

<https://doi.org/10.3176/biol.1968.4.04>

В. ТОХВЕР, Э. ЛОКК

### О ПОЯВЛЕНИИ ДЕФИЦИТНОСТИ К АМИНОКИСЛОТАМ У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

По отношению к микроорганизмам одним из наиболее мощных факторов мутагенеза является облучение различными видами ионизирующих излучений, в том числе и рентгеновскими (Алиханян, Жданова, 1960). Как известно, ионизирующие излучения в зависимости от дозы могут вызвать не только гибель микробной клетки, но и мутационный процесс, ведущий к изменениям в микроорганизме. В связи с этим применение излучений в качестве мутагенного фактора требует решения двух основных вопросов (Алиханян, 1961): во-первых, вопроса о сознательном индуцировании наследственных изменений, во-вторых, вопроса об обнаружении и закреплении этих изменений. Для решения их прежде всего необходимо выбрать дозы облучения. Данные ряда исследователей показывают, что число направленных мутаций растёт с повышением дозы облучения, но не до бесконечности — слишком высокие дозы, при которых выживает уже очень незначительное количество клеток, не пригодны для применения при мутагенезе, так как при превышении известной дозы облучения частота мутаций резко уменьшается (Алиханян и др., 1957; Dylapey, 1959; Алиханян, 1961; Киселев и др., 1961; Емцев, 1962; Алиханян и др., 1962).

Что же касается клубеньковых бактерий (*Rhizobium* Frank), то для них в целях мутагенеза рекомендованы такие дозы ионизирующих излучений, которые позволяют выжить до 10% всех облученных клеток (Емцев, 1962). По данным Д. Джордана, у некоторых клубеньковых бактерий хорошие результаты получены при применении рентгеновского излучения до 45 кр (Jordan, 1952).

Следовательно, определение правильной дозы облучения требует установления радиочувствительности исследуемого организма к данному мутагену. Это тем более уместно, что и частота самих индуцированных мутаций, и частота обратных мутаций очень сильно зависят от особенностей видов и штаммов (Glover, 1956; Алиханян, 1961). Следует, однако, иметь в виду, что различия в чувствительности штаммов микробов к рентгеновским лучам с превышением известной дозы облучения постепенно сглаживаются (Алиханян и др., 1962). Это происходит при дозах, которые уже значительно уменьшают процент выживаемости и вместе с тем мутабельность микробов.

Относительно клубеньковых бактерий следует отметить, что о различиях их отношения к мутагенным факторам, в частности к рентгеновским лучам, в литературе встречается довольно мало данных. Изучено влияние  $\gamma$ -лучей на некоторые штаммы *Rhizobium* и указано, что полностью летальна для них доза 150 кр (Sarić, 1961). Нами изучено отношение четырех видов (шести штаммов) клубеньковых бактерий к рентгеновскому излучению и установлены различия в чувствительности так наз. быстро- и медленно растущих видов. Для первых  $LD_{50}$  находится в пределах 16—20, для вторых — 8—10 кр. Выяснена связь между характером метаболизма и радиочувствительностью клубеньковых бактерий (Тохвер, Локк, 1966).

Несмотря на мощное мутагенное воздействие различных радиаций на микроорганизмы, полезные мутанты возникают довольно редко (Заринь, 1966а, 1966б). Даже при дозе, позволяющей получить максимальную частоту мутаций, уже абсолютное число мутантов, тем более полезных мутантов, довольно низко. К тому же следует учесть, что обычно из полученных мутантов только часть проявляет необходимую устойчивость, другие же более или менее быстро реверсируют (Прозоров, 1961; Künkel, Rodegra, 1963; Trams, Künkel, 1964; Мясник, 1964, 1965; Тодоров, Робов, 1965).

Д. Заринь (1966а) показывает, что все полученные под влиянием мутагенных факторов мутанты по их устойчивости можно разделить на три группы: реверсирующие, устойчивые и проявляющиеся через большой промежуток времени. В первую группу входят варианты, которые в течение первых поколений четко мутантны, но в дальнейшем теряют новые свойства. По Д. Зариню, такие варианты преобладают обычно при однократном облучении. Возможно, в этом случае мы имеем дело не с истинными мутантами, а с так наз. дауэрмодификациями (Goldschmidt, 1961).

