 1947.
- Johnson D.—*J. Biol. Chem.*, 137, 575, 1941.
- Johnson E. a. Colmer—*Antib.*, 7, 10, 511—526, 1957.
- Johnstone D. a. Waksman S.—*J. Bact.*, 55, 317—326, 1948.
- Johnsone D. a. Fishbein J.—*J. Gen., Microb.*, 14, 330, 1956.
- Jordan I. V., Anderson C. B.—*Soil. Sci.*, 69, 4, 311—319, 1950.
- Joslyn M. A.—*Wallerst. Lab. Comm.*, 4, 49—63, 1941.
- Kandler O.—*Arch. Mikrob.*, 15, 430—438, 1951.
- Karow E. O.—*J. Bact.*, 54, 41, 1947.
- Karow E. O. a. Waksman S. A.—*Ind. Eng. Chem.*, 39, 821—825, 1947.
- Keeler R. F.—*J. Bact.*, 73, 4, 1957.
- Keeler R. F., Verner J. E.—*Arch. Bioch., Bioph.*, 70, 2, 585—590, 1957.
- Keeler R., Clark L., Verner J.—*Exptl. Cell. Res.*, 15, 1, 80—84, 1958.
- Kelner A., Morton H.—*J. Bact.*, 53, 695—704, 1947.
- Kertez D.—*Bioch. et Bioph. Acta*, 9, 170—179, 1952.
- Kessler E., Arthur W., Brugger J.—*Arch. Bioch., Bioph.*, 71, 2, 326—335, 1957.
- Kirby K. S.—*Bioch. J.*, 66, 495, 1957.
- Kirby K. S.—*Bioch. J.*, 70, 260, 1958.
- Klotz J.—A symposium on the enzyme action, Baltimore, 257—285, 1954.
- Kluyver A. J. a. van Reenen W. J.—*Arch. Microb.*, 4, 280—300, 1933.
- Knight S. G.—*Thesis Univ. Wis.*, 1946.
- Knüsel F.—*Arch. Mikr.*, 27, 3, 219—259, 1957.
- Koffler H., Knight S., Frazier W.—*J. Bact.*, 53, 1, 115—123, 1947.
- Konischki K. a. Tzuge T.—*Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, 10, 584, 1934.
- Kovats A.—*Polon. Acad. Sci.*, 1, 91—112, 1938.
- Krauss E. a. Specht A.—*Trans. Intern. Conf. use Solar Energy*, 4, 12—14, 1959.
- Kréméry V., Ferencik I.—*Biol. CSSR*, 16, 12, 905—217, 1961.
- Krishnamurty G. G. a. Halvorson H. O.—*J. Bact.*, 79, 1, 1—6, 1960.
- Kurz W. a. Nielsen N.—*Acta Chem. Scand.*, 11, 1278, 1957.
- Lardy H. A.—Symposium on phosphorus metabolism, 1, 477—499, 1951.
- Lardy H. A.—*Physiological Review*, 33, 509, 1953.
- Lavollay J.—*Chronica Botanica*, 1950.
- Lavollay J.—*Sciences*, 62, 1—2, 102—126, 1955.
- Lechevalier H. A.—*Thesis Rutgers Univ.*, New Brunswick, 1951.
- Leitner F. a. Cohen S.—*J. Bact.*, 83, 2, 314—323, 1962.
- Lenhinger A. L.—*Phys. Rev.*, 30, 292—429, 1950.
- Lenta M. a. Rienl M.—*J. Biol. Chem.*, 235, 3, 859—864, 1960.
- Leonian L. H. a. Lilly V. G.—*Am. J. Bot.*, 27, 18—26, 1940.
- Levinson H. a. Hyatt M.—*J. Bact.*, 67, 615—616, 1954.
- Levinson H. a. Hyatt M.—*J. Bact.*, 70, 363—374, 1955.
- Levinson H. a. Hyatt M.—*J. Bact.*, 72, 2, 1956.
- Lochhead A.—*Ann. Rev. Micr.*, 6, 185, 1952.
- Lochhead A. a. Burton M.—*Can. J. Bot.*, 31, 1, 1953.
- Lochhead A. a. Burton M.—*Can. J. Microb.*, 1, 5, 1955.
- Lockwood L. B.—*Rep. Proc. 111 Congr. Microb.*, 229, 1940.
- Lockwood L. B. a. Reeves M. D.—*Arch. Bioch.*, 6, 455—469, 1945.
- Lohrmann W.—*Arch. Mikrob.*, 11, 4, 329—367, 1940.
- Lowe R. H., Ewans H. J.—*J. Bact.*, 83, 1, 210—211, 1962.
- Lulla B. S.—*Bioch. et Bioph. Acta*, 7, 244—256, 1951.
- Mackler B., Mahler H. a. Green D.—*J. Biol. Chem.*, 210, 149—164; 465—489, 1954.
- McLeod R. A.—*J. Bact.*, 62, 3, 337—445, 1951.
- McLeod R., Snell E.—*J. Biol. Chem.*, 170, 351—365, 1947.
- McLeod R., Snell E.—*J. Bact.*, 59, 6, 783—792, 1950.
- McElroy M. D. a. Nason—*Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 5, 1—30, 1954.

