

Є. Ф. ЮРЧУК

ВПЛИВ ФОСФОРОБАКТЕРІЙ ЯК ПРОДУЦЕНТІВ ВІТАМІНІВ ГРУПИ «В» НА РІСТ РОСЛИН І НАГРОМАДЖЕННЯ В НИХ ВІТАМІНІВ*

У комплексі агрономічних заходів, спрямованих на підвищення врожаю, значне місце займають бактеріальні добрива.

За останні роки застосування фосфوروبактерину в чорноземній зоні значно зросло. Так, наприклад, у колгоспах і радгоспах Дніпропетровської області в 1953 р. фосфوروبактерин був внесений на площі 12 тис. га, а в 1962 р. — на площі близько 1 млн. га. Застосування фосфوروبактерину під зернові культури дає приріст врожаю від 10 до 12%, значно кращі результати одержані при застосуванні його під овочеві культури: підвищення врожаю спостерігається до 33,8%.

На думку багатьох дослідників (1, 6, 8), роль фосфوروبактерій у ґрунті обмежується мінералізацією орґанофосфатів, покращуючи таким чином фосфорне живлення рослин.

Безперечно, що *Bac. megatherium* здатний викликати мінералізацію фосфорноорґанічних сполук, властивих ґрунтові. Про це свідчать, зокрема, досліди Р. А. Менкіної (9) і ін., але бактеризація насіння фосфوروبактеріями (13) не приводить до значного розмноження *Bac. megatherium* на поверхні коренів і навіть у ризосфері.

Сумнівно, що *Bac. megatherium* при такому короткочасному перебуванні в ґрунті буде впливати на рослини тільки як мінералізатор орґанофосфатів.

У дослідах багатьох вчених після застосування азотобактерину азотобактер швидко зникав з ризосфери і ґрунту, але в кінці досліді спостерігалось підвищення врожаю на 10—15%. Причину цього явища О. Г. Гебгардт пояснює тим, що азотобактер є активним синтетиком вітамінів групи «В», значну кількість яких екзосмує в ґрунт, збагачуючи ними рослини. Поступаючи в проростаюче насіння, бактеріальні вітаміни позитивно впливають на ряд фізіологічних процесів: поліпшують дихання, поступання азоту і фосфору в рослини (3).

Наша робота була спробою виявити у фосфوروبактерій, крім мінералізуючої їх властивості, здатність до синтезу вітамінів групи «В». Цікаво було також прослідкувати поступання окремих молекул бактеріального тіаміну в рослини.

Деякі дані щодо синтезу культурами *Bac. megatherium* різного походження вітамінів групи «В» одержані Н. І. Мальцевою (12). Нами вивчалися інші штами фосфوروبактерій: П-57 і 5-ий, одержані із Ленін-

* Науковий керівник — доктор біол. наук А. Г. Гебгардт.

градського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології. Дані штами використовуються для виготовлення бактеріального препарату — фосфобактерину.

Для визначення кількісного синтезу вітамінів групи «В» досліджували мікроорганізми культивувались на безвітамінному середовищі Чапека в 250-мілілітрових колбах на качалці: в кожену колбу наливали 30 мл середовища і засівали 3-добовою культурою бактерій з п'ятиразовою повторністю. Вітаміни визначали в трьохденній культурі як у клітинах бактерій, так і в культуральній рідині. Утворення тіаміну вивчали флюорометричним методом (2). Рослини для зважування і визначення в них тіаміну фіксувались по Філіпову (22). Екстракцію В₁ здійснювали шляхом кислотного і ферментного гідролізу, екстракт очищався на колонці з адсорбентом СДВ-3 (5), окислювався в тіохром і переводився в ізобутиловий спирт. У досліді з радіоактивним тіаміном один і той самий ізобутиловий екстракт використовувався для кількісного визначення тіаміну і для вимірювання його радіоактивності на установці типу «Б» з торцевим лічильником (17). При кінцевому підрахунку активності препарату робилась поправка на радіоактивний розпад, самопоглинання випромінювань препаратом не враховувалось. Визначення кількості вітаміну В₆ велось мікробіологічним методом (11). Інтенсивність росту дріжджів вимірювалась турбідиметрично. Екстракція вітаміну В₆ з клітин проводилась за методом Снелла (14). Пантотенову кислоту визначали за методом Одинцової, індикаторною культурою служив організм *Saccharomyces cerevisiae*, Ленінградська раса. Екстрагування здійснювали за Снеллом (14).