Под влиянием ионизирующих излучений нарушается нормальный метаболизм микроорганизмов. При этом часто возникают варианты с разнообразными отклонениями в энзиматических системах, связанных с синтезом клеточного вещества. Вследствие этого наблюдается торможение роста и развития мутантов, что можно устранить выращиванием биохимически недостаточных форм на более полноценных питательных средах, содержащих в готовом виде соединения, биосинтез которых прекращен или ослаблен (Зайцева, Ли Цзюнь-ин, 1961; Касаткина, 1961). В случае клубеньковых бактерий это обстоятельство представляет известный интерес в связи с предположением, что некоторые дефицитные формы в условиях обильной обеспеченности не только минеральными элементами питания, но и соответствующими органическими соединениями в готовом виде могут расти даже более активно, чем исходные прототрофные формы, так как «путь биосинтеза» до готового соединения при таких условиях сокращается.

Вопросы, связанные с мутагенезом клубеньковых бактерий, далеко еще не ясны. Исходя из этого и учитывая весь вышеизложенный литературный материал, мы изучали некоторые стороны указанной проблемы, связанные с появлением биохимически дефицитных форм в результате облучения. В частности, нас интересовали частота и характер дефицитных по отношению к аминокислотам отклонений. Соответствующие результаты представлены в настоящей работе.

## Методика

Объектами исследований служили виды из рода *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, виковый штамм 134, *R. meliloti*, белодонниковый штамм 276 и *R. japonicum*, штамм 631\*. Культуры этих штаммов (видов), выращенные в пробирках на косом агаре на среде № 28 американской коллекции типовых культур (см. Manual of Microbiological Methods, 1957, стр. 113), подвергались облучению рентгеновскими лучами в установке РУМ-7, применяя мощность излучения 33,3 р/сек. Дозировку облучения обеспечивали соответствующей продолжительностью экспозиции. При выборе доз облучения мы исходили из наших экспериментальных данных, показывающих различную радиочувствительность быстро- и медленнорастущих видов клубеньковых бактерий (Тохвер, Локк, 1966). На основе некоторых литературных данных можно заключить, что облучение в целях получения генетически измененных форм следует проводить в условиях, при которых выживаемость составляет приблизительно 10—20% (Емцев, 1962). Поэтому для облучения быстрорастущих видов *R. leguminosarum* и *R. meliloti* применялась доза в 50 кр, а медленнорастущего вида *R. japonicum* — 40 кр.

Опыты для выявления дефицитных по отношению к аминокислотам вариантов проводились по методу замедленного обогащения (метод слоев) Дж. Ледерберга и Э. Татума (Lederberg, Tatum, 1946; Lederberg, 1950). В качестве минимальной применялась при этом следующая среда: дистиллированная вода — 1000 мл,  $K_2HPO_4$  — 0,5 г,  $MgSO_4$  — 0,2 г,  $NaCl$  — 0,1 г,  $CaCl_2$  — 0,2 г, смесь микроэлементов, по М. Федореву, — 1,0 мл, глюкоза — 5,0 г, смесь витаминов — 10 мл (смесь содержит на 100 мл раствора витамины  $B_1$ ,  $B_2$  и биотин — по 10 мг,  $B_5$  и  $B_6$  — по 5 мг,  $B_3$  и парааминобензойную кислоту — по 3 мг и витамин  $B_{12}$  — по 1 мг) и выщелоченный, хорошо вымытый агар-агар — 15 г. На такую среду в чашках Петри наносили по 0,05 мл суспензии облученной культуры, разбавленной до получения в чашках по 200—300 колоний. Общее число клеток (живых и мертвых) в посевном материале определялось под микроскопом. Полученные данные использовались для вычисления процента выживаемости клеток при облучении. Через два-три дня после появления на минимальной среде последних колоний на 50% чашек с облученными и 50% чашек с необлученными бактериями наносили третий, обогащенный 20 аминокислотами (концентрация 0,022%) агаризованный слой. Повторность в обоих вариантах была 20—70-кратная. Контрольные чашки без обогащения, размещенные параллельно с обогащенными, служили критерием появления медленнорастущих колоний. Далее учитывалось число появившихся на обогащенных средах новых колоний. Следует отметить, что ни на одной из контрольных чашек без обогащения в этот же период, как в облученном, так и в необлученном варианте новых колоний не появилось. Появившиеся на обогащенных чашках колонии вторично проверялись на дефицитность по отношению к аминокислотам. Для этого колонии заново пересевались на минимальную среду. Дефицитными считались те из них, которые не дали роста без нового обогащения. Их изолировали, подвергали микроскопической проверке и исследовали дальше. Из материала выделенных дефицитных колоний после двух- и четырехмесячного хранения проводились двукратные контрольные пересевы по вышеописанной схеме (на минимальную среду с последующим прибавлением обогащающего слоя, выделением дефицитных колоний и их вторичной проверкой). Клетки колоний, утративших за время хранения дефицитность к аминокислотам, изучались отдельно для количественного учета клеток, сохранивших и не сохранивших свойства дефицитности. Для этого из материала колоний изготавливались суспензии и проводился соответственный количественный учет с выделением и двукратной проверкой потомства всех клеток, оказавшихся дефицитными в конце четырехмесячного периода хранения.