- Mahler H. R.—Fed. Proc., 12, 3, 694—702, 1953.
- Mahler H. R. a. Elowe D. G.—Biol. Chem., 218, 1, 165—181, 1954.
- Maitra P. K. a. Roy S.—Bioch. J., 75, 3, 483, 1960.
- Man J. C., Galesloof T. E.—Niderl. melk-en Zui-veltijdschr., 16, 1, 1—23, 1962.
- Martell A. a. Calvin M.—Prentice Hill, N. Y., 1952.
- Maschmann E.—Ergeb. Enzymf., 9, 155—192, 1943.
- Massey V.—Bioch. J. (London), 53, 67—71, 1953.
- Medina A. a. Nicholas D. J.—Bioch. Bioph. Acta, 25, 138—141, 1957.
- Medina A. a. Nicholas D. J.—Nature, 179, 4558, 533—534, 1957a.
- Menzel A. E., Wintersteiner O. a. Hoogerheide J.—J. Biol. Chem., 152, 419—429, 1944.
- Metz O.—Arch. Mikr., 1, 197—251, 1930.
- Milstein C.—Bioch. J., 79, 3, 591—596, 1961.
- Minagawa T.—Exp. Cel. Res., 14, 2, 333—340, 1958.
- Miamoto T.—J. Chem. Soc. Japan, 78, 2, 243, 1957.
- Mockeridge F.—Proc. Roy. Soc., London, 89, 508—533, 1917.
- Moyer A. a. Coghill R.—Arch. Bioch., 7, 167—183, 1945.
- Moyer A. a. Coghill R.—J. Bact., 51, 79—93, 1946.
- Mrkham R., Smith J.—The Proteins, Acad. Press, N. Y., 1—124, 1954.
- Mulder E. G.—Arch. Mikrob., 10, 72—86, 1939.
- Mulder E. G.—Anal. Chem. Acte, 2, 793—800, 1948.
- Mulder E. G.—Plant and Soil, 1, 94—119, 1948a.
- Mulder E. G.—Plant and Soil, 5, 368—415, 1954.
- Mulder E. G.—Landb. Tijd., 69, 7/8, 513—574, 1957.
- Mulder E. G.—Landb. Tijd., 69, 7/8, 575—591, 1957a.
- Mulder E. G. a. Gerretsen T. C.—Adv. Arg., 4, 221—227, 1952.
- Mulder E. G., Bakema K., Veen W.—Plant and Soil, 10, 4, 319—334, 1959.
- Mull R. P. a. Nord F. F.—Arch. Bioch., 4, 419—438, 1944.
- Myoda T., Werkmann C. H.—Jowa State J. Sci., 35, 1, 73—88, 1960.
- Najjar V.—A symposium on phosphorus metabolism, 500—516, Baltimore, 1951.
- Nakayama T.—J. Bioch., 48, 6, 812—830, 1960.
- Nason A.—Science, 112, 111—112, 1950.
- Nason A.—Soil Sc., 85, 2, 63—77, 1958.
- Nason A., Kaplan N., Colowick S.—J. Biol. Chem., 188, 397, 1951.
- Nason A., Evans H.—J. Biol. Chem., 202, 655, 1953.
- Neuberg C.—Ann. Rev. Bioch., 15, 435—474, 1946.
- Nicholas D. J.—J. Sci. Food. Agr., 1, 339—344, 1950.
- Nicholas D. J.—Analyst., 77, 629—642, 1952.
- Nicholas D. J.—J. Gen. Microb., 17, 3, 689—698, 1957.
- Nicholas D. J.—Ann. Bot., 21, 84, 587—599, 1957a.
- Nicholas D. J.—Nature, 179, 4564, 1957b.
- Nicholas D. J.—Biochem. Soc. Sympos., Cambridge Press, 15, 1958.
- Nicholas D. J.—Cambridge Press, 1959.
- Nicholas D. J., Nason A.—J. Biol. Chem., 211, 183—197, 1954.
- Nicholas D. J., Nason A., McElroy W.—J. Biol. Chem., 207, 341—351, 1954.
- Nicholas D. J., Nason A.—J. Biol. Chem., 207, 353—358, 1954a.
- Nicholas D. J., Commissiong K.—J. Gen. Micr., 17, 3, 699—707, 1957.
- Nicholas D. J., Goodman T.—J. Exptl. Bot., 9, 25, 97—108, 1958.
- Nicholas D. J., Fisher D. J., Redmond W., Wright M.—J. Gen. Microb., 22, 1, 191—205, 1960.
- Nickerson W. J. a. Chadwick J. B.—Arch. Biochem., 10, 81—100, 1946.
- O'Kane B. G.—Fed. Proc., 13, 739, 1954.
- Olaru D. A.—Rôle du manganèse en agriculture, son influence sur quelques microbes du sol. Paris, 1920.