Визначення ніотинової кислоти проводили за методом Одинцової (16) з тест-мікробом *Zygosaccharomyces marxianus*. Екстракцію здійснювали 1 N H₂SO₄ автоклавуванням при 1 атм. 15 хв.

Кобаламін визначали мікробіологічним методом (24). Інтенсивність росту тест-об'єкту *V. coli* вимірювали турбідиметричним методом.

Визначення рибофлавіну велось флюорометричним методом (25). Стерилізацію голозерного насіння вівса здійснювали перекисом водню (18). Вегетаційний дослід закладали стерильно в однолітрових колбах Ерленмейера з пристосуваннями для продування повітря. Субстратом служив стерильний пісок, зволожений до 80% від повної вологості середовищем Кнопа. В кожній колбі вирощувалось по 12 рослин при штучному освітленні ламп денного світла і температурі 20—22°C. Мічений тіамін вводився в мікробні клітини при вирощуванні фосфобактерій на середовищі Чапека з вмістом радіоактивного тіаміну 20 μ /мл і активністю середовища 5 тис. імн/мл. Культивування вели на роторі 72 год. Відмивання клітин від середовища здійснювали фосфатним буфером і водою шляхом багаторазового центрифугування. Особлива увага приділялась усуненню радіоактивних забруднень з поверхні клітин. Контроль за повним відмиванням здійснювався шляхом вимірювання радіоактивності промивних вод.

Виробничі штами фосфобактерій виявились активними синтетиками вітамінів групи «В», про що свідчать дані таблиці 1, де всі величини оброблені методом варіаційної статистики і представлені як $X \pm \sigma$ (19).

Хоч обидва досліджувані штами синтезують вітаміни групи «В», між ними існує різниця. Штам П-57 більш енергійно синтезує тіамін. Обидва штами близько половинної дози загального синтезу виділяють в оточуюче середовище. Штам 5-й зовсім не синтезує рибофлавіну. Вітамін В₆ цими організмами в значно більшій кількості виділяється в

Таблиця 1

Вміст вітамінів групи «В» в клітинах і виділеннях двох штамів
Bac. megatherium var. *phosphaticum*. (в γ на 1 г сухих речовин)

	Штами фосфоро- бактерій	Тіамін	Рибо- флавін	Піридоксин	Нікотинова кислота	Пантоте- нова кислота	Кобала- мін
Міститься в клітинах	П-57	$28,0 \pm 0,08$	$17,5 \pm 0,05$	$14,45 \pm 0,12$	$123,4 \pm 0,21$	$24,1 \pm 0,11$	$62,3 \pm 0,09$
	Ш-5	$22,5 \pm 0,09$	—	$16,5 \pm 0,09$	$146,8 \pm 0,19$	$18,2 \pm 0,13$	$47,1 \pm 0,08$
Екзосмовано в середови- щі	П-57	$25,2 \pm 0,07$	$22,2 \pm 0,06$	$65,2 \pm 0,11$	$39,0 \pm 0,11$	$11,6 \pm 0,09$	—
	Ш-5	$23,1 \pm 0,07$	—	$58,9 \pm 0,13$	$42,3 \pm 0,18$	$15,3 \pm 0,08$	—
Сума синте- зованого ві- таміну	П-57	53,2	39,7	79,65	162,4	35,7	62,3
	Ш-5	45,6	—	75,4	189,1	33,5	47,1

оточуюче середовище, ніж міститься в клітинах. Від загальної кількості синтезованого піридоксину штам П-57 виділяє в зовнішнє середовище — 81,8%, а штам 5-й — 79,4%.

У відношенні нікотинової кислоти кращим синтетиком є 5-й штам, пантотенову кислоту обидва штами виділяють без особливих кількісних різниць, зате кобаламіну більш синтезує штам П-57.

Вітамін B_{12} знаходиться тільки в клітинах, що співпадає з дослідженнями В. І. Ушакової (21) і Н. І. Мальцевої (12).

В порівнянні з азотобактером (3) фосфобактерії значно більше синтезують піридоксину і є активними синтетиками рибофлавіну і кобаламіну.

Нікотинову і пантотенову кислоти азотобактер виділяє в набагато більших кількостях, ніж фосфобактерії.

У зв'язку з одержаними даними виникає питання: чи можуть екзосмовані вітаміни з оточуючого середовища поступати в рослини?