Работа выполнена при Институте экспериментальной биологии Академии наук ЭССР в феврале—августе 1967 года.

\* Культуры получены из коллекции Научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук им. Ленина.

## Результаты

Результаты экспериментальных исследований изложены в табл. 1 и 2. Изученные виды клубеньковых бактерий характеризуются довольно высокими показателями биохимической дефицитности по отношению к аминокислотам. Заслуживает внимания высокая мера спонтанной дефицитности (0,24% у *R. leguminosarum*, 0,09% у *R. meliloti* и 0,53% у *R. japonicum*). В результате же облучения дефицитными оказались 2—7% всех выживших клеток. Это значит, что при учете показателей выживаемости (8—19%) мера появления дефицитных колоний в результате рентгеновского облучения составляет у изученных видов 0,43—0,64%. В этом отношении закономерных различий между быстро- и медленно растущими видами не отмечено. Отсутствие дополнительного роста на контрольных чашках (без прибавления обогащающего третьего слоя) в период обогащения опытных чашек (табл. 1) свидетельствует о

Таблица 1

Частота появления дефицитных колоний

Показатели	<i>R. leguminosarum</i> , шт. 134		<i>R. meliloti</i> , шт. 276		<i>R. japonicum</i> , шт. 631	
	контроль	облучение, 50 кр	контроль	облучение, 50 кр	контроль	облучение, 40 кр
Число отдельных опытов: на минимальной среде без обогащения с прибавлением третьего (обогащающего) слоя	6	12	7	22	5	12
	7	14	7	24	7	12
Число учтенных колоний: на минимальной среде без обогащения с прибавлением третьего (обогащающего) слоя	5366	1585	4711	12 396	1787	2838
	3821	1701	3046	8149	1308	1559
Появилось «дополнительных» колоний после обогащения среды (после 7-го дня для <i>R. le-</i> <i>guminosarum</i> и <i>R. meliloti</i> и после 11-го дня для <i>R. japonicum</i> ) на контрольных чашках без обогащения на обогащенных чашках	0	0	0	0	0	0
	39	200	21	378	38	130
Из числа «первично-дефицитных» («дополни- тельных») колоний оказались дефицитными при вторичной проверке	9	131	3	186	17	100
Средняя выживаемость клеток после облучения, %		8,4		19,9		12,6
Мера появления дефицитных колоний с учетом меры выживаемости, %		0,60		0,43		0,64

том, что в проведенных опытах не наблюдалось появления медленно растущих колоний после облучения (обогащение опытных чашек проводилось на девятый день культуры у быстрорастущих видов *R. leguminosarum* и *R. meliloti* и на 12-й день у *R. japonicum*).