- Patterson D. S.—*Nature*, 185, 4705, 57, 1960.
- Pengra R. M., Wilson P. W.—*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 100, 3, 1959.
- Perlman D.—*Am. J. Bot.*, 35, 360—363, 1948.
- Perlman D.—*Bot. Rev.*, 15, 3, 1949.
- Perlman D., Kita D. A., Peterson W.—*Arch. Bioch.*, 11, 131—143, 1946.
- Perlman D., O'Brien E.—*J. Bact.*, 68, 167—170, 1954.
- Peters V. a. Snell E.—*J. Bact.*, 67, 1, 69—76, 1954.
- Pirson A.—*Proc. Conf. Held Ogio Agr. Exp. Stat.*, N. Y., 111—135, 1958.
- Plaut G. W. a. Lardy H. A.—*J. Biol. Chem.*, 180, 13—27, 1949.
- Pohlmann G.—*Zbl. Bakt.*, 2, 115, 157—160, 1962.
- Possingham J.—*Austral. J. Biol. Sci.*, 10, 1, 1957.
- Pratt R. a. Dufrenoy J.—*Science*, 105, 574, 1947.
- Principe P. A. a. Thornberry H. H.—*Phytopatology*, 42, 123—126, 1952.
- Proctor M. N., Wilson P. W.—*Arch. Mikrob.*, 32, 3, 251—260, 1959.
- Radler F.—*Arch. Mikrob.*, 22, 335, 1955.
- Ramaian A., Schanmugasundaram E.—*Current Sci.*, 30, 6, 219—221, 1961.
- Ramakrishnan C.—*Naturwissenschaften.*, 43, 15, 352, 1956.
- Ranganayake S., Bahadur K.—*Arch. Microbiol.*, 29, 4, 363—367, 1958.
- Ratajak E. J. a. Owens H. S.—*Bot. Gaz.*, 104, 329—337, 1942.
- Rathledge C. a. Winder F.—*Bioch. J.*, 84, 3, 69—74, 1962.
- Raulin J.—*Ann. Sci. Nat. Ser.*, 5, 11, 93—299, 1869.
- Reynolds D. M. a. Waksman S. A.—*J. Bact.*, 55, 739—752, 1948.
- Richard H. M.—*J. Wiss. Bot.*, 30, 665—668, 1897.
- Richert D. A. a. Westerfeld W.—*J. Biol. Chem.*, 203, 915—923, 1953.
- Richie L., Harold E., Shoukat A.—*Biochem. Biophys. Res., Commun.*, 3, 6, 675—679, 1960.
- Rippel A.—*Arch. Mikrobiol.*, 7, 590—597, 1936.
- Roberg M.—*Zbl. Bakt.*, 2, 84, 196—230, 1931.
- Roberts E. R.—In: *Utilization of Nitrogen and its compounds by plants*, Cambridge, 13, 1959.
- Roberts J. a. Roberts E.—*Soil Sci.*, 48, 2, 1939.
- Rubbo S. D., Albert A. a. Gibson M.—*The British J. Exp. Pathol.*, 31, 3, 425—441, 1950.
- Савада, Танака, Хирано, Сато, Миямого—*J. Chem. Soc. Japan*, 76, 3, 274—277, 1955; *РЖБХ*, 7, 1957.
- Sadasivan V.—*Nature*, 170, 421, 1952.
- Sarachek A.—*Bioch. Biophys. Acta*, 33, 1, 227—230, 1959.
- Saunders A. a. Sylvester J.—112th Meeting Am. Chem. Soc., 9A—10A, 1947.
- Saz A. K. a. Slie R. B.—*J. Biol. Chem.*, 210, 1, 407—412, 1954.
- Scharrer K.—*Berlin und Hamburg. Biochemie der Spurenelements*, 1955.
- Scheffer F., Klocke A., Hünerhoff F.—*Landw. Forsch.*, 10, 3, 173—185, 1957.
- Schopfer W. H.—*Zeits. Vitaminf.*, 14, 42—70, 1943.
- Schröder M.—*Zentr. Bakt.*, 2, 85, 177, 1952.
- Sehgal S. N., Gibbons N. E.—*Can. J. Microb.*, 6, 2, 165—169, 1960.
- Shibko S., Pinchot G.—*Arch. Bioch. a. Biophys.*, 93, 1, 140—146, 1961.
- Shug A. G., Wilson P. W., Green D. R., Mahles H. R.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 26, 3355, 1954.
- Singer T. a. Kearney E.—*The Proteins. Acad. Press.*, N. Y., 1954.
- Singh J., Bhardway I. S.—*J. Sci. Ind. Res.*, C21, 3, 84, 1962.
- Sivarama S., Adiga P., Pagmanaban G., Sarma P.—*Arch. Bioch., Biophys.*, 99, 2, 351—353, 1962.
- Smith E.—*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 35, 80—90, 1949.
- Smith E.—*Univ. Press.*, Baltimore, 1953.