В дослідях І. Боннер і І. Грина (26), В. Х. Шопфера (28) спостерігалось нагромадження вітамінів в органах рослин, які допоміжно постачались даними вітамінами. Проте підвищення вмісту в рослинах вітамінів при збагаченні ними зони коренів, особливо в нестерильних умовах, можна пояснити зміною умов вирощування рослин, що посередньо впливає і на продукування ними вітамінів.

Більш переконливими були досліди Г. М. Шавловського (23), який перший при допомозі радіоактивного тіаміну довів передачу тіаміну мікроорганізмами рослині по нагромадженню радіоактивної сірки в надземній частині і коренях.

Є. П. Ратнер і І. Н. Доброхотова (20) перехоплювали тіамін, внесений ними в поживне середовище в пасоці рослин; тим самим методом був перехоплений тіамін, екзосмований азотобактером (4). Але цей метод не дає можливості виявити нагромадження тіаміну в зелених органах рослин.

У ряді дослідів нами була зроблена спроба з'ясувати можливість передачі рослинам вітаміну B_1 культурами фосфобактерій. Досліди проводились за допомогою міченого тіаміну.

Щоб одержати живі мікробні клітини, які б містили мічений вітамін B_1 , була використана можливість фосфобактерій акумулювати з середовища готові молекули тіаміну.

Таблиця 2

Включення радіоактивного тіаміну в клітини *Bac. megatherium* var. *phosphaticum*.

Штами фосфобактерій	Вміст B_1 в $\gamma/2$ сухої речовини ($X \pm \sigma$)	Кількість імн./хв/2 сухої речовини $X \pm \sigma$	Питома активність імн./хв/г
П-57	148,5 $\pm$ 0,09	120064 $\pm$ 0,03	808,5
5	137,5 $\pm$ 0,087	100896 $\pm$ 0,05	733,8

Дані дослідів (табл. 2) показують, що фосфобактерії активно нагромаджують у своїх клітинах молекули міченого тіаміну, про що свідчить його кількісне визначення і підрахунок імпульсів тіохрому.

Властивість дріжджів вбирати в значних кількостях тіамін з середовища в умовах бродіння була вивчена Є. Н. Одинцовою (15); для деяких бактерій це явище встановлено Г. М. Шавловським (23) при вирощуванні їх на рідких середовищах. Наші дані підтверджують таку здатність у фосфобактерій.

Суспензіями фосфобактерій, збагаченими міченим тіаміном, інкулювали стерилізовані насіння вівса сорту «Радянський».

Дослід був закладений в 4-разовій повторності за такою схемою:

1. Контроль (пісок + овес).
2. Внесення міченого тіаміну (пісок + тіамін (S^{35}) + овес).
3. Внесення фосфобактерій шт. П-57 з попереднім насиченням їх міченим тіаміном.
4. Внесення фосфобактерій шт. 5 з попереднім насиченням їх міченим тіаміном.

Тіамін вносився по краплі на насіння з розрахунку 0,1 γ B_1 на грам піску.

Інокуляцію насіння здійснювали після попереднього його змочування крохмалем, на кожну насінину давали 225 тис. клітин штаму П-57 і 250 тис. клітин 5-го штаму.

Фосфобактерії і розчин тіаміну внесені були по фону повного забезпечення рослин фосфором.

Не дивлячись на те, що рослини були забезпечені фосфором, інокуляція насіння фосфобактеріями позитивно вплинула на ріст і вагу надземної і підземної маси проростків (табл. 3).

В таблиці 3 представлені середні дані 48 рослин. Достовірність різниці між контролем і варіантами дослідів доведена статистично.

Очевидно, на перших фазах росту фосфобактерії впливали на дев'ятиденні проростки як синтетики вітамінів групи «В». У дослідях А. А. Ісакової (7), Г. М. Шавловського (23), О. Г. Гебгардт (4) показаний позитивний вплив бактерій на ріст проростків і нагромадження в них вітамінів. Ці вітаміни стимулюють фізіологічні процеси проростків:

підвищують інтенсивність дихання проростаючого насіння на 11—37%, підсилюють гідролітичні процеси, позитивно впливають на переміщення азоту і фосфору в ростучі органи (3).