Как показывают данные табл. 2, за время выдерживания выделенные дефицитные колонии, как правило, большей частью теряют свойства дефицитности уже к концу второго месяца хранения. К концу же

Поведение дефицитных колоний и содержащихся в них клеток за 4 месяца после выделения и проверки

Показатели	<i>R. leguminosarum</i> , шт. 134	<i>R. meliloti</i> , шт. 276	<i>R. japonicum</i> , шт. 631
Всего выделено дефицитных колоний	131	186	100
Число сохраненных колоний	26	27	31
Число колоний, сохранивших дефицитность к концу второго месяца	6	8	13
к концу четвертого месяца	0	1	0
Число клеток, взятых на изучение из восстановленных колоний в конце четвертого месяца	7187	16 899	29 070
Из изученных клеток после двухступенчатой проверки оказались дефицитными			
Всего	13	0	26
%	0,18	—	0,082
Мера мутабельности под влиянием рентгеновских лучей (с учетом меры появления дефицитных колоний — см. табл. 1)	$10,8 \cdot 10^{-6}$	$> 10 \cdot 10^{-6}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$

четвертого месяца почти не остается дефицитных колоний. Однако, как показывает анализ материала «ревертированных» колоний, поведение отдельных клеток не одинаково. Не все клетки колонии, в целом потерявшей дефицитные свойства, должны быть «ревертированными». Для получения новой колонии при пересеве на минимальную среду материала проверяемой колонии достаточно, если ревертировалась только часть клеток. Проведенный анализ позволяет установить число и долю клеток, сохранивших за время выдерживания свойства дефицитности, полученные в результате облучения X-лучами. Эти клетки можно считать уже истинными мутантами. С учетом меры выживаемости и меры появления первоначально дефицитных форм можно вычислять количественные показатели мутабельности клубеньковых бактерий под влиянием X-лучей. У быстрорастущих видов *R. leguminosarum* и *R. meliloti* этот показатель составляет  $\geq 10 \cdot 10^{-6}$  (у *R. meliloti* сохранилась дефицитной одна колония целиком), а у медленно растущего вида *R. japonicum* мера мутабельности почти в 2 раза меньше —  $5,2 \cdot 10^{-6}$ .

### Обсуждение результатов

При обсуждении результатов возникает, прежде всего, вопрос, как относиться к природе первоначально дефицитных отклонений, полученных у клубеньковых бактерий в результате облучения X-лучами. Нам кажется, что подавляющее большинство этих отклонений не является мутантами в классическом смысле этого термина, несмотря на то что они, несомненно, представляют собой реально существующие, отклонившиеся от нормального типа варианты. Они, судя по их поведению при хранении, являются скорее тем, что обозначается термином Dauermodifikationen (Goldschmidt, 1961), наличие которых отмечено и у других организмов. Следовательно, в качестве истинной реверсии нельзя рассматривать и потерю ими свойств дефицитности. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о том, что в результате облучения X-лучами возникают не только истинные мутанты, появление которых связано, по современным представлениям, с изменениями в генетическом веществе, т. е. в структуре ДНК. Появление дефицитности по отношению

к аминокислотам означает, что потеряна способность к синтезу одного или нескольких ферментов, нужных для синтеза данной аминокислоты. При мутациях, как сказано, такая потеря связывается с изменениями в структуре ДНК. Можно, однако, себе представить и другие возможности последствий нарушения нормального процесса синтеза ферментов, например, на уровне повреждения регуляторного механизма освобождения генетической информации, заключенной в молекуле ДНК, а также на уровне повреждения систем, отвечающих за перенос этой информации, или же систем, осуществляющих активацию и транспорт аминокислот, нужных при синтезе данного фермента, и т. д. Такие повреждения, конечно, должны значительно легче подвергаться «ревертированию», чем истинные мутации. Может быть, в таких нарушениях и есть суть так наз. длительных модификаций, которые, как можно предполагать, и возникают легче, чем истинные мутации. Не исключена, конечно, возможность, что при соответствующих условиях часть таких модификаций переходит в мутации. Это, в свою очередь, означает, что мутирование — это процесс, протекающий во времени, но получающий начало от воздействия индуцирующего фактора (Квитко, Инге-Вечтомов, 1964; Хэйс, 1965; Ogar, 1965). При таком истолковании в потере свойств первоначальной дефицитности подавляющим большинством клеток можно видеть не истинное ревертирование, а реактивацию некоторых поврежденных систем, действующих при синтезе определенных ферментов.