- Smith E., Davis N.—A symposium on the mechanism of enzyme action, Baltimore, 1954.
- Сонэ Киехиде—Vitamins, 26, 1, 13—24, 1962; ПЖБХ, 4, 4Ф249, 1963.
- Spampinato V.—Bull. Soc. Ital. Sperim., 37, 5, 235—237, 1961.
- Spencer D., Takamaschi H. a. Nason A.—J. Bact., 73, 553, 1957.
- Spilsbury J.—Brit. Mycol. Soc. Trans., 31, 210—228, 1948.
- Stapp C. u. Bortels H.—Mitt. Zbl. Bakter, 2, 90, 28—66, 1934.
- Starkey R. L.—Soil. Sci., 79, 1—14, 1955.
- Stein E. A. a. Fischer E. H.—Bioch. Biophys. Acta, 39, 287—290, 1960.
- Steinberg R. A.—Am. J. Bot., 6, 330—375, 1919.
- Steinberg R. A.—Bull. Torrey Bot. Club., 62, 81—90, 1935.
- Steinberg R. A.—J. Agr. Research., 52, 439—448, 1936.
- Steinberg R. A.—J. Agr. Res., 57, 6, 466—476, 1938.
- Steinberg R. A.—J. Agr. Res., 59, 731—748, 1939.
- Steinberg R. A.—J. Agr. Res., 64, 615—633, 1942.
- Steinberg R. A.—Soil Sci., 60, 185—189, 1945.
- Steiner K.—Zbl. Bakt., A, 2, 114, 1, 47, 106, 1961.
- Stern K. L. a. Steinberg M. A.—Bioch. Bioph. Acta, 2, 553, 1958.
- Stout P. R. a. Arnon D. I.—Am. J. Bot., 26, 144—149, 1939.
- Stowe B. B.—Bioch. J., 66, 9, 1955.
- Taha K. M., Ezz El-Din M., El-Zainy T.—Arch. Mikr., 31, 1, 283—288, 1958.
- Taha E., El-Zainy T.—Arch. Mikr., 33, 2, 124—127, 1959.
- Taha E. a. Elrefal M.—Arch. Mikr., 43, 67—75, 1962.
- Takahashi H., Nason A.—Bioch. et Bioph. Acta, 23, 433—435, 1957.
- Temple K. L.—Thesis Rutgers Univ., N. Y., 1948.
- Ter Meulen H.—Recueil trav. chim., 50, 49, 1931.
- Thimann K.—Proc. Nat. Acad. Sci., 22, 511, 1936.
- Thornberry H. a. Anderson H.—Arch. Bioch., 16, 289—397, 1948.
- Timonin M. a. Rouatt K. J.—Canad. J. Pub. Health., 35, 80—88, 1944.
- Totter J. R., Burnett W. T., Monroe R. A., Whitney J. B., Comar C. L.—Science, 118, 555, 1953.
- Vallee B.—Adv. Prot. Chem., 10, 315—384, 1955.
- Vallee B.—2nd Ed. Acad. Press, 1960.
- Vallee B., Stein E., Sumerwell W., Fischer E.—J. Biol. Chem., 235, 11, 2901—2905, 1959.
- Vallee B., Rupley J., Coombs F., Neuratt N.—J. Biol. Chem., 235, 64—69, 1960.
- Vanagishima N.—J. Inst. Polyt. Osaka City Univ., D11, 25—32, 1960.
- Van Eys.—J. Bact., 80, 386, 1960.
- Van Niel.—Arch. Mikr., 6, 215—218, 1935.
- Venkataraman G. S.—Current Sci., 27, 8, 306—307, 1959.
- Virtanen A. I. a. Rautanen N., 1952.—In: The Enzymes, 2, 1089—1130, Acad. Res. N.—Y.
- Virtanen A. I.—Sump. VI Intern. Cong. Microb., Microbiol. metabolism, 1954.
- Waksman S. A. a. Foster J. W.—J. Bact., 35, 70—71, 1938.
- Walker V. B.—Arch. Bioch. Bioph., 46, 1—11, 1953.
- Walker V. B.—Arch. Bioch. Bioph., 53, 1—8, 1954.
- Warburg O. a. Christian W.—Biochem. Zeit., 314, 149, 1943.
- Warren E. C., Wacker C. a. Wallee B.—J. Biol. Chem., 234, 12, 257, 1959.
- Wassiljew G. M.—Arch. Mikr., 6, 250—275, 1935.
- Webley D. M.—J. Gen. Micr., 23, 1, 87—92, 1960.
- Webley D. M., Duff R. B., Anderson G.—J. Gen. Micr., 29, 1, 179—187, 1962.
- Weinberg E.—J. Bact., 70, 289—296, 1955.
- Weinberg E.—Antibiot. Ann., 11, 1959.
- Weinberg E.—Antonie van Leluwenhoek. J., 26, 3, 321—328, 1960.