У наших дослідках внесення тіаміну і насичених ним фосфобактерій в значній кількості підвищує вміст тіаміну в коренях і стеблах (табл. 4). Таке збагачення рослин вітамінами має особливо велике

Таблиця 3

Характеристика дослідних рослин

Варіант	Довжина стебла	Вага стебла	Довжина кореня	Вага кореня
1	2	3	4	5
Контроль	13,07±0,42	9,05±0,35	7,3±0,2	6,6±0,19
Внесення міченого тіаміну	15,08±0,29	12,0±0,48	11,3±0,27	10,5±0,39
Внесення шт. П-57, насиченого міченим тіаміном	16,9±0,81	12,9±0,64	12,8±0,68	11,2±0,54
Внесення шт. 5, насиченого міченим тіаміном	16,8±0,52	12,8±0,43	12,4±0,72	10,9±0,44

значення в фазі проростання рослин, коли запаси вітамінів із насіння уже вичерпані, а синтез їх, очевидно, не здійснюється або здійснюється слабо (26). Інокуляція насіння повноцінним фосфобактерином може заповнити ці прогалини.

Таблиця 4

Нагромадження радіоактивного тіаміну в проростках вівса

Варіант	Вміст тіаміну в стеблах (γ/г сух. реч.)	α	Активність тіохрому стебла (Імп./хв./г сух. реч.)	α	Вміст тіаміну в коренях (γ/г сух. реч.)	α	Активність тіохрому коренів (Імп./хв./г сух. реч.)	α
Контроль	5,7	0,08	—	—	2,47	0,09	—	—
Внесення міченого тіаміну	16,25	0,07	53 908	7,2	16,03	0,13	44 252	5,4
Внесення шт. П-57, насиченого міченим тіаміном	19,3	0,12	52 310	6,1	17,55	0,07	48 048	6,9
Внесення шт. 5, насиченого міченим тіаміном	18,9	0,15	51 837	7,5	18,4	0,10	46 660	7,8

Вимірювання радіоактивності рослинного тіохрому, як свідчать дані таблиці 4, показує, що у варіантах, де підвищився вміст тіаміну, висока радіоактивність тіохрому.

Отже, цей дослід (табл. 4) показує поступання окремих молекул міченого тіаміну з клітин фосфобактерій в рослини, бо спостереження велись не за радіоактивністю рослин взагалі, а враховувалась радіоактивність очищеного рослинного тіаміну.

ВИСНОВКИ

1. Фосфобактерії шт. П-57 і шт. 5 є активними синтетиками таких вітамінів групи «В»: тіаміну, піридоксину, біотину, пантотенової кислоти, нікотинової кислоти, кобаламіну. Рибофлавін утворюється тільки штамом П-57.

2. Синтезовані фосфобактеріями вітаміни не тільки нагромаджуються в їх клітинах, але й в значних кількостях екзосмууються в зовнішнє середовище.

3. Досліджувані штами бактерій здатні акумулювати в своїх клітинах мічений тіамін із зовнішнього середовища.

4. Окремі молекули бактеріального тіаміну здатні поступати в рослини, про що свідчить вимірювання радіоактивності тіаміну, виділеного з рослин і очищеного адсорбентом СДВ-3.

5. Внесення в субстрат радіоактивного тіаміну і фосфобактерій, насичених ним, веде до значного збагачення проростків тіаміном: в стеблах кількість вітаміну В₁ збільшується майже в 4 рази, в коренях — у 8—9 разів.

6. Як фосфобактерії, так і розчин В₁, внесені в субстрат, по фосфорному фону поліпшують ростові процеси проростків вівса.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бондаренко А. П., Волочкова З. Ф. Фосфобактерин и его применение. Ростов-на-Дону. кн. изд-во., 1953.

2. Букин В. П., Поволоцкая К. Л. и др. Флуорометрический метод определения тиамин. Витаминные ресурсы и их использование. Сб. 3. Изд. АН СССР, М., 1955.

3. Гебгардт А. Г. О сущности действия азотобактерина и путях повышения его эффективности. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. Львов, 1959.

4. Гебгардт А. Г. Роль микроорганизмов в накоплении витаминов в почвах и поступлении их в растения. Микроорганизмы и эффективное плодородие почвы. Труды Ин-та микробиол., в. XI, М., 1961.

5. Дмитровский А. А. Использование катионита СДВ-3 при флуорометрическом методе определения витамина В₁. Витаминные ресурсы и их использование. Сб. 3. Изд. АН СССР, М., 1955.

6. Ефимцев М. И. Фосфобактерин как удобрение на черноземе. Автореферат диссертации на соискание учен. степ. канд. сельскохоз. наук, Воронежский сельскохоз. ин-т, 1953.

7. Исакова А. А. Влияние бактеризации семян на синтез витаминов С и В проростками. ДАН СССР, т. XXVIII, 2, 1940.