Что же касается меры истинной мутабельности клубеньковых бактерий под влиянием X-лучей, то следует отметить, что не существует положительной корреляции между мерой мутабельности и появлением первоначальной дефицитности, т. е. появлением длительных модификаций (это говорит в пользу существования различий в механизмах их возникновения). Скорее видно, что более высокой радиорезистентности отвечает более высокая мера мутабельности при индуцировании X-лучами, что и следовало ожидать, опираясь на наши прежние данные (Тохвер, Локк, 1966).

### Выводы

1. Применение рентгеновских лучей в дозах, обеспечивающих 10—20%-ную выживаемость (40—50 кр), позволяло индуцировать у трех видов клубеньковых бактерий (*R. leguminosarum*, штамм 134, *R. meliloti*, штамм 276 и *R. japonicum*, штамм 631) появление 0,4—0,6% дефицитных по отношению к аминокислотам клеток. Большинство их при этом носит характер так наз. *Dauermodifikationen*.

2. Подавляющее большинство первоначально дефицитных по отношению к аминокислотам вариантов теряет свою дефицитность в течение четырех месяцев после возникновения, т. е. подвергается реактивации.

3. Мера истинной мутабельности у изученных видов клубеньковых бактерий под влиянием примененных доз рентгеновских лучей составляет у медленно растущего вида *R. japonicum*  $5,2 \cdot 10^{-6}$ , а у быстрорастущих видов *R. leguminosarum* и *R. meliloti*  $\geq 10 \cdot 10^{-6}$ .

### ЛИТЕРАТУРА

- Алиханян С. И., 1961. Применение физических и химических факторов в селекции микроорганизмов. Тр. Ин-та микробиол. АН СССР 10 : 46—58.  
Алиханян С. И., Гольдат С. Ю., Тетерятник А. Ф., 1957. Мутагенный эффект комбинированного действия этиленмина и ультрафиолетовых лучей на актиномицеты. Докл. АН СССР 116 (5) : 1015.

- Алиханян С. И., Жданова Н. И., 1960. Сравнительный мутагенный эффект этиленimina, ультрафиолетовых лучей и рентгеновских лучей. Докл. АН СССР **133** (2).
- Алиханян С. И., Ерохина Л. И., Любинская С. И., 1962. Особенности индуцированного мутационного процесса у микроорганизмов. Радиационная генетика : 319—332. М.
- Емцев В. Т., 1962. Селекция, изменчивость и хранение культур микроорганизмов, используемых для производства бактериальных удобрений. Изв. АН СССР, сер. биол. (5) : 732—739.
- Зайцев Г. Н., Ли Цзюнь-ин, 1961. Действие рентгеновских лучей на фосфорный и азотистый обмен *Azotobacter agilis* 22-D. Микробиология **30** (2).
- Заринь Д. Г., 1966а. Мутанты микроорганизмов — продуценты аминокислот и их культивирование. Автореф. дисс. канд. биол. н. Рига.
- Заринь Д. Г., 1966б. Влияние рентгеновских лучей в комбинации с новоэмбицином на экстрацеллюлярное накопление аминокислот у *Mycobacterium cyaneum* 416. Изв. АН ЛатвССР (3) : 67—72.
- Касаткина И. Д., 1961. Влияние некоторых аминокислот на рост мутанта *Aspergillus niger*-Т и образование им кислот. Микробиология **30** (3).
- Квитко К. В., Инге-Вечтомов С. Г., 1964. Особенности мутационного процесса у микроорганизмов. Генетика и селекция микроорганизмов : 12—29. М.
- Киселев П. Н., Кашкин К. П., Болтакс Ю. Б., Витовская Г. А., 1961. Приобретение радиорезистентности микробной клеткой при обитании в среде с повышенным уровнем естественной радиации. Микробиология **30** (5).
- Мясник М. Н., 1964. Обратные мутации у ауксотрофных мутантов *E. coli* В/г. Радиобиология **4** (6) : 836—839.
- Мясник М. Н., 1965. К вопросу о делециях у *E. coli* В/г, индуцированных рентгеновыми лучами, ультрафиолетовым светом и азотистой кислотой. Радиобиология **5** (3) : 378—381.
- Грозоров А. А., 1961. Частота одной из мутаций пигментообразования у *Bacterium prodigiosum* на различных стадиях жизни клетки. Микробиология **30** (6) : 998—1002.
- Тодоров С., Робов С., 1965. Исследование влияния *N*-фенилбензамидина на число обратных мутаций, получающихся при облучении суспензии *E. coli* K<sub>54</sub> рентгеновскими лучами. Докл. Болг. АН **18** (1) : 55—58.
- Тохвер В., Локк Э., 1966. К вопросу о прототрофности и радиорезистентности некоторых видов клубеньковых бактерий. Изв. АН ЭССР, сер. биол. **15** (3) : 347—355.
- Хейс У., 1965. Генетика бактерий и бактериофагов. М.
- Dulaneу E., 1959. Mutagenic effect of  $\beta$ -chloroethylamines and related compounds. Appl. Microbiol. **7** (4).
- Clover S. A., 1956. A comparative study of induced reversions in *Escherichia coli*. In: Genetic Studies with Bacteria. Washington.
- Goldschmidt R., 1961. Theoretische Genetik : 200—204. Berlin, Akademie-Verlag.
- Jordan D. I., 1952. Studies on the legume root nodule bacteria. II. The production and behaviour of colonial mutants produced by X-ray irradiation. Can. J. Bot. **30** (2).
- Künkel H. A., Rodegra H., 1963. Über den Einfluß von Aminoäthylisothiuronium (AET) auf die strahleninduzierte Mutationsrate bei *E. coli*. Naturwissenschaften **50** (18).
- Lederberg J., 1950. Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. Methods in Med. Res. **3** (5).
- Lederberg J., Tatum E., 1946. Detection of biochemical mutants of microorganisms. J. Biol. Chem. **165** (1) : 381—382.
- Manual of Microbiological Methods by the Society of American Bacteriologists, 1957. New York—Toronto—London.
- Orav T., 1965. Kiirgused ja organismid. Tallinn.
- Sarič Z., 1961. Uticaj srednjih i visokih doza gama-zrakova na neke sojeve *Rhizobium* sp. Летоп. науч. радова (5) : 146—154.
- Trams A., Künkel H. A., 1964. Über das Spektrum einiger biochemischen Mutanten bei *Escherichia coli* nach Einwirkung von Röntgenstrahlen und cancerogenen Substanzen. Biophysik, **1** (4).