- Wetter C.—Landw. Forsch., 66, 114—119, 1954.
Williston E., Bingenheimer J., Rosenthal S.—Ann. Ins. Past.,
94, 1, 49—60, 1958.
Williston E., Rosenthal S.—Bull. Organ. Mond. Santé, 26, 1, 47—50,
1962.
Winder F.—Amer. Rev. Respir. Dis., 85, 6, 925—926, 1962.
Winder F., Denny J.—Nature, 184, 4687, 742—743, 1959.
Winder F. a. O'Hara C.—Biochem. J., 82, 98—108, 1962.
Winfield M. E.—Rev. pure. a. Appl. Chem., 5, 4, 1955.
Woodruff H. B.—J. Bact., 54, 42, 1947.
Woolley A.—J. Biol. Chem., 140, 311—312, 1941.
Woratz H., Thofern E., Kariminejad A.—Zbl. Bakt., 2, 168, 56,
436—440, 1957.
Wyllie J.—Can. J. Pub. Health., 36, 477—482, 1945.
Yammamoto T., Fukumoto J.—Bull. Agric. Chem. Soc. Japan., 23, 1,
68—70, 1959.
Yoshimura F.—Bot. Mag., 53, 125—128, 1939.
Young R. S.—Sci. Progr., 44, 175, 16—37, 1956.
Zamecnik P. C., Brewster L. E., Lipman.—J. Exp. Med., 85, 381—
394, 1947.
Zittle C. A.—J. Biol. Chem., 163, 1, 111—117, 1946.