8. Каш В. Бактериальные удобрения в Чехословакии. М., 1957.

9. Менкина Р. А. Бактерии, минерализующие органические соединения фосфора. Микробиология, т. XIX, в. 4, 1950.

10. Менкина Р. А. Мобилизация фосфора почвы под влиянием жизнедеятельности бактерий, минерализующих фосфорноорганические соединения. Труды ин-та сельскохоз. микробиологии ВАСХНИЛ, в. 12, 1951.

11. Мейсель М. Н. и Помощникова Н. А. Простой микробиологический метод определения пиридоксина. Биохимия, т. 17, в. 5, 1952.

12. Мальцева Н. И. Утворення деяких вітамінів культурами *Vas. megathicum*. Мікробіол. журн., т. XXIII, в. 3, 1961.

13. Мишустин Е. Н. и Наумова А. Н. Бактериальные удобрения, их эффективность и механизм действия. Микробиология, т. XXXI, в. 3, 1962.

14. Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот. Под ред. Снелла, ИЛ, М., 1954.

15. Одинцова Е. Н. Аккумуляция витамина В₁ дрожжевой клеткой. ДАН СССР, т. 42(3), в. 134, 1944.

16. Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов. Изд. АН СССР, 1959.

17. Остроухова В. А. Об определении радиоактивности тиамин в тканях. Витамины. Изд. АН УССР, 1958.
18. Ремпе Е. Х., Бернард В. В. и Воронкова Е. А. К вопросу о роли корневой микрофлоры в питании растений. Агробиология, № 6, 1956.
19. Рокицкий П. Ф. Метод вариационной статистики для биологов, Изд. Белорусск. ун-та, Минск, 1961.
20. Ратнер Е. И. и Доброхотова И. Н. О возможной роли витаминов, продуцируемых почвенными микроорганизмами, в корневом питании растений. Физиология растений, т. 3, в. 2, 1956.
21. Ушакова В. И. Условия образования витаминов В₁₂ культурой *Vac. megatherium*. ДАН СССР, т. 122, в. 3, 1958.
22. Филипов В. В. и Андреев Л. Н. Динамика содержания витаминов в листьях пшеницы, пораженных ржавчиной. ДАН СССР, т. 116, в. 2, 1957.
23. Шавловский Г. М. Участие микроорганизмов ризосферы в снабжении растений витаминами. ДАН СССР, т. XCV, в. 5, 1954.
24. Яворковский Л. И. и Май Л. А. Методика количественного определения витамина В₁₂ в сыворотке крови с *V. coli*. Лаб. дело, 6, Медгиз, М., 1957.
25. Bessey O. A., Lowry O. H., Love R. H., J. The fluorimetric measurement of the nucleotides of ribo,flavin and their concentration in tissues. J. Biol. Chem., 180(2), 755, 1949.
26. Bonner J. a Green J. Vitamin B₁ and the growth of green plants. Bot. Gaz., 100 (1), 226, 1938.
27. Bonner J. a Green J. Bot. Gar., 101, 2, 1939.
28. Shopfer W. H., Plants a. vitamins, 1943.

Е. Ф. ЮРЧУК

ВЛИЯНИЕ ФОСФОБАКТЕРИИ КАК ПРОДУЦЕНТОВ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ «В», НА РОСТ РАСТЕНИЙ И НАКОПЛЕНИЕ В НИХ ВИТАМИНОВ

Резюме

Нами изучались способность *Vac. megatherium* var. *phosphaticum* шт. П-57 и шт. 5 к продуцированию витаминов группы «В» и поступление отдельных молекул бактериального тиамин в растения. Опытами установлено, что фосфобактерии являются активными синтетиками следующих витаминов группы «В»: тиамин, пиридоксин, биотин, пантотеновой и никотиновой кислот, кобаламина. Рибофлавин продуцирует только штамм П-57. Синтезированные витамины в значительных количествах экзосмируются в окружающую среду. Фосфобактерии могут аккумулировать в своих клетках тиамин из внешней среды. Внесение в субстрат фосфобактерий, предварительно насыщенных меченым тиамином, ведет к накоплению его в проростках растений, что подтверждается измерением радиоактивности растительного тioxрома, очищенного адсорбентом СДВ-3. Содержание тиамин увеличивается в стеблях в 4 раза, а в корнях — в 8–9 раз.

Внесение в субстрат как тиамин, так и фосфобактерий, насыщенных им, усиливает рост проростков овса.