V. TOHVER, E. LOKK

### AMINOHAPPE-DEFITSIITSUSE TEKKIMISEST MÜGARBAKTERITEL RÖNTGENIKIIRTE TOIMEL

#### Resümee

Perekonnas *Rhizobium* indutseeriti aminohappe-defitsiitsus röntgenikiirguse toimel. Viimast kasutati doosides, mis andsid uuritud tüvedel 10—20%-lise üleelamismäära. Selistes tingimustes ilmus 0,4—0,6% defitsiitseid variante, millest enamik on kestusmodifikatsioonide (Dauermodifikationen) iseloomuga.

Suurem osa defitsiitseid variante kaotas nelja kuu jooksul auksotroofsuse aminohapete suhtes, s. t. toimus reaktivatsioon.

Tõeline mutatsioonimäär kasutatud röntgenikiiritusdooside mõjul oli aeglaselt kasvaval *R. japonicum*'il  $5,2 \cdot 10^{-6}$ , aga kiiresti kasvavail *R. leguminosarum*'il ja *R. melilot*'il  $\geq 10 \cdot 10^{-6}$ .

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse  
24. X 1967

V. TOHVER, E. LOKK

### ON THE APPEARANCE OF AMINO ACID DEFICIENCY IN ROOT NODULE BACTERIA AS AN EFFECT OF X-RAY IRRADIATION

#### Summary

The induction of amino acid deficiency in genus *Rhizobium* was accomplished by the use of X-ray irradiation in doses permitting a survival rate of 10—20 per cent. Under those conditions, 0.4—0.6 per cent of deficient variations appeared, the greater part of which showed characteristics of the so-called "Dauermodifikationen".

Most of the preliminarily deficient variations lost their auxotrophic properties relative to amino acids in consequence of reactivation during four-month seasoning after irradiation.

The rate of genuine mutation in root nodule bacteria under investigation is  $5.2 \cdot 10^{-6}$  in the case of the slow-growing *R. japonicum*, and  $\geq 10 \cdot 10^{-6}$  in the case of rapid-growing *R. leguminosarum* and *R. meliloti*.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology

Received  
Oct. 24, 1967