Содержание

Введение	3
ЧАСТЬ I. РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	
Роль металла в ферментных системах	9
Хелатные образования	14
Ферменты, имеющие в своем составе металл	22
Окислительно-восстановительные ферменты	—
Гидролитические ферменты	28
Металлы в нуклеиновых кислотах	30
Физико-химические особенности действия микроэлементов	32
ЧАСТЬ II. ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ	
Влияние микроэлементов на рост микроорганизмов	38
Изменение морфолого-культуральных признаков микроорганизмов	49
Культуральные особенности	50
ЧАСТЬ III. ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ	
Дыхание	60
Дегидрогеназная активность	69
Каталазная активность	76
Протеолитическая активность	79
Амилолитическая активность	85
Фиксация атмосферного азота	91
ЧАСТЬ IV. ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ И ДРУГИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ	
Витамины группы В	99
Образование витаминов группы В почвенными микроорганизмами	104
Гетероауксин	114
Антибиотики	124
Образование комплексов металлов и антибиотических веществ	126
Образование лимонной кислоты и других органических веществ	129
Антагонизм ионов при действии на микроорганизмы	131
ЧАСТЬ V. МИКРОЭЛЕМЕНТЫ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ	
Амино- и нуклеиновые кислоты	136
Изменение антагонистических свойств актиномицетов	138
Изменение биохимических свойств азотобактера	140
ЧАСТЬ VI. УСВОЕНИЕ МОЛИБДЕНА БАКТЕРИЯМИ (ОПЫТЫ С РАДИОАКТИВНЫМ ИЗОТОПОМ Mo^{99})	146
ЧАСТЬ VII. ДЕЙСТВИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ РИЗОСФЕРЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ	
Сравнительное действие бора, молибдена, марганца на микрофлору ризосферы растений	159
Количественные изменения микрофлоры после применения микроудобрений	—

Биологическая активность почвы	162
Динамика нитратов и фосфорной кислоты в почвах	163
Совместное действие микроэлементов и бактериальных удобрительных препаратов	166
Совместное действие микроэлементов с суперфосфатом и органическими удобрениями	170
Биологические методы определения микроэлементов в почвах	177
ЧАСТЬ VIII. СВЯЗЬ МЕЖДУ ДЕЙСТВИЕМ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ И РОСТОМ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	179
ЧАСТЬ IX. РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ (ГРИБНЫМ И БАКТЕРИАЛЬНЫМ)	185
Литература	190

Ольга Ипполитовна Бершова

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ И ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Печатается по постановлению ученого совета Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного

Редактор *Т. И. Матяшевская*

Художественный редактор *В. П. Кузь*

Оформление художника *В. З. Куницы*

Технический редактор *Б. А. Пиковская*

Корректор *Л. Н. Регета*

БФ 03276. Зак. № 388. Изд. № 54. Тираж 2200. Бумага № 2, 60×90^{1/16}. Печ. физ. листов 12,75. Усл. печ. листов 12,75. Учетно-изд. листов 12,63. Подписано к печати 25.V 1967 г. Цена 86 коп.

Издательство «Наукова думка», Киев, Репина, 3.

Киевская книжная типография № 5 Комитета по печати при Совете Министров УССР, Киев, Репина, 4.